

## オオムギうどんこ病抵抗性遺伝子の QTL マッピング

岩佐友彦・部田英雄\*・武田和義

QTL Mapping for Powdery Mildew (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *hordei* EM Marchal) Resistance in Barley (*Hordeum vulgare* L.)

Tomohiko IWASA, Hideo HETA and Kazuyoshi TAKEDA

Powdery mildew, caused by *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *hordei* EM Marchal, is a serious disease of Barley (*Hordeum vulgare* L.). In this study, we used molecular markers to identify the chromosomal locations carrying genes for powdery mildew resistance and to estimate the effect of each gene. Doubled haploid lines derived from Steptoe×Morex (S/M), Harrington×TR306 (H/T) and their parental lines were inoculated with five powdery mildew strains. Several quantitative trait loci (QTL) controlling *E. graminis* resistance were found and located on chromosome 4H, 5H, 6H and 7H in S/M. On the other hand, no QTL was detected in H/T but Harrington had a major resistant gene (*Mlg*) for powdery mildew resistance.

Marker-assisted selection was conducted to examine the effect of accumulation for mildew resistance. There was a significant interaction between QTLs located in 4H and 7H, which suggested the presence of an epistatic effect between these QTLs.

**Key words:** *Hordeum vulgare*, *Erysiphe graminis*, QTL mapping, DH lines.

### 結 言

オオムギうどんこ病 (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *hordei* EM Marchal) はオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) の重要病害であり, 多くの抵抗性主働遺伝子が同定され (Jørgensen

1992), 育種に利用されている。日浦・部田 (1957) は日本のうどんこ病菌に対するオオムギ品種の抵抗性遺伝子について  $M_1$  から  $M_{18}$  までの18の抵抗性遺伝子を見出し, それらの連鎖関係について明らかにしている。オオムギうどんこ病菌は活物寄生菌であるので, 各地域に栽培されているオオムギとの間に密接な関係を持って分化しており, その結果, 特定の地域に生育するオオムギに対して病原性を示す。日浦・部田 (1959), (1961 a, b) は日本各地から採集したオオムギうどんこ病菌を11のレースに判別した。また, オオムギうどんこ病の抵抗性遺伝子はそれに対する特異的な病原性遺伝子の存在によって感受性となるので, これらのレースに対して安定して抵抗性を示す品種を育成するためには, 11全てのレースに対して抵抗性を示す  $Jm_{sn}$  のような抵抗性遺伝子をオオムギの近縁野生種や日本から遠く離れている地域で栽培されているオオムギから導入する必要があるとした。

しかしながら, これらの抵抗性主働遺伝子は病原菌の菌株に対して特異的であるため, 病原性遺伝子の変異などによって, 育成した抵抗性品種は容易に抵抗性を消失してしまう。また, 部田 (1989) はうどんこ病抵抗性遺伝子  $Jm_{sn}$  に対する非病原性菌株間の交雑後代から病原性を示す系統が選抜できることを示した。従って, 永続的な抵抗性品種の育成には菌株に非特異的な圃場抵抗性遺伝子を利用することが必要と考えられるが, 圃場抵抗性遺伝子については関与する遺伝子の数や作用について分からないことが多い (Geiger and Heun 1989)。

一方, RFLP マーカーを用いた連鎖分析の結果によれば, 3H を除く全ての染色体にオオムギうどんこ病の抵抗性遺伝子が見出されている (Saghai Maroof et al. 1994)。また, 倍加半数体系統を用いた QTL 解析による量的抵抗性を支配する遺伝子のマッピングの結果から, それらが5H および7H に座乗していることが明らかにされている (Backes et al. 1995, Heun 1992)。今後さらにうどんこ病抵抗性を支配する量的遺伝子の座乗位置が明らかにされれば, 抵抗性遺伝子と密接に連鎖した分子マーカーによる抵抗性系統の間接選抜が可能となろう。

本研究では異なった菌株に対し抵抗性を示す遺伝子の染色体上の座乗位置とその作用力を解析するために, 2 組合せの倍加半数体集団およびそれらに関するマーカー情報を用いて抵抗性遺伝子の QTL マッピングを行った。

## 材料および方法

### 1. 供試オオムギ品種ならびに系統

オオムギ品種 Steptoe×Morex (以下 S/M) および Harrington×TR306 (以下 H/T) の2交雑組合せからバルボッサム法によって育成された倍加半数体 (以下 DH) 147 (S/M) および144 (H/T) 系統ならびにそれらの両親を供試した。なお, 両 DH 系統群と親品種ならびにマーカー情報は North American Barley Genome Mapping Project より提供された。

### 2. 接種検定

DH 系統および親品種を育苗箱 (50×35×10cm) 1箱につき各系統5個体ずつ計40系統播種し, 18~25℃に調節した隔離温室で2葉期まで育苗後, S/M にはオオムギうどんこ病菌の h81, h83 を, H/T には h9, h4 および k6 の分生子をそれぞれ接種した。接種後10日目に各系統について抵抗性スコアを以下の基準に基づき6段階 (0: 抵抗性~5: 罹病性) で評価した。

- 0 : 肉眼的に葉は完全に健全であり、病徴は全く認められない。
- 1 : 菌糸および分生子は認められないが、小さな褐斑あるいは黄変のえ死斑ができる。
- 2 : 菌糸がわずかに発生し、分生子を形成する。多くは顕著な褐斑あるいは黄斑ができる。
- 3 : かなりの菌糸が発生し、分生子を形成する。また、いろいろな程度の褐斑あるいは黄斑ができる。
- 4 : 多くの菌糸が発生し、よく分生子を形成する。また、わずかの褐斑あるいは黄斑ができる。
- 5 : 多くの菌糸が発生し、豊富に分生子を形成する。

### 3. QTL 解析

抵抗性のデータと222 (S/M) および127 (H/T) のマーカー情報に基づき、MAPMAKER/QTL1.1を用いて interval mapping を行い、LOD score が2.0以上のものを有意なQTLとしてうどんこ病抵抗性を支配する遺伝子の座乗位置と各遺伝子の効果を推定した。

## 結果および考察

### 1. 両親および DH 系統群の抵抗性スコア

本実験に供試した菌株に対し、Step toe と Harrington は抵抗性 (抵抗性スコア : 0 ~ 2) を、Morex と TR306 は罹病性 (3 ~ 4) を示した (Figs. 1, 2)。また、両組合せの DH 系統群において抵抗性スコアは二頂分布に近い変異を示し (Figs. 1, 2)。特に H/T で

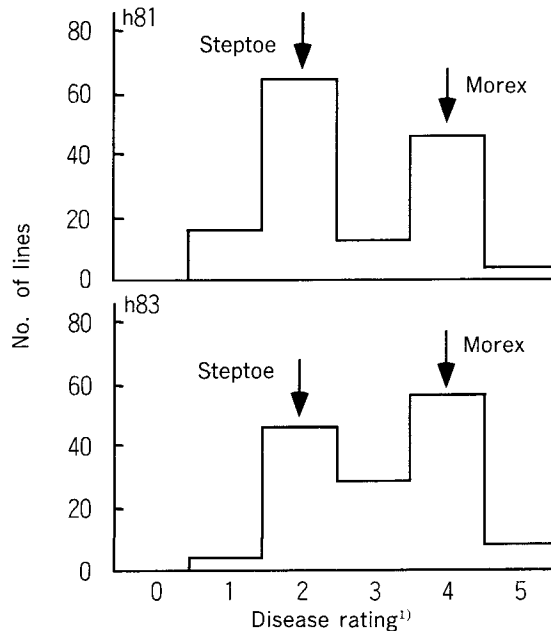


Fig. 1. Variation for disease ratings in DH lines (Step toe × Morex).  
 1) From 0 (resistant) to 5 (susceptible).  
 Arrows indicate parental infection type.

は、供試したいずれの菌株に対しても抵抗性と罹病性が1：1の期待分離比に適合したことから ( $\chi^2=2.31$  (h4), 2.86 (h8, k6)), これらの菌株に対して Harrington は抵抗性の主働遺伝子を持つものと考えられた。

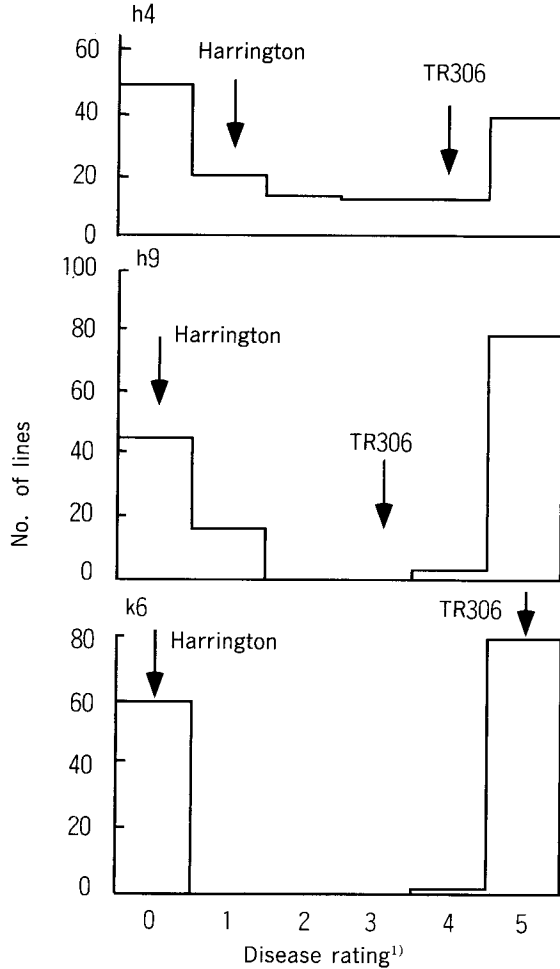


Fig. 2. Variation for disease ratings in DH lines (Harrington x TR306).  
1) From 0 (resistant) to 5 (susceptible). Arrows indicate parental infection type.

## 2. QTL 解析による抵抗性遺伝子の位置と効果の推定

interval mapping によって QTL の位置と効果を推定したところ, S/M に h81 を接種した場合には 4H, 6H および 7H に有意な QTL が見出され, 同じく h83 を接種した場合には 5H および 7H 上に有意な QTL が見出された (Figs. 3, 4). また, うどんこ病の全変異に対するこれらの QTL の効果はそれぞれ 26.4% (h81) および 19.6% (h83) であった (Table 1). 両菌株に対して 7H に見出された QTL はいずれも座乗位置が異なり, それぞれ異なった抵抗性遺伝子であると考えられた. このように, 供試した菌株に対しそれぞれ異なった複数の抵抗

性遺伝子が関与していることは、S/M の分離集団に見られた二頂分布が主働遺伝子によって支配されるような単純なメンデル分離ではないことを示唆する。また、供試したいずれの菌株に対しても罹病性を示した Morex が抵抗性の QTL を 1 個は持つことが明らかとなった (Table 1)。

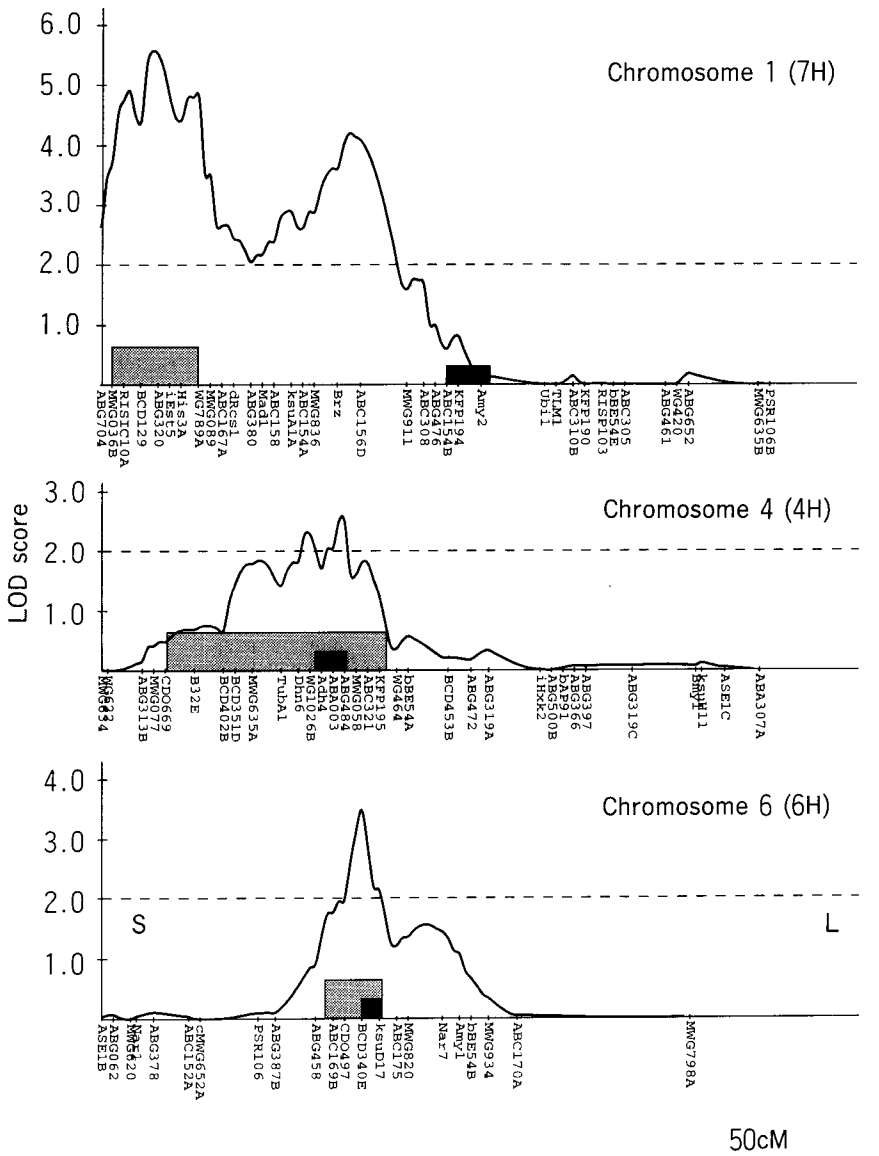


Fig. 3. LOD score for the QTL analysis of powdery mildew resistance in barley (S/M, h81).  
 ■: Centromere of the chromosome  
 ▨: Confidence intervals of the QTL

うどんこ病抵抗性遺伝子のマッピング

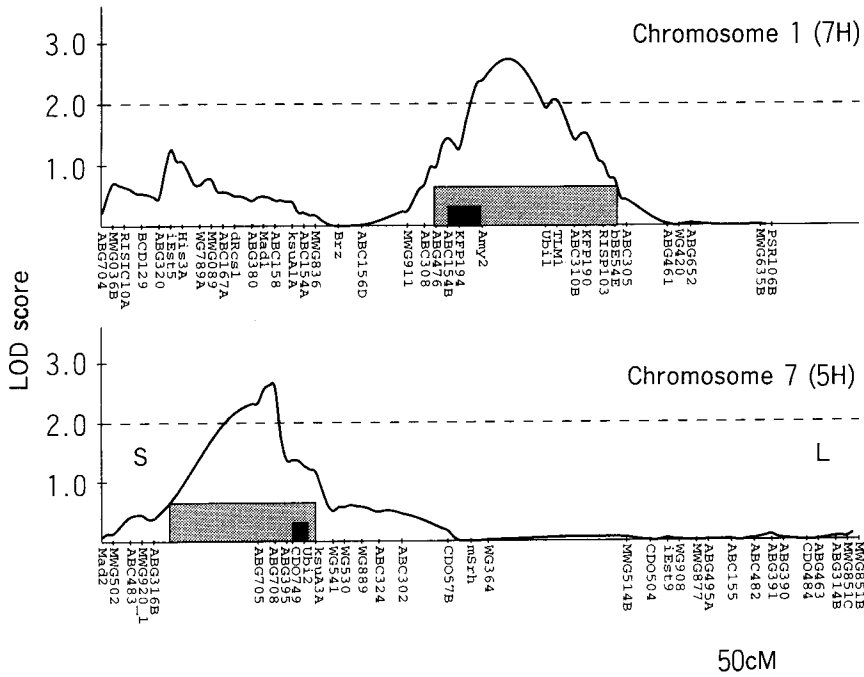


Fig. 4. LOD score for the QTL analysis of powdery mildew resistance in barley (S/M, h83).

■: Centromere of the chromosome  
 ■: Confidence intervals of the QTL

Table 1. Location of QTL affecting powdery mildew resistance in barley

Cross	Isolate	Chr.	Marker interval	LOD	r <sup>2</sup>	Weight	
S/M	h81	4H	ABG484-MWG058	2.5	0.075	0.6S <sup>a</sup>	
		6H	BCD340E-ksuD17	3.5	0.103	0.7M	
		7H	BCD129-ABG320	5.6	0.166	0.9S	
				<i>multilocus</i>	9.7	0.264	
h83		5H	ABG705-ABG708	2.6	0.083	0.7S	
		7H	Amy2-ubi-1	2.7	0.104	0.7M	
				<i>multilocus</i>	5.9	0.196	
H/T	h4	4H	MWG716-dMlg	124.4	0.981	4.7T	
		h9	4H	MWG716-dMlg	75.3	0.920	4.2T
		k6	4H	dMlg-ABG715	302.8	1.000	5.0T

a): Parents contributing higher value allele.

S: Steptoe, M: Morex, T: TR306

H/Tにおいて4Hに見出された抵抗性遺伝子は作用力 (weight) が大きく (4.2~5.0), 全変異に対する QTL の効果を示す r<sup>2</sup>は0.98~1.00といずれも 1 に近似した. なおかつこれらの QTL はいずれも 4H に座乗する抵抗性主働遺伝子である *Mlg* の極めて近傍に位置した (Table 1). また, 各 DH 系統の 3 菌株に対する抵抗性スコアについて相関係数を求めたと

ころ、 $r=0.94\sim 0.99$ といずれも1に近似した。そこでH/T系統群にみられた抵抗性スコアの分離が1つの主働遺伝子によって支配されていると仮定し、スコアによって抵抗性(0~2)と罹病性(3~5)の2群に分類すると、各DH系統の3菌株に対する抵抗性は1つの系統を除き完全に一致した。これらのことから、H/Tにおいて見出されたHarrington由来の3抵抗性遺伝子は既知のうどんこ病抵抗性遺伝子 *Mlg* と同座または極近傍の抵抗性主働遺伝子である可能性が高いとみられた。なお、抵抗性が一致しなかった1系統は検定時における誤分類であると思われる。

### 3. QTL マーカーによる間接選抜の効果

S/Mにおいて見出された各QTLの近傍のマーカーによってDH系統群を分類し、抵抗性スコアの平均値を比較した結果、いずれのマーカーについても選抜の効果は統計的に有意であった。さらに、複数のマーカーによって抵抗性遺伝子を集積すると選抜の効果は顕著であった(Table 2)。このことから、マーカーによる抵抗性系統の間接選抜によって抵抗性は高まり、またより多くのQTLを集積することによって抵抗性を間接的に集積することが可能であると考えられた。しかしながら、h81に対して抵抗性を示すQTLのうち、6Hおよび7Hに見出されたQTL間に5%水準で有意な交互作用が認められ、これらのQTL間にエピスタシスが存在することが示された(Table 3)。このことは、複数のQTLを一つの系統に集積する場合、それらのQTLの間にエピスタシスが存在すれば抵抗性は必ずしも相加的には増大しないことを示しており、育種上留意すべき点と考えられる。一方、H/Tにおいては本実験の供試菌株に対していずれも抵抗性を示す *Mlg* あるいはそれと同座の抵抗性主働遺伝子が関与しており、系統の約半数は高度抵抗性を示したので、この交雑組合せについてうどんこ病の圃場抵抗性を支配するQTLを見出すには *Mlg* に対して病原性を示す菌株を用いる必要がある。

Table 2. Comparison of powdery mildew resistance scores between averages of resistant and susceptible DH line subsets selected by Putative markers linked with QTL

Isolate	Marker	Chrom.	R <sup>1)</sup>	S <sup>1)</sup>	t-value	
h81	ABG484 (a)	4H	2.62	3.22	3.44***	
	BCD340E (b)	6H	2.63	3.29	3.94***	
	ABG320 (c)	7H	2.56	3.41	5.34***	
	a+b			2.42	3.56	5.51***
	b+c			2.46	3.80	7.01***
	a+c			2.33	3.61	6.50***
	a+b+c			2.32	3.89	6.84***
h83	ABG708 (d)	5H	2.87	3.50	3.50***	
	Amy2 (e)	7H	2.98	3.58	3.35***	
	d+e			2.67	3.91	5.48***

\*\*\*: Significant at the 0.1% level

1): Letter suffix "R" or "S" indicates average scores of DH line subsets with mildew resistant or susceptible QTL, respectively.

Table 3. Analysis of variance for the average mildew resistance scores between DH lines grouped by marker genotypes of Steptoe and Morex

Isolate	Marker	df	MS	F	
h81	ABG320 (a)	1	21.10	26.28	***
	ABG484 (b)	1	5.50	6.85	**
	BCD340E (c)	1	10.15	12.64	***
	a×b	1	0.04	0.05	NS
	b×c	1	0.00	0.00	NS
	a×c	1	3.50	4.36	*
	a×b×c	1	1.55	1.93	NS
Error	132	0.80			
h83	Amy2 (d)	1	10.97	10.43	**
	ABG708 (e)	1	14.29	13.54	***
	d×e	1	0.38	0.36	NS
	Error	136	1.06		

\*,\*\* and \*\*\*: Significant at the 5, 1 and 0.1% levels, respectively.

うどんこ病抵抗性遺伝子の座乗染色体については多くの報告があり、宿主と菌株との間の共進化の結果として、1H (*Mla*) および4H (*Mlg*) に複雑な gene family が形成されていることが知られている (Jahoor et al. 1993). RFLP マーカーを用いたうどんこ病抵抗性遺伝子に関する連鎖分析の結果から、これまでに3Hを除く全ての染色体に抵抗性遺伝子が座乗することが明らかにされている (Jensen et al. 1980, Hayashi and Heta 1985, Hinze et al. 1991, Hilbers et al. 1992, Kleinhofs et al. 1993, Saghai Maroof et al. 1994). また、倍加半数体系統を用いた遺伝子のマッピングの結果から、Heun (1992) は5H および7H にうどんこ病抵抗性を支配する QTL を見出し、それらによって全変異の19.8%が説明できるとした。また Backes ら (1995) は7H に全変異の9%を説明できる QTL を見出した。本実験において見出された QTL のうち、h81 および h83 (S/M) に対して抵抗性を示す QTL はこれら5H および7H に見出された QTL と同様に5H (h83) および7H (h81) 染色体の短腕上に見出された。これらの QTL がいずれも異なった遺伝的背景を持つ DH 系統群において見出されたことは興味深い。4H および6H に見出された QTL (h81) はうどんこ病抵抗性遺伝子 *ml-o* (4H) および *mlh* (6H) の近傍に位置したことから、これらの QTL と *ml-o* および *mlh* との関連についてはさらに詳細に検討する必要があるものと考えられる。

H/Tにおいて見出された4Hに座乗する抵抗性遺伝子は *Mlg* と同一または極近傍の抵抗性遺伝子で、h4, h9 および k6 に対して強い抵抗性を持つものと考えられる。一方、S/Mにおいて見出された複数の抵抗性遺伝子は作用力は小さいが、供試した菌株に対してそれぞれ特異的に反応する抵抗性遺伝子であるとみられた。うどんこ病抵抗性品種の育成に当たっては、レース特異的な真性抵抗性だけでなく、レース非特異的で安定して抵抗性を発揮するような圃場抵抗性も高める必要がある。従って、今後さらに詳細なマーカー情報から菌株に対して非特異的な抵抗性を発現する QTL を見出し、それらを集積することによってうどんこ病に対し安定して抵抗性を示すような系統を作出できるものと考えられる。



摘 要

オオムギ品種 Steptoe×Morex (S/M) および Harrington×TR306 (H/T) の2交雑組合せからバルボッサム法によって育成された倍加半数体 (DH) 系統を用い、オオムギうどんこ病菌 h81, h83 (S/M), h9, h4 および k6 (H/T) に対する抵抗性を調べ、抵抗性のデータとマーカー情報からオオムギうどんこ病抵抗性を支配する遺伝子の位置と効果を QTL マッピングにより推定した。その結果、S/M では各菌株に対して特異的に発現するいくつかの抵抗性遺伝子が 4H, 5H, 6H, および 7H に見出された。一方、H/T においてはいずれの菌株に対しても DH 系統群の抵抗性スコアの分離比が抵抗性：罹病性 = 1 : 1 に適合し、見出された遺伝子は抵抗性遺伝子 *Mlg* と同一あるいは同座であるとみられた。

キーワード：うどんこ病抵抗性, オオムギ, 倍加半数体 (DH) 系統, QTL マッピング

引 用 文 献

- Backes G., Graner A., Foroughi-Wehr B., Fischbeck G., Wenzel G. and Jahoor A. 1995. Localization of quantitative trait loci (QTL) for agronomic important characters by the use of a RFLP map in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 90:294-302.
- Geiger H. H. and Heun M. 1989. Genetics of quantitative resistance to fungal diseases, *Ann Rev Phytopathol* 27:317-341.
- Hayashi J. and Heta H. 1985. Association of a mildew resistance gene *Jm1<sub>n</sub>* in Hanna 906 with chromosome 6. *Barley Genet Newsl* 15:46-47.
- 部田英雄. 1989. オオムギうどんこ病抵抗性遺伝子 *Jm1<sub>n</sub>* に対する非病原性菌株間の交雑による病原性菌系の作出. *農学研究*. 61:279-286.
- Heun M. 1992. Mapping quantitative powdery mildew resistance of barley using a restriction fragment length polymorphism map. *Genome* 35:1019-1025.
- 日浦運治・部田英雄. 1957. オオムギの耐病性に関する研究. 第12報. ウドンコ病に対する抵抗性遺伝子の連鎖. *農学研究*. 14-48.
- 日浦運治・部田英雄. 1959. オオムギのうどんこ病に対する抵抗性品種について. *農学研究*. 47:72-83.
- 日浦運治・部田英雄・津島孝宏. 1961a. オオムギうどんこ病菌の Heterothallism. 病原性の変異に関する研究 I. *農学研究* 48:49-54.
- 日浦運治・部田英雄・津島孝宏. 1961b. オオムギのうどんこ病菌株における交雑による病原性の変異, 病原性の変異に関する研究 II. *農学研究* 48:107-115.
- Hinze K., Thompson R.D., Ritter E., Salamini F. and Schulze-Lefert P. 1991. Restriction fragment length polymorphism-mediated targeting of the *ml-o* resistance locus in barley (*Hordeum vulgare*). *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3691-3695.
- Hilbers S., Fischbeck G. and Jahoor A. 1992. Localization of the *Laevigatum* resistance gene *MILa* against powdery mildew in the barley genome by the use of RFLP markers. *Plant Breed* 109:335-338.
- Jahoor A., Jacobi A., Schuller C. and Fischbeck G. 1993. Genetical and RFLP studies at the *Mla* locus

- conferring powdery mildew resistance in barley. *Theor Appl Genet* 85:713-718.
- Jensen J., Jørgensen J.H., Jensen H.P., Giese H. and Doll H. 1980. Linkage of the Hordein loci *Hor1* and *Hor2* with the powdery mildew resistance loci *Ml-k* and *Ml-a* on barley chromosome 5. *Theor Appl Genet* 58:27-31.
- Jørgensen J.H. 1992. Sources and genetics of resistance to fungal pathogens. In "Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology" (Shewry, P.R., ed.), 441-457. Alden Press, Oxford.
- Kleinhofs A., Kilian A., Saghai Maroof M.A., Biyashev R.M., Hayes P., Chen F.Q., Lapitan N., Fenwick A., Blake T.K., Kanazin V., Ananiev E., Dahleen L., Kudrna D., bollinger J., Knapp S.J., Liu B., Sorrells M., Heun M., Franckowiak J.D., Hoffman D., Skadsen R. and Steffenson B.J. 1993. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare* L.) genome. *Theor Appl Genet* 86:705-712.
- Saghai Maroof M.A., Zhang Q. and Biyashev R.M. 1994. Molecular marker analysis of powdery mildew resistance in barley. *Theor Appl Genet* 88:733-740.