

# **ブドウ 24 品種の DNA 品種識別技術マニュアル**

**- SSR マーカーによるブドウ 24 品種の DNA 品種識別技術 -**

**国立研究開発法人**

**農業・食品産業技術総合研究機構**

## 1. はじめに

ブドウは、ブドウ科ブドウ属に属する果樹であり、ワイン、生食、レーズンなどの用途で栽培されるヨーロッパブドウ (*European grape*, *Vitis vinifera*) が世界の主要栽培種である。一方、生育期に降雨が多い地域では、北アメリカを原産とする野生種の *Vitis labrusca* を交雑の基本種として、ヨーロッパブドウやそれ以外の野生種との雑種であるアメリカブドウ (*American grape*, *Vitis labruscana*) が栽培されており、生食用やジュース用に用いられている。日本では、生食用の用途がメインで、アメリカブドウ、およびアメリカブドウとヨーロッパブドウの雑種を中心に、一部にヨーロッパブドウも栽培されている。

ブドウは通常二倍体であるが、突然変異による四倍体が発見され、四倍体枝変わり品種の交雑により「巨峰」が日本で育成された。四倍体は二倍体より大粒になるため我が国では盛んに育種が行われ、「ピオーネ」、「藤稔」、「安芸クイーン」等の品種が育成されている。しかしながら四倍体は「巨峰」を中心に交雑が行われてきたことから、遺伝的な変異は二倍体に比べ狭い。

日本でのブドウの栽培は、総栽培面積 14,160.4ha である (図 1、農林水産省生産局園芸作物課「平成 27 年産 特産果樹生産動態等調査」から作成)。平成 27 年産の品種別栽培面積では、「巨峰」が 31.3%、「デラウェア」が 16.6%、「ピオーネ」が 16.4%、「シャインマスカット」が 7.0%、「キャンベルアーリー」が 3.8%、「ナイアガラ」が 3.4%と続いている。その中で、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶研究部門 (以下、農研機構果樹茶部門) が育成した「シャインマスカット」は、平成 18 年 3 月 9 日に品種登録され、平成 27 年度には栽培面積が 992.3ha に達している。これら優良品種の品種名の偽装表示や登録品種の海外流出は、ブドウ生産に大きな影響をおよぼすだけでなく、消費者に対する食の安全・安心の確保の観点からも大きな問題である。

これまでに、農研機構果樹茶部門は、福島県農業総合センター果樹研究所と共同して、2010 年に「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」を論文公表した\*。本論文の方法では、2 塩基モチーフの 14 種類の SSR (Simple Sequence Repeat の略、別名マイクロサテライト) マーカーを用いて、65 の品種が識別可能である。しかしながら、2 塩基モチーフの SSR マーカーでは、スタッターバンドが生じやすく、また判定するべきピーク間に大幅な増幅差が見られる場合もあり、正確な遺伝子型決定が困難な場合があることから、より長いモチーフをもつ SSR マーカーの開発とブドウの品種識別技術の開発を行った。

ブドウ品種「マスカット・オブ・アレキサンドリア」と「キャンベルアーリー」について、次世代シーケンサによる RNA-seq 解析を行い、アセンブル後に 4-5 塩基の繰り返し配列を Tandem Repeats Finder ソフトウェアで抽出して SSR

マーカーを設計し、「ピノノワール」の物理地図で染色体上の位置を確認した。抽出した SSR マーカーから、正確な遺伝子型の判定が可能等の条件でマーカーを絞り込み、SSR マーカーによるブドウ 24 品種の DNA 品種識別技術を作成した。なお 2013 年に、農研機構果樹茶部門と種苗管理センターが共同で作成した「SSR マーカーによる日本なし 24 品種の DNA 品種識別技術」に準じて、マニュアルを作成した。

\*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 (2010) 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。福島農総セ研報 2, 11-20.

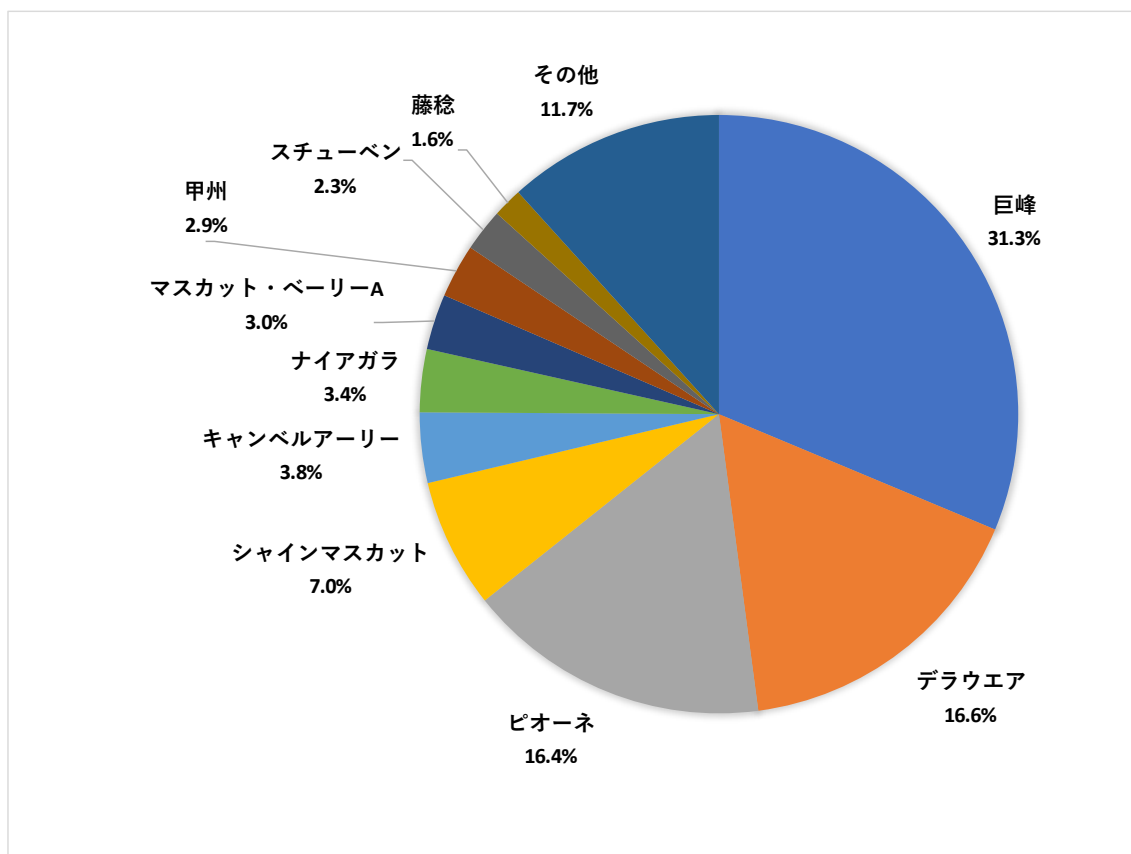


図 1 ブドウの品種別栽培面積 (平成 27 年産)  
総栽培面積 14,160.4ha

## 2. 一般的注意事項及びDNA抽出法について

SSR マーカーによる DNA 品種識別分析での実験、試薬調製の一般的注意事項及びサンプルからの DNA 抽出方法については、農林水産省 HP に掲載の＜SSR マーカーによるニホンナシの DNA 品種識別技術 ([http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna\\_manual/san10.pdf](http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_manual/san10.pdf))＞を参照のこと。

## 3. SSRマーカーを用いたPCR反応

波形のチェックや遺伝子型の判定が容易なことを条件として絞り込んだ、12種類の SSR マーカーを用い24品種についてPCR反応を行う。PCR反応条件は、通常のPCRと基本的に同じプロトコールである。

### ＜準備するもの＞

1.5ml 又は 2.0ml チューブ (滅菌済み)、96 穴 PCR プレート又は 8 連チューブ (Thermo Fisher Scientific/ Applied Biosystems 社、以下 ABI 社と記載)、キャップまたはフルプレートカバー (ABI 社)、サンプル DNA 溶液 (5ng/μl に調製したもの)、Go Taq (Promega 社)、1/10TE バッファー、滅菌超純水、SSR プライマー溶液 (蛍光ラベルされたフォワードプライマーとリバースプライマーを各 10pmol/μl 含む溶液、1/10TE バッファーで希釈)、PCR システム GeneAmp PCR System 9700 (ABI 社) など

### ＜用いた SSR マーカー＞

それぞれの SSR マーカーについて、マーカー名、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、ターゲットサイズ、座乗染色体番号を、表 1 に掲載した。

### ＜本マニュアルで識別可能なブドウ 24 品種＞

「安芸クイーン (あきくいーん)」、「キャンベルアーリー」、「巨峰 (きよほう)」、「クイーンニーナ」、「グロースクローネ」、「甲州 (こうしゅう)」、「コンコード」、「サンヴェルデ」、「シャインマスカット」、「翠峰 (すいほう)」、「スチューベン」、「赤嶺 (せきれい)」、「高尾 (たかお)」、「デラウエア」、「ナイアガラ」、「ナガノパープル」、「ピオーネ」、「藤稔 (ふじみのり)」、「ブラックビート」、「ポートランド」、「マスカット・オブ・アレキサンドリア」、「マスカット・ベリーA」、「ルビーロマン」、「ロザリオビアンコ」。

表1 SSRマーカー

マーカー名	蛍光色素	モチーフ	増幅サイズ (bp)	対立遺伝子数	染色体	フォワードプライマー (5'-3') リバースプライマー (5'-3')	アニーリング 温度(°C)
<b>TsuVv001</b>	Fam	AGAAA	101	2	10	TAAGCAACCACACTTCGGGAAT gtttcttTCACACTGGCACATCACAATTCA	55
<b>TsuVv002</b>	Vic	AAGGA	256	4	11	GCCAAACCGCTGAACATTTAT gtttcttCTTTACATGCACGCCACTGT	55
<b>TsuVv003</b>	Ned	GAAAA	158	3	5	TTGTGGAATGTGGACCTTGA gtttcttTCATCACACCCGTCCTAAACCA	55
<b>TsuVv013</b>	Fam	GAGAG	104	2	4	GAAAGTCTGGCAGTTGGGTA gtttcttCAAAGCCGCATCTCACACTA	55
<b>TsuVv014</b>	Vic	AAAAAT	223	3	1	ACCCATCTGAAAAGCAATGGA gtttcttTGCAGGCTCTTTCCAAAGAIT	55
<b>TsuVv016</b>	Fam	AAGGA	300	2	8	AGGTTGCAGTGGAGACACCT gtttcttACCTCATATGATTTGGCATGG	55
<b>TsuVv019</b>	Fam	AAAT	295	3	unknown	CAAGTTGGATTGTCCTTCC gtttcttCCCAAAGTTTTGGTGCAAG	55
<b>TsuVv025</b>	Fam	ACCTT	210	2	18	ATCTCACCTCCATTTGTGC gtttcttGGGCTGACACAATTTCCAC	55
<b>TsuVv030</b>	Ned	AAAT	218	3	7	TC'TGAAGCTGAGCGAACTGA gtttcttGTTTGGTTGCCCCTGAAAGAT	55
<b>TsuVv031</b>	Fam	CTTC	275	3	1	ATTCACAACCCAAAGCCAAC gtttcttTGAGGGAGGGGATTACT	55
<b>TsuVv047</b>	Vic	AGAA	238	2	16	ATGCCAGTCCAGTCGATAC gtttcttTCCCAACTACAACCCACACAGA	55
<b>VrZAG83</b>	Ned	TC	158	6	unknown	GGCGAGGCGGTAGATGAGAGGGCG gtttcttACGC AACGGCTAGTAAATACAACCGG	62

<基本操作>

(1) 以下のように PCR 反応液を調製する。

Go Taq	5.0 $\mu$ l
SSR プライマー溶液	1.0 $\mu$ l
滅菌超純水	3.0 $\mu$ l
サンプル DNA 溶液	1.0 $\mu$ l
合計	10.0 $\mu$ l

(2) PCR システム GeneAmp PCR System 9700 を用いて、以下のプログラムで、PCR 反応を行う。

- ・ 94°C 5 分間熱変性。
- ・ 94°C 1 分間、55°C 1 分間、72°C 1 分間の反応を、35 サイクル。
- ・ 72°C 7 分間の反応後、10°C で $\infty$ 。

ただし、VrZAG83 については、アニーリング温度を 62°C とする。

#### 4. スタンダードセットの作製

それぞれのマーカーに固有のスタンダードセット（1-3 品種の PCR 産物の混合物）を作製し、これと比較することで遺伝子型を判定する。スタンダードセット用の基準品種は表 2 に、それぞれの波形データは図 2 に示した。

<準備するもの>

1.5ml チューブ（滅菌済み）、1/10TE バッファー等、PCR フラグメント精製キット（MiniElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen 社) 又は同等品）

<基本操作>

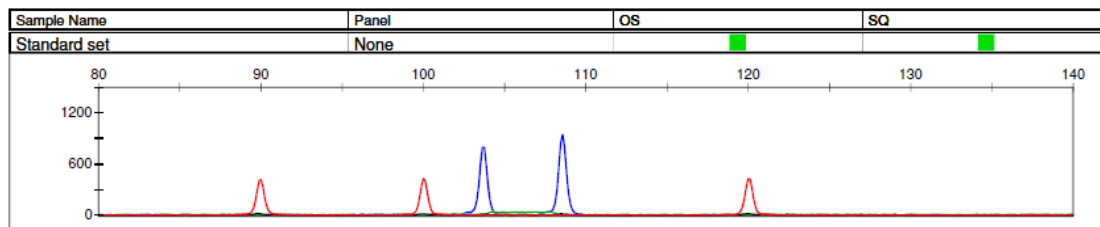
- (1) 3.の(1)の条件で基準品種を増幅する。
- (2) PCR フラグメント精製キットを用いて増幅産物を精製する。
- (3) 精製産物を混合し、1/10TE バッファー等で 100~2000 倍に希釈したものを 10 $\mu$ l 程度ずつ分注する。分注したチューブには、調製日を記入し超低温フリーザー等に遮光して保存し、概ね 2 年以内を目処に使用する。

表2 スタンダードセット用基準品種

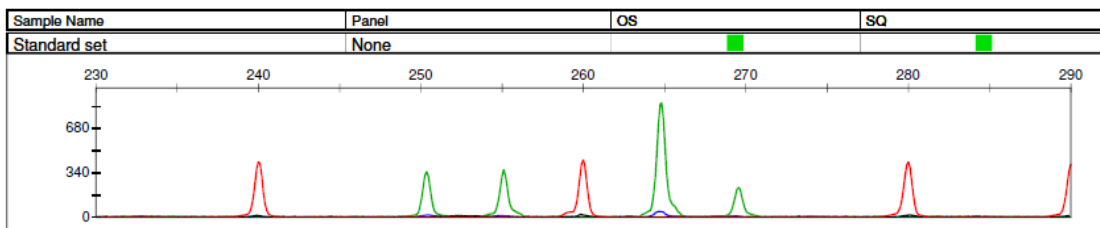
メーカー名	蛍光色素	基準品種	フラグメント パターン
TsuVv001	Fam	マスカット・ベアリーA	A/B
TsuVv002	Vic	甲州、コンコード、デラウエア	A/B/C/D
TsuVv003	Ned	デラウエア、マスカット・ベアリーA	A/B/C
TsuVv013	Fam	キャンベルアアリー	A/B
TsuVv014	Vic	甲州、マスカット・ベアリーA	A/B/C
TsuVv016	Fam	マスカット・ベアリーA	A/B
TsuVv019	Fam	デラウエア、マスカット・ベアリーA	A/B/C
TsuVv025	Fam	キャンベルアアリー	A/B
TsuVv030	Ned	巨峰	A/B/C
TsuVv031	Fam	ポートランド、マスカット・ベアリーA	A/B/C
TsuVv047	Vic	キャンベルアアリー	A/B
VirZAG83	Ned	甲州、コンコード、デラウエア	A/B/C/D/E/F

図2 スタンドセット波形図

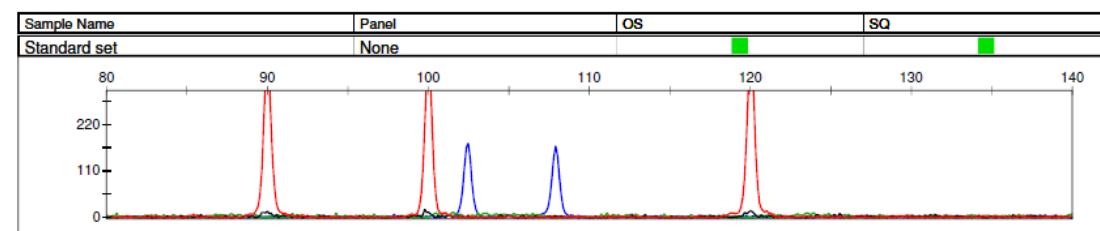
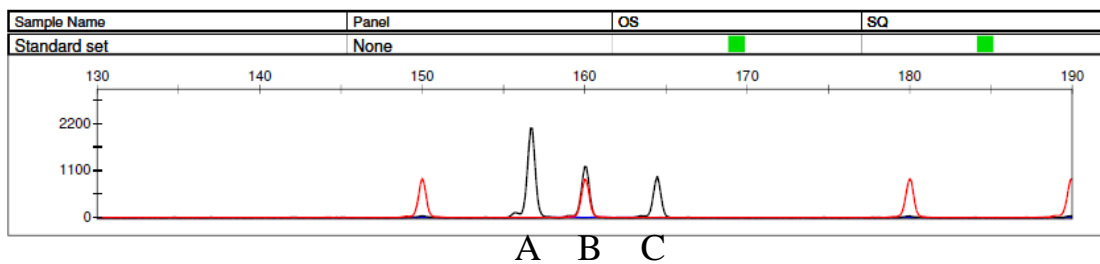
TsuVv001



TsuVv002



TsuVv003



TsuVv014

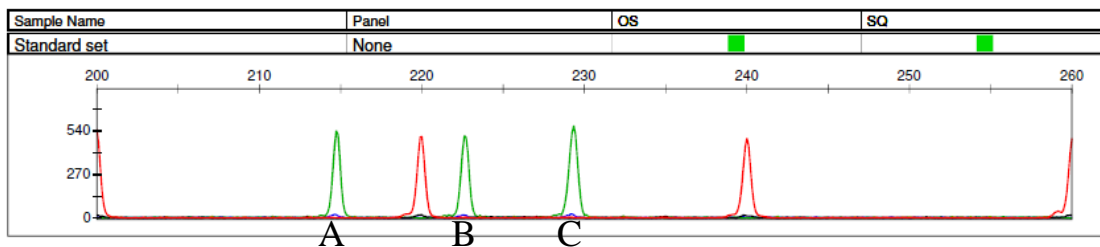
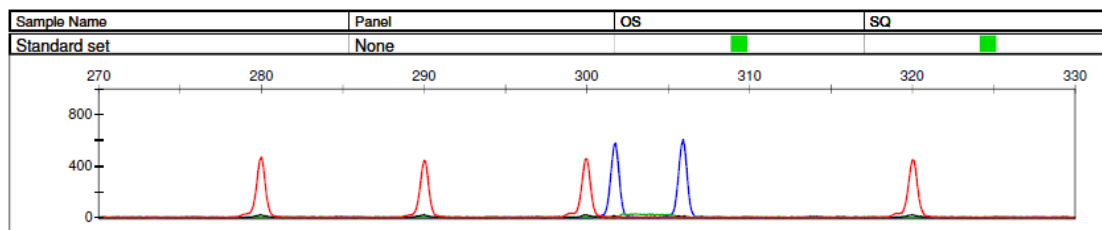


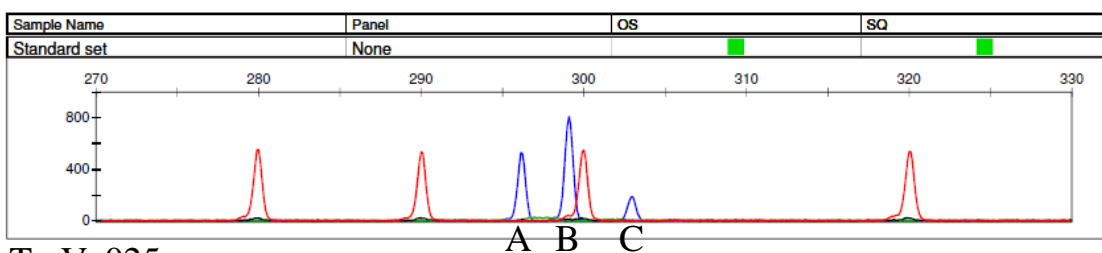


図 2 スタンドセット波形図 (続き)

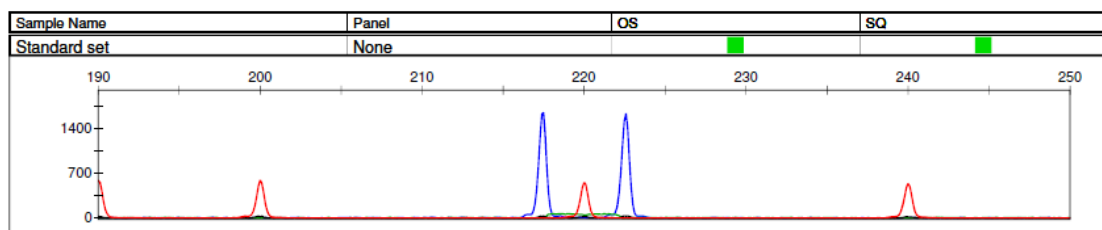
### TsuVv016



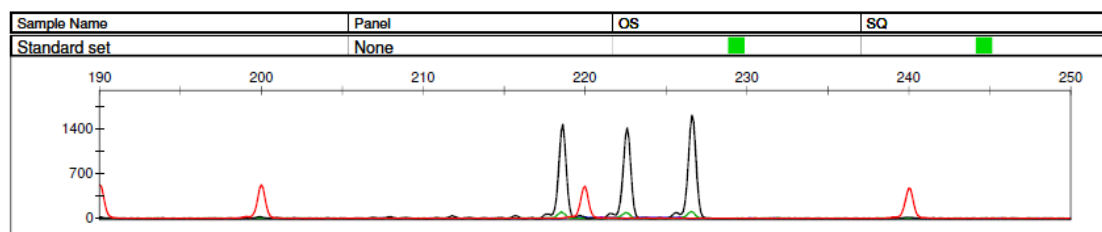
### TsuVv019



### TsuVv025



### TsuVv030



### TsuVv031

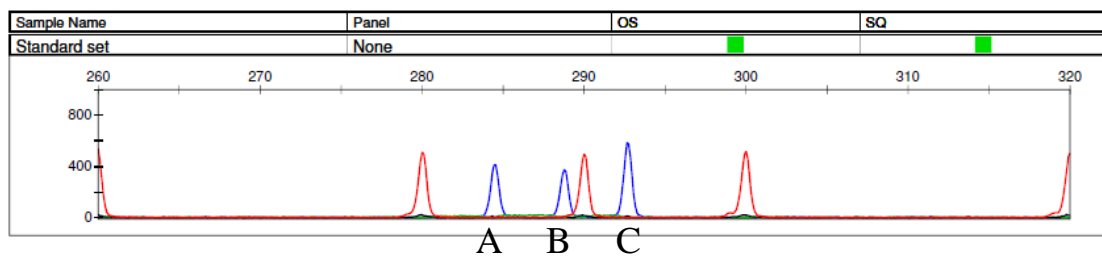
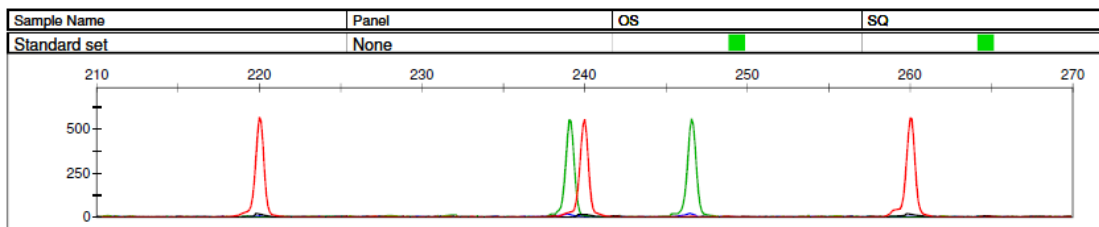
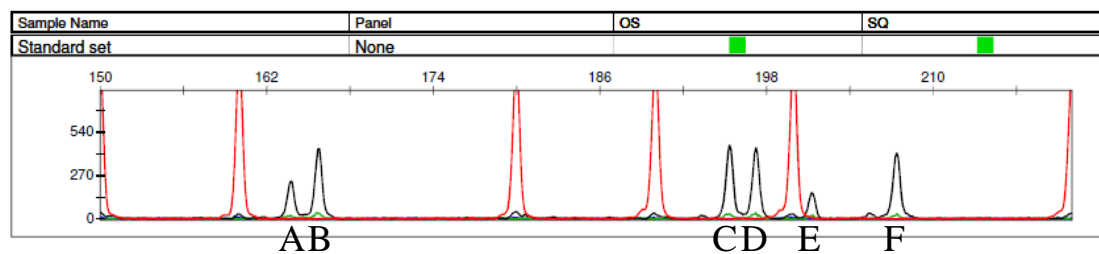


図2 スタンドセット波形図 (続き)

TsuVv047



VrZAG83



## 5. DNAシーケンサを用いたフラグメント解析

上記4項で得た SSR-PCR 産物を DNA シーケンサで分析し、フラグメント解析を行う。基本的分析操作は、ABI 社のフラグメント解析のプロトコールに従って行う。

### <準備するもの>

96 穴 PCR プレート、384 穴プレート又は 8 連チューブ (ABI 社)、1/10TE バッファー、Genetic Analyzer Buffer with EDTA (ABI 社)、Hi-Di Formamide (ABI 社)、3130 POP-7 ポリマー (ABI 社)、3100/3130xl 36cm Capillary Array (47cmx50µm、ABI 社)、GeneScan 400HD ROX サイズスタンダード (ABI 社)、Applied Biosystems 3130 xl Genetic Analyzer (ABI 社)、GeneMapper ソフトウェア (ABI 社)、PCR システム GeneAmp PCR System 9700 (ABI 社) など。

### <基本操作>

- (1) 3.で得た PCR 産物を、1/10TE バッファーで PCR 増幅を考慮し、フラグメント解析に適した倍率で希釈する。
- (2) 1.5µl の希釈 PCR 産物、0.02µl の 400HD ROX サイズスタンダード、8.48µl の Hi-Di ホルムアミドを、96 穴 PCR プレート、384 穴プレート又は 8 連チューブに入れ、混合する。
- (3) PCR システム GeneAmp PCR System 9700 などを用いて、95°C5 分間の熱変性を行った後、直ちに氷上で 5 分間以上静置する。
- (4) Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer のプロトコールに従い、36cm キャピラリー、POP-7 ポリマー、専用のバッファー (Genetic Analyzer Buffer with EDTA) を用いて、分析を行う。
- (5) GeneMapper ソフトウェアを用いて、結果の解析を行う。

## 6. フラグメント解析による遺伝子型判定と結果

### (1) フラグメント解析時の注意点

以下に、フラグメント解析を行う際の基本的な留意点について記した。

- ① 全ての蛍光色素を表示して解析すること。これにより、PCR 増幅産物の希釈濃度が濃すぎることによって生じるフラグメントの乱れをチェックすることが可能である。サンプル濃度が濃いと、本来フラグメントとして検出されるはずのない色でも検出されることがある。このような状態では、ターゲットのフラグメントも正しい結果を表していない場合があるため、PCR 産物の希釈をやり直して、再度分析を行う。
- ② サイズスタンダードのフラグメントと比較して適正な希釈濃度とするこ

と。PCR 増幅産物の希釈濃度が薄い場合、サイズスタンダードのフラグメントと比較して、サンプルのフラグメントが低くなる。最も高いフラグメントがサイズスタンダードの 1/3 以下の場合には別の低いフラグメントを見落とす危険があるため、注意が必要である。明確に判断できない場合は、希釈をやり直して、再度分析を行う。また、希釈濃度が濃すぎるとフラグメントの大きさが検出限界を超えてしまい、フラグメントの先端が表示されない。この場合、サイズスタンダードセットとの比較ができないことがあるため、PCR 産物の希釈をやり直して再度分析を行う。

- ③ サイズスタンダードの波形を確認すること。フラグメント解析におけるフラグメントの数値は、サイズスタンダードのフラグメントサイズをもとに作成した検量線によって計算されるため、サイズスタンダードの波形が乱れていると、正しいデータが計算できない。よってサイズスタンダードの波形が乱れていた場合は分析をやり直す。
- ④ 遺伝子型判定のためのスタンダードセットを必ず供試すること。フラグメント解析では、DNA シーケンサの機種、ポリマー、キャピラリー、サイズスタンダードなどの違いにより、計算上の対立遺伝子のサイズ（フラグメントのピークサイズのこと）がずれる場合がある。このため、4. のスタンダードセットを供試しこれらのフラグメントとの比較で遺伝子型を判定する必要がある。

## (2) ブドウ品種の遺伝子型判定

SSR 遺伝子型の判定は、スタンダードセットとの比較により決定する。判定に当たっては、キャピラリー間の泳動のずれ等を考慮し概ね 1bp 未満のずれに収まるようであれば該当の遺伝子型と判定する。なお、本 12 マーカーを全て使用することで、24 品種を少なくとも 1 つのマーカーが異なることで識別することが可能である。

また、本マニュアルは、ブドウ 24 品種で最適化されたものであり、これを用いて 24 品種以外の品種を識別する場合には、スタンダードセットと明らかに異なるピークが検出される可能性がある。その場合は、ピークの実測値 (bp) を記録し X (xxx bp)、Y (yyy bp) として区別する。なお、未知の品種の識別に際してピークの判定が困難な場合は、スタンダードセットと PCR 産物の希釈溶液を混合して解析を行うことによって、フラグメントサイズの判定を確実にすることが可能である。

本マニュアルで用いるマーカーセットのプライマーには波形を安定させるためのテイル (gtttctt) をリバースプライマーに付加している。しかしながら、供試品種数が多くなると、対立遺伝子間の〈競合〉でピークの高さがかなり違っ

ている場合、ピークがやや判別しにくい場合が出てくる。このような時には、親子関係が正しい両親と子供で、対立遺伝子が遺伝しているか否かを確認することで、対立遺伝子の正確な同定が可能となる。

ブドウには、二倍体、三倍体、四倍体品種が存在し、本マニュアルで識別対象としたブドウ 24 品種のうち、二倍体が 12 品種、三倍体が 1 品種、四倍体が 11 品種である。四倍体では、対立遺伝子間でのピークの高さの差が大きくなる可能性があるため、スコア時に留意する。また、日本で栽培されるブドウ品種には、ヨーロッパブドウ、アメリカブドウ、およびアメリカブドウとヨーロッパブドウの雑種があり、種間の差異のために、対立遺伝子間でのピークの高さの差が大きくなる可能性があるため、スコア時に留意する。

表3. ブドウ24品種のSSR遺伝子型

	TsuVv001	TsuVv002	TsuVv003	TsuVv013	TsuVv014	TsuVv016	TsuVv019	TsuVv025	TsuVv030	TsuVv031	TsuVv047	VrZAG83
安芸クイーン	AB	CC	AB	AB	CC	BB	BB	AB	ABC	BB	AB	EF
キャンベルアリー	AA	CC	AB	AB	CC	BB	BB	AB	BC	BB	AB	CF
巨峰	AB	CC	AB	AB	CC	BB	BC	AB	ABC	BB	AB	CEF
クイーンニーナ	AB	CC	AB	AB	AC	BB	BC	AB	AB	BB	AB	EF
グロースクローネ	AB	CC	BB	AB	CC	BB	BB	AB	ABC	BB	AB	BEF
甲州	AB	AC	BC	AA	BC	BB	BB	AA	AB	BB	AA	AE
コンコード	AA	CD	BB	AB	CC	BB	BB	AB	BB	BC	AB	BC
サンヴェルデ	AA	CC	AB	AB	CC	BB	BC	AB	AB	BB	AB	CE
シャインマスカット	AB	BC	BC	AB	AC	BB	BC	AA	AB	BB	AA	BC
翠峰	AB	CC	AB	AB	CC	BB	BC	AA	AB	BB	AA	CEF
スチューベン	AB	BC	BB	AB	CC	BB	BC	AA	BB	BC	AB	BB
赤嶺	AA	AC	CC	BB	AB	BB	BC	AB	AB	BB	AA	CF
高尾	AB	CC	BB	AB	CC	BB	BC	AB	ABC	BB	AB	EF
デラウェア	AA	BC	AB	AA	CC	BB	AB	BB	BC	BB	AA	DF
ナイアガラ	AA	CC	AB	BB	CC	BB	BB	AB	BC	CC	AB	CD
ナガノパープル	AA	CC	ABC	AB	AC	BB	BC	AB	AB	BB	AB	CF
ピオーネ	AB	CC	AB	AB	CC	BB	BC	AB	ABC	BB	AB	CF
藤稜	AB	CC	BB	AB	CC	BB	BC	AA	BC	BC	AB	BF
ブラックビート	AB	CC	AB	AB	CC	BB	BC	AA	ABC	BB	AB	CF
ポートランド	AA	CC	BB	BB	CC	BB	BC	AA	BB	CC	BB	CC
マスカット・オブ・アレキサンドリア	AB	CC	CC	BB	AC	BB	BC	BB	AB	BB	AA	CC
マスカット・ベリーA	AB	CC	AC	AB	AC	AB	BC	BB	AA	AB	AB	CF
ルビーロマン	AB	CC	BB	AB	CC	BB	BC	AA	BB	BC	AB	BF
ロザリオビアンコ	AB	CC	BB	BB	CC	BB	BC	AA	AB	BB	AA	CE

### (3) ブドウ品種識別における 12 種類の SSR マーカーの特徴

本マニュアルで用いた 12 種類の SSR マーカーは、いずれも単一座由来のマーカーであり、10 種類で染色体位置が明らかになっている（表 2）。

TsuVv014 と TsuVv031 は第 1 染色体に、TsuVv013 は第 4 染色体に、TsuVv003 は第 5 染色体に、TsuVv030 は第 7 染色体に、TsuVv016 は第 8 染色体に、TsuVv001 は第 10 染色体に、TsuVv002 は第 11 染色体に、TsuVv047 は第 16 染色体に、TsuVv025 は第 18 染色体に、位置づけられている。なお、TsuVv019 と VrZAG83 は、存在染色体が不明である。

2018 年 12 月 27 日 初版

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構  
果樹茶業研究部門、種苗管理センター