



Genetic studies on ABA responsiveness and abiotic stress tolerance in hexaploid wheat

Iehisa Ouchi Julio Cesar Masaru

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2013-09-25

(Date of Publication)

2014-09-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第5927号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005927>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

氏 名 Iehisa Ouchi Julio Cesar Masaru

専攻・講座 生命機能科学専攻・農環境生物学講座

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Genetic studies on ABA responsiveness and abiotic

stress tolerance in hexaploid wheat

(6倍性コムギにおけるABA応答性と非生物ストレス

耐性に関する遺伝学的研究)

指導教員 宅見 薫雄

Abstract

The phytohormone abscisic acid (ABA) plays an important role in responses to environmental stress and dormancy. Abiotic stresses seriously affect plant growth and reduce yield in crop species. Therefore, the study of ABA responsiveness in common wheat might lead in an improvement of abiotic stress tolerance and/or seed dormancy. Common wheat is an allohexaploid species originated by natural hybridization between tetraploid wheat and the diploid *Aegilops tauschii*. It is supposed that only a small population of *Ae. tauschii* was involved in the origin of common wheat. Because tetraploid wheat can be crossed with *Ae. tauschii* to obtain synthetic hexaploid wheat, it is possible to exploit the wide natural variation of *Ae. tauschii* in common wheat improvement. In this study, two different plant material sets, common wheat cultivars and synthetic hexaploid wheat lines, were used to identify the genetic factors determining the difference in ABA responsiveness among hexaploid wheat accessions.

Comparison of responsiveness to exogenous ABA, based on root growth inhibition by ABA, revealed that common wheat cultivars Cheyenne (Cnn) and Hope are highly responsive than seedlings of Chinese Spring (CS). The chromosomes involved in the regulation of ABA responsiveness and *Cor* (cold-responsive)/*Lea* (late embryogenesis abundant) expression were identified using chromosome substitution lines, in which a chromosome pair of CS was substituted for the corresponding homologous pair of Cnn or Hope. In both CS-Cnn and CS-Hope substitution lines, chromosomes 3A and 5A were involved in the regulation of ABA responsiveness, *Cor/Lea* gene expression and stomatal response during leaf dehydration.

In common wheat, quantitative trait locus (QTL) for ABA responsiveness at the seedling stage has been reported on chromosomes 1B, 2A, 3A, 6D and 7B. Using a F₂ population derived from a cross between common wheat cultivar CS and CS-Hope5A, a novel QTL for ABA responsiveness on chromosome 5A was identified. Functional analyses of the identified QTL found that stomatal response during leaf dehydration and transcript accumulation levels of the *Cor/Lea* genes *Wrab18* and *Wdhn13* tended to be higher in individuals carrying Hope allele, which showed higher ABA responsiveness. These results suggest that the 5A QTL for ABA responsiveness has a small effect on dehydration tolerance.

ABA responsiveness of 67 *Ae. tauschii* accessions and their synthetic hexaploid wheat lines was evaluated. The wide variations in ABA responsiveness due to D-genome found at the diploid level were also expressed in a hexaploid genetic

background. Two pairs of synthetic wheat lines differing in ABA responsiveness were selected for gene expression analysis and to test abiotic stress tolerance. In one pair, the highly responsive line exhibited higher induction of *Wrab17* by ABA treatment, but no significant difference in dehydration or salinity tolerance was observed. In contrast, in the second pair, the highly ABA-responsive line showed higher levels of *Wdhn13* expression and dehydration and salinity tolerance. Therefore, highly ABA-responsive common wheat cultivars and synthetic hexaploid wheats might be used as genetic resources to improve the abiotic stress tolerance of common wheat.

QTL analysis for ABA responsiveness was performed using F₂ population derived from the highly ABA-responsive synthetic wheat Ldn/KU-2159 and the low responsive Ldn/IG126387. Significant QTL was detected on chromosome 6D, located in a similar region to the previously reported common wheat 6D QTL for ABA responsiveness. Functional analyses of the synthetic wheat and common wheat 6D QTL were performed. In common wheat, individuals carrying highly-responsive parental allele exhibited higher seed dormancy and transcript accumulation of ABA-inducible genes during dehydration. However, in synthetic wheat, association of ABA responsiveness with abiotic stress tolerance and seed dormancy could not be detected in the experimented conditions, possibly due to the heterogeneous genetic background of F₂ individuals.

Drought tolerance has been found to be a complex trait controlled by a large number of genes/QTLs with small effects. These results suggest that the identified QTLs for ABA responsiveness have a small effect on dehydration tolerance, and might contribute in the improvement of wheat drought tolerance by pyramiding with other genes/QTLs. These results also demonstrated that the study of ABA responsiveness in wheat is useful for discovery of genes or QTLs involved in abiotic stress tolerance and/or seed dormancy.

Development of molecular markers are crucial for molecular breeding. In plant species having large and complex genomes and insufficient reference information, RNA-seq is cost effective for single nucleotide polymorphism (SNP) discovery. Deep sequencing of the leaf and spike transcriptomes from two *Ae. tauschii* accessions representing two major lineages led to discovery of 16,148 high-confidence (HC) SNPs in 5,808 contigs. On average, 732 HC polymorphic contigs were mapped *in silico* to each *Ae. tauschii* chromosome. The results indicated that molecular markers developed from polymorphisms between two distinct lineages of *Ae. tauschii* are useful for analysis not only of the diploid but also of the hexaploid wheat genome.

氏名	Iehisa Ouchi Julio Cesar Masaru		
論文 題目	Genetic studies on ABA responsiveness and abiotic stress tolerance in hexaploid wheat (6倍性コムギにおけるABA応答性と非生物的ストレス耐性に関する遺伝学的研究)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	准教授	宅見 薫雄
	副 査	教授	杉本 敏男
	副 査	教授	土佐 幸雄
	副 査	准教授	三宅 親弘
	副 査		

要 旨

植物ホルモンの1つであるアブシジン酸(ABA)は、種子休眠や発芽、乾燥・低温などの脱水ストレスへの応答、離層の形成などに関与することが知られている。世界3大穀物の1つであるパンコムギは、比較的乾燥した気候に適応した作物ではあるが、さらなる乾燥ストレス耐性の付与が育種上期待されている。一方、日本のような湿潤な気候下での栽培では穂発芽の問題が深刻である。ABAはこれらのパンコムギ育種上の課題に強く関わる植物ホルモンであり、これまでのパンコムギの非生物的ストレス応答の解析から、低温凍結耐性の異なるパンコムギ品種間ではABAに対する感受性にも違いが認められ、ABAへの感受性の違いが非生物的ストレス応答に少なくとも一部関与することが明らかにされてきた。本研究では、このような背景のもと、パンコムギを含む6倍性コムギにおけるABA感受性の変異を明らかにし、その変異の原因遺伝子座の量的形質遺伝子座(QTL)解析による同定、さらには同定された個々のQTLの機能について新たな知見を得ることを目的とした。また、パンコムギは未だ全ゲノム情報の解説が終了しておらず、研究の過程で全ゲノムをカバーするDNAマーカーを整備する必要があったため、パンコムギのDゲノム提供親であるタルホコムギのトランスクリプトームの次世代シーケンサーによる解析データをもとに、大量の一塩基多型(SNP)情報の集積を目指した。

第1章では、これまでの低温や乾燥などの非生物的ストレス応答の知見を取りまとめ、特にムギ類におけるABA依存型経路と非依存型経路の構成因子とその機能について概説している。これを本研究の背景として、あわせて本研究の目的についても述べている。

第2章では、パンコムギ品種Chinese Spring (CS)とHope, Cheyenne (Cnn)の間の幼苗期におけるABA感受性の違いと乾燥ストレス処理に反応する特定の遺伝子群の遺伝子発現プロファイルの違いについて明らかにするとともに、CSとHope、あるいはCSとCnnの染色体置換系統群を用いてHopeやCnnのどの染色体がABA感受性や特定の遺伝子群の発現応答に関与しているのかについて推定した。ABA感受性はABA処理下での茎や根の伸長阻害率によって評価した。その結果、CSは他の2品種に比べてABAに対する感受性が低く、*Wdhn13*などの*CorLea*遺伝子の発現量が低い、あるいは発現量がピークに達する時間が長かった。またこの品種間差に関与する遺伝子は3Aと5A染色体に座乗していることが推定された。

第3章では、第2章の結果を受けて、Hopeの5A染色体上にあるABA感受性に関与する遺伝子の座乗位置を推定した。CSとHopeの5A染色体置換系統(Hope5A)をCSと交配したF₂集団を用いて、5A染色体に関する連鎖地図を作成しABA感受性に関するQTL解析を行った。その結果、5A染色体短腕上の動原体よりの位置に単一のQTL (LODスコア9.16、寄与率32%)が認められた。この5A上のQTLに関してはCS型アレルを持つF₃個体とHope型アレルを持つF₃個体との比較解析から、このQTLは種子休眠には関与が認められず、幼苗における乾燥処理下での水分の蒸散量の差異や*CorLea*遺伝子の発現量の差異に関与していることが明らかになった。すなわち、この5A上のABA感受性QTLは乾燥ストレス応答に関与していることが明らかとなった。

第4章では、遺伝的に離れたタルホコムギ2系統の葉のRNAについて次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析を行い、*de novo*でリードのアセンブルを行い10224のcontigを得た。さらに2系統間での変異を抽出したところ、3578のcontig内に10351カ所の変異を見だし、このうち1793のcontig

氏名	Iehisa Ouchi Julio Cesar Masaru
に4578のhigh confidenceの変異を見つけた。4578の変異のうち4337がhigh confidenceのSNPであった。タルホコムギ集団は遺伝的に大きく2つのlineageに分化していることが知られている。本研究でRNA-seq解析に用いたタルホコムギ系統はこの2つのlineageから選んだため、抽出した変異の多くでlineage間の系統間差異を検出しており、効率的にタルホコムギの連鎖地図上に位置づけることができた。また、オオムギの転写産物の高密度連鎖地図情報を利用すれば、変異の見いだされたcontigをオオムギ染色体上に位置づけることができ、オオムギの1Hから7Hまでの染色体にまんべんなくcontigが分布しており、タルホコムギの連鎖地図との比較からコムギとオオムギの染色体間で高度にシンテニーが保たれていることが確認された。このことはオオムギの情報を参照しながら、得られたSNP等の変異情報を利用して、染色体の領域特異的な分子マーカーを選抜し、連鎖地図の高密度化を図ることができることを示している。 第5章では、第4章の結果にさらに穂のRNA-seqデータとSNP等の変異情報を追加することで、さらなるコムギDゲノムの分子マーカーの充実を図った。その結果、葉と穂の合計で約10000のcontigについて多型情報を得ることができた。この配列情報を最近明らかにされたオオムギゲノムの物理地図情報とタルホコムギの簡易ゲノム情報と照らし合わせたところ、ゲノムワイドにマーカーを設定できたことが明らかとなったが、これまでも言われてきたように動原体側よりもテロメア側にマーカーが多く位置づけられた。また、抽出したマーカーの多くは、タルホコムギ系統間、Dゲノムのみ異なるタルホコムギに由来する合成パンコムギ系統間の連鎖地図上に位置づけることが可能であった。パンコムギにDゲノムを提供したタルホコムギ系統は2つのlineageのうちの片方に由来すると考えられているが、これとは異なるlineageに属するタルホコムギ系統に由来する合成パンコムギ系統とパンコムギ品種間の連鎖地図上にも位置づけることが可能であった。これらの結果は、本研究で見いだされたタルホコムギのマーカーは6倍性コムギのゲノム解析に用いることが可能であることを示している。 第6章では、二粒系コムギ品種Langdonと様々なタルホコムギ系統の雑種に由来する67系統の合成パンコムギ系統群を用いて、幼苗におけるABA感受性の多様性を解析した。合成パンコムギ系統と親となったタルホコムギ系統のABA感受性を比較したところ、タルホコムギのABA感受性変異は異質6倍性の遺伝的背景下で概ね同様に反映されていた。この合成パンコムギ系統から2組のABA感受性の異なる系統を選んで遺伝子発現パターンと乾燥ストレス応答を比較したところ、片方の組み合わせではABA感受性の差異と、<i>Wdhn13</i>などの<i>CorLea</i>遺伝子の発現量や乾燥ストレスおよび塩ストレス耐性の系統間差異に相関が認められた。 第7章では、第6章の結果を受けて、合成パンコムギのABA感受性の違いを決定する遺伝子座の同定を目的として、ABA感受性の異なる合成パンコムギ系統間のF₂集団を用いてDゲノムの連鎖地図を作成しQTL解析を行った。連鎖地図の作成には第4章と第5章で見いだした分子マーカーを利用した。その結果、6D染色体長腕上に1つのABA感受性QTL (LODスコア4.77、寄与率22.8%)を見いだした。それぞれの両親アレルを持つF₃個体の比較解析から、この6D上のQTLは吸水後の根とシュートにおける細胞分裂活性の親系統間差異に関与しており、種子休眠の親系統間の差異や<i>CorLea</i>遺伝子の乾燥誘導応答や乾燥ストレス耐性の系統間差異への関与は認められなかった。本研究により見いだされた6D上のQTLは6倍性の遺伝的背景下でABA感受性の違いに関与していた。一方、本QTLの近傍だが別座位のパンコムギ品種Mironovskaya 808とCS間のABA感受性QTLは種子の休眠性にも関与していた。 第8章では、以上の研究結果を受けて、成果のパンコムギ育種における意義と今後の研究の展開について総合的に議論している。今後、本研究によって見いだされたQTLに関する準等質遺伝子系統の育成を進めることが必要であり、パンコムギのゲノム解説研究が進展することによってQTLの高密度化が可能となり、パンコムギ品種の遺伝的背景下で見いだしたQTLの作用を検証することが可能になると予想している。 以上のように、本研究はパンコムギ品種と合成パンコムギ系統を用いて6倍性コムギのABA感受性に関与するQTLを同定し、同定した2つのQTLについてその機能を明らかにしたものである。さらに、パンコムギのDゲノムの大規模マーカー開発を行い、そのマーカー情報のタルホコムギ及び6倍性コムギのゲノム解析への応用について実験系を確立した。これらの成果はパンコムギの遺伝学および育種学において極めて重要な成果の集積であると言え、パンコムギ育種への応用が期待される。よって、学位申請者のIehisa Ouchi Julio Cesar Masaruは、博士(学術)の学位を得る資格があると認める。	