

5. コムギの AFLP マーカーを効率的に STS 化するための Extension-AFLP 法

〔要約〕 AFLP マーカーの選抜プライマーに塩基を付加した 4 種の 3 次選抜プライマーを用いて nested PCR を行う Extension-AFLP 法は、多型を示すターゲット DNA 断片を効率的に選抜する方法である。これにより、コムギの AFLP マーカーを効率的に STS 化できる。

所属	国際農林水産業研究センター・生物資源部			連絡先	029(838)6364		
推進会議名	国際農林水産業	専門	育種・バイオテック	対象	小麦	分類	研究

〔背景・ねらい〕

AFLP (増幅断片長多型) マーカーを STS (Sequence Tagged Site) 化してゲノム DNA からその特定配列を PCR で増幅できる STS マーカーに移行するには、AFLP のターゲットバンドをサブクロニングして塩基配列を特定し PCR プライマーをデザインする。ゲノムサイズの大きいコムギでは、AFLP のターゲットバンドに複数のゲノム領域のコピーが含まれるため、複数シーケンスからターゲット領域の配列を選び出すのが困難である。また STS 化の過程でデザインしたプライマーを用いても、ターゲットの断片長多型を消失してしまうなど STS 化が非常に困難である。そのため、コムギの AFLP マーカーを効率的に STS 化する Extension-AFLP 法を開発した。

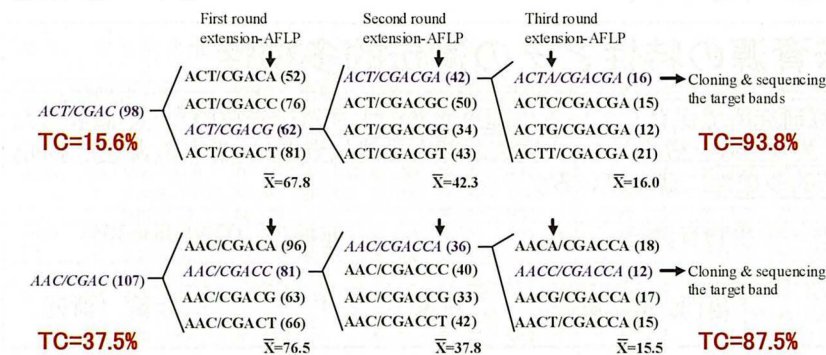
〔成果の概要・特徴〕

1. Extension-AFLP 法は、AFLP マーカーの選抜プライマー (selective primer) に A,T,G,C の塩基をそれぞれ付加した 4 種の 3 次選抜プライマーを用いて nested PCR を行う。その中から多型を示すターゲット DNA 断片を増幅する選択性の高いプライマーを選び、この操作を繰り返すことでゲノムからターゲット領域の配列を効率的に選抜する方法である。
2. AFLP マーカーをサブクロニングする際のターゲットクローンの割合 (E-ACT/M-CGAC118-120 が 15.6%、E-AAC/M-CGAC285 は 37.5%) が、3 回の Extension-AFLP 操作により単一のターゲット領域の配列を選択的に選び出すことが可能で (93.8% 及び 87.5%)、後は従来通りシーケンスおよび PCR プライマーデザインすることで、従来法よりも効率的に STS マーカーを開発できる (図 1)。
3. Extension-AFLP 法により、コムギの赤かび病抵抗性 QTL に大きく寄与する 3 BS 染色体の 2 つの AFLP マーカーが STS 化 (STS-118-120、STS285) でき、ターゲット領域の配列の増幅と多型が検出できる (図 2, 3)。
4. AFLP マーカーが優性マーカーの場合 PCR の失敗によるバンドの欠失の見分けが困難であるが、同時に第 3 のプライマーを用いて共通の増幅断片を得ることで優性マーカーでも分離が確認できる (図 3)。

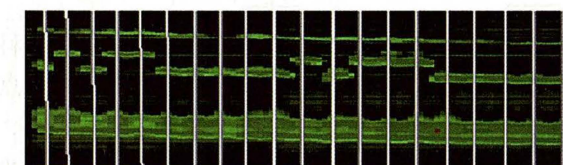
〔成果の活用面・留意点〕

1. Extension-AFLP による効率的な STS 化法は、コムギ以外の場合にも適用できる。
2. AFLP の際の制限酵素認識サイトに欠失がある場合は、Extension-AFLP 法でも STS 化が困難な場合がある。

〔具体的データ〕



STS118F
 E-ACT/M-CGAC118 1' TGACTGCGTACCAATTCACTACATATAT-TCC-GACATAAACAACAAATCTGATTGA
 E-ACT/M-CGAC120 1' TGACTGCGTACCAATTCACTACATATATCTCCACATAAACAACAAATCTGATTGA
 STS120F
 E-ACT/M-CGAC118 59' TGCCCGTAATTTGCTGCGCTCCGGAGGTTTCGGTTTCGTCGTTACTCAGGACTCATA
 E-ACT/M-CGAC120 61' TGCCCGTAATTTGCTGCGCTCTGGGAGGTTTCGGTTTCGTCGTTACTCAGGACTCATA
 STS118-120R



E-ACT/M-CGAC118-120

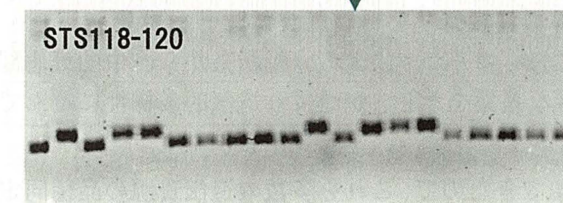
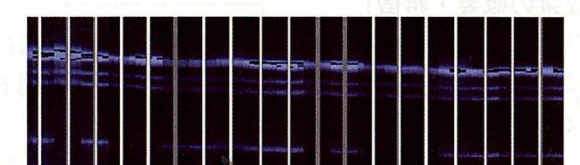


図 2 赤かび病抵抗性関連の AFLP マーカー E-ACT/M-CGAC118-120 のシーケンスと STS 化のためのプライマー配列と STS マーカーのバンドパターンの比較

STS285F
 1' TGACTGCGTACCAATTCAACCGAACAAGGTATGTCAGAACCCACGGCTTGTATTGTT
 61' TTCACAATAGCATACTAGAAATCTTTTGGTGTGCCATGTCATATGTACAATTGTTATT
 STS285F2
 121' TTNAAGTCATGGCAGGGAATGCTTACCCCTCAAAATACATAGCAATAAGTGATGATTT
 181' TGCTTGACATAAACAACAATAATATGCTCTCATCTTATCGAGAAGCTTTGTGTGATCA
 241' TTGCTCATCTATAGTTCAATTGGTCGTTACTCAGGACTCATA
 STS285R



E-AAC/M-CGAC285

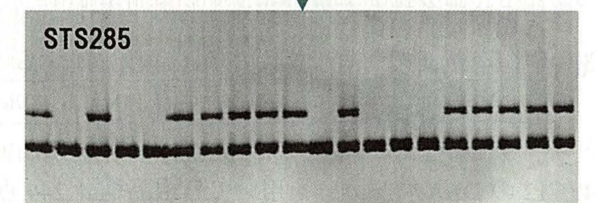


図 3 赤かび病抵抗性関連の AFLP マーカー E-AAC/M-CGAC285 のシーケンスと STS 化のためのプライマー配列と STS マーカーのバンドパターンの比較 (STS285F2+285R により共通のバンドが増幅され、優性マーカーの確認が出来る)

〔その他〕

研究課題：開発途上地域における主要作物の不良環境耐性改良のための育種法の開発研究

予算区分：基盤〔育種法〕、重点支援研究協力員

研究期間：2003 年度 (2001 ~ 2005 年度)

研究担当者：坂智広、許東河

発表論文等：

- 1) 許東河、坂智広 (2003)：コムギにおける赤かび病抵抗性に関連する STS マーカーの開発。育種学研究 5 (別 2)、106 頁。
- 2) D.H. Xu and T. Ban (2003)：Conversion of AFLP markers associated with FHB resistance in wheat into STS markers with an extension-AFLP method. Genome (in press) .