

[研 究 報 文]

Simple Sequence Repeat (SSR) 解析による不明ブドウ品種の同定

後藤 (山本) 奈美・万 光華・沼田美子代・荒巻 功*・橋爪克己

独立行政法人 酒類総合研究所 〒739-0046 東広島市鏡山 3-7-1

Identification of Unknown Grape Cultivars Using Simple Sequence Repeat (SSR) Analysis

Nami GOTO-YAMAMOTO, Guanghua WAN, Mineyo NUMATA, Isao ARAMAKI, and
Katsumi HASHIZUME

National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 739-0046, Japan

Simple sequence repeat (SSR) analysis is known to be a powerful tool for detecting DNA polymorphism, and is more reproducible than random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Thus, SSR analysis is considered to be a suitable method for grape cultivar identification. However, the lengths of the SSR fragments from the same cultivar with the same marker reported by various groups sometimes differ, which is probably caused by the difference in the detection method of the SSR fragments. For the identification of an unknown cultivar using reported SSR data of other groups, we selected candidate cultivars having SSR data that showed high correlation coefficients with the SSR data of the unknown cultivar. Then, the identities of the SSR alleles of the candidate cultivars and the unknown cultivar were confirmed after correcting for their difference with the difference of SSR data of the control cultivars analyzed both in the report and in our laboratory. We identified one of two unknown cultivars, which were originally planted as Pinot blanc, as Sauvignon blanc, and the other was found to be very similar to Melon.

Key words: SSR analysis, microsatellite, cultivar identification, grapes.

緒 言

Simple Sequence Repeat (SSR)解析は、マイクロサテライト解析とも呼ばれ、マイクロサテライト配列の長さの多型を検出する DNA 多型解析である。マイクロサテライト配列とは、ゲノム DNA 中に散在する反復配列のうち、2-4 塩基をユニットとする繰り返し配列で、繰り返し回数の変異が多いことが知られている。SSR 解析では、マイクロサテライト配列の前後に PCR プライマーを設計し、増幅産物の長さの違いを検出する。SSR 解析は多型の検出頻度が高く、異なる研究グループ間でもデータの再現性が高いことから、品種の同定や類縁関係の解析に有効な方法と考えられている。また、遺伝子座に特異的な解析であることから、連鎖解析のマーカーとしても重要である。ブドウの SSR 解析法は、Thomas and Scott (13)によって開発され、Bowers et al. (1)や Sefc et al. (11)等によって、多くの SSR マーカー (この場合は PCR プライマー) が開発された。

ところで、Pinot blanc は Pinot noir の枝変わりと考えられており (4)、両品種は SSR 解析で同じ結果を示すと報告されている (9)。しかし、当所で供試した Pinot blanc 2 系統 (PB1、PB2) は Pinot noir と大きく異なる SSR 解析結果を示し、Pinot blanc とは異なる品種と考えられた。当所で検討できるブドウ品種は限られているが、現在、多くのブドウ品種の SSR 解析結果が報告されていることから、これら既報の SSR データとの比較で PB1、PB2 の品種を同定することが可能かを検討した。

材料と方法

1. 供試ブドウ

当所圃場に植栽されている Pinot blanc (PB1)、Pinot noir、独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 果樹研究所ブドウ・カキ研究部から譲渡された Pinot blanc (PB2)、丹波ワイン株式会社から譲渡された Spätburgunder (Pinot noir のドイツ名) 52-86、Weißburgunder (Pinot blanc のドイツ名) D 209、Ruländer (Pinot gris のドイツ名) 49-207 及び対照として当所圃場の Cabernet Sauvignon、Riesling、Chardonnay

2004 年 8 月 11 日受理

* 現在、福岡国税局鑑定官室 〒812-8547 福岡市博多区博多駅東 2-11-1

を使用した。ブドウ DNA は CsCl 超遠心法 (15) で新葉から抽出した。

2. SSR 解析

SSR マーカーは、当所で開発した VMC2A5 及び VMC2H4、並びに既報の VVS1~VVS4 (13)、及び VVMD5~VVMD8 (1) を用いた。また、一部 VrZAG21、47、62、64、79、及び 83 (11) も用いた。VMC2A5 及び VMC2H4 のプライマー配列は次のとおり: VMC2A5 forward, CCACATGGAAGTGAAGAAAAT; VMC2A5 reverse, TGTATGAGGTATGAGGTGGCAA; VMC2H4 forward, ACCAGGTGTGCCTATAAGAATC; VMC2H4 reverse, TCTCTGGAACATCCAATCAAC。各マーカーの forward 側のプライマーを蛍光色素の NED または FAM でラベルした。PCR の反応液組成は、ゲノム DNA 1 ng/μl、プライマー各 0.2 μM、MgCl₂ 2.5 mM、dNTP 各 0.2 mM、AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) 0.04 U/μl、1x バッファー II で、反応液量は 10 μL とした。PCR の反応温度は、94°C 1 分、51°C (VVS3 は 49°C) 1 分、73°C 1 分で 45 サイクル反応させた。反応液 0.2 または 0.5 μL、サイズスタンダードの GeneScan 500 ROX 0.5 μL、脱イオンホルムアミド 12 μL を混合し、95°C で 2 分間変性後、急冷して、泳動サンプルとした。泳動にはキャピラリタイプの DNA シーケンサー ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) と POP4 ゲルを用い、検出されたフラグメントの長さ (塩基数) を Gene Scan Analysis ソフトウェアで算出し、整数で表示した。供試したブドウ品種は 2 倍体であるため、1 つの SSR マーカーで 2 遺伝子座が検出される。フラグメントが 1 本しか得られない場合は、2 遺伝子座が同じアレル (対立遺伝子、この場合は同じ長さのマイクロサテライト配列) を持つ場合と、片方の遺伝子座が欠失した場合 (ヌル・アレル) の 2 つの可能性が考えられるが、今回使用した SSR マーカーについて、2 遺伝子座ともヌル・アレルとなってフラグメントが検出されないブドウ品種の例は報告されていないため、ヌル・アレルではなく、2 遺伝

子座が同じアレルを持つと仮定して解析した。

結果及び考察

1. Pinot 系品種の SSR 解析結果

10 種類のマーカーを用いた SSR 解析の結果、Pinot noir とドイツ系の Spätburgunder、Weißburgunder、Ruländer のデータは完全に一致したが、Pinot noir と PB1、及び PB2 はともに 9 遺伝子座で異なるサイズのフラグメントが検出された (Table 1)。Regner et al. (9) は、Pinot noir, Pinot blanc, 及び Pinot gris は 30 の SSR マーカーを用いても識別できないと報告しており、Pinot noir と Chardonnay の違いが 5 遺伝子座であることを考えると、PB1、PB2 は、品種内のバリエーションではなく、品種が異なるものと考えられた。

2. 品種同定方法の検討

SSR 解析は再現性が高い方法とされているが、実際には研究グループによって同品種・同マーカーのデータが 1~数塩基異なることが多い。これは、おそらく DNA フラグメントの検出方法の違いによるものと推定される。現在、SSR 解析には、放射性同位元素でラベルして変性ゲル電気泳動・オートラジオグラフィーで検出する方法、ファルマシア社製シーケンサーを使用する方法、及びアプライド・バイオシステムズ社製シーケンサーを使用する方法がよく用いられているが、当所と同じアプライド・バイオシステムズ社製シーケンサーを使用した報告 (5) とはデータが一致した。

従って、当所のデータと他の研究グループのデータを比較して完全にデータが一致する品種を捜す手法は

Table 1 SSR alleles (length in base pairs) of Pinot group and reference cultivars.

Cultivar	VVS1		VVS2		VVS3		VVS4		VVMD5	
Cabernet Sauvignon	178	178	135	148	210	216	167	174	228	236
Riesling	187	187	139	148	210	216	167	167	222	230
Chardonnay	180	187	133	139	210	216	167	172	230	234
Pinot noir	180	187	133	148	210	216	167	172	224	234
PB1	178	187	129	148	210	216	167	167	224	228
PB2	187	187	133	139	210	216	167	167	234	236
Cultivar	VVMD6		VVMD7		VVMD8		VMC2H4		VMC2A5	
Cabernet Sauvignon	205	205	237	237	137	152	213	221	149	164
Riesling	205	207	247	255	137	141	221	225	149	182
Chardonnay	198	207	237	241	135	141	201	235	164	182
Pinot noir	198	198	237	241	135	137	201	235	182	182
PB1	198	205	237	255	137	137	221	235	164	182
PB2	198	207	237	247	135	141	221	235	164	182

Alleles of PB1 and PB2 different from those of Pinot noir are indicated in boldface. Spätburgunder, Weißburgunder and Ruländer have the same alleles as Pinot noir.

不適切と考えられる。また、同じマーカーを用いた2研究グループ間のデータの差異は常に一定ではなく、Cabernet SauvignonのVVS2解析結果 (Table 2) のようにフラグメントの長さが大きく異なると、データの差異が1塩基程度異なる場合もある。この場合は、先にデータの差異を補正し、データが一致する品種を機械的に検索する方法

も困難になる。そこで、当所のPB1、PB2のSSRデータと、報告されているSSRデータの単相関係数を求め、多数の品種からSSRデータが同じ傾向を示す品種に絞り込み、当所と報告の両方で解析されている品種のデータの比較から、PB1、PB2と比較する品種のデータの差異が妥当な値かどうかを判断し、アレルが一致するかどうかを検討した。

3. PB1、PB2に近い品種の検索

Sefc et al. (12) はヨーロッパ各地で栽培されている164品種のSSR解析結果を報告しており、これは現在公開されているSSR解析結果のうち最も品種数が多いと思われる。そこで、この報告と当所の解析とで共通して用いられている3マーカー (VVS2、VVMD5

及びVVMD7) について、PB1及びPB2との単相関係数を求めた。その結果 (Table 2)、PB1はChenin blanc及びSauvignon blancと最も高い相関係数を示し、Cabernet SauvignonやPinot noirのデータの比較からデータの差異を補正すると、3マーカーの6遺伝子座が一致するものと推定された。PB2と一致する品種は無かったが、Chardonnay、Gamayのほか、Table 2に示すドイツ/オーストリア系の4品種は4遺伝子座が一致した。

次に、これらの品種について、他の報告のデータと比較した。

4. PB1とChenin blanc、Sauvignon blancの比較

Table 2 Comparison of SSR alleles of unknown cultivars (PB1 and PB2) with those reported by Sefc et al. (12).

No.	Cultivar	SSR allele						Correlation coefficient	
		VVS2		VVMD5		VVMD7		PB1	PB2
25	Chenin blanc	<i>132</i>	<i>150</i>	226	230	236	254	0.9998	0.9910
30	Sauvignon blanc	<i>132</i>	<i>150</i>	226	230	236	254	0.9998	0.9910
2	Blaufraenkisch	142	142	224	238	236	246	0.9865	0.9955
3	Elbling	142	150	236	238	246	254	0.9940	0.9982
10	Orangetraube	136	142	234	236	236	244	0.9864	0.9999
14	Schlagerblut	136	142	230	236	236	252	0.9935	0.9982
24	Chardonnay	136	142	232	236	236	240	0.9837	0.9991
27	Gamay	132	136	232	236	236	246	0.9876	0.9998
23	Cabernet Sauvignon	138	150	230	238	236	236	0.9809	0.9955
29	Pinot	136	150	226	236	236	240	0.9895	0.9962
	Cabernet Sauvignon ¹	135	148	228	236	237	237		
	Pinot noir ¹	133	148	224	234	237	241		
	PB1	<i>129</i>	<i>148</i>	224	228	237	255		
	PB2	133	139	234	236	237	247		
	Difference ²	+3	(+2)	+2	+2	-1	-1		

Alleles of PB1 and corresponding alleles of Chenin blanc and Sauvignon blanc after correction for the difference are indicated in italics.

Alleles of PB2 and corresponding alleles of cultivar nos. 2 to 27 after correction for the difference are indicated in boldface.

¹ SSR data in this study.

² Difference between SSR data of Cabernet Sauvignon and Pinot in this study and reported data.

Table 3 Comparison of SSR alleles of PB1 with reported alleles of Sauvignon blanc.

Cultivar	VVS1 ³		VVS3 ³		VVS4 ³		VVS4 ⁴		VVMD6 ⁴		VVMD8 ⁴	
Cabernet Sauvignon	180	180	212	218	167	174	168	175	211	212	143	157
Sauvignon blanc	180	189	212	218	167	168	168	169	205	212	143	143
Cabernet Sauvignon ¹	178	178	210	216	167	174	167	174	205	205	137	151
Sauvignon blanc ¹	178	187	210	216	167	167	167	167	198	205	137	137
PB1	178	187	210	216	167	167	167	167	198	205	137	137
Difference ²	+2	+2	+2	+2	0	0	+1	+1	(+6)	+7	+6	+6

Alleles of PB1 and Sauvignon blanc¹, and corresponding alleles of reported Sauvignon blanc after correction for the difference are indicated in boldface.

¹ See Table 2.

² Difference between SSR data of Cabernet Sauvignon in this study and reported data.

³ Data reported by Sefc et al. (10). SSR alleles of the three markers shown in Table 2 are also identical.

⁴ Data reported by Bowers and Meredith (2). SSR alleles of VVS1 and the three markers shown in Table 2 are also identical.

Table 4. Comparison of SSR alleles of PB2 with reported alleles of progenies of Pinot x Gouais blanc (3).

No. Cultivar	VVMD5		VVMD6		VVMD7		VVS2		VVS4		VMC2A5		VMC2H4	
1 Pinot noir	228	238	205	205	239	243	137	151	168	173	189	189	204	238
2 Gouais blanc	234	240	194	214	239	249	133	143	168	169	157	171	204	224
3 Aligote	228	240	194	205	239	239	133	137	168	173	171	189	224	238
6 Bachet noir	234	238	205	214	243	249	143	151	168	169	171	189	224	238
8 Chardonnay	234	238	205	214	239	243	137	143	168	173	171	189	204	238
9 Dameron	238	240	205	214	239	243	133	151	169	173	171	189	224	238
12 Gamay noir	234	238	205	214	239	249	133	137	168	173	171	189	204	224
14 Melon	238	240	205	214	239	249	137	143	168	168	171	189	224	238
15 Peurion	234	238	194	205	239	243	133	137	168	169	171	189	224	238
Pinot noir ¹	224	234	198	198	237	241	133	148	167	172	182	182	201	235
PB2	234	236	198	207	237	247	133	139	167	167	164	182	221	235
Difference ²	+4	+4	+7	+7	+2	+2	+4	(+3)	+1	+1	+7	+7	+3	+3

Alleles of PB2 and corresponding alleles of the reported cultivars after correction for the difference are indicated in boldface.

¹ See Table 2.

² Difference between SSR data of Pinot noir in this study and reported data.

Chenin blanc は、フランスのアンジュを原産とする品種で、Pinot d'Anjou, Pinot de la Loire と呼ばれ、アルゼンチンでは Pinot blanco と呼ばれている (4) ことから、Pinot blanc と間違われた可能性もあると予想された。しかし、PB1 と Chenin blanc は、Thomas et al. (14)、及び Bowers et al. (1) のデータとの比較で、VVS3 及び VVMD6 は一致したが、VVS1、VVS4 の各一方の遺伝子座及び VVMD8 の 2 遺伝子座が異なっていた (データ省略)。一方、PB1 と Sauvignon blanc は、Sefc et al. (10)、及び Bowers and Meredith (2) のデータとの比較で、VVS4 の 1 遺伝子座以外のデータが一致した (Table 3)。そこで、当所の Sauvignon blanc を供試したところ、VVS4 を含む全ての供試マーカー (VVS1 ~ VVS4、VVMD5 ~ VVMD8、VMC2H4、VMC2A5) の遺伝子座が PB1 と一致し、PB1 は Sauvignon blanc が誤って植栽されたものと考えられた。

Sauvignon blanc の VVS4 の解析で、Sefc et al. (10) 及び Bowers and Meredith (2) は 1 塩基違いの 2 本のフラグメントが検出されると報告したが、当所の解析では 1 本しか検出されなかった。これは用いた DNA ポリメラーゼのターミナルトランスフェラーゼ活性の違いによるものと推定される。同様の現象は Cabernet Sauvignon の VVMD6 の解析結果 (Table 3) にも認められる。

なお、この検討の過程で、以前に報告したブドウの AFLP 解析 (6, 7) で使用した Pinot blanc の DNA は、Sauvignon blanc の DNA に Pinot noir の DNA が誤って混入したものであることが明らかになった。この古い Pinot blanc の DNA からは複数の SSR マーカーで 3 本のフラグメントが増幅され、供試したすべての SSR マーカーについてそのデータが Sauvignon blanc と Pinot noir のデータの和となっていた (データ省略)。

今回報告した PB1 のデータは全て再調整した DNA を使用したものである。

5. PB2 と Pinot x Gouais blanc 自然交配品種の比較

PB2 と一致する遺伝子座が多かった Chardonnay 及び Gamay は Pinot と Gouais blanc の自然交配品種であると報告されている (3)。そこで、同じくこの 2 品種の自然交配品種の可能性が高いと報告された 16 品種について、7 マーカーのデータを比較し、一致

Table 5 Comparison of SSR alleles of PB2 with reported alleles of Melon (9).

Cultivar	VVS1		VVS3		VVMD6		VVMD8		VrZAG21	
Chardonnay	183	190	214	220	199	209	141	147	202	208
Melon	183	190	214	220	199	209	141	147	202	204
Chardonnay ¹	180	187	210	216	198	207	135	141	198	204
PB2	187	187	210	216	197	207	135	141	198	200
Difference ²	+3	+3	+4	+4	(+1)	+2	+6	+6	+4	+4

Cultivar	VrZAG47		VrZAG62		VrZAG64		VrZAG79		VrZAG83	
Chardonnay	161	169	189	197	160	164	244	246	190	202
Melon	159	165	195	205	140	160	240	244	190	202
Chardonnay ¹	158	166	187	195	157	171	240	242	189	201
PB2	158	162	193	203	135	157	236	240	189	201
Difference ²	+3	+3	+2	+2	+3	+3	+4	+4	+1	+1

Alleles of PB2 and corresponding alleles of Melon after correction for the difference are indicated in boldface.

¹ See Table 2.

² Difference between SSR data of Chardonnay in this study and reported data.

する遺伝子座の多い品種を Table 4 に示した。その結果、Pinot noir どうしのデータの差異から推定して、PB2 は Melon と 7 マーカーの全遺伝子座が一致することが明らかになった。さらに、異なる 10 マーカーについて Regner et al. (9) のデータとの比較を行ったところ (Table 5)、7 マーカーの遺伝子座が一致したが、VVS1、VrZAG47 及び VrZAG64 の各 1 遺伝子座が一致しなかった。従って、PB2 は Melon に非常に近い品種と推定された。Melon はブルゴーニュの古い品種で、ロアール地域に導入され、現在は Muscadet と呼ばれている。カリフォルニアでは Melon が Pinot blanc と誤称されていた (4) ことがあり、PB2 はアメリカから導入されたと記録されていることから、PB2 は Melon のクローンの 1 つである可能性も推定できる。

以上のように、SSR データが報告されている品種であれば、対照となる品種が供試できない場合でも、既報の SSR データとの比較で、不明品種の同定、又は類似する品種の推定が可能であることが示された。ブドウには非常に多くの品種がある上、品種の混同もよくあると指摘されている (8)。形態による品種同定は熟練を要するため、DNA 多型解析による品種同定は有用な方法と考えられる。今後は、使用しやすいブドウの SSR データベースの開発が望まれる。

要 約

SSR 解析は、DNA 多型の検出頻度・再現性ともに高いことが知られており、ブドウのように非常に多くの品種がある栽培植物の品種同定に適した方法であると考えられる。現在、多品種のブドウ SSR データが複数のグループから報告されているが、研究グループによって同品種・同マーカーのデータに若干の差異がある。さらに、データの差異が同じマーカーであっても一定でない場合もある。そこで、不明品種の SSR データと報告されている品種の SSR データの相関係数を求め、SSR データが同じ傾向を示す品種を選択した上で、共通に分析されている品種のデータの差異を補正し、SSR データが一致するかどうかを検討した。この方法で、Pinot blanc として植栽されているが Pinot noir と異なる SSR データを示す 2 サンプル (PB1、PB2) の品種同定を試み、PB1 は Sauvignon blanc と SSR データが一致すること、及び PB2 は Melon と大部分の SSR データが一致し、Melon に近い品種と推

定されることが示された。このように、対照となる品種が供試できない場合でも、既報の SSR データとの比較で、不明品種の同定、又は類似する品種の推定が可能であった。

謝 辞

ブドウ新葉サンプルをご譲渡戴いた、独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 果樹研究所ブドウ・カキ研究部、及び丹波ワイン株式会社に深謝致します。

文 献

1. Bowers, J. E., G. S. Dangl, R. Vignani and C. P. Meredith. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). Genome 39: 628-633 (1996).
2. Bowers, J. E. and C. P. Meredith. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. Nature Genetics 16: 84-87 (1997).
3. Bowers, J., J. M. Boursiquot, P. This, K. Chu, H. Johansson and C. Meredith. Historical genetics: The parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of northeastern France. Science 285: 1562-1565 (1999).
4. Galet, P. Grape varieties and Rootstock varieties. Oenoplurimédia, Chaintré (1998).
5. Grando, M. S. and C. Frisinghelli. Grape microsatellite markers: Sizing of DNA alleles and genotype analysis of some grapevine cultivars. Vitis 37: 79-82 (1998).
6. 後藤 (山本) 奈美. ブドウの AFLP 解析に対する制限酵素濃度の影響、並びに AFLP 解析による 'Pinot noir' 及び 'Pinot blanc' の識別. J. ASEV Jpn. 9: 83-88 (1998).
7. Goto-Yamamoto, N. Phenetic clustering of grapes (*Vitis* spp.) by AFLP analysis. Breeding Sci. 50: 53-57 (2000).
8. Hinrichsen, P., C. Narváez, J. E. Bowers, J. M. Boursiquot, J. Valenzuela, C. Muñoz and C. P. Meredith. Distinguishing Carmenère from similar cultivars by DNA typing. Am. J. Enol. Vitic. 52: 396-400 (2001).
9. Regner, F., A. Stadlbauer, C. Eisenheld and H. Kaserer. Genetic relationships among Pinots and related

- cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 7-14 (2000).
10. Sefc, K. M., H. Steinkellner, H. W. Wagner, J. Glössl and F. Regner. Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine. *Vitis* 36: 179-183 (1997).
 11. Sefc, K. M., F. Regner, E. Turetschek, J. Glössl and H. Steinkellner. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* 42: 367-373 (1999).
 12. Sefc, K. M., M. S. Lopes, F. Lefort, R. Botta, K. A. Roubelakis-Angelakis, J. Ibáñez, I. Pejic, H. W. Wagner, J. Glössl, H. Steinkellner. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 100: 498-505 (2000).
 13. Thomas, M. R. and N. S. Scott. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* 86: 985-990 (1993).
 14. Thomas, M. R., P. Cain and N. S. Scott. DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Mol. Biol.* 25: 939-949 (1994).
 15. Yamamoto, N., G. Ono, K. Takashima and A. Totsuka. Restriction fragment length polymorphisms of grapevine DNA with phenylalanine ammonia-lyase cDNA. *Japan. J. Breed.* 41: 365-368 (1991).