

分子マーカーを利用したコムギ近縁種の遺伝資源としての変異の解明

Studies on Genetic Variation in Relatives of Wheat Using Molecular Markers

(課題番号: Grant No. 12460143)

平成12年度～平成14年度 科学研究費補助金(基盤研究B1)  
Grant-in-Aid for Scientific Research, 2000-2002, Basic research (B1)

研究成果報告書  
Research Report



平成 15 年 3 月

研究代表者 河原 太八  
Leader KAWAHARA Taihachi

京都大学農学研究科助教授  
Associate Professor  
School of Agriculture, Kyoto University

科研
2002
51

## 目次: Contents

はしがき: Introduction	1
研究成果: Results	5
1. アイソザイム分析: Isozyme analysis	
(a) KAWAHARA T., Isozyme variation in species of the section Comopyrym of <i>Aegilops</i> , Genetic Resources and Crop Evolution, 47, 641-645, 2000.	5
(b) KAWAHARA T., Morphological and isozyme variation in genebank accessions of <i>Aegilops umbellulata</i> Zhuk., a wild relative of wheat, Genetic Resources and Crop Evolution, 49, 641-645, 2002.	10
2. 葉緑体ゲノムのフィンガープリンティング: Fingerprinting of chloroplast genome	
(a) ISHII T., MORI N. and OGIHARA Y., Evaluation of allelic diversity at chloroplast microsatellite loci among common wheat and its ancestral species, Theoretical and Applied Genetics, 103, 896-904, 2001.	16
(b) MORI N., ISHII, T., ISHIDO T., BELAY G., TAKUMI S., KAWAHARA T., OGIHARA Y. and NAKAMURA C., Variation in chloroplast microsatellite loci among wild and cultivated species of Emmer wheat, Proceedings of the 4th. International Triticeae Symposium, 73-76, 2001.	25
(c) JEORDAR, N-A B., MORI N. and NAKAMURA C., Transferability of hexaploid wheat ( <i>Triticum aestivum</i> ) microsatellite markers to tetraploid species ( <i>T. turgidum</i> ) carrying A and B genomes, Cereal Research Communication (in press).	32
3. SINE配列の解析: Analysis of SINE sequence	
(a) YASUI Y., NASUDA S., MATSUOKA Y. and KAWAHARA T., The Au family, a novel short interspersed element (SINE) from <i>Aegilops umbellulata</i> , Theoretical and Applied Genetics, 102, 463-470, 2001.	40

## はしがき

コムギは三大穀物の一つであり、人類の生存を支える重要な作物である。コムギ育種に当たっては、交雑の容易な野生近縁種からの有用遺伝子の導入が、もっとも効率の良い手法である。しかしコムギ近縁種は、細胞遺伝学的手法、オルガネラゲノムの解析、遺伝子や核ゲノムの分析などのさまざまな手法で種間の系統関係が明らかにされてきたグループであるが、これらはいずれも限られた少数の材料を使って進められたきた。そのためコムギ属の他の栽培種および野生種や、近縁のエギロプス属植物にどの程度の変異が存在するか、あるいはその遺伝的変異が地理的にはどのように分布しているかは、少数の種を除いて解明されていない。このため有用遺伝子の導入も、いくつかの先駆的な試みはあるが体系的には行われてこなかった。

近年タンパクの変異解析やDNAマーカーの利用など、分子生物学的手法の発達により、多くの系統を用いて変異を解析することが容易に行なえるようになった。これまでコムギ近縁種では、イスラエルのハイファ大学のNevo教授らが野生のエンマーコムギを対象にアイソザイム・種子タンパク・いくつかのDNAマーカーなど、さまざまな手法で変異を明らかにしている。またパンコムギのDゲノム親となったタルホコムギ(エギロプス属)では、各国でアイソザイムや種子タンパク・DNA変異の解析が行われている。またイスラエルのヘブライ大学のZohary教授らは、エギロプス属のシトプシス節の5種を対象にアイソザイム変異の研究を行なった。しかしコムギ・エギロプス属約30種のうち、これら以外の種を対象とした全体の変異の解析はまだ試みられていない。また地域的にも上記の種の分布はコムギ・エギロプス属全体の分布域のごく一部である。

本研究はこれらの空白を埋め、コムギ近縁種遺伝資源の保存・収集・開発について基礎的データを明らかにするために計画された。その目的は 1) いくつかの分析手法についてコムギ近縁種全体で利用できる実験条件を確立すること、2) これまで利用されていない新規のDNAマーカーを開発すること、3) 今後の野生近縁種遺伝資源の収集のために、予備的な現地調査を行なうこと、である。

なおパンコムギでは、各国の研究者によりさまざまな分子マーカーを使った染色体の高密度マッピングが進められており、近縁野生種より有用遺伝子を導入するための受け皿としての手法はほぼ完成している。またパンコムギDゲノム親のタルホコムギ(*Aegilops tauschii*)でも、分子マーカーによる高密度マッピングが進行中である。コムギ近縁種の変異の全容を明らかにすることにより、有用遺伝子のより組織的・効率的な導入が可能となるであろう。

本研究の結果、アイソザイムや AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)、葉緑体DNAのフィンガープリンティングなどの手法で、標準的な解析方法を確立した。いくつかの種を対象に、これらの解析方法の有効性を確認したが、とくに葉緑体の解析では栽培エンマーコムギの起原地の確定など、画期的な新知見を得た。またレトロトランスポゾン的一种であるSINE(Short Interspersed Nuclear Elements)配列を、新規にマーカーとして利用するための基礎的知見を得ることが出来た。本研究では取り扱うことの出来なかった近縁種について、今回の手法を利用し変異の解析を体系的に進めてゆくことが今後の課題である。

本研究は平成12年度から14年度の三年間にわたり、基盤研究(B)(1)として行なわれた。

## 研究組織

研究代表者: 河原 太八 (京都大学・農学研究科・助教授)

研究分担者: 安井 康夫 (京都大学・農学研究科・助手)

研究分担者: 森 直樹 (神戸大学・農学部・助教授)

## 研究経費(交付決定額・直接経費)

平成12年度	260,000	千円
平成13年度	220,000	千円
平成14年度	200,000	千円
合計	680,000	千円

## 成果概要

### 1. 分析手法の確立

アイソザイム分析: 河原が担当した。コムギ・エギロプス属全体で実験条件の設定を行なったあと、エギロプス属コモパイラム節の2種と *Aegilops umbellulata* について、種内変異を観察した。コモパイラム節の2種については、それらが遺伝的に大きく分化していること、また *Ae. umbellulata* については種内の遺伝的分化が地理的分布とほぼ対応していることを明らかにした。さらに *Ae. umbellulata* について種内の形態的変異を観察し、アイソザイム変異と合わせて遺伝的分化について論文をまとめた。

AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism): これまでに変異解析のため各種の手法が使われてきた普通系コムギを対象に、森がAFLPの分析条件の検討を行なった。コムギはゲノムサイズが非常に大きいので、合計7塩基を選択塩基とするシステムを新しく開発した。普通系コムギ・栽培二粒系コムギ・タルホコムギの計90系統を用い、10組のプライマーを使って AFLP 分析を行なった。各系統ごとに487本のバンドを読みクラスター分析を行ったところ、*Triticum macha* と *T. spelta* はそれぞれ明瞭なクラスターを形成したが、*T. aestivum* と *T. compactum* は明瞭なグループに分かれなかった。

DNA フィンガープリンティング: 森はまた DNA フィンガープリンティング手法の開発を試みた。精密なフィンガープリンティングを行うため、葉緑体ゲノムに存在する24の SSR (simple sequence repeat) 座を探索した。コムギの倍数種およびエギロプス属の11種43系統を用いて解析したところ、この SSR 座は核ゲノムの RFLP とほぼ同等の高い多型性を示し、変異の解析に利用できることが明らかになった。次に栽培コムギの起原を明らかにするため、179系統の4倍性コムギと69系統の普通系コムギを用いて葉緑体 DNA のフィンガープリンティングを行った。その結果、野生二粒系コムギの栽培化が肥沃な三日月地帯の北部で行われた可能性が高いこと、また、二粒系コムギから普通系コムギに至る母系が2つ存在することが明らかになった。さらに森は栽培コムギの Bゲノム親とされている *Ae. speltoides* の種内変異を明らかにし、四倍性コムギの起原を分子レベルで考察するため、78系統の *Ae. speltoides* からDNAを抽出し、葉緑体 DNA のフィンガープリンティングを行った。この結果を159系統の *T. dicoccoides* の葉緑体タイプと比較したところ、1) *Ae. speltoides* はその種内の多様性が非常に大きい。2) トルコ南部の *Ae. speltoides* が野生エンマーコムギ (*T. dicoccoides*) の細胞質親であり、したがってBゲノム親である可能性が高いこと。の2点が明らかとなった。

### 2. 新規手法の開発

コムギ・エギロプス属全体で利用できる新しい分子マーカーを開発するため、安井が近年 *Ae. umbellulata* で発見したレトロトランスポゾン的一种である SINE (Short Interspersed sequence) 配列の解析を行なった。その結果、この配列がコムギ・エギロプス属全体のほか、それらに近縁種なライムギ属やオオムギ属にも存在し、またパンコムギゲノム中に約  $10^4$  コピーと多量にしかも染色体全体にわたって散在していることがわかった。このことから SINE 配列がマーカーとして有効に利用できることが確認できたため、引き続き、コムギ・エギロプス属の SINE 配列の解析を行なった。

*Ae. umbellulata* および別の近縁種 *Ae. mutica* から, Au ファミリーに属する SINE 配列, 合計34クローンを単離した。その DNA 配列から, これらのクローンが大きく3つのグループに分けられることを明らかにした。種特異的なもの, 種を超えて存在し進化の初期に増幅したと考えられるものなど様々なものがあった。引き続きパンムギ(*T. aestivum*), タルホコムギ(*Ae. tauschii*)を対象に SINE 配列のクローニングと塩基配列の決定を行ない, コムギ SINE マーカーの開発を試みた。これまでに, 120 個の SINE 配列をクローニングし, 挿入部位の配列の特異性を調査した。また 30 個の SINE マーカーについて PCR プライマーを作成した。なおこれらのマーカーは, すべてパンコムギのナリ・テトラ系統を利用し, 座乗染色体の決定を行なっている。

### 3. 野生集団の予備調査

平成13年度に河原・森・安井の3名で, コムギ近縁野生種の変異解明のため, 7月7日から8月3日まで, シリア・トルコ・ギリシャで予備的調査を行なった。シリアでは国際乾燥地農業研究センター (ICARDA), トルコではアンカラ大学のそれぞれ担当者と将来の研究協力について打ち合わせをし, あわせて自生地の観察を行なった。ギリシャではエーゲ海東部の島嶼(レスボス, キオス, サモス)で, 自生地を調査し種子の収集を行なった。また平成14年度には, 森がムギ類近縁野生種の生態遺伝学的調査のため, 6月7日から6月21日まで現地調査を行なった。野生二粒系コムギが栽培化された, トルコ共和国のガジアンテップおよびカーラマンマラシュ近くの丘陵地帯において, コムギの祖先野生種の分布と頻度を調査した。

### 研究発表

#### (1) 学会誌等

ISHII T., MORI N. and OGIHARA Y., Evaluation of allelic diversity at chloroplast microsatellite loci among common wheat and its ancestral species, *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 896-904, 2001.

JEORDAR, N-A B., MORI N. and NAKAMURA C., Transferability of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) microsatellite markers to tetraploid species (*T. turgidum*) carrying A and B genomes, *Cereal Research Communication* (in press).

KAWAHARA T., Isozyme variation in species of the section Comopyrum of *Aegilops*, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47, 641-645, 2000.

KAWAHARA T., Morphological and isozyme variation in genebank accessions of *Aegilops umbellulata* Zhuk., a wild relative of wheat, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49, 641-645, 2002.

MORI N., ISHII, T., ISHIDO T., BELAY G., TAKUMI S., KAWAHARA T., OGIHARA Y. and NAKAMURA C., Variation in chloroplast microsatellite loci among wild and cultivated species of Emmer wheat, *Proceedings of the 4th. International Triticeae Symposium*, 73-76, 2001

YASUI Y., NASUDA S., MATSUOKA Y. and KAWAHARA T., The Au family, a novel short interspersed element (SINE) from *Aegilops umbellulata*, *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 463-470, 2001.

(2) 口頭発表

河原太八(2000) コムギ近縁野生種, *Aegilops umbellulata* のアイソザイム変異 日本育種学会第98回講演会(弘前大学)9月

石井尊生、森直樹、荻原保成(2000) 普通系コムギならびにその祖先種でみられたコムギ葉緑体マイクロサテライト座における多様性 日本遺伝学会第72回大会(京都大学)11月

森直樹、石井尊生、石堂貴夫、Getachew Belay、宅見薫雄、河原太八、中村千春(2000) 栽培二粒系コムギとその祖先野生種にみられた葉緑体マイクロサテライト座の種内変異 日本遺伝学会第72回大会(京都大学)11月

広沢秀二郎、森直樹、宅見薫雄、河原太八、中村千春(2001) 普通系コムギの AFLP 分析 日本育種学会第99回講演会(日本大学)4月

森直樹、石井尊生、石堂貴夫、G. Belay、宅見薫雄、河原太八、中村千春(2001) 葉緑体マイクロサテライト座の種内変異からみた栽培二粒系コムギの起源 日本遺伝学会第73回大会(お茶の水女子大学)9月

広沢秀二郎、森直樹、石井尊生、宅見薫雄、河原太八、荻原保成、中村千春(2001) 葉緑体マイクロサテライト座の SSRP からみた普通系コムギの母系 日本育種学会第100回講演会(九州大学)10月