

学位論文題名

GENETIC STUDIES OF LETHAL TIP NECROSIS
INDUCED BY CLOVER YELLOW VEIN VIRUS
INFECTION IN PEA (*Pisum sativum* L.)

(クローバー葉脈黄化ウイルス感染で誘導される
エンドウの頂部えそに関する遺伝学的研究)

学位論文内容の要旨

クローバー葉脈黄化ウイルス (CIYVV) は、ポティウイルス属のウイルスでマメ科植物に被害をもたらす。日本では、北海道のインゲンつる枯れ病の病原ウイルスとして知られており、また本州のインゲン、ソラマメ、エンドウでも甚大な被害を出すウイルスとして報告されている。またインゲン、エンドウ、シカクマメ、ソラマメ、大豆やルーピンなどのマメ科作物のほかに、スイートピー、スターチス、リンドウなどの花き類やハウレンソウなどの野菜類で発生がある。本ウイルスの特徴は、多くのマメ科作物で全身えそを誘導して枯死させることである。

エンドウは、CIYVV 感染に抵抗性の系統もあるが、多くは感染によって全身えそを起こす系統とモザイクを起こすものに大別される。えそを起こす系統とモザイクを起こす系統の交雑組み合わせに由来する F_2 集団のウイルス接種によるえそとモザイクの病徴に関する分離実験から、えその誘導が優性または半優性の一因子によって支配されていると思われた。しかし F_2 の中には、えそとモザイク両方を示す中間的な病徴を出す個体もあって、えそを起こす因子が一つであるのか確証がなかった。PI 118501 は、CIYVV 感染に応答して、頂部えそをおこして枯死する。この系統をモザイク系統の PI 226564 と交配し、 F_2 後代の接種試験から、この因子が半優性であることがわかった。本論文では、エンドウ系統 PI 118501 において、えそ病徴が 1 因子によって支配され、さらに遺伝子マッピングを行い、この因子が染色体リンケージグループ III に座乗することを明らかにした。

1) RILs (Recombinant Inbred Lines) の作成

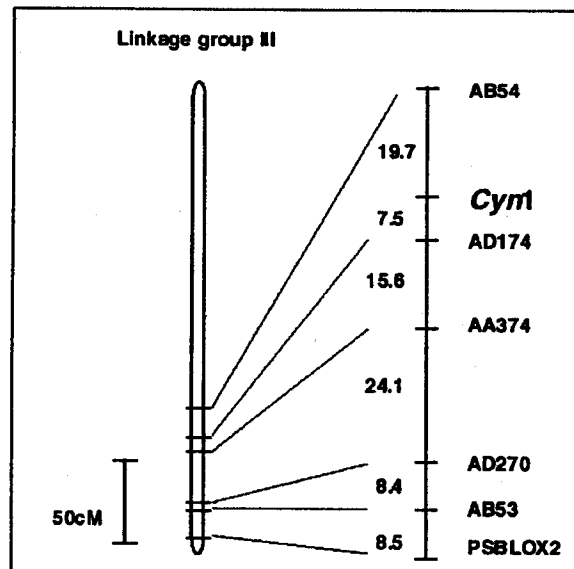
頂部えそをおこして枯死する PI 118501 とモザイク系統の PI 226564 を交配した。 F_2 世代の個体から Single Seed Descendant 法によって、102 の F_7 系統を得た。これらに CIYVV を接種すると、48 系統が頂部えそを起こして枯死し、54 系統がモザイク病徴となった。病徴は、それぞれ親である PI 118501 と PI 226564 と同じ反応で、中間型を示すものはなかった。頂部えそ：モザイクは、1：1 に分離したので頂部えそ病徴は 1 因子によって支配されることが確認された。この因子は、*Cyn1* (Clover yellow vein virus - induced necrosis) と命名した。

2) 遺伝子マッピングに用いる DNA 多型検出法の検討

遺伝子マッピングに利用する DNA 多型の検出法として、8つの方法を検討した。Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP)、Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP)は、バンドの数が少なく多型の検出が困難であった。Sequence-Specific Amplified Polymorphism (SSAP)はバンドが多く検出されたが、今回用いた二つの系統間では多型頻度が比較的低かった。Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) や Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP)はバンドも多く、多型も SSAP に比べて多かった。Simple Sequence Repeats (SSRs)、 Microsatellite Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPs)、 driven Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (dCAPs)はマーカーの座乗位置が特定されており、ほとんどのマーカーについて単一もしくは少数バンドがはっきりと得られたので、今回のマッピングに最も適していた。

3) *Cyn1* のマッピング

209のSSR、CAPsおよびdCAPsマーカーより最終的に67のマーカーで多型を検出できた。RILs 系統のうち100系統について、これらのマーカーの分離を調査し、*Cyn1* をマッピングした。その結果、*Cyn1* はリンケージグループ III の SSR マーカーAD174 から 7.5 cM の位置に座乗することが明らかになった。ウイルス感染でえそを誘導する因子がエンドウでマップされたのは、*Cyn1* が世界で初めてである。



エンドウとマメ科のモデル植物である *Medicago truncatula* のゲノムでは多くの遺伝子でシニニーが確認されている。エンドウのリンケージグループ III は、*M. truncatula* のリンケージグループ III に対応する。そこでエンドウの *Cyn1* の位置に対応する *M. truncatula* の領域を調べると R-gene-analogue (RGA) とよばれる病害抵抗性遺伝子のクラスターが存在していることがわかった。またエンドウのこの領域には既に機能が未知であるが二つの RGA 配列が見ついている。今回の成果は、エンドウのリンケージグループ III のこの領域に RGA のクラスターがあるのか、また C1YVV 感染による頂部えそ因子が RGA の一つか否か等、今後のウイルス病徴発現に関するエンドウのゲノム解析研究に大きな展望を開いた。

以上、本研究ではエンドウにおける C1YVV 感染でえそを誘導する因子を染色体上にマップし、作物のウイルス感染で誘導されるえそ病徴発現因子解析の研究に大きく寄与するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 一 郎

副 査 教 授 内 藤 哲

副 査 教 授 増 田 税

学 位 論 文 題 名

GENETIC STUDIES OF LETHAL TIP NECROSIS INDUCED BY CLOVER YELLOW VEIN VIRUS INFECTION IN PEA (*Pisum sativum* L.)

(クローバー葉脈黄化ウイルス感染で誘導される
エンドウの頂部えそに関する遺伝学的研究)

本論文は、図 27、表 10、引用文献 97 を含み 7 章からなる総頁数 89 の英語論文である。他に参考論文 2 編が添えられている。

クローバー葉脈黄化ウイルス (CIYVV) は、ポティウイルス属のウイルスでマメ科植物に被害をもたらす。日本では、北海道のインゲンつる枯れ病の病原ウイルスとして知られており、また本州のインゲン、ソラマメ、エンドウでも甚大な被害を出すウイルスとして報告されている。本ウイルスの特徴は、多くのマメ科作物で全身えそを誘導して枯死させることである。

エンドウ系統の多くは、CIYVV 感染によって全身えそを起こす系統とモザイクを起こすものに大別される。えそを起こす系統とモザイクを起こす系統の交雑組み合わせに由来する F₂ 集団のウイルス接種によるえそとモザイクの病徴に関する分離実験から、えその誘導が優性または半優性の一因子によって支配されていると思われた。しかし F₂ の中には、えそとモザイク両方を示す中間的な病徴を出す個体もあって、えそを起こす因子が一つであるのか確証がなかった。PI 118501 は、CIYVV 感染に応答して、頂部えそをおこして枯死する。この系統をモザイク系統の PI 226564 と交配し、F₂ 後代の接種試験から、この因子が半優性であることがわかった。本論文では、エンドウ系統 PI 118501 において、えそ病徴が 1 因子によって支配され、さらに遺伝子マッピングを行い、この因子が染色体リンケージグループ III に座乗することを明らかにした。

1) RILs (Recombinant Inbred Lines) の作成

PI 118501 と PI 226564 を交配した。F₂ 世代の個体から Single Seed Descendant 法によって、102 の F₇ 系統を得た。これらに CIYVV を接種すると、48 系統が頂部えそを起こして枯死し、54 系統がモザイク病徴となった。病徴は、それぞれ親である PI 118501 と

PI 226564 と同じ反応で、中間型を示すものはなかった。頂部えそ：モザイクは、1 : 1 に分離したので頂部えそ病徴は1因子によって支配されることが確認された。この因子は、*Cyn1* (*Clover yellow vein virus* - induced necrosis) と命名した。

2) 遺伝子マッピングに用いる DNA 多型検出法の検討

遺伝子マッピングに利用する DNA 多型の検出法として、8つの方法を検討したところ、マーカーの座乗位置が特定されており、ほとんどのマーカーについて単一もしくは少数バンドがはっきりと得られた Simple Sequence Repeats (SSR)、 Microsatellite Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS)、 driven Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (dCAPS) が、マッピングに最も適していた。

3) *Cyn1* のマッピング

209のSSR、CAPSおよびdCAPSマーカーより最終的に67のマーカーで多型を検出できた。RILs 系統のうち100系統について、これらのマーカーの分離を調査し、*Cyn1* をマッピングした。その結果、*Cyn1* はリンケージグループ(LG) III のSSRマーカーAD174から7.5 cMの位置に座乗することが明らかになった。ウイルス感染でえそを誘導する因子がエンドウでマップされたのは、*Cyn1* が世界で初めてである。

エンドウとマメ科のモデル植物である *Medicago truncatula* のゲノムでは多くの遺伝子でシンテニーが確認されている。エンドウのLG III は、*M. truncatula* のLG III に対応する。そこでエンドウの *Cyn1* の位置に対応する *M. truncatula* の領域を調べると R-gene-analogue (RGA) とよばれる病害抵抗性遺伝子のクラスターが存在していることがわかった。今回の成果は、エンドウのLG III のこの領域にRGAのクラスターがあるのか、またCIYVV感染による頂部えそ因子がRGAの一つか否か等、今後のウイルス病徴発現に関するエンドウのゲノム解析研究に大きな展望を開いた。

以上、本研究ではエンドウにおけるCIYVV感染でえそを誘導する因子を染色体上にマップし、作物のウイルス感染で誘導されるえそ病徴発現因子解析の研究に大きく寄与するものである。よって、審査員一同は、ラベロ・ジェラルド・バレングが博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。