

コムギゲノムに移入された *Thinopyrum* 7Ai-1 に由来し
黄化萎縮病抵抗性遺伝子を持つ微小クロマチンの
GISH法及びRAPD法による同定

馬 有志* ** · 富田因則* · 徐 琼芳** · 陳 孝** · 辛 志勇** · 安室喜正*
平成12年6月30日受付

*鳥取大学農学部生物生産学講座, **中国農業科学院作物育種栽培研究所

Identification of *Thinopyrum* 7Ai-1 Derived Small Chromatin with
a Barley Yellow Dwarf Virus Resistance Gene Transferred in the Wheat
Genome by Genomic *in situ* Hybridization and RAPD

You-Zhi Ma* **, Motonori Tomita*, Qong-Fang Xu** , Xiao Chen** , Zhi-Yong Xin**
and Yoshimasa Yasumuro*

* Laboratory of Plant Genetic and Breeding, Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680-8553, Japan

** Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Thinopyrum intermedium is an useful source of resistance genes for barley yellow dwarf virus (BYDV), which is one of the most serious wheat diseases. In this study, wheat/*Th. intermedium* translocation lines with a BYDV resistance gene were developed using *Th. intermedium* 7Ai-1 chromosome addition wheat line, and then translocated 7Ai-1 derived chromatins were identified by genomic *in situ* hybridization (GISH) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). GISH using *Th. intermedium* total genome DNA probe allowed to detect 7Ai-1 derived small chromatins with a BYDV resistance gene, which were translocated on the end of wheat chromosomes in the line Y95011 and YW243. RAPD analyses using 120 random 10-mer primers were conducted between the BYDV resistant translocation lines, Y95011 and Y960843, and susceptible lines. Two primers amplified the DNA fragments, which were specific to the resistant line and would be useful as the molecular markers to identify 7Ai-1 derived BYDV resistance chromatins in the wheat genome.

(Received 30 June 2000)

Key words: barley yellow dwarf virus, resistance gene, *in situ* hybridization,
RAPD, wheat, *Thinopyrum*

緒 言

Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV) による黄化萎縮病は栽培コムギ (*Triticum aestivum*, $2n=42$, AABBDD) の世界的な重大病害の一つである [15]。中国では、1966年以来、北西部、華北及び東北のコムギ栽培地域で5回にわたって黄化萎縮病が大規模に発生し、コムギ生産量の被害が20~30%に上った [20]。コムギはBYDV抵抗性遺伝子を持たないので、コムギの近縁種からBYDV抵抗性遺伝子を栽培コムギに導入することが求められている。

コムギの近縁種 *Thinopyrum intermedium* ($2n=42$, E₁E₂E₃E₄XX) は、染色体7Ai-1 [3, 7] と2Ai-2 [2] に座落する2種類のBYDV抵抗性遺伝子を持っている。Banksら (1995) [2] はBYDV抵抗性遺伝子を持つ *Th. intermedium* 7Ai-1染色体添加コムギ系統L1を利用して、オーストラリアのコムギ品種にBYDV抵抗性遺伝子を持つクロマチンを移入した転座系統を育成した。しかし、6系統のうち、5系統では *Th. intermedium* 7Ai-1染色体の長腕と短腕の一部がコムギの染色体に転座しており、1系統では7Ai-1由来のクロマチンが転座した7D染色体長腕全長の44%に及んでいた [11]。このように *Th. intermedium* 染色体の大部分がコムギ染色体に転座した系統には、BYDV抵抗性遺伝子以外に、野生種の不良遺伝子も移入されている。したがって、7Ai-1に由来し、BYDV抵抗性遺伝子を持つ微小なクロマチンがコムギ染色体に転座した系統の育成が望まれている。

我々は中国の黄化萎縮病の発生地域に適したBYDV抵抗性コムギ品種を育成するため、数回の戻し交雑によって *Th. intermedium* 7Ai-1に座落するBYDV抵抗性遺伝子を現地のコムギ品種に移入し、収量などの農業形質が改善されたBYDV抵抗性コムギ系統を育成した。これらの系統を育種に有効利用するためには、移入された *Th. intermedium* のBYDV抵抗性クロマチンを検出し、そのゲノム構成を明らかにする必要がある。さらに、BYDVの抵抗性検定には、検体植物に接種するBYDV保毒アブラムシ (*Rhopalosiphum padi* L.) の維持と管理が必要であり、また、検体植物にBYDVを均一に接種するのは労力を要する。したがって、BYDV抵抗性遺伝子を分子マーカーで選抜する方法が望まれている。

全ゲノムDNAをプローブにして染色体標本にハイブリダイゼーションする Genomic in situ hybridization (GISH) 法は、*Th. intermedium* [7, 11]、*Th. elongatum* [12]、ライムギ [1, 14]、オオムギ [1, 13] などの近縁種からコムギゲノムに移入されたクロマチンの検出に利用されている。一方、ランダムヌクレオチドをプライマー

にしたPCRで増幅産物の多型を検出する Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法によって、普通コムギにおけるさび病抵抗性遺伝子 Lr9 [17]、Lr24 [4]、コムギ黒穂病抵抗性遺伝子 [5]、うどん粉病抵抗性遺伝子 Pm18 [10]、Pm21 [16]、コムギタバエ抵抗性遺伝子 [6, 18] などに連鎖したDNAマーカーが開発されている。

本研究では、*Th. intermedium* から中国コムギ品種に移入されたBYDV抵抗性遺伝子を持つ7Ai-1由来のクロマチンをGISH法で検出し、さらに、RAPD法によってそれらクロマチンの分子マーカーの開発を試みた。

材料及び方法

植物材料

同祖染色体間の組み換えを促進するため、BYDV抵抗性遺伝子を持つ7Ai-1染色体添加コムギ系統L1 (Cauderon から分譲) をコムギ品種 Chinese Spring (CS) の同祖染色体対合抑制遺伝子 *Ph* の突然変異系統 CS_{Sph} 及び *Ph* の座乗する5Bが5Dに置換された5Bナリソミックス・5Dテトラソミックス (CS N5BT5D) 系統と交雑し、さらに、中国の普通コムギ品種 San 7859, Feng 8, FengKang 3, Zhong 8601 及び Zhong 7902 に戻し交雑した。Zhong 8601/4/Zhong 7902/3/2×CS_{Sph}/L1//CSN5BT5D の組合せから、BYDV抵抗性のコムギ系統 PP9-1 が育成された。さらに、CS_{Sph}×2/L1//CSN5BT5D の交雑に由来するBYDV抵抗性のコムギ系統 5395-12 (McIntosh から分譲) と PP9-1 を用いて、BYDV抵抗性コムギ系統 Y95011 ((PP9-1/San 7859×2) F₄)、YW243 (PP9-1/San 7859//Feng 8/3/3×FengKang 3/ Kpapl) および Y960843 (Zhong 8601×4//Zhong 7902 /5395-12) を育成した。

GISH分析

BYDV抵抗性コムギ系統 Y95011 と YW243 を GISH 分析に供試した。Fukui (1996) [8] の酵素解離/空気乾燥法で体細胞中期の染色体標本を作製した。Tomita ら (1993) [19] の方法に従って、*Th. intermedium* のゲノムDNAを抽出し、ランダムプライマー法で biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim) で標識した。各染色体標本に15 µl のハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムアミド, 2×SSC, 4.0~5.0 µg/ml プローブDNA, 600 µg/ml 非標識コムギ品種CSゲノムDNA, 500 µg/ml サケ精子DNA) を滴下し、37℃で12時間ハイブリダイゼーションさせた。洗浄は40℃の2×SSCで10分間ずつ3回、40℃の4×SSCで10分間行った。プローブDNAの

蛍光検出はFukuiら(1994)[9]の方法に従って行った。なお、転座したクロマチンの大きさを5細胞ずつ測定し、Friebeら(1992)[7]のFraction Length (FL)で示した。

RAPD分析

BYDV抵抗性系統Y95011, Y960843とそれらのコムギ親品種Shan 7859, Zhong 8423ならびに7Ai-1添加系統L1とそのコムギ親品種Vilmorin 27をRAPD分析に供試した。Y960843とShan 7859との交雑F₂世代から抵抗性個体と罹病性個体をそれぞれ10個体ずつ選抜してDNAを抽出し、それらのDNAを等量ずつ混合して抵抗性バルクと罹病性バルクとした。120種類のランダム10 merのプライマー(Operon)をそれぞれ単独のプライマーにして、25 µlの反応液(2.0 µg/ml テンプレートDNA, 0.2 µM プライマー, 0.1 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, Taq DNA ポリメラーゼ 1 ユニット)で、95°C 15 秒, 37°C 45 秒, 72°C 1 分で45サイクルのPCR反応を行った。PCR産物は1.5%のアガロースゲル電気泳動で分離した。

結 果

GISH分析

非標識の普通コムギ品種CSのゲノムDNAをブロッキングDNAとし、biotin-16-dUTPで標識した*Th. intermedium*のゲノムDNAをプローブとするGISHによって、2n=42のY95011から、一対のコムギ染色体で短腕末端に転座した*Th. intermedium* 7Ai-1由来の小さなクロマチンが検出された(第1図・A)。この転座ホモ系統Y95011に移入された7Ai-1に由来するクロマチンの大きさは、転座染色体短腕の全長の20%を占め、転座点と動原体との距離(FL)は0.80であった。一方、YW243(2n=42)についても、一対のコムギ染色体で短腕末端に転座した7Ai-1由来の小さなクロマチンが検出された(第1図・B)。転座ホモ系統YW243に移入された7Ai-1に由来するクロマチンの大きさは、転座染色体短腕全長の17%を占め、転座点と動原体との距離(FL)は0.83であった。

RAPD分析

BYDV抵抗性遺伝子を持つ7Ai-1転座型コムギ系統と罹病性系統に対して、120種類のランダム10 merプライマーでRAPD分析を行った結果、2種類のプライマーF-01(5'-ACGGATCCTG-3')とAB-01(5'-CCGTCGGTAG-3')のPCR産物に多型が検出された。

プライマーF-01により、7Ai-1添加系統L1からは8個、7Ai-1転座系統Y95011からは6個のDNAフラグメントが増幅された。一方、7Ai-1添加系統L1のコムギ親Vilmorin 27からは2個のDNAフラグメントが増幅された(第2図)。このうち、7Ai-1添加系統L1と7Ai-1転座型系統Y95011で増幅された2100 bpのDNAフラグメントF-01₂₁₀₀は、コムギ親のVilmorin 27では増幅されなかった。したがって、F-01₂₁₀₀は、*Th. intermedium* 7Ai-1に由来し、BYDV抵抗性遺伝子を持つクロマチンから増幅されたものと考えられる。

プライマーAB-01により、7Ai-1添加系統L1から6個、Y960843とShan 7859との交雑F₂から抽出した抵抗性バルクから5個のDNAフラグメントが増幅された。一方、7Ai-1添加系統L1のコムギ親Vilmorin 27からは3個、Y960843とShan 7859との交雑F₂の罹病性バルクからは5個のDNAフラグメントが増幅された(第3図)。このうち、7Ai-1添加系統L1と抵抗性バルクで増幅された1500 bpのDNAフラグメントAB-01₁₅₀₀は、Vilmorin 27と罹病性バルクでは増幅されなかった。したがって、AB-01₁₅₀₀は、7Ai-1に由来するBYDV抵抗性遺伝子を持つクロマチンから増幅されたものと考えられる。

以上のように、7Ai-1染色体に由来する微小クロマチンに特異的なDNAフラグメントF-01₂₁₀₀とAB-01₁₅₀₀が見い出された。これらはコムギゲノムに移入された7Ai-1に由来するBYDV抵抗性遺伝子の分子マーカーとして利用することができる。

考 察

*Th. intermedium*のBYDV抵抗性遺伝子は7Ai-1染色体の長腕に座乗する[3]。Banksら(1995)[2]はBYDV抵抗性遺伝子を持つ*Th. intermedium* 7Ai-1由来のクロマチンをコムギゲノムに移入し、BYDV抵抗性の転座系統を6系統育成した。そのうち、5系統では7Ai-1の長腕と短腕の一部が移入され、1系統では7Ai-1由来のクロマチンが染色体7D長腕全長の44%を占めた[11]。以上のように、これまでに育成された系統は7Ai-1染色体の大部分がコムギ染色体に転座したものだ。本研究で育成した2種類の転座系統から、GISH分析によって7Ai-1に由来する微小なクロマチンが検出された。このように、我々はPh遺伝子を持たないCSph系統とCSN5BT5D系統を利用して、7Ai-1染色体とコムギ染色体との同祖染色体間組み換えを誘発することによって、7Ai-1由来の微小なBYDV抵抗性クロマチンを持つ転座型コムギ系統を初めて育成した。これらの7Ai-1転座系統は、今後のBYDV抵抗性コムギ品種育成の母本として役立つと考え

られる。

これまで7Ai-1添加系統L1を利用して育成されたBYDV抵抗性系統は、7Ai-1長腕の一部が7D長腕に転座したタイプ(7DS・7DL-7Ai-1L)と7Ai-1長腕と7Ai-1短腕の一部が7D短腕に転座したタイプ(7DS-7Ai-1S・7Ai-1L)の2種類であった[11]。これに対して、本研究で育成した転座系統Y95011とYW243は、7Ai-1長腕の一部がコムギ7同祖群染色体の短腕に転座した新しいタイプ(7Ai-1L・7XS・7XL)のBYDV抵抗性系統である。

本研究では、BYDV抵抗性系統と罹病性系統との間で120種類のランダムプライマーでRAPD分析を行い、7Ai-1由来のBYDV抵抗性遺伝子を持つクロマチンに特異的な分子マーカーを初めて獲得した。プライマーF-01によって増幅されるDNAフラグメントF-01₂₁₀₀とプライマーAB-01によって増幅されるDNAフラグメントAB-01₁₅₀₀を指標にして、*Th. intermedium* 7Ai-1に由来し、BYDV抵抗性遺伝子を持つクロマチンの存在を判定することができる。

以上のように、本研究では、*Th. intermedium* 7Ai-1由来の微小なクロマチンを持つ新しいタイプのBYDV抵抗性転座型コムギ系統を育成し、さらに、BYDV抵抗性遺伝子の分子マーカーを獲得した。

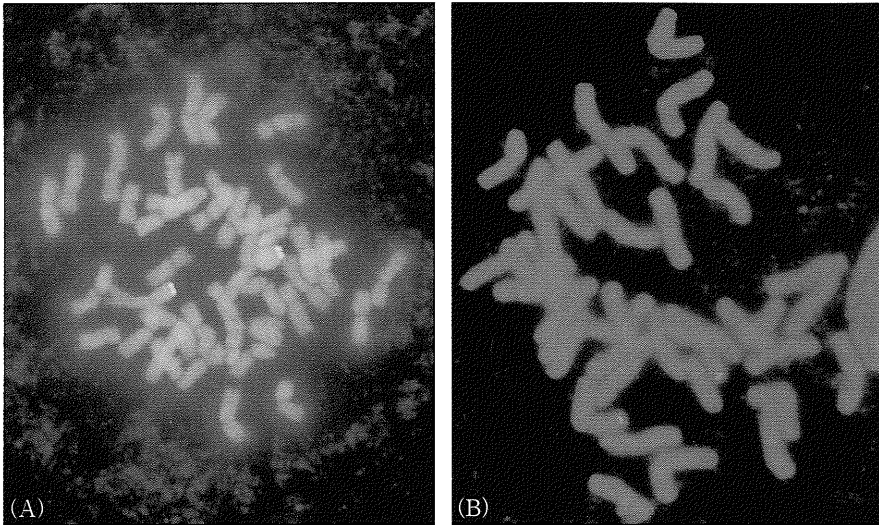
謝 辞

本研究費の一部は日本学術振興会科学研究費補助金(特別研究員奨励費: ID. P98461)によった。

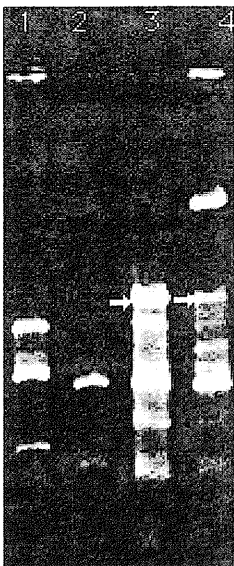
文 献

- 1) Anamthawat-Jonsson, K., Schwarzacher, T., Leitch, A.R. and Heslop-Harrison, J.S. : Discrimination between closely related Triticeae species using genomic DNA as a probe. *Theor. Appl. Genet.*, 79:721-728 (1990)
- 2) Banks, P.M., Larkin, P.J., Bariana, H.S., Lagudah, E.S., Appels, R., Waterhouse, P.M., Brettell, R.I.S., Chen X., Xu, H.J., Xin, Z.Y., Qian, Y.T., Zhou, X.M., Cheng, Z.M. and Zhou, G.H. : The use of cell culture for subchromosomal introgressions of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyrum intermedium* to wheat. *Genome*, 38:395-405 (1995)
- 3) Brettell, R.I.S., Banks, P.M., Canderon, Y., Chen, X., Cheng, Z.M., Larkin, P.J. and Waterhouse, P.M. : A single wheatgrass chromosome reduces the concentration of barley yellow dwarf virus in wheat. *Ann. Appl. Biol.*, 113:599-603 (1988)
- 4) Dedryver, F., Jubier, M., Thouvenin, J. and Goyeau, H. : Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene Lr24 in different wheat cultivars. *Genome*, 39: 830-835 (1996)
- 5) Demeke, T., Laroche, A. and Gaudet, D.A. : A DNA marker for the BT-10 common bunt resistance gene in wheat. *Genome*, 39:51-55 (1996)
- 6) Dweikat, I., Ohm, H., Patterson, F. and Cambron, S. : Identification of RAPD markers for 11 hessian fly resistance genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 419-423 (1997)
- 7) Friebe, B., Zeller, F.J., Mukai, Y., Forster, B.P., Bartos, P. and McIntosh, R.A. : Characterization of rust-resistant wheat *Agropyron intermedium* derivatives by C-banding, in situ hybridization and isozyme analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 83:775-782 (1992)
- 8) Fukui, K. : Plant chromosomes at mitosis ; in *Plant chromosome: laboratory methods*, ed. Fukui, K. and Nakayama, S., CRC Press, New York (1996) pp. 1-18
- 9) Fukui, K., Ohmido, N. and Khush, G.S. : Variability in rDNA loci in genus *Oryza* detected through fluorescence in situ hybridization. *Theor. Appl. Genet.*, 87:893-899 (1994)
- 10) Hartl, L., Weiss, H., Stephan, U., Zeller, F.J. and Jahoor, A. : Molecular identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum*). *Theor. Appl. Genet.*, 90:601-606 (1995)
- 11) Hohmann, U., Badaeva, K., Busch, W., Friebe, B. and Gill, B.S. : Molecular cytogenetic analysis of *Agropyron* chromatin specifying resistance to barley yellow dwarf virus in wheat. *Genome*, 39:336-347 (1996)
- 12) Jing, J., Friebe, B., Dhaliwal, H.S., Martin, T.J. and Gill, B.S. : Molecular cytogenetic analysis of *Agropyron elongatum* chromatin in wheat germplasm specifying resistance to wheat streak mosaic virus. *Theor. Appl. Genet.* 86:41-48 (1993)
- 13) Mukai, Y., Friebe, B., Hatchett, j., Yamamoto, M. and Gill, B.S. : Molecular cytogenetic analysis of radiation-induced wheat-rye terminal and intercalary chromosomal translocations and the detection of rye chromatin specifying resistance to hessian fly. *Chromosoma*, 102:88-95 (1993)
- 14) Mukai, Y. and Gill, B.S. : Detection of barley chromatin added to wheat by genomic in situ hybridization. *Genome*, 34:448-452 (1991)
- 15) Pike, K.S. : Review of barley yellow dwarf virus crop

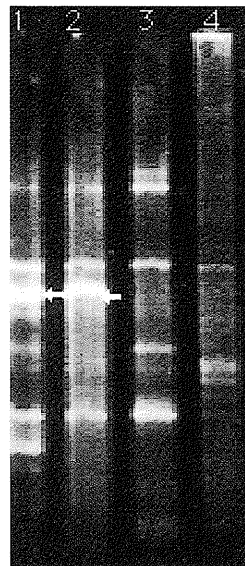
- losses.; in *World perspectives on barley yellow dwarf*.
ed. Burnett, P.A., International Maize and Wheat
Improvement Center (CIMMYT), Mexico, D.F., Mexico.
(1990) pp. 356-361
- 16) Qi, L.L., Cao, M.S., Chen, P.D., Li, W.L. and Liu, D.J. :
Identification, mapping, and application of polymorphic
DNA associated with resistance gene Pm21 of wheat.
Genome, 39:191-197
- 17) Schachermayr, G., Siedler, H., Gale, M.D., Winzeler, H.,
Winzeler, M. and Keller, B. : Identification and
localization of molecular markers linked to the Lr9,
leaf rust resistance gene of wheat. *Theor. Appl. Genet.*,
88:110-115 (1994)
- 18) Seo, Y.W., Johnson, J.W. and Jarret, R.L. : A molecular
marker associated with the H21 hessian fly resistance
gene in wheat. *Molecular Breeding*, 3:177-181 (1997)
- 19) Tomita, M., Nakata, N. and Yasumuro, Y. : *EcoO109 I*
repeated DNA families specific to the genome of rye,
Secale cereale L. ; in *Proc. 8th. Int. Wheat Genet.*
Symp., ed. Li, Z.S. and Xin, Z.Y., China Agricultural
Scientech, Beijing (1993) pp. 787-797
- 20) Xin, Z.Y., Xu, H.J., Chen, X., Lin, Z.S., Zhou, G.H., Qian,
Y.T., Cheng, Z.M., Larkin, P.J., Banks, P.M., Appels, R.,
Clarke, B. and Brettell, R.I.S. : Development of common
wheat germplasm resistant to barley yellow dwarf
virus by biotechnology. *Science in China (Series B)*,
34:1055-1062 (1991)



第1図 BYDV抵抗性コムギ系統Y95011(A)及びYW243(B)におけるコムギ染色体短腕に転座した*Th. intermedium* 7Ai-1に由来する微量なクロマチンの検出



第2図 プライマーF-01によるRAPD
 1 : コムギ品種Zhong 8423
 2 : コムギ品種Vilmorin 27
 3 : 7Ai-1 転座型コムギ系統Y95011
 4 : 7Ai-1 添加型コムギ系統L1
 矢印は7Ai-1染色体から特異的に増幅されたRAPD



第3図 プライマーAB-01によるRAPD
 1 : 7Ai-1 添加型コムギ系統L1
 2 : Y960843×Shan 7859 F₂ 抵抗性個体バルク
 3 : Y960843×Shan 7859 F₂ 羅病性個体バルク
 4 : コムギ品種Vilmorin 27
 矢印は7Ai-1染色体から特異的に増幅されたRAPD