

氏名	あでる あぶでる あじず いすまいる はっさん はぐらす ADEL ABDEL-AZIZ ISMAIL HASSAN HAGRAS
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	甲第380号
学位授与年月日	平成17年 9月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Development and Utility of Barley Expressed Sequence Tag (EST) Markers for the Analysis of Alien Chromosomes Added to Wheat Genetic Background (コムギの遺伝的背景に添加された異種染色体用オオムギ Expressed Sequence Tag (EST) マーカーの開発と利用)
学位論文審査委員	(主査) 辻本 壽 (副査) 富田 因則 細木 高志 中 田 昇 執行 正義

学位論文の内容の要旨

Related and wild species in Triticeae represent a rich reservoir of useful genetic variability that can be exploited for wheat improvement. The main objective of this study is to produce polymorphic DNA markers between wheat and some important alien species, covering a wide range of variation in Triticeae. Therefore, 1,165 barley EST primer sets was investigated. These primers were consisted of four series. Series 1 was randomly chosen from pool of the barley EST primer sets. While, the remaining three were pre-screened in a previous study and showed polymorphic and co-amplified patterns between barley and wheat. Percentages of the primer sets that amplified single clear bands in the species ranged from 22 to 100%; of which from 29 to 75% were polymorphic to wheat. The frequency of amplification was in correspondence with their phylogenetic distance from barley. A large number of polymorphic DNA markers (78-859) between each species and wheat were obtained. These markers would be a valuable tool in identifying the alien chromosomes added to wheat genetic background. In addition, they would be useful in the basic and the applied studies of the wild Triticeae species.

Further study was conducted using both *in situ* hybridization and barley expressed sequence tag (EST) markers to characterize and compare the chromosomes of *H. chilense* with *H. vulgare*. FISH with four repetitive DNA sequences, AG, AAG, 5S rDNA and 45S rDNA, was applied to the mitotic chromosomes of *H. vulgare*, *H. chilense* and available wheat-*H. chilense* addition

and substitution lines. The AAG repeat differentiated the individual chromosomes of *H. chilense* and *H. vulgare*. The patterns of FISH signals in the two species differ greatly. The 45S rDNA signals were observed on two pair of chromosomes in both species, while the 5S rDNA signals were observed on four pairs of chromosomes in *H. vulgare* and on one pair in *H. chilense*. The AG repeat showed FISH signals at the centromeric regions of all chromosomes of *H. vulgare* but none of *H. chilense*. These results indicate that the chromosomes of the two species are highly differentiated. To study the homoeology between the two species, 209 EST markers of *H. vulgare* were allocated to individual chromosomes of *H. chilense*. One hundred and forty of the EST markers were allocated to respective chromosomes of *H. chilense* using the wheat-*H. chilense* addition and substitution lines. Twenty-six EST markers on average were allocated to each chromosome except to the chromosome 2H^{ch}S to which only 10 markers were allocated. Ninety percent of the allocated EST markers in *H. chilense* were placed on *H. vulgare* chromosomes of the same homoeologous group, indicating highly conserved expressed sequences of the two species. These EST markers would be useful in detecting chromatin introgressed from these species into the wheat genome.

論文審査の結果の要旨

コムギ連 (Triticeae) は、コムギ、オオムギ、ライムギ、および牧草を含む分類群であるが、これらの栽培植物以外に300種以上の野生植物の種を含む。コムギやオオムギのような重要穀類では、最近のゲノム科学研究の中で、DNA マーカーや長鎖DNA を含むクローンのライブラリーなど、遺伝子解析のための研究基盤が整備されており、全ゲノム解読に向けた取り組みがなされている。これに対し、野生種は、世界に広く分布し、多様な繁殖・生殖様式をもち、多くの生物・環境ストレスに対する抵抗性遺伝子をもつため、コムギやオオムギを大幅に改良するために、重要な遺伝資源であるにもかかわらず、研究基盤はおろか、系統関係さえ十分に把握されておらず、そのため、これら野生種を栽培植物の遺伝資源として十分活用できていない。

最近、オオムギにおいて、発現遺伝子を部分解読する EST (expressed sequence tag) プロジェクトが進み、この塩基配列の情報を利用して多数の PCR プライマーが作成された。この大量の EST マーカーを利用して、オオムギの遺伝分析が進められ、オオムギ育種のために、きわめて重要な研究基盤としての役割を果たしている。本学位論文は、このオオムギの 'EST マーカー' の中から、野生植物用においても用いることのできる PCR マーカーを選抜し、さらに、それによって、野生種のゲノムが詳細に解析できることを示すものである。

第一章は、オオムギの EST マーカーの中から、野生種用として選抜するための研究について記述している。コムギ連の種から、多様な生態的変異を示し、かつコムギの遺伝的背景に染色体添加されているものを中心に10種を選び、対象としてコムギとオオムギを加えた全12種のゲノ

ム DNA を鋳型として、オオムギの EST マーカーのプライマーを用いて PCR を行った。オオムギ EST プライマーは、プレスクリーニングの結果に基づき 4 シリーズに分け、合計 1,165 のプライマーセットを調査した。その結果、多くのオオムギマーカーがオオムギ以外の種でも明瞭な DNA 断片を増幅することが明らかとなった。また、その中には、コムギと野生種間で多型を示すものも多く含まれていた。これらマーカーの選抜の結果、野生種やライムギにおいて 258~820 もの PCR マーカーを一挙に作ることができた。コムギ連の植物のゲノム基本数は 7 であるので、染色体当り、平均 11.122 マーカーを開発したことになる。マーカーとして使えるものは、オオムギとの類縁度が高いものに多く、逆に、その結果から、用いた野生種の類縁度を議論している。

第二章では、野生種 *Hordeum chilense* の染色体を添加したパンコムギ系統を用いて、第一章で得た 208 マーカーを、各 7 本の染色体に割り振り、実際にこれらのマーカーの野生種への適用性を調査したものである。その結果、このうちの 140 マーカーの座乗染色体を決定することができた。全体の 90% の EST マーカーが、オオムギと同じ同祖群に存在しており、とくに、第 4 同祖群染色体のマーカーは両種で 100% 一致していたおり、両種ゲノムはきわめて類縁性の高いものであることが明らかとなった。染色体を同定できなかったマーカーには、添加系統が利用できなかった染色体上に座乗するものが多いものと推測される。一方、様々なプローブを用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH) によって、同種とオオムギゲノムの染色体の形態を調査した。まず、FISH による染色体の研究では、用いた AAG サテライト、AG サテライト、および 5SrDNA のいずれにおいても、両ゲノムがきわめて異なった形態を示すことが明らかになった。このように、発現遺伝子レベルと染色体レベルの分析結果は大きく異なった。その理由として、染色体形態の指標となる反復配列は、発現遺伝子に基づく EST マーカーより変異性が高いものであると結論付けている。

これら研究の結果は、ゲノム科学が進展して整備されてきた作物の分子マーカーを野生植物の研究に適用できることを明瞭に示したことが評価される。また、この論文で大規模に開発した多数のマーカーは、今後、野生植物の遺伝的変異をコムギへ利用促進のための、研究基盤としてか活用されるものである。このような理由で、本論文は、学位論文として求められる水準に十分達しているものと判断した。

最終試験の結果の要旨

本審査会(上記の主査および副査の 5 名)は、平成 17 年 7 月 30 日に、鳥取大学において、学位論文公開審査会を開催し、学位申請者である Adel Hagrass 氏に学位論文の説明を求め、その内容について質疑応答を行った。さらに、関連事項についても諮問を行った結果、いずれについても満足のいく回答が得られた。語学については、英語での論文執筆、論文発表での受け答えから判断して、十分能力のあるものと判断できた。識見については、現在も自国の農業研究センターの職員であり、自国の農業全般について深い認識がある。また、所属研究室内におけるシニア大学

院生としての役割も大きく果たし、教員、学生からの信望も厚い。以上のことから、本審査会は、同人を大学院農学研究科論文博士としての学力、識見を有すると認め、博士(農学)の学位を与えるに十分な資格を持つものと判定した。