

ビール大麦の有用遺伝子の遺伝解析のための半数体倍加系統の作出

内村要介^{1,2)}・古庄雅彦¹⁾・馬場孝秀¹⁾・山口修¹⁾・甲斐浩臣¹⁾・塚崎守啓¹⁾・吉田智彦³⁾

(¹⁾ 福岡県農業総合試験場, (²⁾ 東京農工大学農学部, (³⁾ 宇都宮大学農学部)

要旨: 分子マーカーを利用して有用遺伝子を効率的に導入する育種法を確立する目的で、遺伝解析の材料として半数体倍加系統を作出するため、徳島モチ裸由来のオオムギ縞萎縮病抵抗性品種縞系 6 とオオムギ縞萎縮病罹病性品種 lk2 の F₁ に野生オオムギの cb2920 を交配して得た胚を培養して、コルヒチン処理を行った。半数体倍加系統の作出率は、野生オオムギを受粉した F₁ の穎花数に対して、4.5%であった。半数体倍加系統 95 系統のオオムギ縞萎縮病 (I 型) に対する表現型は、抵抗性が 48 系統と感受性が 47 系統で、期待分離比 1:1 に適合した。また、分子マーカーにより検出した半数体倍加系統の遺伝子型は、ヘテロ型は全く検出されず、分子マーカー 37 種類のうち 36 種類において縞系 6 ホモ型: lk2 ホモ型が 1:1 の期待分離比に適合した。半数体倍加系統群は遺伝解析の材料として、完全なホモ接合体で劣性遺伝子の形質発現が評価できること、ヘテロ型が判定できない優性の分子マーカーも有効に使えること、表現型および遺伝子型の分離比が単純であること、同一の遺伝子構成の材料として維持・増殖が容易なため、様々な環境条件下で形質評価を繰り返し行うことが可能で、遺伝子発現の評価の信頼性を高めることができる点で優れていた。

キーワード: 遺伝分析, 半数体倍加系統, ビール大麦, 分子マーカー, *H.bulbosum* L.

近年、分子マーカーを利用したオオムギの連鎖地図を作製し、育種目標となる重要な農業形質である種子感水性 (岩佐ら 1999)、醸造適性 (岡田ら 2002)、側面裂皮粒 (Kaiら 2003) および木石港 3 由来のオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 (Miyazakiら 2001) に関与する有用な遺伝子の解析が急速に進んでいる。遺伝解析により開発された有用遺伝子に連鎖する分子マーカーは、極少量の葉や種子から抽出した DNA を鋳型にして遺伝子型を調査することで、有用遺伝子を有する個体を効率的かつ高精度に判別することが可能になる。そのため、新品種育成において、環境条件による変異で評価が困難な形質や、評価に多大な労力、時間および専用の分析機器を要する形質の選抜を効率化する一つの手段として期待されている (井辺・吉村 1999)。このような育種選抜に利用できる分子マーカーの開発には、塩基配列の解読や分子マーカーの作成技術、DNA 多型検出技術、連鎖地図の作製および量的遺伝子の座乗位置を解析する QTL 解析 (鵜飼 2000) の技術などが必要である。しかし近年、塩基配列や分子マーカーの情報はオオムギにおいて多くの情報が公開されている (Blakeら 1996, Manoら 1999, Ramsayら 2000)。また、イネをはじめとするコムギやダイズ、野菜や果樹においても、分子マーカーの開発が独立行政法人の農業生物資源研究所による「DNA マーカーを用いた新育種技術の開発」プロジェクトと農業技術研究機構作物研究所による「DNA マーカーによる効率的な新品種育成システムの開発」プロジェクトにより急速に進展している。連鎖解析や QTL 解析は、コンピュータソフト MAPMAKER version 3.0 (Landerら 1987) や MAPL98 (鵜飼 1995) など多くのプログラムが開発され、必要なデータを入力することで迅速に結果が得られる。QTL の検出は、

遺伝解析の手始めとして対象とする遺伝子の座乗領域を明らかにする目的であれば、50 cM の間隔で分子マーカーが分布する連鎖地図を作製すれば可能であり、分子マーカーの数はさほど重要ではない (Darvasi and Soller 1994)。遺伝解析の研究で重要なのは、DNA 解析の対象となる形質を高い精度で評価する方法の確立と、安定した評価が得られる質の高い材料の確保である (矢野・春島 1994)。形質の評価方法は、形質が環境の影響を受けて変異しやすい場合、環境の影響を小さくするために様々な条件下で評価を繰り返し行うか、精度の高い評価方法を開発する必要がある。一方、遺伝解析の材料は、遺伝解析の対象となる形質について個体間 (または系統間) で明らかに遺伝子由来の変異が認められ、形質発現が安定していて再現性のある結果が得られること、遺伝的に固定化されていて繰り返し栽培してもその後代で形質の分離が無いこと、同一遺伝子構成の材料として増殖が容易で分析用として多量に確保できること、が望ましい。

そこで著者らは、オオムギの病害の中で最も被害が大きいウイルス病 (草場ら 1965, 遠山・草場 1970, 氏原ら 1984) に対して抵抗性を示す徳島モチ裸に由来する新たなオオムギ縞萎縮病抵抗性の劣性遺伝子 (以下仮に *rym7t* として表記, 福岡ら 1991, 古庄・福岡 1997) の遺伝解析に適する材料を作出する目的で、野生オオムギ *Hordeum bulbosum* L. を利用する Furushoら (1990) の方法に準じて、半数体倍加系統群を作出した。半数体倍加系統は、オオムギ品種と野生オオムギを交雑すると受精後早い段階で野生オオムギの染色体のみが消失する現象を利用し、残っているオオムギ品種由来の染色体をコルヒチン処理により倍化することで、染色体がすべてホモ接合体の固定系統を短期

間で得ることができる利点がある。遺伝解析の材料として半数体倍加系統を用いた報告はいくつかある(岩佐ら1999, Kaiら2003)が、遺伝解析材料の重要性からみて、半数体倍加系統の作出から形態マーカーや分子マーカーにおける遺伝子型の分離比までの具体的なデータを示して、遺伝解析材料としての適性について検討したものはないようである。

そこで、分子マーカーを利用した効率的な育種方法(Marker Assisted Selection)の開発のための遺伝解析材料として、半数体倍加系統群を作出し、効率的な作出方法、形態マーカーと分子マーカーにおける遺伝子型とその分離比からみた遺伝解析材料としての適性を検討したので報告する。

材料と方法

1. 半数体倍加系統の作出

オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* を解析するために適する品種として、*rym7t* を有する六条オオムギ品種の縞系6と、*rym7t* が無くオオムギ縞萎縮病に感受性である二条オオムギ品種のlk2を供試した。オオムギ半数体の作出は、野生オオムギ *H. bulbosum* で花粉を多く得られる系統cb2920を利用する古庄ら(1987)の方法に準じた。cb2920の株わけを6月下旬に行い、1/5000ワグネルポット40ポットで増殖を行った。活着するまでは日陰で養成し、活着後は日なたで液肥を適宜与えながら養成した。12月中旬から2月にかけて交配用の花粉を得ることを目的に、9月上旬から5ポットずつ1週間おきに人工気象室で5°C、8時間日長で8週間の春化処理を行った後、15°C以上で24時間照明の温室内で開花まで養成した。半数体を作成するため材料養成は、縞系6とlk2とを交配して得たF₁種子を9月20日にプランターに播種し、12月以降は15°C以上で24時間照明の温室で養成した。除雄は止め葉より穂が抽出する頃に行い、除雄した穂をポリエチレン袋で被覆した。除雄から3~4日後に *H. bulbosum* との交配を行い、交配後直ちに第2節間で切断して穂を切花延命剤入りの水に挿し、25°C、18時間日長下で維持した。なお、交配翌日に胚の肥大を促進させるためにGA₃(75ppm)を穂に噴霧した。交配11日後に胚をクリーンベンチ内で無菌的に摘出し、B5培地に置床して暗所25°Cで培養した。発芽後は12時間日長、暗:20°C、明:25°C条件にして培養した。こうして得られた2~3葉期の植物体を、砂:土:パーミキュライト=1:1:1の床土のポリエチレン製のポットに移植して約1ヶ月栽培し、半数体を得た。半数体の幼植物の根を0.05%のコルヒチン溶液に20°C、5時間浸漬させる倍加処理を行い半数体倍加系統を得た。受粉穎花数、幼胚着生数、半数体作出数、半数体倍加処理数、半数体倍加系統数作出数を調査し、半数体倍加系統を効率的に作出する方法を検討した。

2. オオムギ縞萎縮病抵抗性検定とその他の形態マーカーの調査

rym7t 由来のオオムギ縞萎縮病抵抗性の判定は、発芽やその後の生育が不良であった系統を除いた95の半数体倍加系統について、オオムギ縞萎縮病I型ウイルスに汚染された福岡県筑紫野市萩原の圃場で1997年、1998年および2001年に行った。発病程度の判定が困難であった半数体倍加系統は、ELISA検定(高橋1988)を行って判定した。

rym7t は、7H染色体上の皮裸性および長短芒性と連鎖関係が認められる(福岡ら1991, 古庄・福岡1997)ことから、7H染色体上に座乗する形態マーカーは、*rym7t* の座乗位置を解明する連鎖解析に利用できる。そこで、7H染色体上に座乗する形態マーカーで、半数体倍加系統の由来となるオオムギ品種縞系6とlk2の表現型が異なり、半数体倍加系統群で分離が認められ連鎖解析に利用できるモチウルチ性(Klamer and Blander 1961)、皮裸性(Kikuchiら2003)および長短芒性(武田ら2004)を以下のように調査した。また、条性は、7H染色体以外の形態マーカーではあるが、縞系6とlk2の表現型が異なり半数体倍加系統群で分離が認められるため、期待分離比に適合するか調査した。長短芒性と条性の調査は、福岡県農業総合試験場場内のウイルスに汚染されていない圃場で1999年に栽培して出穂後、観察により行った。皮裸性の調査は、収穫物を脱穀して観察により行った。モチウルチ性の調査は、脱穀して得た種子の30粒を直径約2mmになるまでパーレスト((株)ケツト科学研究所製)でとう精したものを用いた。とう精後の種子を沃素:沃素カリ:水=1:2:3000の溶液25mLに30分浸漬後、水で3回すすぎ、100mLの水に3時間浸漬した。浸漬後の種子の色をピーカーの真上から観察し、種子が脱色して白くなった系統をモチ性、青紫色のままのものをウルチ性と判定した。調査した形態マーカーの分離比が半数体倍加系統の期待分離比に適合するか χ^2 検定を行った。

3. 分子マーカーの選定と半数体倍加系統群の遺伝子型の分離比調査

まず最初に、*rym7t* の連鎖解析に利用できる縞系6とlk2間でDNA多型を検出できる分子マーカーの選定を行った。分子マーカーの選定は、*rym7t* が7H染色体上の形態マーカーの皮裸性および長短芒性と連鎖している(福岡ら1991, 古庄・福岡1997)ことから、SSRマーカー(Ramsayら2000)とSTSマーカー(Blakeら1996, Manoら1999)から既知の染色体上の位置情報を基にして7H染色体上のものを用いた。SSR分析(Weber and May 1989)は以下のように行った。PCR反応液は、濃度を20 ng μL^{-1} に調整した鋳型DNAを1 μL 、Forward側プライマーおよびReverse側プライマーをそれぞれ10 pmol、(株)タカラバイオ社製のTaKaRa Ex Taqを0.05 μL 、付属されている10 \times Ex Taq Bufferを1 μL 、dNTP Mixtureを1 μL 、MgCl₂を

0.8 μ Lに滅菌水を合わせて10 μ Lとした。PCR反応は、94 $^{\circ}$ C 1分間後、94 $^{\circ}$ C 1分間と55 $^{\circ}$ C 1分間と72 $^{\circ}$ C 2分間を40サイクル行い、最後に72 $^{\circ}$ Cを10分間行った。DNA多型の確認は、PCR増幅産物を0.5% TBE緩衝液中にて11.3%ポリアクリルアミドゲルを用いて400Vの電圧で150分間電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線照射下で行った。STSプライマーを用いたCAPS分析(Konieczny and Ausubel 1993)は以下のように行った。PCR反応液の組成および反応条件はSSR分析と同様に行った。PCR後の増幅産物は16種類の制限酵素 *Hinf*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Eco*T14I, *Pst*I, *Dra*I, *Eco*O65I, *Eco*T22I, *Ban*II, *Hae*III, *Mbo*I, *Bsp*T107I, *Fok*I, *Csp*6I, *Hin*6I および *cfr*13I を1unitと緩衝液を加えて、それぞれ一昼夜の消化と、無処理の計17種類の処理を行った。DNA多型の確認は、1.5%アガロースゲルによる200V, 55分間の電気泳動を行い、その後はSSR分析と同様の方法で行った。さらに *rym7t* 近傍の分子マーカーの開発を目的として、10塩基のランダムプライマーを用いたバルク分析(Michelmoréら1991)によるDNA多型の検出を行った。PCR反応の鋳型となるDNAバルクの作製は、半数体倍加系統からオオムギ縞萎縮病に対して抵抗性を示した10系統、罹病性を示した10系統を選び、それぞれ10系統のDNAを等量ずつ混合して最終濃度20ng μ L⁻¹のDNA混合溶液とした。ランダムプライマーは、オペロン社製のものと福岡県農業総合試験場が所有していたものから任意の2種類を混合してPCR反応に用いた。PCR反応液は、DNA混合溶液を1 μ L, 10 pmolのランダムプライマー2種類をそれぞれ0.5 μ L, (株)タカラバイオ社製のTaKaRa Ex Taqを0.05 μ L, 付属されている10 \times Ex Taq Bufferを1 μ L, dNTP Mixtureを1 μ L, MgCl₂を1 μ Lに滅菌水を合わせて10 μ Lとした。PCR反応は、94 $^{\circ}$ C 1分間後、94 $^{\circ}$ C 1分間と35 $^{\circ}$ C 2分間と72 $^{\circ}$ C 3分間を45サイクル行い、最後に72 $^{\circ}$ Cを10分間行った。DNA多型の確認は、PCR増幅産物を0.5% TBE緩衝液中にて1.5%アガロースゲルによる200V, 55分間電気泳動を行い、その後はSSR分析と同様の方法で行った。縞系6とlk2間でDNA多型が検出できた分子マーカーについては、縞系6とlk2交配F₁由来の半数体倍加系統における遺伝子型の調査を行った。この調査で得られた遺伝子

型の分離比が、半数体倍加系統の理論的な期待分離比の1:0:1(縞系6型:ヘテロ型:lk2型)に適合するか χ^2 検定を行った。

結果と考察

1. 半数体倍加系統群の作出

第1表に、縞系6とlk2由来のF₁と*H. bulbosum*との受粉穎花数、幼胚着生数、半数体作出数、半数体倍加処理数、半数体作出数および受粉穎花数に対するそれぞれの作出率を示した。受粉穎花数に対する幼胚着生率では、1996年、1997年および1999年でそれぞれ54.0%, 41.8%および23.5%であり、平均41.9%であった。1999年の受粉穎花数に対する幼胚着生率が他の年次に比べてかなり低かった。この原因は、生育中のハウス内の低温が原因と考えられる出穂の遅延により、交配時期に野生オオムギの花粉が十分得られず、受粉の作業精度が低くなったためと考えられた。半数体倍加系統の作出率を高位安定化するには、交配時期に十分量の花粉を得ることが重要である。そのため対策として、交配に最適な時期に出穂するように最低気温が15 $^{\circ}$ C以上に維持と管理ができる環境を整えることが重要である。次に、受粉穎花数に対する半数体作出率では、1996年、1997年および1999年でそれぞれ14.3%, 17.8%および7.1%, 平均13.6%であった。この結果は、Furushoら(1990)が行った二条オオムギ品種3組合せのF₁を用いた結果の12.1~23.9%に比較して同等かやや低い結果であった。半数体の作出率に差を生じる原因としては、交配時の温度および作業の熟練度(古庄ら1987)の他に、オオムギ品種と*H. bulbosum*との交配親和性の差(Devauxら1990, Furushoら1990)、胚培養におけるカルス生長量や不定芽再分化率を高める遺伝子の存在(Komatsudaら1991, Manoら1996)などが報告されている。本実験では、1999年度の半数体作出率が低下したが、これは受粉作業の精度低下が主な原因であり上述の他の要因の影響は小さかったと考えられる。半数体倍加系統作出率は、受粉穎花数に対して1996年、1997年および1999年でそれぞれ3.7%, 7.2%および2.1%, 平均4.5%であった。3年間の半数体倍加系統の作出を行った結果、2309の受粉穎花数に対して103系統の半数体倍加系統が得られ、その作

第1表 *bulbosum*法による大麦幼胚着生率、半数体作出率、半数体倍加処理および半数体倍加系統作出率。

年度	受粉穎 花数(a)	幼胚着生		半数体作出		半数体倍加 処 理		半数体倍加 系統作出	
		数(b)	b/a%	数(c)	c/a%	数(d)	d/a%	数(e)	e/a%
1996	929	502	54.0	134	14.3	100	10.8	34	3.7
1997	775	324	41.8	138	17.8	125	16.1	56	7.2
1999	605	142	23.5	43	7.1	43	7.1	13	2.1
合計	2309	968	41.9	315	13.6	268	11.6	103	4.5

第2表 半数体倍加系統群におけるオオムギ縞萎縮病抵抗性およびその他の表現型分離.

形態	調査系統数	表現型		系統数		χ^2 値 (1:1)	P
		縞系6型	lk2型	縞系6型	lk2型		
オオムギ縞萎縮病 (I型) 条性	95	抵抗性:感受性		48:47	0.011	0.90<	
皮裸性	95	六条:二条		49:46	0.095	0.70-0.80	
モチウルチ性	95	裸性:皮性		46:49	0.095	0.70-0.80	
長短芒性	94	モチ性:ウルチ性		48:46	0.043	0.80-0.90	
	95	長芒:短芒		50:45	0.263	0.50-0.70	

第3表 分子マーカーの選定.

分析方法	プライマーの種類		DNA 多型 検出率 (b/a%)	半数体倍加系統群の遺伝子型分離比が1:1に適合した分子マーカー数 ¹⁾
	調査数 (a)	DNA 多型 検出数 (b)		
SSR	59	13	22.0	12
CAPS	47	17	36.2	17
RAPD ²⁾	4008	7	0.2	7

1) 縞系6とlk2交配F1由来の94の半数体倍加系統を調査し、 χ^2 検定を有意水準5%で行った結果.

2) バルク分析での結果.

出率は4.5%であった.

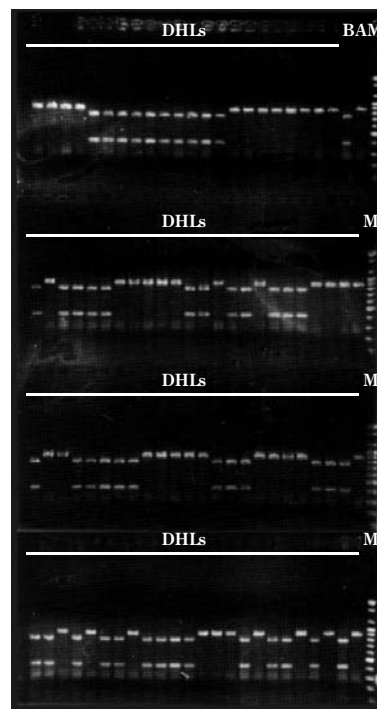
2. 半数体倍加系統群におけるオオムギ縞萎縮病抵抗性およびその他の形質の分離比

出芽やその後の生育が不良であった系統を除いた半数体倍加系統における *rpm7l* 由来のオオムギ縞萎縮病抵抗性とその他の形質の分離比を第2表に示した. オオムギ縞萎縮病は, 抵抗性:感受性が48系統:47系統で, 半数体倍加系統の期待分離比1:1に適合した. また, その他の形態マーカーについても, 条性では六条:二条が49系統:46系統, 皮裸性では裸性:皮性が46系統:49系統, モチウルチ性ではモチ性:ウルチ性が48系統:46系統, 長短芒性では長芒:短芒が50系統:45系統で, いずれも半数体倍加系統の期待分離比1:1に適合した.

3. 分子マーカーの選定と遺伝子型の分離比

SSR分析, CAPS分析およびバルク化したDNAを用いたRAPD分析を行った結果, 縞系6とlk2間でDNA多型を検出したSSRマーカー, CAPSマーカーおよびRAPDマーカーをそれぞれ17種類, 13種類および6種類の合計36種類選定できた(第3表). DNA多型の検出率は, 国内二条大麦品種間(内村ら2004)に比べて高かった. これは縞系6とlk2が, 裸性の六条オオムギと皮性の二条オオムギであるという形態の違いからみて, 遺伝的多様性が高いと推定されるためと, SSR分析においてポリアクリルアミドゲルを用いたことでわずかな差のDNA多型を検出できたためと考えられた. 次に, 半数体倍加系統の遺伝子型の分離比を調査した結果を第3表に示した. SSRマーカーとCAPSマーカーは, ヘテロ型を検出できる共優性マーカー

であるが, 選定したこれらの分子マーカーにおける半数体倍加系統群の遺伝子型を調査したところ, ヘテロ型は全く検出されず(第1図), 選定した分子マーカー30種類のうち, 29種類が半数体倍加系統の遺伝子型の期待分離比である1:0:1(縞系6型:ヘテロ型:lk2型)に適合した(第3表). 一方, バルク分析により選定したRAPDマーカーは,



第1図 CAPSマーカーにおけるオオムギ半数体倍加系統の遺伝子型の調査.

1) M; サイズマーカー(100bp Ladder), A; 縞系6, B; lk2, DHLs; 半数体倍加系統.

優性マーカーでヘテロ型が検出できないため、半数体倍加系統の期待分離比は1:1(稿系6型:lk2型)となる。選定した7種類のRAPDマーカーは、半数体倍加系統群の遺伝子型の分離比を調査したところ、すべて期待分離比に適合した(第3表)。

4. 半数体倍加系統の遺伝解析材料としての適性

半数体倍加系統のオオムギ縞萎縮病抵抗性の評価では、オオムギ縞萎縮病汚染圃場による3年分の評価とELISA検定により、抵抗性と感受性の系統数が期待分離比に適合する信頼性の高いデータが得られた。繰り返し形質評価を行うことは、環境による変異の影響を小さくすることができ、精度の高いデータが得られることから、QTLの検出力を高めることができる(Lander and Botstein 1989)など精度の高い遺伝解析が可能である。形態や分子マーカーにおける半数体倍加系統群の分離比の歪みは、形質の誤分類などの実験上のミスや生物学的要因を検討する必要がある(鶴飼 2000)。本実験で選定した形態マーカーと分子マーカーの36種類は理論的なメンデル分離比に適合した。このことから、今回作出した半数体倍加系統群の形態と分子マーカーにおける遺伝子型の評価は正しく行われたと判断した。*H. bulbosum*との交雑親和性の品種間差(Furushoら1990)からみた再分化能力の差を生じる遺伝子(Thompsonら1991, 小西ら1994)など特異的な遺伝子との連鎖は無かったのであろう。条性、長短芒性とモチウルチ性の評価および分子マーカーによる遺伝子型の調査は、オオムギ縞萎縮病抵抗性検定とは別の圃場で栽培を行い、いずれも評価と分析用に十分量の材料を確保できた。半数体倍加系統は、遺伝的に固定されているため維持・増殖が容易であり、ビール用二条オオムギにおいて、重要な農業形質である醸造適性など多量の分析用サンプルを必要とする形質や、環境の影響を受けやすく数年間の評価が必要な収量関連形質(馬場ら1998)などの遺伝解析の材料として適すると考えられる。また、半数体倍加系統の遺伝子型は、今回選定した分子マーカーからみて、完全なホモ接合体であった。そのため、劣性遺伝子である*rym7t*由来のオオムギ縞萎縮病抵抗性やモチウルチ性の表現型が判別でき、さらに分子マーカーによる遺伝子型との対応を確認することもできた。また、優性マーカーでヘテロ型が検出できないRAPDマーカーも有効活用できた。

半数体の育種への利用について、古庄ら(1988, 1990)は半数体の世代でオオムギ縞萎縮病抵抗性やうどんこ病抵抗性の評価を行い、通常之交雑育種と比べて早い世代での選抜が可能としている。これらの抵抗性遺伝子の有無を判別できる分子マーカーの開発は、半数体の幼植物の数mgの葉から抽出したDNAを鋳型にしたPCR反応により、抵抗性個体の精度の高い選抜を可能にする。そのため、半数体の幼植物をウイルスで均一に汚染された環境条件を維持管理して耐病性の検定を行うより、より精度が高い効率的

な育種選抜が可能になると考えられる。選抜した系統は速やかにコルヒチン処理を行い、固定系統として生産力検定を行うなど育種期間の短縮が可能になる。

引用文献

- 馬場孝秀・山口修・古庄雅彦 1998. ビール大麦の収量および外観品質における品種×年次交互作用. 日作紀 67: 510-515.
- Blake, T. K, D. Kadqrzhanova, K. W. Shepherd, A. K. M. R. Islam, P. L. Langridge, C. L. McDonald, J. Erpelding, S. Larson, N. K. Blake and L. E. Talbert 1996. STS-PCR markers appropriate for wheat-barley introgression. *Theor. Appl. Genet.* 93: 826-832.
- Darvasi, A. and Solter, M. 1994. Optimum spacing of genetic markers for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci. *Theor. Appl. Genet.* 89: 351-357.
- Devaux, P., Adamski, T. and Surma, M. 1990. Studies on low crossabilities encountered with the *Hordeum bulbosum* method for haploid production of barley, *Hordeum vulgare* L. *Plant Breed.* 104: 305-311.
- 福岡忠彦・古庄雅彦・牧野徳彦 1991. モチ性オオムギ品種'徳島モチ裸'に存在する新しい縞萎縮病抵抗性遺伝子について. 育雑 41 (別 2): 388-389.
- 古庄雅彦・浜地勇次・伊藤昌光 1987. 半数体利用によるビール大麦の育種方法. 1. 効率的な半数体の作出法. 日作九支報 54: 92-94.
- 古庄雅彦・浜地勇次・吉田智彦 1988. オオムギ半数体倍加系統の大量作出法と半数体におけるうどんこ病抵抗性の選抜. 育雑 38 (別 2): 336-337.
- 古庄雅彦・浜地勇次・吉田智彦・中島阜介 1990. 半数体におけるオオムギ縞萎縮病の選抜. 育雑 40 (別 1): 290-291.
- Furusho, M., Y. Hamachi and T. Yoshida 1990. Varietal difference in cross-ability between Japanese two-rowed barley and *Hordeum bulbosum* L.. *Japan J. Breed* 40: 411-417.
- 古庄雅彦・福岡忠彦 1997. オオムギ縞萎縮病抵抗性の遺伝子分析とその利用. 農研センター研報 27: 31-71.
- 井辺時雄・吉村淳 1999. イネ育種においてDNAマーカーは使えるのか?. 育種学最近の進歩 41: 63-66.
- 岩佐友彦・高橋秀和・武田和義 1999. 大麦種子感水性のQTLマッピング. 岡大資生研報 6: 21-28.
- Kai, H., T. Baba, M. Tsukazaki, Y. Uchimura and M. Furusho 2003. The QTL analysis of hull-cracked grain in Japanese malting barley. *Breeding Sci.* 53: 225-230.
- Kikuchi, S., S. Taketa, M. Ichii and S. Kawasaki 2003. Efficient fine mapping of the naked caryopsis gene (*nud*) by HEGS (High Efficiency Genome Scanning) / AFLP in barley. *Theor. Appl. Genet.* 108: 73-78.
- Klamer, H. H. and B. A. Blander 1961. Orientating linkage maps on the chromosome of barley. *Crop Sci.* 1: 339-342.
- Komatsuda, T., T. W. Lee, H. Sato, T. Annaka, S. Enomoto, M. Kang and S. Oka 1991. A genetical factors enhancing plant regeneration linked with the *V-v* locus in *Hordeum vulgare* L. *Japan J. Breeding* 41: 661-664.
- Konieczny, A. and F. M. Ausubel 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4: 403-410.

- 小西猛朗・T. M. Choo・吉見良太 1994. オオムギ半数体倍加系統にみられる分離比の歪み. 育種 44 (別 1) : 226.
- 草場敏彦・遠山明・建部実次 1965. 大麦縞萎縮病に対するビール麦品種の被害抵抗について. 中国農業研究 33 : 36-38.
- Lander E. S., Green P., Abrahamson J., Batlow A., Daly M. J., Lincoln S. E., Newburg L. 1987. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1 : 174-181.
- Lander, E. S. and D. Botstein 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121 : 185-199.
- Mano Y., H. Takahashi, K. Sato and K. Takeda 1996. Mapping genes for callus growth and shoot regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Breeding Science* 46 : 137-142.
- Mano Y., B. E. Sayed-Tabatabaei, A. Graner, T. Blake, F. Takaiwa, S. Oka and T. Komatsuda 1999. Map construction of sequence-tagged sites (STSs) in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98 : 937-946.
- Michelmore, R. W., Paran, I., and Kesseli, R. V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 9828-9832.
- Miyazaki, C., E. Osanai, K. Saeki, K. Ito, T. Konishi, K. Sato and A. Saito 2001. Mapping of quantitative trait loci conferring resistance to barley yellow mosaic virus in a Chinese barley landrace Mokusekko 3. *Breeding Sci.* 51 : 171-177.
- 岡田吉弘・木原誠・斉藤渉・河田尚之・伊藤一敏 2002. 日本および北米の優良ビール大麦品種を用いた麦芽品質のゲノム解析. 育種学研究 4 (別 2) : 320.
- Ramsay, L., M. Macaulay, S. degli Ivanissevich, K. MacLean, L. Cardle, J. Fuller, K. J. Edwards, S. Tuveesson, M. Morgante, A. Massari, E. Maestri, N. Marmioli, T. Sjakste, M. Ganal, W. Powell and R. Waugh 2000. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156 : 1997-2005.
- 高橋義行 1988. ELISA 法—その特徴と実施上の注意点—. 植物防疫 42 : 88-92.
- 武田真・櫻井幸恵・天野里子・Asif Javaid・一井眞比古 2004. オオムギ 7H 染色体に座乗する密穂および短芒遺伝子のマッピング. 育種学研究 6 (別 1) : 54.
- Thompson, D. M., K. Chalmers, R. Waugh, B. P. Forster, W. T. B. Thomas, P. D. S. Caligari 1991. The inheritance of genetic markers in microspore-driven plants of barley *Hordeum vulgare* L. *Theor. Appl. Genet.* 81 : 487-492.
- 遠山明・草葉敏彦 1970. オオムギ縞萎縮病の伝染について: 第 2 報 *Polymyxa graminis* Led. による媒介. 日植病報 36 : 223-229.
- 内村要介・古庄雅彦・吉田智彦 2004. 国内二条大麦の DNA マーカーによる品種識別. 日作紀 73 : 35-41.
- 鶴飼保雄・大澤良・斉藤彰・林武司 1995. DNA 多型連鎖地図作成と QTL 解析のためのコンピュータ・プログラム MAPL. 育種 45 : 139-142.
- 鶴飼保雄 2000. ゲノムレベルの遺伝解析. 東京大学出版会, 東京. 1-345.
- 氏原和人・藤井敏男・野沢清一・関口忠男 1984. 大麦縞萎縮病とビール大麦品質. 育種 34 (別 1) : 302-303.
- Weber, J. K. and P. E. May 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44 : 388-397.
- 矢野昌裕・春島嘉章 1994. 分子マーカーを利用したイネ量の形質の遺伝解析. 育種学最近の進歩 36 : 29-32.

Production of Doubled Haploid Lines for Genetic Analysis of Useful Characters of Malting Barley : Yosuke UCHIMURA^{1,2)}, Masahiko FURUSHO¹⁾, Takahide BABA¹⁾, Osamu YAMAGUCHI¹⁾, Hiroomi KAI¹⁾, Morihito TSUKAZAKI¹⁾ and Tomohiko YOSHIDA³⁾ (¹⁾ Fukuoka Agr. Res. Cent., Chikushino 818-8549, Japan; ²⁾ Tokyo Univ. of Agr. and Tech.; ³⁾ Utsunomiya Univ.)

Abstract : To develop a DNA marker assisted selection system for lines with recessive resistance gene to all races of barley yellow mosaic virus (BaYMV), we produced doubled haploid lines (DHLs) of barley (*Hordeum vulgare* L.) by the *bulbosum* method. Japanese six-rowed barley cultivar Shimakei 6 with a gene for resistance to all races of BaYMV was crossed with susceptible two-rowed barley cultivar Ik2. DHLs were obtained by pollinating the F₁ plants with pollen of *H. bulbosum* L.. Frequency of DHLs obtained was 4.5% of the pollinated florets. Ninety five DHLs were classified into 48 resistant and 47 susceptible lines in the field infected with BaYMV strain I. This segregation ratio fitted a theoretical ratio of 1:1. Segregation ratios determined with 36 molecular markers also fitted a theoretical ratio of 1:1 except for one marker. No heterozygous genotype was observed. DHLs are useful because we could obtain fixed lines with a completely homogeneous phenotype in a short period, and reliable repeated evaluation of phenotype is possible because they are fixed without segregation by seed multiplication.

Key words : Barley, Doubled haploid lines, Genetic analysis, *H. bulbosum* L., Molecular marker.