

## エステラーゼアイソザイムを利用した オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子の集積法

五月女敏範<sup>1,2)</sup>・河田尚之<sup>3)</sup>・吉田智彦<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 栃木県農業試験場栃木分場, <sup>2)</sup> 東京農工大学大学院連合農学研究科,

<sup>3)</sup> 九州沖縄農業研究センター, <sup>4)</sup> 宇都宮大学農学部

**要旨:** オオムギ縞萎縮病 (BaYMV) 抵抗性遺伝子の *rym5* と *rym3* を集積した品種を選抜した. *rym5* と密接に連鎖しているエステラーゼアイソザイム遺伝子 *Est1-Est2-Est4* の遺伝子型 *Ca-null-Nz/Ca-null-Nz* (木石港型) を持つビールオオムギ品種と, *Pr-Fr-Su/Pr-Fr-Su* (Prior 型) で *rym3* を持つ品種との交雑後代において, *Est1-Est2-Est4* の型と, 異なる BaYMV 系統により汚染された圃場における抵抗性・罹病性の反応から BaYMV 抵抗性遺伝子型を推定した. BaYMV I 型系統 (*rym5* 及び *rym3* を持つオオムギ品種が BaYMV 抵抗性を示す系統) 汚染圃場で抵抗性を示しかつエステラーゼアイソザイムが *Pr-Fr-Su/Pr-Fr-Su* (Prior 型) の品種を選抜することにより *rym3* を持つ III 型系統 (*rym5* を冒す BaYMV 系統) 抵抗性品種, エステラーゼアイソザイムが *Ca-null-Nz/Ca-null-Nz* (木石港型) で III 型汚染圃場にて抵抗性を示す品種を選抜することにより *rym5* と *rym3* とを集積した複合抵抗性遺伝子集積品種を選抜することが可能で, その誤選抜率は約 4.9% であった. また, これらの交雑後代において農業形質で選抜を行うことにより, *rym3* の出現頻度が有意に低く歪んだ.

**キーワード:** エステラーゼアイソザイム, オオムギ, オオムギ縞萎縮病 (BaYMV) 抵抗性, 集積法.

栃木県におけるビールオオムギ生産は, 1901 年頃から始められ, 1906 年からはビール会社と耕作者の間で契約により栽培が行われるようになった. また, 1910 年から現在まで生産量はほぼ日本一を維持しており, 我が国のビールオオムギ生産の中で, 栃木県での生産の安定は重要な課題となっている.

一方, 我が国のビールオオムギ生産において最も重大な病害はオオムギ縞萎縮病で, 本病に罹病すると著しい減収や醸造用品質の低下を招く (氏原ら 1984, 藤井ら 1984a). 最近では, 我が国だけでなくヨーロッパや韓国の冬作オオムギにおいても同様に重要な病害になっている (Friedt and Foroughiwehr 1987). 本病は菌類により媒介される Barley Yellow Mosaic Virus (以下 BaYMV) による土壤伝染性のウイルス病であり, 薬剤による有効な防除方法はなく (大兼ら 1988), オオムギ縞萎縮病 (以下 BaYMV (Barley Yellow Mosaic Virus)) 抵抗性品種を作付する以外に確実な防除方法はない. 本病に対する抵抗性遺伝資源の探索の結果, 多数の抵抗性品種及び抵抗性遺伝子が見いだされており (高橋ら 1966, 1970, Kawada and Tsuru 1987, Kawada 1991), *rym1* (旧表記 *Ym*) (高橋ら 1970), *Rym2* (同 *Ym2*) (高橋ら 1970), *rym3* (同 *ym3*) (Ukai 1984), *rym4* (同 *ym4*) (Friedt ら 1990), *rym5* (同 *Ym*) (高橋ら 1970), なす二条 (寺村ら 1990) 等が報告されている.

ビールオオムギにおける BaYMV 抵抗性育種は 1964 年から始められ, 1985 年に木石港 3 由来の第 3 染色体長腕上に座上する抵抗性遺伝子 *rym5* (Konishi and Kaiser 1991) を持った世界初の抵抗性ビールオオムギ品種ミサトゴール

デンが育成された (藤井ら 1984b, Kobayashi ら 1987). その後もミカモゴールデンなどの抵抗性品種が育成され, 病害の防除と安定生産に大きな成果を上げている. また, 食料用二条オオムギでもはがねむぎ由来の *rym3* (佐々木ら 1982, 河田 1984, 1985, 1988) を持つ BaYMV 抵抗性品種イシュクシラズが育成されている (鶴ら 1983).

しかし, 近年 BaYMV の系統分化が明らかになり (安正・吉野 1964, 斉藤・岡本 1964, 草葉ら 1971, 宇杉ら 1985, Kashiwazaki ら 1989, 飯田ら 1992), ミサトゴールデンをはじめとす *rym5* を持つ抵抗性ビールオオムギ品種を冒す BaYMV III 型 (以下 III 型) 系統が出現し (戸嶋ら 1990), 栃木県を初めとする北関東のビールオオムギ主産地で被害が拡大している (五月女ら 1997). その結果, 従来の *rym5* を持つ BaYMV 抵抗性ビールオオムギ品種では, その安定生産は望めなくなっている (山口ら 2002).

一方, BaYMV 抵抗性遺伝子 *rym3* は III ウイルス型系統に抵抗性を示し, 1980 年より *rym5* 以外の新しい BaYMV 抵抗性遺伝子としてその導入が図られてきた (藤井ら 1981) が, *rym3* を持ったビールオオムギ品種は育成されていなかったため *rym3* を持つ品種あるいは *rym5* と *rym3* とを集積した品種育成が強く望まれていた (五月女ら 1996).

なお, BaYMV の系統には I, II, III 型に系統分化が認められ, *rym5*, *Rym2* や *rym3* を持つオオムギ品種は I 型には抵抗性を示し, *Rym2* は II 型には罹病性となる (Kashiwazaki ら 1989). さらに, *rym3* を持ったオオムギ品種を冒す新型のウイルス系統が山口県で発見されているが (五月女ら

第1表 供試材料の親品種及び主要な BaYMV 抵抗性品種の抵抗性遺伝子とエステラーゼアイソザイム *Est1-Est2-Est4* の遺伝子型及び BaYMV 品種に対する反応.

品種名	BaYMV 抵抗性 遺伝子	エステラーゼアイ ソザイム遺伝子型 Est1Est2Est4	BaYMV 品種 に対する反応 **	
			I 型	III 型
タカホゴールド*, ヤチホゴールド*, アサカゴールド*, 関東二条 25 号*, 関東二条 26 号*, 九州二条 11 号*, 大系 R3426*	<i>rym5</i>	<i>CanullNz</i> (木石港型)	RR	S
関東二条 29 号*, 新田二条 14 号*, 栃系 216*, 栃系 217*, 栃系 220*, 栃系 221*, 栃系 222*, 栃系 223*, 栃系 226*, 大系 R3156*, (イシュクシラズ) (Ea52), (倍取) (はがねむぎ) (御堀裸 3 号)	<i>rym3</i>	<i>PrFrSu</i> (Prior 型)  <i>CaUnSu</i> <i>CanullNz</i>	RR	RR
(Sonate)	<i>Rym2</i>	<i>AfnullSu</i>	RR	RR
(Diana d)	<i>rym4</i>	<i>PrFrSu</i> <i>CaFrSu</i>	R	R
なす二条	<i>unkown</i>	<i>CaUnSu</i>	S	RR

\* 本実験に供試した材料の親品種. 以下の表では同一遺伝子型の親は込みにして計算した.

品種名の ( ) はビールオオムギ品種以外, その他はビールオオムギ品種.

\*\*RR: 完全に抵抗性, R: 僅かに発病, S: 罹病性.

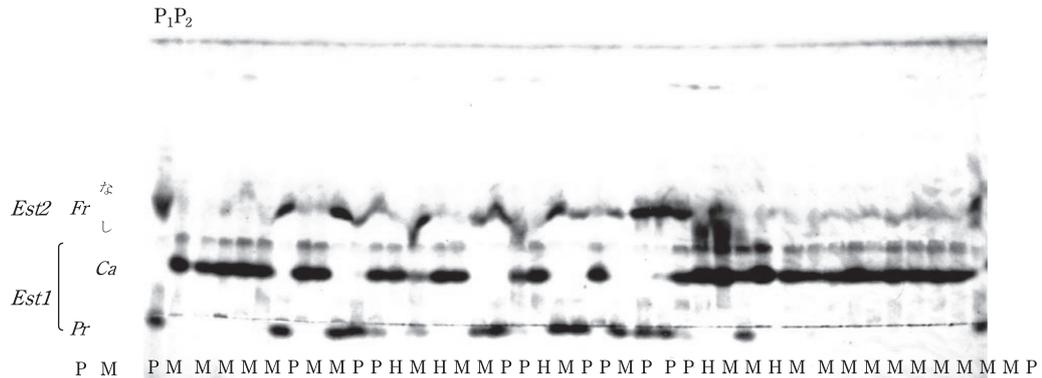
1997), *rym5* と *rym3* とを集積した品種では I~III 型と山口県の新型全てに抵抗性となる.

これら抵抗性品種を育成する上で, BaYMV 系統毎の検定圃場が利用できれば選抜効率は高まるが, 土壌伝染性ウイルス病では単一単系統のみによる汚染圃場の確保及び維持は困難である. また, 抵抗性遺伝子に密接に連鎖する標識となる遺伝子がある場合には同様に選抜に利用できるが, エステラーゼアイソザイム遺伝子ブロック *Est1-Est2-Est4* (Kahler and Allard 1970, Hvid and Nilsen 1977) と密接に連鎖している *rym5* (Konishi and Matsuura 1989, 河田 1989), またはエステラーゼアイソザイム遺伝子ブロックが連鎖していることが示唆されている未知の II 型抵抗性遺伝子 (飯田ら 1993), *rym4*, *rym1* に対する DNA マーカー (GRANER と BAUER 1993, Okada ら 2003) を除いて, *Rym2*, *rym3* 等の標識遺伝子は発見されていない.

III 型に抵抗性を示す *rym3* を持つ品種の育成は BaYMV 罹病性品種と *rym3* を持つ品種との交配と抵抗性検定によって可能であるが, 在来抵抗性品種と罹病性ビールオオムギ品種との交配による品種育成では *rym5* の場合, Resist-Ym No.1 (Muramatsu 1983) や南系 B4641 (Seko 1987) などの中間母本の育成までに 5~8 年を要し, 普及品種ができるまでに 20 年以上を要している (吉田ら 1988). また, これまでの高品質ビールオオムギ品種のほとんどが *rym5* を持っており, 抵抗性高品質ビールオオムギの育種においては交配親として *rym5* を持った品種を使用せざるをえない. それらと *rym3* を持った品種との交雑により *rym3* をも持った品種を育成する場合, 日本国内に多く存在している I 型に分類される汚染圃場 (柏崎 1990) においては *rym5* 及び

*rym3* の両方が抵抗性反応を示すため, *rym3* を持った品種を効率的に選抜することは難しく, *rym5* と *rym3* とを集積した品種を育成することが困難となっている.

ところで, アイソザイムはその多型により作物の起源地の推定 (中川原 1976), 遺伝的分化 (注: 小西猛朗 1989. 同位酵素からみた大麦の遺伝的分化に関する研究. 昭和 63 年度科学研究費補助金 研究成果報告書) や品種識別 (Muramatsu 1983) などに利用されてきた. 育種的な利用としては, ニラのアポミクシス率の推定 (Kojima ら 1991) やニラの雑種選抜 (注: 木村栄 1994. ニラの新品種育成 1) 交雑育種及び交雑系統の品種選定. 平成 5 年度野菜試験研究成績概要集 関東・東海 (I): 96-97), 選抜標識としてインゲン (Weeden ら 1984) やトマト (Stevens and Rick 1986) など病害抵抗性遺伝子と緊密に連鎖しているアイソザイム遺伝子などの報告がある. オオムギの場合, アイソザイムは既に 21 種類の酵素に関する 42 遺伝子座が明らかにされ (Shepherd and Islam 1987), 先述のエステラーゼを用いて *rym5* を選抜する方法が報告されている (小西 1989, 早乙女ら 1990, 注: 河田尚之 1990. オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子の同定と抵抗性育種戦略. 九州農業試験場年報: 34-38). しかし, 九州農業試験場 (現農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター) 等で適用した例 (注: 河田尚之・鶴政夫 1990. 育種年限短縮のための遺伝形質の早期固定化技術の利用 (育種研究報告昭和 59 年度~昭和 63 年度 63-73)) はあるが日常的に品種育種に利用している報告はない. また, DNA マーカーや種子貯蔵蛋白等の多型を標識とした遺伝子の集積の試みは, イネ (吉村ら 1993) をはじめとしてオオムギでもホルデンによる



第1図 F<sub>5</sub>個体におけるエステラーゼアイソザイム遺伝子型の一例。

M: *Ca-null-Nz/Ca-null-Nz* (木石港型), P: *Pr-Fr-Su/Pr-Fr-Su* (Prior型), H: *Ca-null-Nz/Pr-Fr-Su* (ヘテロ型)。

Est4は、供試材料が3月中旬(9葉期)での採取であったため、見えにくくなっている。

うどんこ病抵抗性遺伝子 *MI-k* と *MI-a* の集積 (Jensen ら 1980) などが報告されているが、品種育成に日常的に用いた例は少ない。

本報告では、BaYMV 抵抗性遺伝子 *rym5* とそれと密接に連鎖するエステラーゼアイソザイム遺伝子型を用いて BaYMV 抵抗性遺伝子型の推定や BaYMV I 型汚染圃場で低い危険率で確実に *rym3* を持った品種を選抜する方法、さらに BaYMV III 型汚染圃場を検定に利用することにより *rym5* と *rym3* の両方を持つ遺伝子集積品種の育成を効率的に行う方法を提案し、その有効性を確認し、実際のビールオオムギ品種の育種に導入したので、それらについて報告する。

### 材料と方法

供試材料は BaYMV I 型及び II 型抵抗性遺伝子 *rym5* と同 I~III 型抵抗性遺伝子 *rym3* を単独で持つビールオオムギ品種間の組合せで、*rym5* は全て木石港 3、*rym3* は栃系 216 のみ Ea52、他は全てはがねむぎ由来である (第1表)。これら材料は、栃木県栃木市の栃木県農業試験場栃木分場 (以下栃木分場) におけるビールオオムギ育種ルーチンに準じ、交配後、F<sub>2</sub>~F<sub>3</sub> は世代促進操作を伴う集団栽培にて養成し、F<sub>4</sub> は穂別系統として栃木分場内 BaYMV I 型汚染圃場において栽培を行い、BaYMV 抵抗性を示し、出穂期、草型、穂数、穂型、倒伏程度などの農業形質で選抜を行った F5 派生系統 19 組合せ 645 品種と、さらに F<sub>5</sub> で農業形質について選抜した F6 派生系統 16 組合せ 129 系統を用いた。

*rym5* に密接に連鎖し選抜標識となるエステラーゼアイソザイム *Est1-Est2-Est4* の遺伝子型は、Havid and Nielsen (1977) の方法に準じデンプン電気泳動法により決定した (第1図)。泳動用の材料は 11 月上旬に圃場に播種し自然条件で養成したもので、翌年の 2~3 月に最上位の新葉 (第 7~9 葉) の葉身を 1 品種あたり 5 個体供試した。BaYMV 抵抗性遺伝子型は、2 ヶ年にわたり栃木分場内 I 型汚染圃場と栃木県壬生町の III 型汚染圃場に材料を播種し、

オオムギ縮萎病のモザイク病斑の有無により抵抗性を検定し推定した。なお、これら汚染圃場は ELISA 法による抗原抗体反応により麦類萎縮病の発生がないこと及びオオムギ縮萎病の発生を確認した。さらに、BaYMV 抵抗性遺伝子 *rym5* と *rym3* を集積していると推定した品種のうち、ビール醸造用品質等で選抜した 14 品種について、I 型、III 型および山口県の新型汚染圃場にてその抵抗性を確認した。

また、BaYMV 抵抗性ビールオオムギ品種育成のための母材として *Rym2*、*rym3* 及び *rym5* と非対立遺伝子と考えられる抵抗性遺伝子を持つオオムギ品種のエステラーゼアイソザイム遺伝子型を電気泳動法により調査した。

なお、本材料は世代促進操作を伴う集団栽培にて養成し、F<sub>2</sub> 及び F<sub>3</sub> 世代における次世代種子は株由来でなく集団を bulk として早熟の穂を中心に選抜したものであるため、遺伝子の出現頻度の確認として SSD 法 (Single Seed Descent: 単粒法) を用いて養成したイシユクシラズ (BaYMV 抵抗性遺伝子型 +/+、*rym3/rym3*) / ニシノチカラ (同 *rym5/rym5*、+/+) の無選抜の F8 221 品種を I 型及び III 型圃場に約 20 粒播種し、BaYMV 抵抗性反応等を調査した。

### 結果と考察

#### 1. エステラーゼアイソザイム遺伝子 *Est1-Est2-Est4* と BaYMV 汚染圃場を用いた抵抗性遺伝子型の推定

供試した材料の親品種の BaYMV 系統に対する反応とエステラーゼアイソザイム *Est1-Est2-Est4* 遺伝子型の調査結果を第2表に示した。*rym5* を持つ交配親品種のエステラーゼアイソザイム遺伝子型はすべて *Ca-null-Nz/Ca-null-Nz* (木石港型)、*rym3* を持った交配親の遺伝子型は全て *Pr-Fr-Su/Pr-Fr-Su* (Prior 型) であった (第1表)。ただし、*rym3* を持つはがねむぎは木石港型であり、*rym5* の交配親と同じ型であった。

*rym5* とエステラーゼアイソザイム遺伝子が約 1~6% の組換え価で連鎖していることが知られており (Konishi and

第2表 エステラーゼアイソザイム *Est1-Est2-Est4* 遺伝子型と BaYMV III 型圃場での反応による BaYMV 抵抗性遺伝子型の推定。

エステラーゼ アイソザイム	<i>CanullNz/CanullNz</i> (木石港型)		<i>CanullNz/PrFrSu</i> (ヘテロ型)		<i>PrFrSu/PrFrSu</i> (Prior 型)	
	RR	S	RR	S	RR	S
BaYMV III 型に 対する反応						
抵抗性遺伝子型	<i>rym5/rym5,rym3/rym3</i>		<i>rym5/rym5,rym3/+</i>		<i>rym5/+ ,rym3/rym3</i>	
(組換型*)	<i>rym5/+ ,rym3/rym3</i>		<i>rym5/rym5,rym3/rym3</i>		<i>rym5/rym5,rym3/rym3</i>	
	<i>rym5/rym5, +/+</i>		<i>rym5/+ ,rym3/rym3</i>		<i>rym5/+ ,rym3/rym3</i>	
	<i>rym5/+ ,rym3/rym3</i>		<i>rym5/rym5, +/+</i>		<i>rym5/+ ,rym3/rym3</i>	

供試材料は全て BaYMV I 型に抵抗性を示したものを供試。

\* エステラーゼアイソザイム *Est1-Est2-Est4* 遺伝子と *rym5* との間で組換え。

第3表 F<sub>2</sub> 供試品種のエステラーゼアイソザイム *Est1-Est2-Est4* の遺伝子型及び BaYMV III 型圃場における抵抗性反応。

エステラーゼ アイソザイム		BaYMV III 型に対する反応				エステラーゼアイソザイム の分離理論値	
		RR	S	計	不明	総計	
エステラーゼ アイソザイム	<i>CanullNz/CanullNz</i> (木石港型)	166	259	425	40	465	422
	<i>CanullNz/PrFrSu</i> (ヘテロ型)	27	12	39	1	40	50
	<i>PrFrSu/PrFrSu</i> (Prior 型)	116	6	122	18	140	174
	計	309	277	586	59	645	
BaYMV 抵抗性反応の理論値		383	203	586			
		(0.53)	(0.47)				

供試材料は 19 組合せ, 645 品種。

エステラーゼアイソザイムと *rym5* の組換え価は 0 として算出。

( ) の数字は出現頻度。

$\chi^2$  (BaYMV) = 41.46 (P < 0.005) (不明は除く),  $\chi^2$  (エステラーゼ) = 12.83 (P < 0.005)。

Matsuura 1989, 河田 1989), 本実験に供試した材料では, 理論的には高い確率で交雑後代で *Ca-null-Nz/Ca-null-Nz* (木石港型) の品種は *rym5* を持つと推定された。ただし, 交配親となる品種によっては *rym3* で *Ca-null-Nz/Ca-null-Nz* (木石港型) の場合もあることが判明したため, エステラーゼアイソザイムを調査する前に交配親の遺伝子型を調査しておかなければならない。

BaYMV 系統に対する反応では, *rym5* 品種は BaYMV I 型汚染圃場で抵抗性かつ III 型汚染圃場では罹病性, *rym3* 品種は I 型及び III 型では抵抗性であった (第 1 表)。ここで, *rym5* および *rym3* は劣性遺伝子であるため両ヘテロ遺伝子型 (*rym5/+*, *rym3/+*) も罹病性であるが, 本材料は F4 穂別系統で BaYMV I 型汚染圃場にて完全な抵抗性を選抜したものであるため, *rym5* または *rym3* のどちらかはホモ化しており, BaYMV 抵抗性遺伝子型は *rym5/rym5*, *rym3/rym3*, *rym5/rym5*, *rym3/+*, *rym5/rym5*, *+/+*, *rym5/+*, *rym3/rym3*, *+/+*, *rym3/rym3* のいずれかであり, また III 型汚染圃場で抵抗性の品種は *rym3* をホモで持っていると考えられた。

以上のことから, エステラーゼアイソザイム遺伝子型,

BaYMV I 型及び III 型汚染圃場における反応を調査することにより, 品種の BaYMV 抵抗性遺伝子型が推定できる。すなわち, I 型汚染圃場で抵抗性を示しエステラーゼアイソザイムが *Ca-null-Nz/Ca-null-Nz* (木石港型) で, III 型汚染圃場にて抵抗性を示す品種の抵抗性遺伝子型は *rym5/rym5*, *rym3/rym3*, III 型汚染圃場にて罹病性の品種は *rym5/rym5*, *+/+* または *rym5/rym5*, *rym3/+*, エステラーゼアイソザイムが *Ca-null-Nz/Pr-Fr-Su* (ヘテロ型) で III 型汚染圃場にて抵抗性品種は *rym5/+*, *rym3/rym3*, エステラーゼアイソザイムが *Pr-Fr-Su/Pr-Fr-Su* (Prior 型) で III 型汚染圃場にて抵抗性品種は *+/+*, *rym3/rym3* と推定され, それ以外のパターンは *rym5* と *Est1-Est2-Est4* との組換え体と考えられた (第 2 表)。

## 2. I 型汚染圃場での *rym3* の選抜方法及び *rym5* と *rym3* の集積方法

*rym5* を持つ品種と *rym3* を持つ品種の交雑後代系統において, エステラーゼアイソザイム遺伝子型を利用して BaYMV I 型汚染圃場で *rym3* を選抜する方法と, *rym5* と *rym3* とを集積する方法を検討した。

第4表 F<sub>6</sub> 供試品種のエステラーゼアインザイム *Est1-Est2-Est4* の遺伝子型及び BaYMV III 型圃場における抵抗性反応。

	BaYMV III 型に対する反応				エステラーゼアインザイム	
	RR	S	計	不明	総計	の分離理論値
<i>CanullNz/CanullNz</i> (木石港型)	26	68	94	2	96 (0.74)	87 (0.67)
エステラーゼ アインザイム <i>CanullNz/PrFrSu</i> (ヘテロ型)	10	2	12	0	12 (0.09)	5 (0.04)
<i>PrFrSu/PrFrSu</i> (Prior 型)	20	1	21	0	21 (0.16)	37 (0.29)
計	56 (0.44)	71 (0.56)	127	2	129	
BaYMV 抵抗性反応の理論値	85 (0.67)	42 (0.33)	127			

供試材料は 19 組合せ, 645 品種.

エステラーゼアインザイムと *rym5* の組換え価は 0 として算出.

( ) の数字は出現頻度.

$\chi^2$  (BaYMV) = 41.46 (P < 0.005) (不明は除く),  $\chi^2$  (エステラーゼ) = 12.83 (P < 0.005).

第5表 F<sub>5</sub> 及び F<sub>6</sub> 系統における BaYMV 抵抗性遺伝子の出現度数と頻度.

世代	組合せ数	<i>rym5/rym5,rym3/rym3</i>	<i>rym5/rym5,+/+</i>	<i>rym5/+,rym3/rym3</i>	<i>+/+,rym3/rym3</i>	計	$\chi^2$	P
F <sub>5</sub>	19	166 0.28 (180) (0.31)	277 0.47 (203) (0.35)	27 0.05 (45) (0.08)	116 0.20 (158) (0.27)	586	46.55	P < 0.005
F <sub>6</sub>	16	26 0.20 (44) (0.35)	71 0.56 (42) (0.33)	10 0.08 (5) (0.04)	20 0.16 (37) (0.29)	127	41.18	P < 0.005

上段は出現度数, 下段は出現頻度.

( ) は各遺伝子型における理論値.

前述した BaYMV 抵抗性遺伝子型推定に従って, *rym5* を持つ品種と *rym3* を持つ品種との交雑後代 F<sub>5</sub> 系統 19 組合せ, 645 系統, F<sub>6</sub> 系統 16 組合せ, 129 系統の遺伝子型を推定した. F<sub>5</sub> 及び F<sub>6</sub> 系統のエステラーゼアインザイム遺伝子型と III 型汚染圃場における結果を第 3 表及び第 4 表, これより推定した遺伝子型とその出現頻度を第 5 表に示した.

本報に示した BaYMV 抵抗性遺伝子型推定法で, I 型汚染圃場で抵抗性を示しかつエステラーゼアインザイムが *Pr-Fr-Su/Pr-Fr-Su* (Prior 型) の品種は, *rym5* とエステラーゼアインザイム遺伝子とが組換えを起こさない限り抵抗性遺伝子は *+/+, rym3/rym3* となる. このことから, I 型汚染圃場でエステラーゼアインザイムが *Pr-Fr-Su/Pr-Fr-Su* (Prior 型) の抵抗性品種を選抜すれば, *rym3* をホモに持った品種が選抜できると考えられ, この場合, *rym5* とエステラーゼアインザイム遺伝子 *Est1-Est2-Est4* が密接に連鎖していることから, 組換え体が出現する確率は低いと推察され, 第 6 表に示したように, 供試材料におけるこの組換え体の出現率は, 0.78~1.02% であった. また, *rym5/*

*rym5, +/+* の遺伝子型の品種を選抜する誤選抜率は 4.76~4.92% となり, 次世代で抵抗性の再確認を行えば育種上は問題ないと考えられた.

また, BaYMV I 型及び III 型汚染圃場で抵抗性を示し, エステラーゼアインザイムが *Ca-null-Nz/Ca-null-Nz* (木石港型) の品種を選抜すれば, 抵抗性遺伝子型は *rym5/rym5, rym3/rym3* となる. この場合も組換え体を選抜する危険性は低いと考えられ, エステラーゼアインザイム遺伝子型, I 型及び III 型汚染圃場での抵抗性検定により, *rym5* と *rym3* とを両方持つ複合抵抗性遺伝子集積品種を選抜できると考えられた. 第 7 表に本材料にて *rym5* と *rym3* を集積していると推定した品種のうち, ビール醸造用品質等で優れた 14 品種の I 型, III 型及び型山口県の新型汚染圃場における反応の結果を示した. *rym5* と *rym3* を集積した品種は, I 型, III 型及び山口県の新型汚染圃場全てで抵抗性となるが, 14 品種のうち 13 品種が山口県の新型圃場で抵抗性を示し, これら 14 品種のうち山口県の新型ほ場で罹病した 1 品種は抵抗性遺伝子型が *+/+, rym3/rym3* と推

第6表 F<sub>5</sub>及びF<sub>6</sub>品種におけるエステラーゼアイソザイム遺伝子とBaYMV抵抗性遺伝子 *rym5* との組換え型のうち Prior型 *rym5/rym5, +/+* の出現率.

世代	供試品種数	Prior型* 品種数	Prior型 BaYMV III型 罹病性品種数	組換え型** 出現率 (%)	誤選抜率*** (%)
F <sub>5</sub>	586	122	6	1.02	4.92
F <sub>6</sub>	127	21	1	0.78	4.76

\*Pr-Fr-Su/Pr-Fr-Su.

\*\*BaYMV III型罹病性品種数 / 供試品種数 × 100.

\*\*\*Prior型 BaYMV III型罹病性品種数 / Prior型品種数 × 100.

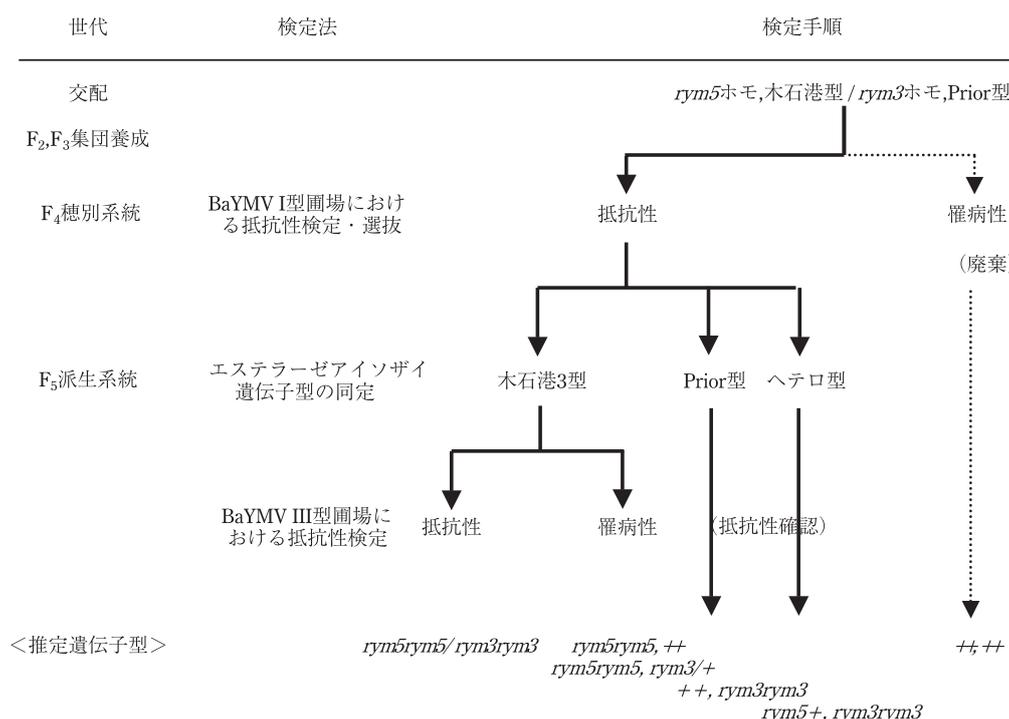
第7表 *rym5* と *rym3* を集積していると推定された品種\*のBaYMV I型, III型及び山口県の新型圃場における反応.

供試品種数	BaYMV に対する反応						<i>rym5</i> とエステラーゼアイソザイム 遺伝子との組換え型出現率** (%)
	I型		III型		山口県の新型		
	RR	S	RR	S	RR	S	
14	14	0	14	0	13	1	7.14

\**rym5/rym5, rym3/rym3*.

*rym5* を持つ品種は, I型:RR, III型:S, IV型:RR. *rym3* を持つ品種は, I型:RR, III型:RR, 山口県の新型:S.

\*\*BaYMV 山口県の新型に対するRR数 / 品種数 × 100.



第2図 BaYMV抵抗性育種における遺伝子推定手順.

木石港型: Ca-null-Nz/Ca-null-Nz, ヘテロ型: Ca-null-Nz/Pr-Fr-Su, Prior型: Pr-Fr-Su/Pr-Fr-Su.

定された. この結果から, *rym5* とエステラーゼアイソザイム遺伝子の組換え型の出現率は7.14%で, 高い確率で *rym5* と *rym3* の複合抵抗性遺伝子集積品種を選抜できることが確かめられた.

このBaYMV抵抗性遺伝子推定法を適用し遺伝子集積を効率的に行う手順を第2図に示した. この方法は, エステラーゼアイソザイムの代わりに *rym5* に関連したDNAマ

ーカー (Bettinaら2005) に当てはめることも可能で, 現在, 栃木分場ではDNAマーカーによるMAS (Marker-assisted selection) の一環として, 本手法を育種事業に導入している.

### 3. *rym5* と *rym3* の出現頻度の歪み

F<sub>5</sub>及びF<sub>6</sub>系統におけるエステラーゼアイソザイム遺伝子型の分離及び抵抗性遺伝子型の出現度数と頻度を第3

第8表 イシユクシラズ / ニシノチカラ SSD F<sub>8</sub> 系統の BaYMV I 型及び同 III 型圃場における抵抗性反応 .

	BaYMV I 型に対する反応			理論値 (出現頻度)
	RR	S	計	
BaYMV III 型に対する反応	RR	109	0	109 (0.49)
	S	51	61	112 (0.51)
	計	160 (0.72)	61 (0.28)	221
	理論値 (出現頻度)	164 (0.74)	57 (0.26)	221

BaYMV 抵抗性遺伝子型は、イシユクシラズ (+/+、*rym3*、*rym3*)、ニシノチカラ (*rym5*/*rym5*、+/+)。完全な抵抗性以外は S としてカウントした。 $\chi^2$  (BaYMV I 型) = 0.38 (0.75 > P > 0.5),  $\chi^2$  (BaYMV III 型) = 0.00 (1 > P > 0.95)。

表、第4表及び第5表に示した。ここで、本材料では1組合せ当たりの品種数が少なく期待度数が小さくなっているために、全ての組合せを込みにして適合性を検討した。すると、エステラーゼアイソザイム、抵抗性遺伝子とも出現頻度が有意に歪み、*Pr-Fr-Su/Pr-Fr-Su* (Prior 型) と *rym3* の頻度が有意に低くなった。エステラーゼアイソザイム遺伝子型で *Ca-null-Nz/Ca-null-Nz* (木石港型) : *Ca-null-Nz/Pr-Fr-Su* (ヘテロ型) : *Pr-Fr-Su/Pr-Fr-Su* (Prior 型) の出現頻度は、F5 系統では理論値の 0.65 : 0.08 : 0.27 に対して 0.72 : 0.06 : 0.22, F6 系統では 0.67 : 0.04 : 0.29 に対して 0.74 : 0.09 : 0.16 と *Pr-Fr-Su/Pr-Fr-Su* (Prior 型) の出現頻度が理論値に比べて有意に低く、*Ca-null-Nz/Ca-null-Nz* (木石港型) の頻度が有意に高かった。同様に、抵抗性遺伝子型で *rym5*/*rym5*, *rym3*/*rym3* : *rym5*/*rym5*, +/+ : *rym5*/*rym5*, *rym3*/+ : *rym5*/+, *rym3*/*rym3* : +/+, *rym3*/*rym3* の出現頻度は、F5 系統では 0.31 : 0.35 : 0.08 : 0.27 に対して 0.28 : 0.47 : 0.05 : 0.20, F6 系統では 0.35 : 0.33 : 0.04 : 0.29 に対して 0.20 : 0.56 : 0.08 : 0.16 と理論値に適合せず *rym5* の出現頻度が有意に高く、*rym3* の頻度が有意に低く歪んだ。また、F<sub>5</sub> と F<sub>6</sub> 系統を比較した場合、農業形質選抜を繰り返すほど歪みが大きくなった。

ここで、通常の育種ルーチンとは別にイシユクシラズ / ニシノチカラの SSD F8 系統での BaYMV に対する反応を調査した結果を第8表に示した。SSD 法により養成された本材料では、I 型及び III 型に対する反応は理論値に適合し、*rym5* 及び *rym3* の分離比に歪みが生じないものと思われた。このことから、エステラーゼアイソザイム及び BaYMV 抵抗性遺伝子で確認された歪みは分離比の歪みによるものではなく、これらの遺伝子と連鎖した雑種集団養成過程における集団構成の上で生じる歪み (例えば、穂数や1穂粒数の多少など) によるものか、供試材料は集団養

成中 F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> の収穫に際しては成熟の早い系統を中心に穂選抜をしていることや、出穂期・草型・穂数・穂型・倒伏程度など農業形質ついて F<sub>4</sub> 穂別系統では平均 4.9% (1.4~9.0%), F<sub>5</sub> 系統では同 17.2% (5.0~34.9%) の選抜率で選抜していることから、農業形質での選抜により歪みが生じたと推察された。

小西・松浦 (1987) は、エステラーゼアイソザイム遺伝子ブロックの周辺に育種上重要な遺伝子があり、農業形質の選抜に伴ってエステラーゼアイソザイム遺伝子頻度が歪むことを示唆しているが、本試験に供試した交配組合せで *rym5* 近傍に優良な遺伝子が存在しているのか、あるいは *rym3* 近傍に劣悪な遺伝子が存在しているのは、不明で、今後これらの歪みの原因を明らかにすることが育種上重要と思われる。

以上のことから、*rym5* を持つ品種と *rym3* を持つ品種の交雑後代において、*rym3* の出現頻度が減少することが判明したが、育種上有用な BaYMV 抵抗性遺伝子 *rym3* を持った品種育成の効率化や、山口県の新型系統をはじめ新しい BaYMV 系統に対応すべく *rym3* と *rym5* との集積品種の育成には、農業選抜を行う以前の世代に *rym3* を対象とした選抜を加える必要があると考えられた。

#### 4. BaYMV III 型抵抗性ビールオオムギ品種育成母材への適用

本報告に記した選抜法や集積法は、オオムギの抵抗性育種において、BaYMV 抵抗性遺伝子 *rym5* を持つ品種とエステラーゼアイソザイム遺伝子型の異なる同 III 型抵抗性遺伝子 *rym3* を持つ品種との交雑後代で適用できる。しかし、*rym3* を持つ品種のエステラーゼアイソザイム遺伝子型が *rym5* を持つ品種と同じ場合は適用することができない。

また、*rym3* 以外の抵抗性遺伝子を持つ品種 (第2表参照) でも *rym5* を持つ品種とエステラーゼアイソザイム遺伝子型が異なっていれば、同様に適用できると考えられ、御掘裸3号及びその後代の持つ抵抗性遺伝子 *Rym2*, *Sonate*, *Diana* 等の持つ *rym4* においても、*rym5* との交雑後代品種での遺伝子の推定及び集積に利用できると考えられ、さらに、新たな抵抗性遺伝子による *rym5* と *rym3* 以外の集積パターンや準同質抵抗性遺伝子系統の作出 (河田・五月女 1998) にも適用できる。

謝辞：本研究は農林水産省指定試験事業の一環として行われた。試験を遂行するにあたり、試験圃場の管理ならびに調査等の補助を頂いた栃木県農業試験場佐野原種農場石川武技査に心から感謝の意を表します。

#### 引用文献

- 安正純・吉野正義 1964. オオムギ萎縮病に関する生態的研究. 埼玉県農試研報 24 : 1-115.  
Bettina, P., S. Stefan, B. Eva, S.D.P. Nils, S. Andra, F. Wolfgang, O. Frank, G. Andreas 2005. High-resolution mapping of *Rym4* / *Rym5* locus

- conferring resistance to the barley yellow mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) in barley (*Hordeum vulgare* ssp. *Vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 110 : 283–293.
- Friedt, W. and B. Froughiwehr 1987. Genetics of resistance to Barley Yellow Mosaic Virus. *Barley Genetics* V : 659–664.
- Friedt, W., F. Ordon, R. Gotz and R. Kaiser 1990. Bodenbuetige Krankheiten, eine fort dauernde Herausforderung fur die Pflanzenzuchtungsbeleuchtet am Beispiel der Gelbmosaikvirose der Gerste. *Ber Arbeitstag Saatzucht Gumpenstein* 40 : 23–38.
- 藤井敏男・北原操一・鈴木崇之 1981. オオムギ縞萎縮病抵抗性ビールムギ品種育成に関する研究 1. はがねむぎ由来の高度抵抗性二条オオムギ系統について. *育種学雑誌* (別) 31 : 20–21.
- 藤井敏男・小林俊一・瀬古秀文 1984a. 大麦縞萎縮病抵抗性ビールムギ品種育成に関する研究 4. 抵抗性系統の有用性. *育種学雑誌* 34(別1) : 306–307.
- 藤井敏男・小林俊一・瀬古秀文 1984b. 大麦縞萎縮病抵抗性ビールムギ品種育成に関する研究 5. 栃木県における「関東二条22号」の実用性. *育種学雑誌* 34(別1) : 308–309.
- Graner, A. and E. BAUER 1993. RFLP mapping of the *ym4* virus resistance gene in barley. *Theor. Appl. Genet.* 86 : 689–693.
- Hvid, S. and G. Nielsen 1977. Esterase isoenzyme variants in barley. I. *Hereditas. Crop Sci.* 87 : 155–162.
- 飯田幸彦・渡辺健・戸嶋郁子・小川奎 1992. 大麦縞萎縮病ウイルス系統に対する大麦品種の抵抗性反応. *育種学雑誌* 42 : 863–877.
- 飯田幸彦・渡辺健・戸嶋郁子・小川奎 1993. 大麦縞萎縮病ウイルス系統に対する二条大麦品種の抵抗性. 反応とエステラーゼ同位酵素の遺伝型との関係. *育種学雑誌* 43 : 113–122.
- Jensen, J., J.H. Jorgensen, H.P. Jensen, H. Giese and H. Doll 1980. Linkage of the hordein loci *Hor1* and *Hor2* with powdery mildew resistance loci *Ml-k* and *Ml-a* on chromosome 5. *Theor. Appl. Genet.* 85 : 27–31.
- Kahler, A.L. and R.W. Allard 1970. Genetics of isozyme variants in barley. I. Esterase. *Crop Sci.* 10 : 444–448.
- Kashiwazaki, S., K. Ogawa, T. Usugi, T. Omura and T. Tsuchizaki 1989. Characterization of several strains of Barley Yellow Mosaic Virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 55 : 15–25.
- 柏崎哲 1990. 大麦縞萎縮病における病原ウイルス系統と大麦縞萎縮病抵抗性をめぐる諸問題—病原ウイルス系統の研究の現状と今後の課題—. *農業技術* 45 : 111–115.
- 河田尚之 1984. オオムギ縞萎縮病抵抗性の遺伝様式 I. F1 及び F2 分離からわかった抵抗性遺伝子の分離. *育種学雑誌* 34(別2) : 128–129.
- 河田尚之 1985. オオムギ縞萎縮病抵抗性の遺伝様式 II. いくつかの新抵抗性遺伝子. *育種学雑誌* 35(別2) : 328–329.
- Kawada, N. and M. Tsuru 1987. Genetics and breeding of resistance to Barley Yellow Mosaic Virus. *Barley Genetics* V : 651–657.
- 河田尚之 1988. オオムギ縞萎縮病抵抗性の遺伝様式 III. 劣性抵抗性遺伝子. *育種学雑誌* 38(別2) : 418–419.
- 河田尚之 1989. オオムギ縞萎縮病抵抗性の遺伝様式 IV. 不完全優性遺伝子の遺伝分析. *育種学雑誌* 39(別2) : 286–289.
- Kawada, N. 1991. Resistant cultivars and genetic ancestry of the resistance genes to Barley Yellow Mosaic Virus in barley. *Bull. Kyushu Natl. Agric. Exp. Stn.* 27 : 65–79.
- 河田尚之・五月女敏範 1998. オオムギ縞萎縮病抵抗性準同質遺伝子系統の作出と病原ウイルス系統に対する反応. 栃木県農業試験場研究報告 47 : 65–77.
- Kobayashi, S., H. Yoshida and K. Soutome 1987. Breeding for resistance to yellow mosaic disease in malting barley. *Barley Genetics* V : 667–672.
- Kojima, A., Y. Nagato and K. Hinata 1991. Degree of apomixis in chinese chive (*Allium tuberosum*) estimated by esterase isozyme analysis. *育種学雑誌* 41 : 73–83.
- 小西猛朗・松浦誠司 1987. わが国の二条大麦品種の変遷とエステラーゼ同位酵素の変異. *育種学雑誌* 37 : 412–420.
- 小西猛朗 1989. 育種学最近の進歩 29 : 79–82.
- Konishi, T. and S. Matsuura 1989. Linkage relationship between two loci for the Barley Yellow Mosaic Resistance of Mokusekko 3 and esterase isozymes. *育種学雑誌* 39 : 423–430.
- Konishi, T. and R. Kaiser 1991. Genetic difference in Barley Mosaic Virus Resistance between Mokusekko 3 and Misato Golden. *育種学雑誌* 41 : 499–505.
- 草葉敏彦・遠山明・湯本武義・建部美次 1971. 大麦縞萎縮病に対する二条大麦品種の抵抗性検定. 鳥取農業試験場特別研報 2 : 1–208.
- Muramatsu, M. 1983. Breeding of malting barley variety which is resistant to Barley Yellow Mosaic. *Barley Genetics* III : 476–485.
- 中川原捷洋 1976. 遺伝子の地理的分布からみた栽培イネの分化. *育種学最近の進歩* 17 : 35–44.
- Okada, Y., S. Kashiwazaki, R. Kanatani, S. Arai and K. Ito 2003. Effects of barley yellow mosaic disease resistant gene *rym1* on the infection by strains of Barley yellow mosaic virus and Barley mild mosaic virus. *Theor Appl Genet* 106 : 181–189.
- 大兼善三郎・手塚徳弥・手塚神浩・本郷武・中山喜一・斎藤司朗 1988. 二条大麦のオオムギ縞萎縮病防除. 栃木県農業試験場研究報告 35 : 77–86.
- 斉藤康夫・岡本弘 1964. 土壌伝染性ムギウイルス病に関する研究 V. 品種抵抗性の検定. *農技研報* C17 : 75–102.
- 早乙女和彦・吉田久・小林俊一・天谷正行 1990. エステラーゼ同位酵素遺伝子型によるオオムギ縞萎縮病抵抗性系統の選抜. 栃木県農業試験場研究報告 37 : 1–9.
- 佐々木昭博・河田尚之・鶴政夫 1982. オオムギ縞萎縮病抵抗性の遺伝子源. *日作九支報* 49 : 53–55.
- 五月女敏範・早乙女和彦・河田尚之・福田暎・石川直幸・宮川三郎・加藤常夫・神永明・佐々木昭博・大塚勝・吉田久・桐生光広・伊藤浩・小林俊一・徳江紀子・天谷正行・瀬古秀文・藤井敏男・田谷省三・小玉雅晴 1996. オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *ym3* を持つ極高品質、多収ビール大麦系統「関東二条29号」. 栃木県農業試験場研究報告 44 : 91–108.
- 五月女敏範・早乙女和彦・河田尚之・前岡庸介・井上興 1997. BaYMV III 型系統の拡大及び抵抗性遺伝子 *ym3* を持つ品種の罹病について. *育種学雑誌* 47(別1) : 279.
- Seko, H. 1987. Development of a two-rowed malting barley cultivar resistant to Barley Mosaic. *TARC.* 21(3) : 162–165.
- Shepherd, W. and A.K.M. R. Islam 1987. Cytogenetic manipulation of barley chromosomes in a wheat background. *Barley Genetics* V : 375–387.
- Stevens, M.A. and C.M. Rick 1986. A scientific basis for improvement. *Genetics and Breeding. In The Tomato Crop* J. Atherton, and G. Rudich (eds.). Chapman and Hall, New York. 35–109.

- 高橋隆平・林二郎・山本秀夫・守屋勇・平尾忠三 1966. 大麦の縞萎縮病抵抗性に関する研究. 第1報 二条大麦及び六条大麦品種の抵抗性検定試験. 農学研究 51 : 135-152.
- 高橋隆平・林二郎・守屋勇・平尾忠三 1970. 大麦の縞萎縮病抵抗性に関する研究. 第2報 品種の抵抗性程度と被害との関係ならびに異なる常発地の病原ウイルスに対する品種反応比較. 農学研究 53 : 153-165.
- 寺村好司・小山内英一・伏田均・河西隆喜 1990. ビール大麦新品種「なす二条」の育成とその縞萎縮病抵抗性について. 育種学雑誌 40(別2): 174-175.
- 戸嶋郁子・渡辺健・飯田幸彦 1991. 茨城県における大麦縞萎縮病III型系統発生実態調査—下館市小川地区における「ミサトゴールド」の発病状況. 関東東山病害虫研報 38 : 35-36.
- 鶴政夫・佐々木昭博・吉田智彦・田谷省三・前田浩敬・桐山毅・池田和彰 1993. 二条大麦新品種「イシユクシラズ」について. 九州農業試験場報告 22 : 527-552.
- 氏原和人・藤井敏男・野沢清一・関口忠男・千葉恒夫 1984. 大麦縞萎縮病とビールムギ品質. 育種学雑誌 42(別1): 302-303.
- Ukai, Y. 1984. Genetic analysis of a mutant resistant to Barley Yellow Mosaic Virus. Barley. Genet. Newsl. 14 : 31-33.
- 宇杉富雄・柏崎哲・土崎常男 1985. オオムギ縞萎縮病ウイルス系統について. 関東東山病害虫研究会年報. 32 : 53-55.
- Weeden, N.F., R. Provvidenti and G.A. Marx 1984. An isozyme marker for resistance to bean yellow mosaic virus in *Pisum sativum*. The Journal of Heredity 75 : 411-412.
- 山口昌宏・谷口義則・関和孝博・大塚勝・五月女敏範・小田俊介 2002. オオムギ縞萎縮病がビール大麦の収量及び麦芽品質に及ぼす影響 栃木県農業試験場研究報告. 51 : 1-8.
- 吉田久・田谷省三・福田暎・伊藤浩・早乙女和彦・天谷正行・桐生光広・加藤常夫・瀬古秀文・氏原和人・北原操一・武田元吉・野中舜二・川口敷美・小林俊一・藤井敏男・小松田美津留・関口忠男・倉井耕一・鈴木崇之・大橋一夫・吉沢朋子・若田部紀国・久保野実・山野昌敏 1988. 二条大麦新品種「ミカモゴールド」の育成(二条大麦農林13号). 栃木県農業試験場研究報告 35 : 31-50.
- 吉村智美・吉村淳・R.J. Nelson・S.R. Mccouch・T.W. Mew・岩田伸夫 1993. 分子マーカーを利用したイネ白葉枯病抵抗性遺伝子のマッピングと集積の試み. 育種学雑誌 43(別1): 161.

**Method of Pyramiding for BaYMV Resistance Genes by Using Esterase Isozyme** : Toshinori SOTOME<sup>1,2)</sup>, Naoyuki KAWADA<sup>3)</sup>, Tomohiko YOSHIDA<sup>3)</sup> (<sup>1)Tochigi Agr. Exp. Stn. Tochigi Brn., Tochigi 328-0008, Japan;</sup> <sup>2)United Grad. Sch. of Agr. Coll., Tokyo Univ. of Agr. and Tech. ;</sup> <sup>3)Natl. Agric. Res. Cent. Kyushu Okinawa Reg. ;</sup> <sup>4)Fac. Agr., Utsunomiya Univ.)</sup>

**Abstract** : BaYMV resistance genes, *rym5* and *rym3*, were pyramided using esterase isozyme genes (*Est1-Est2-Est4*), whose loci had been reported to be tightly linked with *rym5*. BaYMV reaction was also evaluated in the field contaminated with BaYMV strain I (to which cultivars with *rym5* and *rym3* are resistant) or III (to which cultivars with *rym5* is susceptible). Malting barley cultivars having *rym5* with esterase isozyme pattern *Ca-null-Nz* (Mokusekko-type) were crossed with the cultivars having *rym3* with *Pr-Fr-Su* (Prior-type). Selection of resistant lines in the field contaminated with BaYMV I with the esterase isozyme genotype of *Pr-Fr-Su* (Prior-type) gave lines with *rym3*. Selection of resistant lines in the field contaminated with BaYMV III with esterase isozyme genotype of *Ca-null-Nz* (Mokusekko-type) gave lines pyramided with *rym5* and *rym3*, in which the crossing-over rate was about 4.9%. During the selection by agronomic characters, the frequency of *rym3* was lowered significantly.

**Key words** : Barley, BaYMV resistance, Esterase isozyme, Pyramiding.