

Genetic polymorphisms of powdery mildew resistant locus Mla and Mlo in Japanese barley cultivars

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): <i>Hordeum vulgare</i> L., powdery mildew resistance, DNA marker, Breeding 作成者: 長嶺, 敬, 池田, 達哉, 柳澤, 貴司, 高橋, 飛鳥, 五月女, 敏範 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001685

日本のオオムギ品種における うどんこ病抵抗性遺伝子座 *Mla* 及び *Mlo* の多型解析

長嶺 敬・池田達哉¹・柳澤貴司・高橋飛鳥・五月女敏範²

Key words : *Hordeum vulgare* L., powdery mildew resistance, DNA marker, Breeding

目 次

I 緒 言	15	III 結果及び考察	17
II 材料及び方法	16	1 <i>Mla</i> 遺伝子塩基配列の品種・系統間差異	17
1 材 料	16	2 はだか麦品種の <i>Mlo</i> 遺伝子型の分類	21
2 うどんこ病抵抗性の幼苗検定	16	3 総合考察	21
3 <i>Mla</i> 遺伝子第4エクソンの部分塩基配列の解析	16	IV 摘 要	23
4 CAPS 法による <i>Mla</i> 遺伝子型の分類	17	引用文献	23
5 <i>Mlo</i> 遺伝子に関わる om2 マーカーの多型分析	17	Summary	26

I 緒 言

うどんこ病はオオムギの収量や品質を低下させることが知られており^{5, 15, 33}，最近のビール大麦の新品種や新配付系統のほとんどはうどんこ病抵抗性を有し，事実上，新品種の備えるべき必須形質となっている。他方，六条性のはだか麦や皮麦では普及品種に限らず，新配付系統も未だにうどんこ病罹病性の系統が多く，抵抗性品種の早期開発が望まれている。

Hiura and Heta (1955)¹³ は6群のオオムギ判別品種群を選定し，日本国内で採取したうどんこ病菌レースの分類を行い，11タイプのうどんこ病菌レースを見だし，その地理的分布を明らかにするとともに，各レースに対する抵抗性反応を基にオオムギ品種を分類している。その中で，関東以西で主要な

うどんこ病菌レース I，II，IVのすべてに対して完全な抵抗性を示す品種として「三尺穂長」，「雪不知」などの六条性在来品種も存在したが，多くは外国品種であったことを報告している。

なお，日本品種が持つ二条オオムギが持つ抵抗性遺伝子についてはうどんこ病抵抗性の関与遺伝子数⁷⁾ や来歴^{23, 37)}，他形質との連鎖^{21, 36)} などが報告されている。

海外品種を用いた研究でも *Mla* 座，*Mlo* 座，*Mlg* 座，*Mlk* 座などの抵抗性遺伝子座に多数の抵抗性対立遺伝子が存在することが報告されている³⁾。とくに1H染色体短腕上の抵抗性遺伝子座 *Mla* には多くの複対立遺伝子が見出されている^{2, 9, 19, 17, 25, 29)}。いくつかの *Mla* 遺伝子については塩基配列も報告されており，特定のうどんこ病菌レースに特異的な抵抗性を示す遺伝子 (*Mla6*, *13*など) や多くのレースに抵抗性を示す遺伝子 (*Mla1*, *7*) などの抵抗性

(平成21年7月28日受付，平成21年11月13日受理)

大麦・はだか麦研究チーム

¹ パン用小麦研究チーム

² 栃木県農業試験場 ビール麦品質改善指定試験地

機作が研究されている^{4, 11, 30, 31}。

うどんこ病菌レースの変化による「抵抗性品種の罹病化」が欧州では長年にわたって問題となっており、新たな抵抗性遺伝子の利用や抵抗性遺伝子の集積が重要な育種課題となっている^{1, 18}。我が国においても、昭和40年代に入るとうどんこ病菌のレース構成が変化し、レースIXが優先となって、育成当時はうどんこ病抵抗性であった二条オオムギ品種の罹病化が生じている²⁴。その後、二条オオムギ育種においては、Mona, Spartan, Unionなどの海外のうどんこ病抵抗性品種を育種母本として活用し、ヤチホゴールデン、タカホゴールデンなどの抵抗性品種が開発されている^{23, 24}。同様に、六条オオムギについても、うどんこ病菌のレース変化によって、既存品種のうどんこ病被害が拡大した。昭和40年には抵抗性品種キカイハダカが開発されたが²⁸、近年ではうどんこ病に罹病性ながら、多収で高品質な「イチバンボシ」、「マンネンボシ」の普及面積が大きい。しかし、とくにマンネンボシは多肥栽培でのうどんこ病の多発が問題視されており²⁹、収量性向上の基盤として、うどんこ病抵抗性品種の再開発が必要となっている。

各種のうどんこ病抵抗性遺伝子の中で、*Mlo*座の抵抗性遺伝子はすべてのレースに抵抗性を示し¹⁶、多くの菌系特異的抵抗性遺伝子とは抵抗性の機作が異なり^{6, 8, 20, 31, 33, 34}、抵抗性崩壊がおこりにくい有望な遺伝子と考えられている^{12, 18}。すでに*Mlo*遺伝子を利用した抵抗性品種も開発利用されている¹。

本研究では、オオムギのうどんこ病抵抗性育種の効率化のためのDNAマーカー選抜法の開発を目的として、*Mla*遺伝子について主要なオオムギ日本品種・系統の遺伝子型分類を行うとともに、うどんこ病抵抗性との関係を抵抗性品種と罹病性品種との交雑後代を用いた解析により明らかにした。一方、*Mlo*遺伝子座についてはAlexisが持つ*mlo-9*遺伝子をはだか麦育種に利用することを目的として、既報の選抜マーカーであるom2³⁵について検討を行い、新たなDNAマーカーの開発を行った。

II 材料及び方法

1 材 料

*Mla*遺伝子座の遺伝子型分類には国内の主要なオオムギ品種・系統や育種利用されている外国品種など計70品種・系統を用いた。また、*Mla*遺伝子型とうどんこ病抵抗性との関係解析には、ユメサキボシ(抵抗性)×ミカモゴールデン(罹病性)のF3-76系統を用いた。また、*Mlo*遺伝子の解析には、はだか麦日本品種23品種及び抵抗性遺伝子*mlo-9*を持つAlexisを用いた。

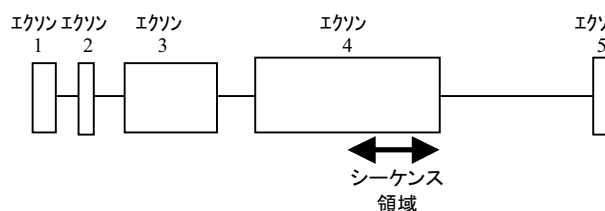
2 うどんこ病抵抗性の幼苗検定

*Mla*遺伝子型が異なるユメサキボシとミカモゴールデンの交雑後代F3-76系統を圃場に春播き(4月29日)して、播種25日目及び40日目にうどんこ病の発病の有無を調査した。なお、発病を促進するため、試験区周縁はうどんこ病に極弱のミカモゴールデンをスプレッターとして密植した。なお、うどんこ病菌の人工散布は行わなかった。

3 *Mla*遺伝子第4エクソンの部分塩基配列の解析

公開されている*Mla*遺伝子の塩基配列情報(*Mla1*: Genebank AY009939, *Mla6*: AJ302293, *Mla7*: AY266444.1, *Mla10*: AY26445.1, *Mla13*: AF523683.1)をもとに変異が多く認められた第4エクソン後半部分の701bpの塩基配列をPCRダイレクトシーケンス法によって解析した(第1図)。

PCRの反応液組成は滅菌イオン交換水 24 μ l, PCR緩衝液 3.2 μ l, dNTPs(デオキシリボヌクレオチド3リン酸混合液各 2mM) 3 μ l, 100pmol/ μ lにしたフォワードプライマー(*Mla98F*: 5'-GGAGGTGTTGGATCTTGGAA), リバースプライ



第1図 *Mla*遺伝子の構造

マー (Mla98R: 5'-CAAGTCGAAGCCACGGTTAC) 各 0.2 μ l, DNA ポリメラーゼ 0.5unit (HotStar Plus, QIAGEN 社), Ikeda ら¹³⁾ の方法で種子胚から調製した鋳型 DNA 30ng (1 μ l) とした. 反応は PCR Thermal Cycler Dice (Takara 社) を用い, 94°C 4 分 - (94°C 30秒 - 55°C 30秒 - 94°C 1分) \times 35 回 - 72°C 5 分とした. 増幅産物の塩基配列は PCR 産物をスピнкаラム (Nucleospin Exttract II, Machery-Nagel 社) で精製したものを鋳型に用い, 依頼分析 (ファスマック社) により, 解析した.

4 CAPS 法による *Mla* 遺伝子型の分類

ユメサキボシ \times ミカモゴールドンの F3 系統について, CAPS 法による遺伝子型判別を行った. 上述の Mla98 プライマーを用いて得られた PCR 反応液 15 μ l に, 制限酵素 *Bse*RI 1 unit (New England BioLabs社) と添付の反応緩衝液 2 μ l, イオン交換水 30 μ l を添加し, 37°C 8 時間の反応を行った. 1.8%アガロースゲル (タイプ I-A, Sigma-Aldrich 社) で100V, 20~30分間電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色した後, 紫外線照射下で写真撮影した.

5 *Mlo* 遺伝子に関わる om2 マーカーの多型分析

Mlo 遺伝子の5'上流域を増幅する DNA マーカー om2³³⁾ を用いて PCR を行った. PCR 反応液組成は前述の通りである. ただし, プライマーはフォワード (om2F: 5'-TAGCAATCACGGTCACGTCAAC), リバーズ (om2R: 5'-CCGCAAGGCTGCTATGAAAAGGG) を用い, PCR 反応プログラムは94°C 4 分 - (94°C 30秒 - 65°C 30秒 - 94°C 1分) \times 35回 - 72°C 5 分とした. いくつかの品種については増幅産物についてダイレクタシーケンスを行った.

また, 一部品種については, om2 増幅領域内での in/del 変異を検出する om2Indel プライマー (フォワード: 5'-GGTTCCTCAAATCAAATCATTTG, リバーズ: 5'-GGCGGAAGCTTTTGTCTCA) を用いた PCR {反応条件: 94°C 4 分 - (94°C 30秒 - 55°C 30秒 - 94°C 7 分) \times 35回 - 72°C 5 分} を行い, 3.5% NuSieve GTG アガロースゲルで100V, 60分間の電気泳動に供した.

III 結果及び考察

1 *Mla* 遺伝子塩基配列の品種・系統間差異

Mla98 プライマーによって増幅した *Mla* 遺伝子第 4 エクソン後半領域 (Mla98 領域) には日本品種・系統間で多様な塩基配列の変異が見られ (第 2 図), 供試した70品種・系統は11の遺伝子型に分類された (第 1 表).

日本のビール大麦37品種・系統及び食用二条皮麦 2 品種・系統は「サチホゴールデン型」, 「はるな二条型」, 「しゅんれい型」の 3 群に分けられた.

この分類はうどんこ病抵抗性の有無ともほぼ一致し, サチホゴールデン型の品種・系統はいずれもうどんこ病抵抗性で, はるな二条型の品種・系統ではミハルゴールド, Alexis など一部の品種以外はすべて罹病性であった. このうち, Alexis は後述のように *Mla* とは異なる遺伝子座のうどんこ病抵抗性遺伝子 *mlo-9* を持つ品種である.

一方, はだか麦にはビール大麦でみられた「サチホゴールデン型」, 「はるな二条型」に加えて, 「マンネンボシ型」, 「トヨノカゼ型」が見出された. 供試した6つの二条はだか麦品種・系統はいずれもうどんこ病抵抗性を有するが, すべてサチホゴールデン型であった. 一方, 数少ないうどんこ病抵抗性六条はだか麦である「四国裸116号」, 「キカイハダカ」もサチホゴールデン型であった. ただし, 六条はだか麦にはイチバンボシのようにサチホゴールデン型であっても罹病性のもも 8 品種・系統あり, 二条種とは状況が異なった.

六条皮麦はビール大麦やはだか麦とは遺伝子型が全く異なり, 品種ごとに「カシマムギ型」, 「はがねむぎ型」, 「ファイバースノウ型」, 「シルキースノウ型」, 「魁型」に分かれ, 六条皮麦品種には多くの *Mla* 遺伝子型が存在することが示唆された.

今回見出された日本品種の *Mla* 遺伝子の塩基配列はいずれも既報の *Mla1*, *Mla6*, *Mla7*, *Mla10*, *Mla13* 遺伝子とは異なっていた. 第 3 図は Mla98 領域の塩基配列をもとに, 日本品種の *Mla* 遺伝子型及び既報の *Mla* 遺伝子の差異を平均距離法によって示したものである. 既報の *Mla* 遺伝子群と比較的に距離が近いのはサチホゴールデン型, トヨノ

Mla6 (AJ302293) 4639	TGCCGTCCACAGTTTGAATTTGAGAAGATTAATCTACCTAAATTTAGTTGGCTGTCAGGTGGTTCCTCCAGTTGGTTTG
サチコールデン	. A T A T T . G . .
はるな二条 - T TC . G G
しゅんれい - T TC G
マンボシ - T G
西海皮 32 号 - C . T TC . G G
かしまぎ	. A - T A . - C G
シルキスノウ	. A T - C . T T C T T G
ファイバースノウ T - T C TC . G G
はがねむぎ T - C . T T C T T G
魁 - T G
トヨカセ	. A - T A T T . G . .
Mla6 (AJ302293) 4719	TTGCAAAATCTAACAGCCATAGAAGTGTGAGGGGTATCTTGGTCTCTCTGAACATTATTGCACAAGAGCTTGGCAAGTT
サチコールデン G
はるな二条 G . T AC CC
しゅんれい G . T T . C CC
マンボシ G . T G CA
西海皮 32 号 G . T AC CC
かしまぎ G . T G G
シルキスノウ G . T G . G A CC
ファイバースノウ G . T AC CC
はがねむぎ G . T G . G A CC
魁 G . T G CA
トヨカセ G
Mla6 (AJ302293) 4799	GAAAAGTATGAGGGAGCTTGAGATTCGCTTCAATGATGGTAGTTTGGATTTGTATGAAGGTTTCGTGAAGTCTCTTGCA
サチコールデン G A . G A T . C . G
はるな二条 GC T . T G . A T G
しゅんれい GC T . T A T G
マンボシ G . GC C . T GG C T G
西海皮 32 号 GC T . T G . A T G
かしまぎ C . T A A . T . C . G
シルキスノウ G . GC TA AA T G
ファイバースノウ GC T . T G . A T G
はがねむぎ G . GC TA AA T G
魁 G . GC C . T GG C T G
トヨカセ G A . G A T . C . G
Mla6 (AJ302293) 4879	ACTTACATCACATAGAAAGCCTAATCATTGGTTGCAATCTAGAGAAACATCATCTTTGAAGTGATGGATCTCTGGGA
サチコールデン	. GC C T G . A C . G C . A T
はるな二条	. . C C . A GT . A C C . T
しゅんれい	. . C C . A T . A C C
マンボシ	. . C T TGT . A . GA CGA C
西海皮 32 号	. . C C A GT . A C C . T
かしまぎ	. . C CA T . AT . A . A C . CGA . A C T
シルキスノウ	. . C C T . CGT . AG C C . T G
ファイバースノウ	. . C CA A T . A CT C . T
はがねむぎ	. . C C T . CGT . AG C C . T G
魁	. . C T TGT . A . GA CGA C
トヨカセ	. GC C T G . A C . G C . A T
Mla6 (AJ302293) 4959	GAACGGTGGGTGCCTCCTGTACATCTCCGTGAATTTGAGTCGTCATGCCTAGCCAACTCTCTGCACCTGCGAGGGTGGAT
サチコールデン A . . A . T A A . T C
はるな二条 T T T . G T . C G
しゅんれい T A A . T C
マンボシ C T T . A
西海皮 32 号 T T T . G T . C G
かしまぎ	. A A . A . T A . T . A . T C
シルキスノウ C . C CAG T . T C
ファイバースノウ T T T . G T . C G
はがねむぎ C . C CAG T . T C
魁 C T T . A
トヨカセ A . . A . T A A . T C

第2図 Mla 遺伝子第4エクソン Mla98 領域における塩基配列多型 (第2図 1 / 2 頁目)

Mla6 (AJ302293) 5039 AAAGAGAGACCCCTCCATCTCTCAAACCTCTCGACTTAGTCCT---GCCAGTGAAGGAAGTGAACAGGATGACGTGG
 サホゴ[®]ルデン . C . . . G G G . . . A . . . CACAT C G
 はるな二条 G GA . G . . . A . . . CGG . G G G
 しゅんれい . C G A . G . . . AC . CTG G G
 マンボ[®]シ G G T . . . CTT . T C G A
 西海皮 32 号 G GA . G . . . A . . . CGG . G G G
 カシムキ[®] . . . A G A . G . . . T . . . CTG . T C C
 シルキ[®]スノウ A G G . . . A . . . CTC . T C G
 ファイバ[®]スノウ G GA . G . . . A . . . CGG . G G T . . . G
 はがねむぎ A G G . . . A . . . CTC . T C G
 魁 G G T . . . CTT . T C G A
 トヨカ[®] . C . . . G G G . . . A . . . CACAT C G

Mla6 (AJ302293) 5119 AAATCATTGGGGGTTGCTGGCCCTTCGCCGTCTCTG---GATAAAGAGCAACCAACCAACACAACGGCTGCTAGTCATC
 サホゴ[®]ルデン AC . T . T . . . A . . TC . . . C---TC C . T
 はるな二条 -C . T . T . . . TT . . . GATA C G
 しゅんれい A . . TCTC . . . A . TTGT . . . ---TC . . . T C
 マンボ[®]シ T . TG T . . . TAATA . . . C . . . C . G G
 西海皮 32 号 -C . T . T . . . TT . . . GATA C G
 カシムキ[®] T . T C AATAG T G . G . T
 シルキ[®]スノウ T . TG T . . . TTATA . . . C . . . C . G G
 ファイバ[®]スノウ -C . T . T . . . TT . . . GATA C G
 はがねむぎ T . TG T . . . TTATA . . . C . . . C . G G
 魁 T . TG T . . . TAATA . . . C . . . C . G G
 トヨカ[®] AC . T . T . . . A . . TC . . . C---TC C . T

Mla6 (AJ302293) 5199 CCTGTAGATGGGTTCCACTGTATTGTTGACTTTCAGTTGGACTGTGGATCTGCCACGCAGATATTGTTTGAGCCTGGAGC
 サホゴ[®]ルデン C G G T T A
 はるな二条 G . C . . . A G G T . T . . . T G
 しゅんれい CGC G TG A T C
 マンボ[®]シ G . C . . . A G CG T . . . A . T C A . A . . .
 西海皮 32 号 G . C . . . A G G T . T . . . T G
 カシムキ[®] C G . C . . . G GT T A A AA
 シルキ[®]スノウ G . C G CG . C GA T G A . A . . .
 ファイバ[®]スノウ A . . C . . AT G G T . T . . . T G T
 はがねむぎ G . C G CG GA T A A . A . . .
 魁 G . C . . . A G CG T . . . A . T C A . A . . .
 トヨカ[®] C G G G T T A

Mla6 (AJ302293) 5279 TTTGCCGAGGGCAGAATCAGTTGTGATCAGTCTGGCGGTGCGGG-TGGCGAAAGAGG-ATGGTAACCGTG 5340
 サホゴ[®]ルデン C - -
 はるな二条 G C - T
 しゅんれい - . CGG C . T . . -C . . TC T . T . C
 マンボ[®]シ C G T - G
 西海皮 32 号 G C -
 カシムキ[®] G G G G . T . . - . . G . A A ATTG---
 シルキ[®]スノウ A G . T . AG . . . TG . T . . . C . . T . . . - . . A
 ファイバ[®]スノウ G C C . CTG . TTTT-GACTA . . . A C . CTTGA
 はがねむぎ A G . T . AG . . . TG . T . . . C . . T . . . - . . A
 魁 C G G T - G C . . TAAA
 トヨカ[®] C - - A . CG . . . -

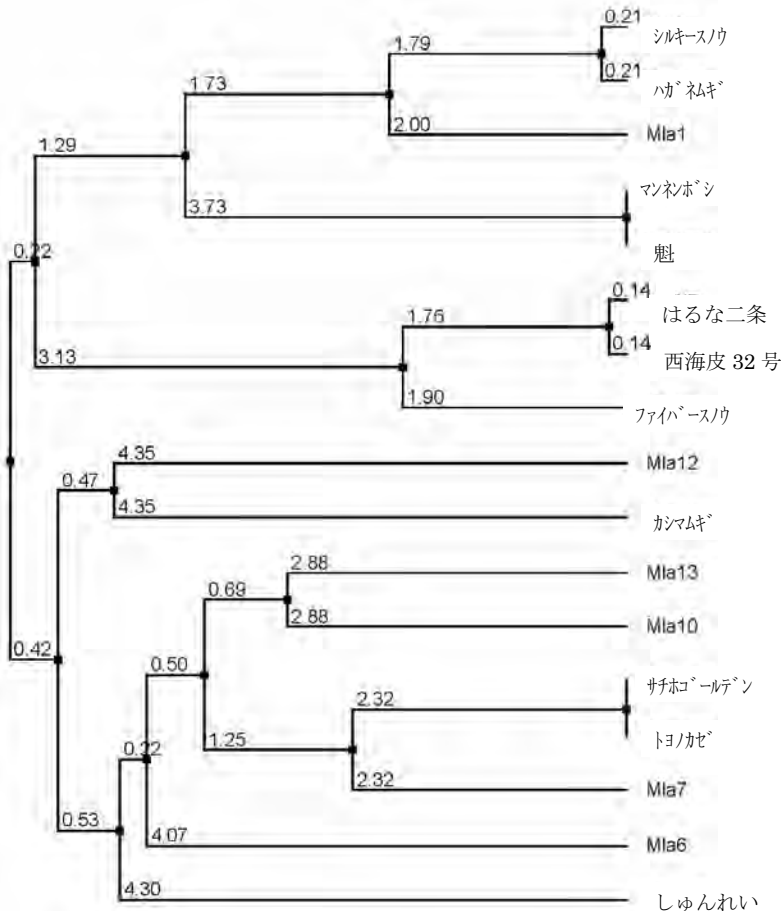
第 2 図 *Mla* 遺伝子第 4 エクソン Mla98 領域における塩基配列多型 (第 2 図 2 / 2 頁目)

Mla6 の塩基配列は Genebank AJ302293 (C.I. 16151) による (イタリック番号は同配列における塩基番号), - は欠失, ■部分は制限酵素 *BseRI* の認識配列 (CTCCTC)

第1表 Mla 遺伝子第4エクソン Mla98 領域の塩基配列多型に基づくオオムギ日本品種・系統の分類

遺伝子型	麦種	品種・系統名
サチホーゴールデン型	ビール麦(二条皮麦)	<i>サチホーゴールデン</i> <i>スカイゴールデン</i> <i>タホーゴールデン</i> <i>ヤシゴールデン</i> <i>ヤチホーゴールデン</i> 関東二条25号 関東二条29号 関東二条40号 新田二条20号 新田二条21号 九州二条18号 大系HO4 Mona
	二条食用皮麦	<i>ニシホシ</i> 白妙二条
	二条はだか麦	<i>ユキサホシ</i> 四国標93号 四国標97号 四国標109号 四国標糯119号 四国標115号
	六条はだか麦	<i>仔バンホシ</i> キカイハダカ センホシハダカ 四国標28号 四国標116号 四国標117号 四国標118号 四系9305 四系8913
	はるな二条型	ビール麦(二条皮麦) はるな二条 <i>アスマーゴールデン</i> あまぎ二条 きぬ二条12号 <i>ゴールデンメロン</i> こまき二条 さきたま二条 さつきばれ シハリー <i>つゆしらず</i> とね二条 栃木ゴールデンメロン なす二条 ニシゴールト <i>ニューゴールデン</i> にらさき二条 ミモゴールデン シバルゴールト ミホゴールデン <i>ビール麦中間母本農1号</i> 栃系133 栃系216 Alexis ant28-2131
しゅんれい型	ビール麦(二条皮麦) しゅんれい	
マンネホシ型	六条はだか麦 マンネホシ 四国標67号 四国標110号 四国標糯113号 四系9123	
トノカセ型	六条はだか麦 トノカセ ダイシホチ	
西海皮32号型	二条食用皮麦 西海皮32号 西海皮33号	
カシマムギ型	六条皮麦 カシマムギ	
はがねむぎ型	六条皮麦 はがねむぎ	
ファイバースノウ型	六条皮麦 ファイバースノウ	
シルキースノウ型	六条皮麦 シルキースノウ	
魁型	六条皮麦 魁	

斜字はうどんこ病抵抗性品種・系統



第3図 Mla98 領域の塩基配列に基づく Mla 遺伝子の距離

図中の数値は100塩基あたりの変異塩基数。系統樹の算出は平均距離法によった。既報の Mla 遺伝子塩基配列はGenebankによる (Mla1: AY009939 (品種 Algerian), Mla6: AJ302293 (C.I. 16151), Mla7: AY266444.1 (C.I. 16147), Mla10: AY26445.1 (C.I. 16149), Mla13: AF523683.1 (C.I. 16155))

カゼ型, しゅんれい型であった。サチホゴールドン型, しゅんれい型に属する品種の多くはビール大麦であり, 系譜上には外国品種も多く, 他の遺伝子型とは異なっていることは予想できることであるが, 系譜的に全く異なるトヨノカゼがサチホゴールドンと類似性が高いことは興味深い。また, 他の六条性品種ではカシマムギ型が他の遺伝子型とは距離が離れており, ファイバースノウ型, はがねむぎ型が, *Mla1* に距離が近いことが明らかとなった。

うどんこ病抵抗性と *Mla* 遺伝子型との関係の解析に用いたユメサキボシ (うどんこ病抵抗性, *Mla* 遺伝子型: サチホゴールドン型) × ミカモゴールドン (罹病性, *Mla* 遺伝子型: はるな二条型) の交雑後代 F3 76系統は幼苗検定において抵抗性52系統系統: 罹病性24系統に分離した。

この分離比は抵抗性が1遺伝子優性支配される形質と仮定した場合の期待値に適合することが χ^2 検定によって確認された。

第2図に示したとおり, サチホゴールドン型 *Mla* 遺伝子を持つ場合, *Mla98* プライマーによる PCR 増幅産物は制限酵素 *Bse*RI によって切断され, 電気泳動ではおよそ 540bp と 190bp の2本のバンドが見られる。はるな二条型 *Mla* 遺伝子は *Bse*RI によって切断されず, 約 730bp のバンドが見られる。このような CAPS 分析の結果, F3 抵抗性52系統はすべてサチホゴールドン型 *Mla* 遺伝子をもち, 罹病性24系統はいずれもはるな二条型ホモ系統であった。すなわち, ユメサキボシが持つサチホゴールドン型の *Mla* 遺伝子はうどんこ病抵抗性をもたらす優性遺伝子であることが確認された。

2 はだか麦品種の *Mlo* 遺伝子型の分類

主要なはだか麦21品種について, *Mlo* 遺伝子⁵上

流域 (-2.3kb) の In/Del 変異を検出する om2 マーカー(35)を用いて分類した結果, 抵抗性遺伝子 *mlo-9* を持つ Alexis と同じ In 型 (増幅産物長: 約 1000bp) が18品種, del 型 (増幅産物長: 約 750bp) は3品種であった (第2表)。供試したはだか麦品種は, いずれもうどんこ病に罹病性であり, *Mlo* 座の抵抗性遺伝子は持たない。すなわち, om2 マーカーに関するはだか麦日本品種の多型は *Mlo* 座の抵抗性遺伝子に連鎖するものではなく, *Mlo* 遺伝子領域にサイズの近い挿入変異があったためと考えられる。om2 マーカーでは, ビール大麦でも同様に *Mlo* 座の抵抗性遺伝子を持たずに In 型に分類される品種 (あまぎ二条, ミカモゴールドンなど) が報告されている²⁷⁾。

om2 マーカーによる増幅産物の塩基配列を比較したところ, In 型のはだか麦品種 (イチバンボシ) と Alexis では21箇所の一塩基置換 (SNPs) と3箇所の欠損変異が見られた (第4図)。イチバンボシでは10塩基と8塩基の欠損が近接して存在したことから, この欠損を含む領域を増幅する om2indel プライマーを設計して品種分類を行なったところ, In 型のはだか麦品種 (増幅産物長 269bp) は Alexis (同287bp) とは3.5%アガロースゲル電気泳動によって区別することができた。

これらの結果から, はだか麦育種において Alexis が持つ *mlo-9* の導入を目的とした DNA マーカー選抜を行う場合, マンネンボシなどの del 型品種を母本とする組み合わせでは om2 マーカーを用い, イチバンボシなどの In 型品種を母本とする場合には om2indel マーカーの利用が可能であると考えられた。

第2表 om2 マーカー及び om2indel マーカーによる日本のはだか麦品種の分類

om2 マーカー型	om2 Indel マーカー型	品種名			
In型(1000bp)	287bp型	Alexis (<i>mlo-9</i>)			
	269bp型	イチバンボシ	ダイシモチ	トヨノカゼ	アヤマハダカ
		クロシオハダカ	サヌキハダカ	サンシュウ	シラヒメハダカ
		シロシノリキ	センボンハダカ	ナンエイハダカ	ナンブウハダカ
		ハンリハダカ	ハヤウレハダカ	ハヤシロハダカ	ハヤテハダカ
		ハンダイハダカ	ベニハダカ		
del型(750bp)	—	マンネンボシ	シラヌイハダカ	タマモハダカ	

Alexis イパ ^ン ホ ^シ	7	CCATGCTACTGGCCCTCCGATATAATACAGTATAACTAACTCGATGGTACGTAGCACCAGGCAACAATAGCCAGCCATC .A.....-.....
Alexis イパ ^ン ホ ^シ	81	GTGCACGCACGTCCCGGCCGGTGAACGTTTCGACCCTCTAGTACGTACGTGGCTGCCTAGCTAGGTCCGACCCGCTCGAA
Alexis イパ ^ン ホ ^シ	161	GCTGCTGCCAGGCGCGGGGACATGATCCGGCACCACCCGACGCGGGCTCGCCGGCGGGAACAGTCAGCAGCGTGAACCG...
Alexis イパ ^ン ホ ^シ	241	TCTCGCCGCGACCAACGTGTGGCTAGCTACTACGTACGTGAACCGGCCGTAACCCGTTTCGTTTACTTTACGTCGA
Alexis イパ ^ン ホ ^シ	321	CGCCAATACATGCATGTTTCGCGTCAATTTCTCTAATAACTTTTCGCGGGAACAAGTCTGCGGTGGCGCGGCATCAACTCAC.....
Alexis イパ ^ン ホ ^シ	401	ACACGAACAAAGTGATCCGACCGACGTACACAACCTCGACCCGGCCCTCGATTGGGAAACGGGCTATGCCGTTTTCTTGG.A.....
Alexis イパ ^ン ホ ^シ	481	CCGGTCCCAACGAGAACTCTCCGTCCTTTCTTTGAAGTAAAGCAGGAATTTATTTCATTAACAATAACTGTTCCATCGT
Alexis イパ ^ン ホ ^シ	561	TTATGAAGACCATTATAATATCATTAAAGAGGTTCTCAAATCAAATCATTGACTAAAGAAAACTAGCTAGTCTAGCAAG-----
Alexis イパ ^ン ホ ^シ	641	CTCATGCACAACCTTTATTTGCTTTCTATTACAGTGTTCGAATCTAGTAGTAATGAAGTCACATTCATAATGAAAACAATCA..G.....A.....G.....G..
Alexis イパ ^ン ホ ^シ	721	ATCTAAGATTGCCATCGTCGCTCCCGCCGATTGTCCTCCGTCCTCCATGGTTTCAAATTCTCAATCACCTTCATGATATT ..T.....GC.....T.....-----
Alexis イパ ^ン ホ ^シ	801	TGAGTTAATAATAAGGTGATTACATCCTGTCTTTGTGACAAAATTATGCCAAATTTTAGGACAAAAGCTTCGGCCGTCAA...
Alexis イパ ^ン ホ ^シ	881	GAACGTCCGTGTAACAGTCAATCTTTTCATTTCTCCAGCAATAAACCTGCCTTTATCATCTCTTAGAACTGCTCTATTT.....C.....TG.T.T.....
Alexis イパ ^ン ホ ^シ	961	AAACCACTAAATAAGTCGTGGTCAAAGAAGCGTCAGCATTACGTTTACAAAAA 1018T.....

第4図 *Mla* 遺伝子 om2 領域における塩基配列多型

イタリック番号は塩基番号、-は欠失、■は om2indel プライマーの対合部位

3 総合考察

今回の実験では、うどんこ病抵抗性ビール大麦品種・系統のほとんどが「サチホゴールデン型」*Mla* 遺伝子型を持ち、罹病性品種は「はるな二条型」であったことや、ユメサキボシとミカモゴールデンの雑種後代の抵抗性系統はすべての系統が「サチホゴールデン型」*Mla* 遺伝子を持っていることが明らかとなった。また、山口ら³⁶⁾ はビール大麦育成系統 関東二条25号が持つうどんこ病抵抗性はCホルデン遺伝子と2.9cMで連鎖することを報告しているが、Barley Consensus Map¹⁰⁾ によればCホルデン遺伝子座 (*Hor1*) は1H染色体上の *Mla* 座とは3cM程度の距離にマッピングされており、関東二条25号

(*Mla* 遺伝子型：サチホゴールデン型) が持つうどんこ病抵抗性は *Mla* 座の遺伝子による可能性が示唆される。これらの実験結果、関連情報から、我が国のビール大麦品種・系統が持つうどんこ病抵抗性は多くの場合、*Mla* 座の「サチホゴールデン型」遺伝子によるものであると推察された。サチホゴールデンの *Mla* 遺伝子は系譜的には Mona に由来し、栃系167、関東二条25号などを通じて導入されたと考えられる。Mona はうどんこ病抵抗性遺伝子として *Mla9* 及びそれと密に連鎖する *Mlk* を持つといわれており、サチホゴールデンの *Mla* 遺伝子は *Mla9* であると思われる。

Mla 遺伝子型がサチホゴールデン型であるユメサ

キボシを用いた今回の分離解析では *Mla* 遺伝子に連鎖する抵抗性遺伝子を検出することはできなかったが、Mona に系譜がより近い日本品種を用いてさらに検討する必要がある。

また、今回の実験では「非サチホゴールド」型 *Mla* 遺伝子型を抵抗性品種としてミハルゴールド、とね二条、さきたま二条が見出された。

ミハルゴールドが持つうどんこ病抵抗性は Spartan に由来するといわれ³⁷⁾、とね二条、さきたま二条については *Mlg* 遺伝子を持つ Union に由来する可能性がある。日本の二条オオムギのうどんこ病抵抗性品種の多くが Mona, Spartan の後代であり、今後、特に Spartan 由来の抵抗性遺伝子に関する解析、DNA マーカー化が重要である。

一方、六条はだか麦では「サチホゴールド」型 *Mla* 遺伝子型を持っていても、イチバンボシのように罹病性の品種・系統が多く存在した。今回、解析対象とした *Mla* 遺伝子第4エクソン領域は多型が多く、抵抗性との関係もこのように一致しないケースもあることから、抵抗性発現にはあまり関係しない領域であると推察される。今後、これらの品種の *Mla* 遺伝子全塩基配列の解析などによって、抵抗性との関係がより密接な領域を同定することが育種的には重要である。また、*Mla* 遺伝子による抵抗性発現に必要な場合があるとされている *RAR1* (Required for *Mla12* resistance) 遺伝子³²⁾、*SGT1* (Suppressor of G-two allele of *skp1*) 遺伝子³⁰⁾、などの遺伝子の変異についても検討する必要がある。

将来的なうどんこ病菌レースの変化による抵抗性崩壊の可能性を考慮すれば、ビール大麦を含めて二条オオムギでは抵抗性品種の多くが *Mla* 座の「サチホゴールド型」遺伝子に集中的に依存していると思われる状況は好ましくない。抵抗性遺伝子源の多様化をすすめるためにも、ミハルゴールドやしゅんれいなどの抵抗性遺伝子の利用が望まれる。

さらに、うどんこ病抵抗性の新たな遺伝子源として育種利用が期待される *mlo-9* については、既報の選抜マーカー om2 を利用できない場合があることがビール大麦で報告されていたが²⁷⁾、はだか麦でも交配組み合わせによっては適用不可であることが明らかになった。ただし、今回新たに開発した om2indel マーカーを用いれば、*mlo-9* の DNA マー

カー選抜が可能であり、*Mlo* 座の抵抗性遺伝子の導入が容易になった。今後は *Mla* 座と *Mlo* 座の抵抗性遺伝子の集積系統の開発も期待される。なお、*Mlo* 座の抵抗性遺伝子の導入系統では葉にネクロシスが生じ、収量への影響が懸念される報告²²⁾ もあるが、ビール大麦育種指定試験地などの育成系統ではこれらの問題は回避されており、系統選抜にあたっては留意すれば、ネクロシスの問題は解決可能と考えられる。

IV 摘 要

オオムギの重要病害であるうどんこ病に対する抵抗性遺伝子座 *Mla*, *mlo* について日本のオオムギ品種の変異およびうどんこ病抵抗性との関係を調べた。*Mla* 遺伝子の第4エクソン内の701塩基の塩基配列によって、主要品種など71品種・系統を分類した結果、11の遺伝子型に分類された。二条性のビール大麦やはだか麦のほとんどの抵抗性品種・系統と六条はだか麦の抵抗性品種が「サチホゴールド型」に分類された。ただし、ビール大麦ではそれ以外の遺伝子型に属す抵抗性品種も少数ながら存在し、六条はだか麦では「サチホゴールド型」でも罹病性品種が見られた。また、ユメサキボシ×ミカモゴールドのF3 76系統を用いて、*Mla* 遺伝子型とうどんこ病抵抗性との関係を調べた結果、抵抗性系統はすべてユメサキボシに由来する「サチホゴールド型」*Mla* 遺伝子を持つことが分かった。一方、*Mlo* 遺伝子については Alexis が持つ抵抗性遺伝子 *mlo-9* の DNA マーカーを用いて導入するための条件を明らかにした。*mlo-9* 遺伝子の選抜に使われている既報の om2 マーカーが適用できないはだか麦品種・系統を明らかにした。さらに、これらの品種・系統の om2 領域の塩基配列変異を明らかにし、選抜に利用できる新たな DNA マーカーを開発した。

引用文献

- 1) Andersen, L. 1991. *Mlo* aggressiveness in European barley powdery mildew. Integrated Control of Cereal Mildews. RISO NATIONAL

- LABORATORY, Roskilde, Denmark. 187–196
- 2) Backes, G., A. Graner, B. Foroughi-Wehr, G. Fischbeck, G. Wenzel and A. Jahoor 1995. Localization of quantitative trait loci (QTL) for agronomic important characters by the use of a RFLP maps in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 90: 294–302
 - 3) Backes, G., G. Schwarz, G. Wenzel, and A. Jahoor 1996. Comparison between QTL analysis of powdery mildew resistance in barley based on detached primary leaves and on field data. *Plant Breed.* 115: 419–421.
 - 4) Caldo R.A., D. Nettleton and R.P. Wise 2004. Interaction-dependent gene expression in Mla-specified response to barley powdery mildew. *Plant Cell.* 16: 2514–28.
 - 5) Carver, T.L. W. and E. Griffiths 1981 Grain yield of spring barley in relation to effects of powdery mildew infection on green leaf area. *Barley Genet.* 4: 472–478.
 - 6) Favret, E.A. 1970. Different categories of mutations for disease reactions in the host organism. *Mutat. Breed. Disease Resist. FAO/IAEA.* 107–116.
 - 7) 古庄雅彦・馬場孝秀・山口 修・吉田智彦・濱地勇次・吉川 亮・水田一枝・吉野 稔 1999. ビール大麦新品種「ほうしゅん」の育成. 福岡農総試研報 18 : 26–31.
 - 8) Freialdenhoven, A., C. Peterhansel, J. Kurth, F. Kreuzaler, and P. Schulze-Lefert 1996. Identification of Genes Required for the Function of Non-Race-Specific mlo Resistance to Powdery Mildew in Barley. *Plant Cell* 8: 5–14.
 - 9) Giese, H., J.H. Jorgensen, H.P. Jensen and J. Jensen 1981. Linkage relationships of ten powdery mildew resistance genes on barley chromosome 5. *Hereditas* 95: 43–50.
 - 10) GrainGenes 2.0: A Database for Triticeae and Avena [Barley Consensus Map] <http://wheat.pw.usda.gov/cmap/> (2009/07/20アクセス)
 - 11) Halterman, D.A. and R. P. Wise 2004. A single-amino acid substitution in the sixth leucine-rich repeat of barley MLA6 and MLA13 alleviates dependence on RAR1 for disease resistance signaling. *Plant J.* 38: 215–226.
 - 12) 部田英雄・武田和義 1995. オオムギうどんこ病抵抗性遺伝子 ml-o の各種菌株に対する反応. 岡大資生研報 3 : 11–16.
 - 13) Hiura, U. and H. Heta. 1955. Studies on the disease-resistance in barley. III Further studies on the physiologic races of *Erysiphe graminis hordei* in Japan. *Bericht Ohara Inst.* 10: 135–154.
 - 14) Ikeda, T.M., T. Nagamine, H. Fukuoka and H. Yano 2002. Characterization of new low molecular-weight glutenin subunit genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 104: 680–687.
 - 15) Jerkin, J.F. 1984. Effects of powdery mildew on grain filling in spring barley in contrasting environments. *Ann. Appl. Biol.* 105: 195–212.
 - 16) Jorgensen, J.H. 1970. Comparison of induced mutant genes with spontaneous genes in barley conditioning resistance to powdery mildew. *Mutat. Breed. Disease Resist., FAO/IAEA.* 117–124.
 - 17) ——— and J.G. Moseman 1971. Two new genes at the Ml-a locus in barley for resistance to *Erysiphe graminis f.sp.hordei*. *Z.Pflanzenzuchtg.* 66: 67–75.
 - 18) ——— 1984. Durability of the ml-o powdery mildew resistance genes in barley. *Vortr. Pflanzenzuchtg.* 6: 22–31.
 - 19) ——— 1991a. Powdery mildew resistance genes Mla22 and Mla23 in barley. *Barley Genet.* 6: 596–598
 - 20) ——— 1991b. Mechanism of Mlo resistance to barley powdery mildew. *Sveriges utsades. Tid.* 101: 80–84.
 - 21) 加島典子・石川直幸・大塚 勝・小玉雅晴・谷口義則・河田尚之・五月女敏範 1999. ビール大麦の原麦ジアスターゼカと他形質との関係. 栃木農総試研報 48 : 47–52.

- 22) Kjaer, B., H.P. Jensen, J. Jensen and J.H. Jorgensen 1990. Associations between three ml-o powdery mildew resistance genes and agronomic traits in barley. *Euphytica* 46: 185–193.
- 23) 河田尚之・石川直幸・福田 瑛・早乙女和彦・加藤常夫・五月女敏範・大塚 勝・徳江紀子・宮川三郎・神永 明・佐々木昭博・桐生光広・伊藤 浩・吉田 久・田谷省三・天谷正行・小林俊一・瀬古秀文・藤井敏男・小松田美津留・氏原和人・関口忠男・倉井耕一 1995. 二条大麦新品種「タカホゴールド」の育成. 栃木農試研報43: 107–126.
- 24) 増田澄夫 1993. うどんこ病抵抗性品種の育成. 増田澄夫・川口数美・長谷川康一・東 修編, わが国におけるビール麦育種史. ビール酒造組合, 60–61.
- 25) Moseman, J.G. and J.H. Jorgensen 1971. Identification of genes at the Ml-a locus in barley for resistance to *Erysiphe graminis f.sp.hordei*. *Crop Sci.* 11: 547–550.
- 26) 村上優浩・宮下武則・大山興央・山田千津子・森 芳史・西村 恵 2003. 裸麦「マンテンボシ」の収量と品質に及ぼす施肥法と施肥量の影響. 香川農試研報 56: 19–24.
- 27) 長嶺 敬・天谷正行・池田達哉・大関美香・春山直人・加藤常夫・五月女敏範 2007. ビール大麦の主要形質 DNA マーカーの開発・評価と育種利用上の問題点. 栃木農試研報 59: 45–54.
- 28) 中川元興・渡辺進二・牛腸英夫・西尾小作 1965. 裸麦新品種「キカイハダカ」について. 東近農試研報 12: 103–121.
- 29) Schuller, C., G. Backes, G. Fischbeck, and A. Jahoor, 1992. RFLP markers to identify the alleles on the Mla locus conferring powdery mildew resistance in barley. *Theor. Appl. Genet.* 84: 330–338.
- 30) Shen, Q.H, F. Zhou, S. Bieri, T. Haizel, K. Shirasu and P. Schulze-Lefert 2003. Recognition specificity and RAR1/SGT1 dependence in barley Mla disease resistance genes to the powdery mildew fungus. *Plant Cell.* 15: 732–44.
- 31) Shirasu, K., T. Lahaye, M.W. Tan, F. Zhou, C. Azevedo, P. Schulze-Lefert 1999. A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell* 99: 355–366.
- 32) Sloodmaker, L.A.H. and A. Essen. 1969. Yield losses in barley caused by mildew attack. *Neth. J. Agric. Sci.* 17: 279–282
- 33) Stolzenburg, M.C., J.R. Aist and H.W. Israel 1984. The role of papillae in resistance to powdery mildew conditioned by the ml-o gene in barley. I. Correlative evidence. *Physiol.Plant Pathol.* 25: 337–346.
- 34) Stolzenburg, M.C., J.R. Aist and H.W. Israel 1984. The role of papillae in resistance to powdery mildew conditioned by the ml-o gene in barley. II. Experimental evidence. *Physiol. Plant Pathol.* 25: 347–361.
- 35) Tacconi, G., V. Baldassarre, N.C. Collins, D. Bulgarelli, A.M. Stanca and G.Vale 2006. Haplotype characterization and markers at the barley *Mlo* powdery mildew resistance locus as tools for marker-assisted selection. *Genome* 49: 864–872.
- 36) 山口 修・馬場孝秀・古庄雅彦・石川直幸・大塚 勝・小玉雅晴・加島典子 1998. ビール大麦系統「関東二条25号」にはCホルデイン遺伝子型C1型—うどんこ病抵抗性—高ジアスターゼ力の連鎖ブロックがある. 育雑48(別2): 74.
- 37) 吉川 亮・浜地勇次・古庄雅彦・伊藤昌光・吉田智彦・水田一枝・山口 修・吉野 稔・篠倉正住 1997. ビール大麦新品種“ミハルゴールド”の育成. 福岡農総試研報16: 17–22.

Genetic polymorphisms of powdery mildew resistant locus *Mla* and *Mlo* in Japanese barley cultivars

Takashi NAGAMINE, Tatsuya M. IKEDA¹, Takashi YANAGISAWA, Asuka TAKAHASHI
and Toshinori SOUTOME²

Summary

The haplotypes of *Mla* and *Mlo* genes in Japanese barley cultivars/lines and their relations to powdery mildew resistance were studied. Forty-nine Japanese cultivars/lines were classified into 11 haplotypes by their sequence of 701 bases in the fourth exon of *Mla* gene. Most of powdery mildew resistant ones belonged to 'Sachiho golden' haplotype, except for several resistant malting cultivars, however there were also susceptible six-row hull-less ones in 'Sachiho golden' type. The significance of 'Sachiho golden' type *Mla* gene to the resistance against powdery mildew were confirmed by the complete co-segregation of resistance and 'Sachiho golden' type *Mla* genes in 76 F3 plants of 'Yumesakiboshi' X 'Mikamo golden'. Also, the molecular marker assisted selection system for *mlo-9* powdery mildew resistant gene were developed by new DNA marker which detect in/del differences between *mlo-9* donor 'Alexis' and most Japanese hull-less cultivars.

Barley Research Team

¹ Bread Wheat Research Team (WeNARC Subteam)

² Tochigi Prefectural Agricultural Experiment Station