

## 生食用ブドウの品種判別および果実加工品の判別技術の開発

大橋義孝\*・岡田初彦\*・佐藤守\*・山田昌彦\*\*  
三谷宣仁\*\*・西谷千佳子\*\*・山本俊哉\*\*

Discrimination of Japanese table grape varieties  
and processed fruits using SSR markers.

Yoshitaka OHASHI \*, Hatsuhiko OKADA \*, Mamoru SATO \*, Masahiko YAMADA \*\*  
Nobuhito MITANI \*\*, Chikako NISHITANI \*\* and Toshiya YAMAMOTO \*\*

### Abstract

Discrimination techniques for major Japanese table grape cultivars (*V. × labruscana*) as well as wine grapes (*Vitis vinifera* L.) were successfully established using SSR markers. Out of 20 SSR markers developed from wine grapes, 14 SSRs could be transferable for cultivar discrimination of table grapes, which produced clear amplified bands for all tested cultivars. SSR genotypes of 65 cultivars were clearly identified, in which cultivar identification and parentages were confirmed.

Then, DNA extraction and profiling were tried for fruit tissues (shaft, pericarp, sarcocarp) and several processed fruits such as raisin, dried fruits and fruit jelly. Enough amount and quality of DNAs could be extracted from fruit tissues, raisin and dried fruits, which were successfully used for DNA profiling by SSR markers. In contrast, DNA profiling for fruit jelly could not be performed maybe due to few extracted DNAs or severely digested DNAs.

Key word: grape, discrimination, SSR marker, genotype

キーワード: ブドウ、判別、SSR マーカー、遺伝子型

### 1 緒言

日本において、ブドウはワイン用だけでなく、生食用としての需要も高く、様々な品種が栽培されている。さらに、果実入りゼリーや干しぶどう、ジュースなど様々な加工品が販売されている。

昭和53年に農産種苗法が改正され、新品種を育成・発見した際の品種登録と、種苗の独占的な販売の権利が与えられた。現在までに、ブドウは149品種(平成21年4月2日までに登録済み)が登録されており、昭和53年以前の品種を含めると、数多くのブドウの品種が存在している。ブドウの品種育成には多くの年数を要する。たとえば農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所(以下農研機構果樹研)で育成された「シャインマスカット」は、交配から命名登録までに18年という長い年月がかかっている<sup>14)</sup>。

さらに、ブドウは贈答用として品種により生じる付加

価値性が高い果実であり、品種の不当表示の問題は今後深刻化する可能性が高い。また、挿し木繁殖等により容易に増殖できるため、DNA品種判別技術の開発により育成者の権利を守ることが必要である。

果樹では、葉や枝、果実など外見が酷似していること、果実などの形質をみて判定するために長い時間が必要であること、樹齢やその年の気象、生産者の栽培法により、収穫期や果実形質が大きく変わってしまうことなどにより品種判別が困難となっている。

これらのことから、DNAマーカーを用いた確実に時間のかからない品種判別法が望まれており、果樹ではモモ、ナシ、オウトウで、SSR(Simple Sequence Repeat)マーカーを用いた品種判別が報告されている<sup>3)-7)10)11)15)</sup>。SSRマーカーは、多型の検出頻度や再現性の高さなどの点から広く用いられており、ブドウにおいては、ワイン用品種でSSRマーカーを用いた品種判別が報告されている<sup>1)2)9)12)</sup>。

受理日 平成21年10月1日

\* 福島県農業総合センター果樹研究所, \*\* 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所

現在、栽培されているブドウは、ヨーロッパ原産のヴィニフェラ種 (*Vitis vinifera* L.)、アメリカ原産のラブルスカ種 (*Vitis labrusca* L.) およびその交雑種 (*Vitis labruscana* Bailey) に大きく分けられる。ワイン用ブドウ品種の多くはヴィニフェラ種であり、日本の生食用ブドウの多くはヴィニフェラ種とラブルスカ種の交雑種である。日本の生食用ブドウでは品種判別の報告が少ないことから、本研究では、既に報告されているワインブドウ用のSSR マーカーを用いて、生食用ブドウの品種判別を試みた。

さらに、モモやナシにおいては、果実および加工品からの品種判別が報告されている<sup>8) 16)</sup> ことから、ブドウにおいても果実および加工品からのDNA抽出と品種判別を試みた。

## 2 試験方法

SSR マーカーを用いた品種判別の手順は、サンプルからのDNA抽出、SSR マーカーを用いたPCR反応、DNAシーケンサーを用いたフラグメント解析の3つの工程に大別される。

### (1) 葉を用いた品種判別

#### A 供試材料

現在、栽培されているヴィニフェラ種 (*Vitis vinifera* L.)、ラブルスカ種 (*Vitis labrusca* L.)、これら2種の交雑種 (*Vitis labruscana* Bailey) を用いた。

品種判別には福島県農業総合センター果樹研究所(以下福島果樹研) および農研機構果樹研が栽培・保存している、50品種(重複を含めると65品種)を供試した(表1)。

表1 供試品種

品種名	採取場所	品種名	採取場所
安芸クイーン	農研機構果樹研および福島果樹研	ネオマスカット	農研機構果樹研および福島果樹研
安芸シードレス	農研機構果樹研	ノースブラック	農研機構果樹研および福島果樹研
あづましずく	福島果樹研	ノースレッド	農研機構果樹研および福島果樹研
伊豆錦	農研機構果樹研	バッフアロー	農研機構果樹研
イタリア	農研機構果樹研	ハニービーナス	農研機構果樹研および福島果樹研
オリエンタルスター	農研機構果樹研	バラデー	農研機構果樹研
甲斐路	農研機構果樹研	ビオーネ	福島果樹研
カベルネソービニオン	農研機構果樹研	ピットロビアンコ	農研機構果樹研
キャンベルアーリー	農研機構果樹研および福島果樹研	ピノ・ノワール	農研機構果樹研
巨峰	福島果樹研	ヒムロッドシードレス	福島果樹研
甲州三尺	農研機構果樹研	ヒムロッドシードレス4倍体	福島果樹研
ゴルビー	福島果樹研	ふくしずく	農研機構果樹研および福島果樹研
サニールージュ	農研機構果樹研および福島果樹研	藤稔	福島果樹研
シャインマスカット	農研機構果樹研	ブラックオリンピア	福島果樹研
シャルドネ	農研機構果樹研	紅伊豆	福島果樹研
翠峰	農研機構果樹研	ポートランド	農研機構果樹研および福島果樹研
スチューベン	農研機構果樹研および福島果樹研	マスカットオブアレキサンドリア	農研機構果樹研
瀬戸ジャイアンツ	農研機構果樹研および福島果樹研	マスカットベリーA	農研機構果樹研および福島果樹研
センチニアル	福島果樹研	マニキュアフィンガー	福島果樹研
ダークリッジ	農研機構果樹研および福島果樹研	メルロー	農研機構果樹研
高尾	福島果樹研	メンデルのブドウ	福島果樹研
デラウエア	福島果樹研	リースリング	農研機構果樹研
トムソンシードレス	農研機構果樹研	リザマート	農研機構果樹研および福島果樹研
ナイアガラ	農研機構果樹研および福島果樹研	ロザキ	農研機構果樹研
ニューナイ	農研機構果樹研	ロザリオビアンコ	福島果樹研

表2 供試したSSRマーカー

マーカー	forward配列	reverse配列	アニーリング温度	増幅	引用
VVS1	ACAATTGGAAACCGGTGGAG	gtttcttCTTCTCAATGATATCTAAAACCATG	50or55	×	M.R.Thomasら <sup>12)</sup>
VVS2	CAGCCCGTAAATGTATCCATC	gtttcttAAATTCAAAATCTAATTCAACTGG	55	○	M.R.Thomasら <sup>12)</sup>
VVS3	TGCCCTATCAATAGTTCACCTA	gtttcttTCGACTTTGATATATTGATGATT	50or55	×	M.R.Thomasら <sup>12)</sup>
VVS4	CCATCAGTGATAAACCTAATGCC	gtttcttCCCACCTTGCCCTTAGATGTTA	55	○	M.R.Thomasら <sup>12)</sup>
VVMD5	CTAGAGCTACGCCAATCCAA	gtttcttTATACAAAAATCATATTCCTAAA	55	○	J.E.Browersら <sup>11)</sup>
VVMD6	ATCTCTAACCCATAAACCAT	gtttcttCTGTGCTAAGACGAAGAAGA	50or55	×	J.E.Browersら <sup>11)</sup>
VVMD7	AGAGTTGGCGGAGAACAGGAT	gtttcttCGAACCTTCACACGCTTGAT	55	○	J.E.Browersら <sup>11)</sup>
VVMD8	TAACAAACAAGAAGAGGAAT	gtttcttAGCACATCCACAACATAATG	50or55	×	J.E.Browersら <sup>11)</sup>
VrZAG7	GTGGTAGTGGGTGTGAACGGAGTGG	gtttcttAACAGCATGACATCCACCTCAACGG	55	○	K.M.Sefcら <sup>9)</sup>
VrZAG12	CTGCAAAATAAATATTAATAAATTCG	gtttcttAAATCCTCGGTCTCTAGCCAAAAGG	50or55	×	K.M.Sefcら <sup>9)</sup>
VrZAG15	GGATTTTGCGTGTAGTTTGTGAAG	gtttcttATCTCAAGCTGGGCTGTATTACAAT	52	○	K.M.Sefcら <sup>9)</sup>
VrZAG21	TCATTCACTCACTGCATTCATCGGC	gtttcttGGGGCTACTCCAAGTCAGTCTCTTG	50	○	K.M.Sefcら <sup>9)</sup>
VrZAG47	GGTCTGAATACATCCGTAAGTATAT	gtttcttACGGTGTGCTCTCATTGTCATTGAC	50	○	K.M.Sefcら <sup>9)</sup>
VrZAG62	GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC	gtttcttCCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	55	○	K.M.Sefcら <sup>9)</sup>
VrZAG64	TATGAAAGAAACCCAACGGCGGCACG	gtttcttTGCAATGTGGTCAAGCCTTTGATGGG	55	○	K.M.Sefcら <sup>9)</sup>
VrZAG67	ACCTGGCCCGACTCCTCTGTATGC	gtttcttTCCTGGCGGATAACCAAGCTATG	55	○	K.M.Sefcら <sup>9)</sup>
VrZAG79	AGATTGTGGAGGAGCGAACAAACCG	gtttcttTGCCCCCATTTTCAAACTCCCTTCC	55	○	K.M.Sefcら <sup>9)</sup>
VrZAG83	GGCGGAGGCGGTAGATGAGAGGGCG	gtttcttACGCAACGGCTAGTAAATACAACGG	55	○	K.M.Sefcら <sup>9)</sup>
VMC2A5	CCACATGGAAAGTGGAAAGAAAAT	gtttcttTGATGAGGTATGAGGTGGCAA	55	○	後藤奈美ら <sup>2)</sup>
VMC2H4	ACCAGGTGTGCCTATAAGAATC	gtttcttTCTCTGGAACATCCAATCAAC	55	○	後藤奈美ら <sup>2)</sup>



## B DNA抽出

各品種の葉、約100mgをマイクロチューブに入れ、液体窒素で冷却しながらベッスルを用いて粉碎した。粉碎した試料からのDNA抽出には、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用い、抽出したゲノムDNAを電気泳動または分光光度計により定量した。

## C SSRマーカー

品種判別用SSRマーカーとして、ワイン用品種で報告されている中からVVS1、2、3、4<sup>12)</sup>、VVMD5、6、7、8<sup>1)</sup>、VrZAG7、12、15、21、47、62、64、67、79、83<sup>9)</sup>、VMC2A5、2H4<sup>2)</sup>の合計20種類を用いた(表1)。各SSRマーカーは、フォワード側のプライマーの5'末端をFam、Vic、Nedのいずれかでラベルした。

## D PCR反応

PCRの反応液の組成は、10mMのTris-HCl (pH8.3)、50mMのKCl、1.5mMのMgCl<sub>2</sub>、0.2mMのdNTPs、0.5μMの各プライマー、5ngのゲノムDNA、0.5unitのTaq polymeraseとし、反応量を10μlとした。反応は、94℃1分、55℃、52℃、50℃のいずれか(表1)で1分、72℃2分で35サイクル行った。各SSRマーカーのアニリング温度、フォワードプライマーとリバースプライマーの塩基配列を表1に示した。

## E フラグメント解析

PCR反応の後、増幅産物をDNAシーケンサー(ABI 3100または3130、Applied Biosystems)により高分子ポリマーPOP4(ABI 3130はPOP7)で分画した。解析は内部標準の蛍光ラベルDNAマーカー(400HD-ROX)を指標に、GENESCANソフト(Applied Biosystems)を用いて、増幅したフラグメントの長さを整数値で表し、各品種の遺伝子型とした。このデータを基に、生食用ブドウの品種判別を試みた。

### (2) 生果実からの品種判別

果実からの品種判別は、「巨峰」および「ピオーネ」の軸、果皮および果肉を用いた。軸および果皮は液体窒素で冷却しながら、乳鉢と乳棒を用いて粉碎した。果肉は、凍結乾燥(EYELA FD-711、東京理化を用いた)を行った後に粉碎した。粉碎した試料からのDNA抽出は、軸および果皮ではDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用い、果肉ではGenomic-tip20 (QIAGEN) を用い、抽出したゲノムDNAを電気泳動または分光光度計により定量した。

以後の解析は、葉からの解析と同様に行い、遺伝子型を決定し品種判別を試みた。

### (3) 果実加工品の品種判別

#### A 遺伝子型の決定

果実加工品からの品種判別は、レーズン(A、Bの2種類、品種名表記無し)、干しぶどう(巨峰干しぶどう)、果肉入りゼリー(A、Bの2種類、品種名表記無し)中の果実を供試した。レーズンおよび干しぶどうは液体窒素で冷却しながら、乳鉢と乳棒を用いて粉碎した。果肉入りゼリーは、凍結乾燥(EYELA FD-711、東京理化を用いた)を行った後に同様に粉碎した。粉碎した試料からのDNA抽出は、レーズンおよび干しぶどうではDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用い、果肉入りゼリーではGenomic-tip20 (QIAGEN) を用い、抽出したゲノムDNAを電気泳動または分光光度計により定量した。

以後の解析は、葉からの解析と同様に行い、遺伝子型を決定し品種判別を試みた。

#### B 抽出したDNAの確認

果実および加工品から抽出したDNAを品種判別に使用できるかどうか確認するために、NS5-NS6 rDNA領域を増幅するプライマー<sup>13)</sup>を用いて、PCR反応を行い、電気泳動により、増幅DNAの確認を行った。

## 3 試験結果

### (1) SSRマーカーの選択

品種判別マーカーとして選んだSSRマーカーが、生食用ブドウ品種に適用できるかどうかを検証した。ワイン用ブドウ品種(「カベルネソービニオン」、「リースリング」)では、供試した20種類のSSRマーカーすべてで、1~2本の増幅バンドが見られた。一方、生食用ブドウ品種では、20種類のSSRマーカーのうち、14種類で明瞭な増幅バンドが認められ、遺伝子型を決定することができたことから、生食用ブドウの品種判別に使用できることが判明した(図1)。残りの6種類のSSRマーカーは、生食用ブドウでの増幅が不十分であったこと、増幅してもバンドの正確なサイズ決定が困難であったことから、それ以降の分析から除外した(表2)。

次に、生食用ブドウで使用可能な14種類のSSRマーカーを用いて品種判別が可能であるかどうかの検討を行った。確認のため、20品種の遺伝子型を決定し比較したところ、各マーカーの遺伝子型は、「スチューベン」と「キャンベルアーリー」間で14種類中10種類、「スチューベン」と「ロザキ」では14種類のマーカーすべてで遺伝子型が異なっていた。供試した20品種ワイン用2品種含む)では、7種類以上のSSRマーカーの差で品種判別が可能であることが確認できた。

## (2) 葉を用いた品種判別

## A 葉からの DNA 抽出

ワイン用と生食用ブドウ 65 品種の葉 100mg から DNA の抽出を試みた。DNeasy Plant Mini Kit を用いた抽出で、各品種 0.5 ~ 10 $\mu$ g の DNA を抽出することができた。

## B 品種判別

福島果樹研と農研機構果樹研でそれぞれ栽培されている2倍体品種「キャンベルアーリー」および4倍体品種「安芸クイーン」について、遺伝子型を比較し、遺伝子型が一致するかどうかを検証した。両研究所の「キャンベルアーリー」および「安芸クイーン」の遺伝子型は、供試した14種類のSSRマーカーすべてで一致したことから、品種判別が可能であることが示された(表2)。

また、供試した50品種全てで、品種の判別が可能であった。「巨峰」と「ブラックオリンピア」、「紅伊豆」と「甲斐路」の2つの組み合わせでは14種類中1種類のみ、SSRマーカーの差を認めた。それ以外の組み合わせで

は2種類以上の差が認められた。

## C 親子判別

2倍体品種の親子判別には、「ネオマスカット」、その両親とされている「マスカットオブアレキサンドリア」および「甲州三尺」を供試した。「ネオマスカット」の遺伝子型は、SSRマーカーVVS2で131/153であり、「マスカットオブアレキサンドリア」から153の対立遺伝子が、「甲州三尺」からは131の対立遺伝子が1つずつ遺伝していた(表4)。同様に14種類のマーカーすべてで両親から矛盾無く遺伝していたため、「ネオマスカット」の両親は「マスカットオブアレキサンドリア」と「甲州三尺」であることが確認できた。

4倍体品種の親子判別には、「あづましずく」、両親の「ブラックオリンピア」および「ヒムロッドシードレス4倍体」を供試した。「あづましずく」において、SSRマーカーVrZAG79の遺伝子型は、243/249/265/271であり、「ブラックオリンピア」から243と249の対立遺伝子が、「ヒムロッドシードレス4倍体」からは265と271の対立遺

表3 2倍体および4倍体品種の品種判別

品種名	倍数性	SSR マーカー				
		VVS2	VVMD7	VrAG62	VrZAG67	VrZAG79
キャンベルアーリー (農研機構果樹研)	2	127/137	240/252	210/212	147/156	243/253
キャンベルアーリー (福島県果樹研)	2	127/137	240/252	210/212	147/156	243/253
安芸クイーン (農研機構果樹研)	4	127/137/139	240/244/254	192/194/210	136/147	243/249/257
安芸クイーン (福島県果樹研)	4	127/137/139	240/244/254	192/194/210	136/147	243/249/257

表4 2倍体品種の親子判別

品種名	SSR マーカー				
	VVS2	VVS4	VVMD5	VVMD7	VrZAG62
マスカットオブアレキサンドリア	137/153	171/178	232/236	256/254	192/210
ネオマスカット	131/153	171/178	232/238	248/254	192/194
甲州三尺	131/141	198/178	242/238	248/248	194/194

表5 4倍体品種の親子判別

品種名	SSR マーカー													
	VrZAG21				VrZAG79									
ブラックオリンピア	195	/	205	/	211	/	219	243	/	249	/	253	/	257
あづましずく	195	/	195	/	211	/	211	243	/	249	/	265	/	271
ヒムロッドシードレス4倍体	195	/	195	/	211	/	211	265	/	271	/	265	/	271



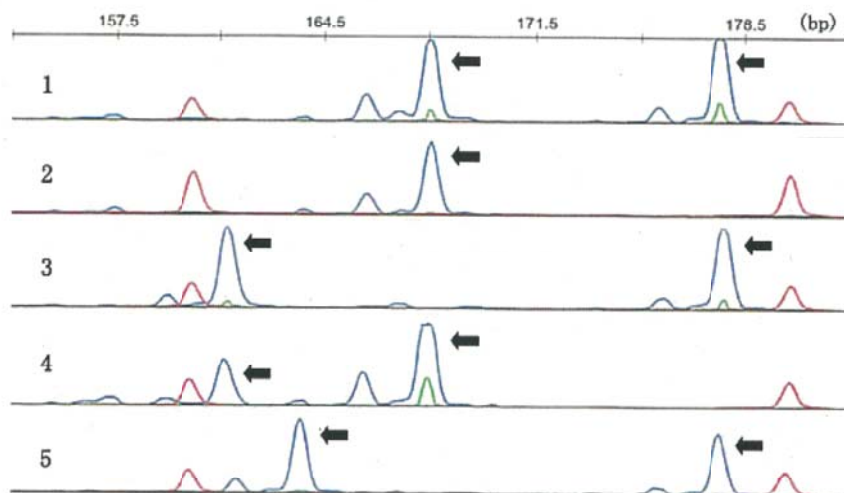


図1 マーカー VrZAG47 で増幅したフラグメント解析の波形図  
(1. 瀬戸ジャイアンツ 2. ポートランド 3. リザマート 4. ゴルビー 5. バラディー)

表6 軸および果皮からの品種判別

品種名 (部位)	倍数性	SSR マーカー				
		VVS2	VVMD5	VVMD7	VrZAG21	VrZAG47
ピオーネ (軸)	4	137/139	236/240	240/244/252	205/211/219	160/166
ピオーネ (果皮)	4	137/139	236/240	240/244/252	205/211/219	160/166
ピオーネ (葉)	4	137/139	236/240	240/244/252	205/211/219	160/166

表7 果実からの品種判別

品種名 (部位)	倍数性	SSR マーカー			
		VVS2	VVMD5	VVMD7	VrZAG21
巨峰 (果肉)	4	127/137/139	236/240	240/244/252/254	195/205/211/219
巨峰 (葉)	4	127/137/139	236/240	240/244/252/254	195/205/211/219

伝子が2つずつ遺伝していた (表5)。同様に14種類のマーカーすべてで、両親から対立遺伝子が矛盾無く遺伝していたため、両親に誤りがないことが確認できた。このことから、2倍体および4倍体品種の親子判別が可能であることを確認できた。

D 遺伝子型データベースの作成

生食用ブドウを含む50品種(重複を含めると65品種)について、14種類のSSRマーカーの遺伝子型データベースを作成することができた (別表)。

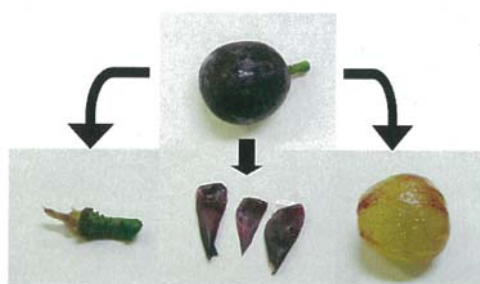


図2 供試した果実サンプル

(3) 生果実からの品種判別

果実からのDNA抽出は、主軸から切り離した生果実1つを軸(150~200mg)、果皮(1.5~2.0g)および果肉(約15g)に分けて行った (図2)。DNeasy Plant Mini Kitにより、軸からは1.1~2.3μgのDNAを、果皮からは0.7~0.8μgのDNAを抽出することができた。これらのDNAを用いてフラグメント解析により遺伝子型を決定することができた。供試した14マーカー全てで遺伝子型が一致したことから、品種判別が可能であることを確認できた (表6)。

また、果肉からは、凍結乾燥後 Genomic-tip20 を用いて、0.3~0.6μgのDNAを抽出することができた。抽出したDNAを用いて、フラグメント解析により遺伝子型を決定することができ、14マーカー全てで遺伝子型が一致したことから、品種判別が可能であることを確認できた (表7)。このことから、生果実からの品種判別が可能であることを確認できた。

表8 加工品の品種判別

商品ラベル	SSR マーカー				判別結果
	VVS2	VVMD5	VVMD7	VrZAG21	
レーズンA	149/155	238/238	244/258	195/207	トムソンシードレスと一致
レーズンB	149/155	238/238	244/258	195/207	トムソンシードレスと一致
巨峰干しぶどう	137/155	238/240	244/258	195/205	供試品種と不一致
トムソンシードレス(葉)	149/155	238/238	244/258	195/207	-
巨峰(葉)	127/137/139	236/240	240/244/252/254	195/205/211/219	-

#### (4) 果実加工品の品種判別

加工品レーズン(約5g) および干しぶどう(約5g) は、液体窒素を用いて粉碎した後、Genomic-tip20 により DNA を抽出し、フラグメント解析により遺伝子型を決定することができた。レーズン A と B は、14 マーカー全てで「トムソンシードレス」と遺伝子型が一致した。しかし、巨峰干しぶどうについては、「巨峰」の遺伝子型と一致せず、データベースにあるどの品種とも一致しなかった(表 8)。

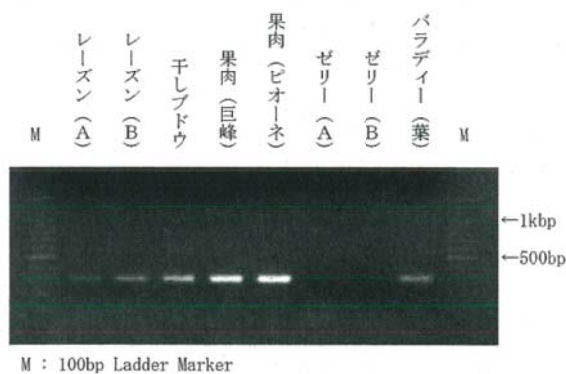


図3 NS5-NS6 primer を用いたゲノム DNA の確認

果肉入りゼリーは、凍結乾燥後、Genomic-tip20 を使用して DNA を抽出し、フラグメント解析を行ったが、遺伝子型を決定できる波形データを得ることができなかった。このため、DNA が抽出されていることを確認するために、NS5-NS6 プライマーを用いた PCR 後、電気泳動を行ったが増幅は見られなかった(図3)。

以上のことから、加工品の果肉入りゼリーでは品種判別ができなかったが、レーズンおよび干しぶどうでは品種判別が可能であることを確認できた。

## 4 考察

ワイン用ブドウ品種を判別できる SSR マーカーが、生食用ブドウ品種に適用できるか検証したところ、20 種類中 14 種類で明瞭な増幅バンドを生じ、遺伝子型を決定することができたことから、これらのマーカーが、生食用ブドウ品種判別に使用可能であると推察された。

本研究では、メーカーが同一で機種の異なる DNA シンセター (ABI 3100 または 3130) を使用して遺伝子型を決定したが、波形データに違いはみられなかった。泳動の際に使用するポリマー (POP4、POP7) では、波形データには違いはみられないが、使用する SSR マーカーによっては、泳動度が 1bp 程度異なるケースが散見された。しかし、その差異は全ての品種で同様にみられたため、分析する際にポジティブコントロールとなる品種を用いることで、遺伝子型データを一致させることが可能であった。

また、本研究では、PCR 増幅の際に異なる DNA Taq Polymerase を使用し、遺伝子型の決定を試み、ブドウにおいては、波形データに違いがみられなかったことも確認している(データ省略)。これらのことから、本研究で使用した SSR マーカーを使用することで、異なる場所においても、本研究と同様の遺伝子型のデータを得ることができると推察される。

園芸作物では、しばしば倍数体育種が試みられており、ブドウにおいても例外ではなく、主に大粒化を目的として 4 倍体品種が作出されている。また、現在の経済栽培品種では 4 倍体品種が数多く存在しているため、4 倍体品種間の判別は重要である。4 倍体品種の遺伝子型を確認すると、3 または 4 個の推定対立遺伝子を検出した SSR マーカーが複数存在した。また、4 倍体品種においても品種判別と親子判別が可能であったことから、倍数性が異なっても検出能力に差はないと推察される。しかし、4 倍体品種において全ての対立遺伝子を決定するためには、両親の遺伝子型を把握する必要があるため、遺伝子型データベースの拡充を図る必要がある。

登録品種の権利侵害が疑われる場面を想定した場合、葉の入手が困難な場合も考えられる。その場合は、販売されている生果実から品種を判別する技術が必要となる。このため、生果実を供試し、軸、果皮および果肉と 3 つの部位から品種判別を行い、すべての部位で判別が可能であった。しかし、DNA を抽出する際に、水分含量の多い果肉は凍結乾燥をする必要があるが、軸および果皮は、凍結乾燥が不要で、果肉よりサンプル量が少量で行える。また、抽出法において、果肉は Genomic-



tip20 を使用しなければ十分な収量は得られず、モモにおいても果肉からの DNA 抽出には、Genomic-tip20 が適しているとの報告がある<sup>7)</sup>。一方、軸および果皮は、DNA 抽出の工程が比較的容易な DNeasy Plant Mini Kit で行うことができる。軸と果皮を比較すると、DNA の収量は軸の方が多いため、生果実からの品種判別には、軸が時間と労力のかからない部位と推察される。

加工品のレーズンおよび干しぶどうにおいて、品種判別が可能であったことから、これらの加工処理による DNA の損傷は少ないと推察される。果肉入りゼリーの品種判別では、モモにおいても、シロップ漬け等で DNA の増幅ができない加工品が報告されている<sup>8)</sup>ことから、ブドウにおいても加工処理段階の加圧や糖の付加により、DNA が損傷を受けていると推察された。このため、品種判別が可能な加工程度の検討を行う必要があるが、今後、解析する品種と SSR マーカーの数をさらに増やすことで、より精度の高い品種判別が可能であると考えられる。また、品種判別、親子判別技術を確立するために、SSR マーカーによるカタログ化やブドウ遺伝子型データベースを拡充していく必要がある。

本研究により、登録された品種によく似た生産物（ブドウ）が外国などで生産・出荷された際に、登録品種であるかどうかの真偽を科学的に確認することができる。また、果実および加工品（一部）から品種の判別が可能であることが明らかになったため、品種の不当表示に対する警鐘とすることができ、問題が生じる可能性のある場合は科学的に確認できると推察される。本研究の技術活用の留意点として、場所を異にする研究機関間の共同試験等により、本品種判別法の精度を確認する必要がある。また、分析は DNA シーケンサーを保有する場所でしか行えないことを十分に考慮する必要がある。

## 5 摘要

生食用ブドウの品種判別に利用可能な SSR マーカーの選抜を行い、主要な生食用品種やワイン用品種の品種を判別するための技術開発を試みた。さらに、果実および加工品（レーズン、果実ゼリー）からの DNA 抽出の検討を行い、品種判別法の開発を試みた。

- (1) 生食用ブドウの品種判別に利用可能と推察される、明瞭な増幅バンドを生じ、遺伝子型を決定することができる 14 種類の SSR マーカーを選抜することができた。
- (2) 14 種類の SSR マーカーを用いて生食用ブドウ 65 品種（重複無しでは 50 品種）の遺伝子型を決定し、品種判別や親子判別が可能であることを確認した。
- (3) 果実（軸、果皮、果肉）および加工品（レーズン、干

しぶどう、ゼリー）から DNA を抽出し、フラグメント解析を行った。果実および加工品のレーズン、干しぶどうでは、品種判別が可能であったが、果実ゼリーでは、DNA が抽出されていないまたは、破壊されている可能性が示唆され、品種判別ができなかった。

- (4) 以上のことから、品種判別が可能な加工程度について、検討の余地が残されたが、生食用ブドウの葉および果実、加工品（レーズン等）について DNA 判別が可能であり、重複を含む 65 品種のブドウ遺伝子型データベースを構築することができた。

## 謝辞

本研究に際し、ブドウの葉の採取にご協力いただいた穴沢清市氏はじめ、多くのご助言をいただいた農研機構果樹研究所の皆様には感謝の意を表します。なお、本研究は農林水産省プロジェクト「安全で信頼性、機能性が高い食品・農産物提供のための評価・管理技術の開発」の一環として行われたものである。

## 引用文献

- 1) Bowers, J. E., G. S. Dangl, R. Vignani and C. P. Meredith. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39: 628-633.
- 2) 後藤奈美・万光華、沼田美子代、他. 2004. Simple Sequence Repeat (SSR) 解析による不明ブドウ品種の同定. *J.ASEV*. 15 No.2 : 52-57.
- 3) Kimura, T., Y. Z. Shi, M. Shoda, K. Kotobuki, N. Matsuta, T. Hayashi, Y. Ban and T. Yamamoto. 2002. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis. *Breeding Science*. 52 : 115-121.
- 4) Kimura, T., Y. Sawamura, K. Kotobuki, N. Matsuta, T. Hayashi, Y. Ban and T. Yamamoto. 2003. Parentage analysis in pear cultivars characterized by SSR markers. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 72: 182-189.
- 5) 小野勇治・山本俊哉・山口正己・佐藤 守・岡田初彦・林 建樹. 2003. SSR マーカーによるモモの品種識別と親子鑑定. *園学雑* 72 (別 2) : 253.
- 6) 小野勇治・山本俊哉・山口正己・佐藤 守・岡田初彦・林 建樹. 2004. SSR マーカーによるモモの品種識別と親子鑑定 その 2 育成品種・系統の解析. *園学雑*. 73 (別 1) : 182.
- 7) 大橋義孝・木幡栄子・岡田初彦・佐藤 守. SSR マー

- カーを用いたモモの品種識別. 平成 17 年度福島県普及に移す成果.
- 8) 大橋義孝・木幡栄子・小野勇治・佐藤守. 2008. モモ加工製品における品種判別の検証. 農林水産省農林水産技術会議事務局研究成果 445 : 88-91.
- 9) Sefc, K. M. , F. Regner, E. Turetschek, J. Glossl and H. Steinkellner. 1999. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome* 42: 367-373.
- 10) 高品善・松田成美・木村鉄也・山本俊哉・西村幸一. 2004. オウトウ品種判別における SSR マーカーの利用. 育種学研究. 6 (別1) : 181.
- 11) 高品善・石黒亮・西村幸一. 2007. SSR マーカーによる輸入オウトウおよび国内市販品種の品種識別. *DNA 多型* 15 : 101-104.
- 12) Thomas, M. R. and N. S. Scott. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence - tagged sites (STSs) . *Theor. Appl. Genet.* 86: 985-990.
- 13) White, T. J. , T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In "PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications " Innis, M. A. , D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (eds.) , Academic Press, Inc., USA :315-322.
- 14) 山田昌彦・山根弘康・佐藤明彦・平川信之・岩波宏・吉永勝一・小澤俊治・三谷宣仁・白石美樹夫・吉岡美加乃・中島育子・中野正明・中畝良二. 2008. ブドウ新品種 'シャインマスカット'. 果樹研報 Bull. Natl. Inst. Fruit Tree Sci. 7 : 21-38.
- 15) Yamamoto T. , K. Mochida, T. Imai, T. Haji, H. Yaegaki, M. Yamaguchi, N. Matsuta, I. Ogiwara and T. Hayashi. 2003. Parentage analysis in Japanese peaches using SSR markers. *Breeding Science* 53: 35-40.
- 16) Yamamoto, T. , T. Kimura, T. Hayashi and Y. Ban. 2006. DNA profiling of fresh and processed fruits in pear. *Breeding Science.* 56 : 165-171.



別表 遺伝子型データベース1

品種名	倍数	SSR マーカー						
		VV52	VV54	VVMD5	VVMD7	VrZAG7	VrZAG21	VrZAG47
安芸クイーン	4	127/137/139	178/180	236/240	240/244/254	160/166	195/205/211	160/166
安芸シードレス	2	129/139	171/178	231/238	244/254	160/160	195/195	166/175
あづましずく	4	127/139/155	178/186	236/242	244/252/254	160/166	195/211	160/166/175
伊豆錦	4	131/139	171/178	232/242	254/254	160/162	195/219	160/175
イタリア	2	137/153	171/178	236/242	248/252	160/160	195/205	160/175
オリエンタルスター	2	129/137	178/180	242/242	248/254	166/166	195/205	160/166
甲斐路	2	131/139	171/178	232/242	254/254	160/162	195/219	160/175
カベルネソーピニオン	2	143/155	171/178	236/244	244/244	160/160	205/211	156/170
キャンベルアーリー	2	127/137	178/180	240/240	240/252	166/166	205/211	160/166
巨峰	4	127/137/139	178/180	236/240	240/244/252/254	160/166	195/205/211/219	160/166
甲州三尺	2	131/141	178/198	238/242	248/248	160/162	199/205	166/175
ゴルビー	4	137/139	178/180	236/240	244/252/254	160/166	195/205/219	160/166
サニールージュ	4	129/137/139	171/178/186	232/236/248	240/248/252	160/166	205/207/219	160/166/181
シャインマスカット	2	129/155	170/180	242/242	248/254	162/162	195/195	160/166
シャルドネ	2	141/147	171/176	238/242	244/248	160/160	205/211	162/170
翠峰	4	139/139	178/178	230/236/240	244/254	160/160	195/205/219	160/166
スチューベン	2	129/137	178/180	242/242	240/252	160/166	205/211	166/168
瀬戸ジャイアンツ	2	139/153	170/178	232/244	248/248	160/162	195/207	166/175
センテニアル	4	111/137/139	172/178	230/236	244/254	160/160	195/219	166/166
ダークリッジ	4	127/137	178/180	236/240	240/244/246	160/166	195/205/211	160/166
高尾	高4	127/137/139	155/178/180	236/236	240/244/254	160/166	205/211/219	166/166
デラウエア	2	129/137	171/186	232/248	248/252	160/166	205/207	166/181
トムソンシードレス	2	149/155	178/178	238/238	244/258	160/160	195/207	162/175
ナイアガラ	2	127/137	178/180	240/240	240/246	166/166	211/211	160/166
ニューナイ	2	151/159	178/178	228/238	248/248	160/160	207/211	175/175
ネオマスカット	2	131/153	171/178	232/238	248/254	160/162	195/199	160/175
ノースブラック	2	127/129	178/186	242/242	240/252	162/166	207/211	160/166
ノースレッド	2	127/159	178/186	242/242	240/252	162/166	205/205	160/166
パッファロー	2	137/159	178/180	242/242	240/254	162/166	211/211	166/168
ハニービーナス	4	127/129/137/153	178/180	236/240/242	240/244/252/254	160/166	205/211/219	160/166
パラデー	2	155/155	178/178	242/242	252/256	160/160	195/211	162/175
ピオーネ	4	137/139	178/178	236/240	240/244/252	160/166	205/211/219	160/166
ピッテロピアンコ	2	149/153	170/178	240/250	252/254	160/160	195/211	160/162
ピノ・ノワール	2	141/155	171/176	232/242	244/248	160/160	205/211	166/170
ヒムロッドシードレス	2	129/155	155/180	238/242	244/252	166/166	195/211	166/175
ヒムロッドシードレス4倍体	4	129/155	178/186	238/242	244/252	166/166	195/211	166/175
ふくしずく	4	111/129/137	178/180/186	236/238/240/242	244/252	160/166	195/211/219	160/166
藤稔	4	137/139/153	178/180	236/242	240/244	160/166	205/211/219	166/166
ブラックオリンピア	4	127/137/139	155/178	236/240	240/244/252/254	160/166	195/205/211/219	160/166
紅伊豆	4	127/137/139	178/180	236/236	240/244/254	160/166	205/211/219	166/166
ポートランド	2	145/155	171/178	230/230	240/246	166/166	211/211	166/166
マスカットオブアレキサンドリア	2	137/153	171/178	232/236	254/256	160/162	195/211	160/175
マスカットベリー A	2	131/139	171/178	231/242	254/254	160/160	195/205	166/176
マニキュアフィンガー	2	155/155	170/178	240/242	252/256	168/168	195/207	162/166
メルロー	2	137/155	171/176	232/242	244/268	160/160	195/205	170/172
メンデルのブドウ	2	137/147	170/178	236/250	244/252	160/162	207/211	166/166
リースリング	2	147/155	171/171	230/238	254/262	160/160	207/211	162/170
リザマート	2	155/159	172/178	232/244	238/258	162/162	205/205	160/175
ロザキ	2	137/139	172/178	230/236	244/254	160/160	195/219	166/166
ロザリオピアンコ	2	137/153	171/172	232/236	244/256	160/160	211/219	166/175

別表 遺伝子型データベース 2

品種名	倍数	SSR マーカー						
		VrZAG62	VrZAG64	VrZAG67	VrZAG79	VrZAG83	VMC2A5	VMC2H4
安芸クイーン	4	192/194/210	141/145	136/147	243/249/257	202/208	154/154	208/221/223
安芸シードレス	2	192/194	143/159	143/155	245/265	196/208	154/169	210/212
あづましずく	4	194/210	143/145/163	143/145/147/158	243/249/265/271	166/202/208	154/169	208/212/223/229
伊豆錦	4	192/210	143/163	130/143	261/263	196/208	154/154	221/221
イタリア	2	198/210	163/200	143/158	261/263	196/202	154/154	208/210
オリエンタルスター	2	192/210	143/163	130/143	253/261	196/202	154/154	210/221
甲斐路	2	192/210	143/163	130/143	261/263	198/208	154/154	221/221
カベルネソービニオン	2	194/200	143/163	130/143	253/253	208/208	154/169	219/227
キャンベルアーリー	2	210/212	141/145	147/156	243/253	196/208	154/169	221/223
巨峰	4	192/194/210	141/143/145	136/147/158	243/249/253/257	196/202/208	154/178	208/221/223
甲州三尺	2	194/194	145/163	143/151	249/263	202/208	154/169	206/219
ゴルビー	4	194/210	141/143/145	136/147/158	243/249/254/257	202/208	154/178	207/223
サニールージュ	4	210/210	141/143/159	136/141/156/158	243/253/257/271	196/198/208	154/169	208/221/223
シャインマスカット	2	192/194	143/145	130/130	253/261	166/196	154/154	215/221
シャルドネ	2	194/202	163/167	143/156	249/251	196/208	169/188	208/242
翠峰	4	192/194	141/143/145	136/147/158	243/249/253/257	196/202/208	154/178	208/223
スチューベン	2	198/208	143/145	130/147	253/253	166/166	154/169	215/242
瀬戸ジャイアンツ	2	194/194	143/167	130/153	257/263	196/202	154/169	221/221
センテニアル	4	192/194	141/143	136/158	249/257	196/202	154/178	208/221
ダークリッジ	4	194/208/210	141/145	136/147/158	243/257/265	196/208	154/169	221/223/229
高尾	高4	192/194/210	141/143/145	136/147/158	249/253/257	202/208	154/178	221/223
デラウエア	2	208/210	141/159	141/156	257/271	198/208	154/169	212/221
トムソンシードレス	2	194/194	147/163	130/143	253/265	196/202	169/169	212/221
ナイアガラ	2	208/210	143/145	145/147	243/265	196/198	167/169	223/229
ニューナイ	2	194/202	147/163	132/143	255/257	202/202	154/176	210/219
ネオマスカット	2	192/194	143/145	130/151	261/263	196/202	154/169	206/221
ノースブラック	2	208/210	145/145	130/147	243/271	166/196	154/155	208/221
ノースレッド	2	200/212	141/145	130/156	243/271	166/208	154/169	208/221
パッファロー	2	192/212	143/163	143/145	245/253	208/208	154/154	208/223
ハニービーナス	4	192/194/208/210	141/143/145	130/136/147	243/245/249	196/208	154/169/178	208/210/221
バラディー	2	194/210	147/163	132/143	257/263	196/202	154/154	211/221
ピオーネ	4	192/194/210	141/143/145	136/147/158	243/253/257	196/208	154/178	208/223
ピッテロピアンコ	2	202/210	145/163	136/143	257/257	196/198	154/169	219/221
ピノ・ノワール	2	194/200	143/167	130/156	245/251	196/208	188/188	208/242
ヒムロッドシードレス	2	194/210	143/163	143/145	265/271	166/196	169/169	212/229
ヒムロッドシードレス4倍体	4	194/210	143/163	143/145	265/271	166/196	169/169	212/229
ふくしずく	4	194/210	143/145/163	143/145/147/158	243/253/271	166/196/202/208	154/169/178	221/223/229
藤稔	4	194/208/210	141/143/145	130/136/147	243/249/253/265	166/208	154/178	208/210/215/223
ブラックオリンピア	4	192/194/210	141/143/145	136/147/158	243/249/253/257	196/202/208	154/178	208/221/223
紅伊豆	4	192/194/210	141/143/145	136/147/158	249/253/257	202/208	154/178	223/223
ポートランド	2	208/208	143/145	145/147	253/265	196/196	154/169	208/215
マスカットオブアレキサンドリア	2	192/210	143/145	130/130	253/261	196/196	154/154	210/221
マスカットベリー A	2	192/192	143/159	130/155	245/249	196/208	154/167	208/210
マニキュアフィンガー	2	194/210	147/163	132/143	255/257	196/202	154/154	212/212
メルロー	2	194/208	143/163	130/143	251/265	198/202	154/154	206/221
メンデルのブドウ	2	202/210	143/163	130/153	253/257	196/202	154/172	221/221
リースリング	2	200/210	141/163	143/156	249/251	196/202	154/188	227/232
リザマート	2	194/202	163/167	143/153	253/263	196/202	154/169	212/221
ロザキ	2	192/194	141/143	136/158	249/257	196/202	154/178	208/221
ロザリオピアンコ	2	194/210	141/143	130/136	253/257	196/202	154/154	210/221