

# ブドウ 24 品種の DNA 品種識別技術

- SSR マーカーによるブドウ 24 品種の果実の 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

2021 年 1 月 27 日 初版

# SSR マーカーによるブドウ 24 品種の果実の 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  
果樹茶業研究部門

## 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。

日本における平成 29 年産のブドウの品種別の栽培面積の合計は 13632ha であり (図 1、農林水産省生産局園芸作物課「平成 29 年産 特産果樹生産動態等調査」から作成)、そのうち「巨峰」が 29.5%、「ピオーネ」が 16.4%、「デラウェア」が 15.6%、「シャインマスカット」が 10.1%、「キャンベルアーリー」が 3.8%、「ナイアガラ」が 3.3%と続いている。特に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 29 年度には栽培面積が 1378.6ha 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。このため、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、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、より長いモチーフをもつ SSR マーカーの獲得をした。その結果をもとに 2018 年 12 月 7 日に「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-」を作成し公表した。今回はそのマニュアルの一部を修正し、果実からの解析に適したバージョンとして改訂を行なった。本バージョンに記載されている品種識別の手法については種苗管理センターで妥当性が確認されている。

なおマニュアルの作成にあたっては、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」に準じて行なった。

\*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

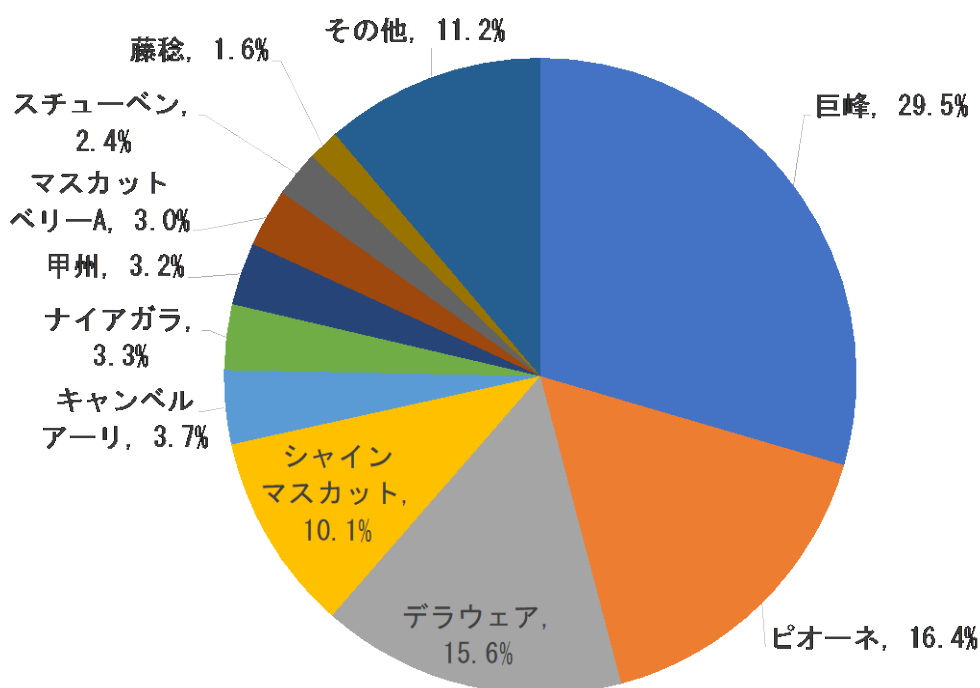


図 1 ブドウの品種別栽培面積の割合 (平成 29 年産)  
品種別の栽培面積の合計 13632ha

## 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。

DNA 品種識別分析における一般的注意事項及び実験、サンプルからの DNA 抽出方法については、〈植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項 — 技術開発と利用のガイドライン — ([http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna\\_manual/guideline.pdf](http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_manual/guideline.pdf)) 〉及び〈DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン ([http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna\\_meeting/H20\\_2nd/guideline.pdf](http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_meeting/H20_2nd/guideline.pdf)) 〉を参照のこと。

ブドウの果実には多糖類やポリフェノールが多く蓄積していることから、DNA 抽出には材料や抽出キットに注意が必要である。材料は果皮を用いることが望ましい。果肉は水分や糖分が多いことから、また、果梗（軸）は木質化していて硬く粉砕が困難であることから、本マニュアルの用途には適した材料ではない。抽出キットについては DNeasy® Plant Pro kit（QIAGEN 社）を用いると本マニュアルの分析に十分な品質と量の DNA の抽出が可能であることを確認している。ただし、このキットを用いてもなお、完全な夾雑物の排除は難しく凍結中に抽出した DNA の劣化が生じるおそれがあることから、抽出後 3 カ月以上経った DNA は分析に使用しないことが望ましい。

### 1) DNA の抽出

〈準備するもの〉

1.5ml 又は 2.0ml チューブ（滅菌済み）、乳鉢・乳棒（滅菌済み、180℃で 2 時間乾熱滅菌したもの）、ディスポミクロスパーテルまたは薬さじ（滅菌済み、180℃で 2 時間乾熱滅菌したもの）、液体窒素、Tissue Disruption Tubes（QIAGEN 社）、MB Spin Column（QIAGEN 社）、Collection Tube (2ml)（QIAGEN 社）、Collection Tube (1.5ml)（QIAGEN 社）、Solution CD1（QIAGEN 社）、Solution PS（QIAGEN 社）、Solution CD2（QIAGEN 社）、Buffer APP（QIAGEN 社）、Buffer AW1（エタノール添加、QIAGEN 社）、Buffer AW2（エタノール添加、QIAGEN 社）、Buffer EB（QIAGEN 社）、滅菌超純水、高速遠心機 1 台（1.5～2.0ml チューブが利用可能なもの）など。

- ・ Solution CD1、Buffer APP など溶液中に析出がみられた場合は使用前に 60℃で保温する。
- ・ 実験開始前にサンプル数分の Tissue Disruption Tube に 450µl の Solution CD1 と 75µl の Solution PS を加えておく。

### <実験操作>

基本操作は、QIAGEN 社のプロトコールに従っているが、抽出した DNA の収量を上げるため、サンプル量など一部修正箇所あり。QIAGEN 社のプロトコール通りでも問題なく DNA 抽出が可能である。

- (1) ブドウ果実から果皮をむき、約 0.2g の果皮をサンプルとする。凍結した果実を用いる場合、計量中に解凍しないよう迅速に行う (図 2)。
- (2) 乳鉢・乳棒などを利用して、液体窒素中でサンプルを凍結状態で粉砕する。
- (3) 冷却したマイクロスパーテルを用いて粉砕したサンプル約 50mg (マイクロスパーテル 5 杯程度) を Tissue Disruption Tubes に入れる (図 3、4)。ここでのサンプル投入量が過剰であると、後の操作の PCR で十分に増幅がみられないことがあるため約 50mg とすることが望ましい。数回転倒混和しサンプルと Solution CD1、Solution PS をよく混ぜる。
- (4) 68°C で 15 分インキュベート (静置) したのち、高速遠心機で 12,000×g、2 分間、室温で遠心する。
- (5) (4) の遠心分離で得られた上清 450µl を Collection Tube (1.5ml) に移し、250µl の Solution CD2 を加えてボルテックスで 5 秒間混合する。高速遠心機で 12,000×g、1 分間、室温で遠心する。
- (6) (5) の遠心分離で得られた上清 500µl を Collection Tube (1.5ml) に移し、500µl の Buffer APP を加えてボルテックスで 5 秒間混合する。
- (7) (6) の混合液 600µl を MB Spin Column に移し、高速遠心機で 12,000×g、1 分間、室温で遠心した後、溶出液を捨てる。
- (8) (7) の残液を MB Spin Column に移し、高速遠心機で 12,000×g、1 分間、室温で遠心した後、溶出液を捨てる。
- (9) MB Spin Column を Collection Tube (2ml) に装着し、650µl の Buffer AW1 を MB Spin Column に加え、高速遠心機で 12,000×g、1 分間、室温で遠心した後、溶出液を捨てる。
- (10) 650µl の Buffer AW2 を MB Spin Column に加え、高速遠心機で 12,000×g、1 分間、室温で遠心した後、溶出液を捨てる。
- (11) 高速遠心機で 12,000×g、2 分間、室温で遠心した後、MB Spin Column を MB Spin Collection Tube (1.5ml) に移す。
- (12) MB Spin Column に 50µl の Buffer EB を加えて 5 分間室温で放置する。
- (13) 高速遠心機で 12,000×g、1 分間、室温で遠心した後、MB Spin Column を捨て、溶出液を回収する。



図2 操作(1)でサンプリングした果皮 (2片で約 0.2g)



図3 操作(3)ディスポミクロスパーテルですくい取った果皮粉砕物

## 2) PCR による DNA の品質確認

通常 DNA の品質確認は、吸光度や電気泳動像などを用いて確認するが、果皮から抽出した DNA は通常数 ng/ $\mu$ l と濃度が薄く、OD230 が高い傾向があることから吸光度による定量や品質確認は困難であり、DNA 溶液の電気泳動像による確認も難しい。そのため、ブドウゲノムにシングルコピーで存在する領域を増幅するプライマーセットを用いて PCR 増幅が可能なことを確認することにより、DNA の品質を確認する。

### <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 (抽出 DNA 溶液の濃度が 5ng/ $\mu$ l を超えていれば 1/10TE バッファーで 5ng/ $\mu$ l に調製し、濃度が 0.2~5 ng/ $\mu$ l の範囲のサンプルは原液を使用する)、Go Taq® Colorless Master Mix (Promega 社)もしくは Go Taq® Green Mastar Mix (Promega 社)、1/10TE バッファー、滅菌超純水、プライマー溶液 (フォワードプライマーとリバースプライマーを各 10pmol/ $\mu$ l 含む溶液、1/10TE バッファーで希釈)、PCR システム ProFlex™ PCR System (ABI 社)、6× Loading Buffer もしくは 10× Loading Buffer (タカラバイオ社)、100bp DNA ラダーマーカー (バイオメディカルサイエンス社)、2.0% アガロースゲル、1 X TAE バッファー、TE バッファー、エチジウムブロマイド溶液 (TE バッファーに、0.5-1.0  $\mu$ g/ml の濃度でエチジウムブロマイドを加えた溶液)、電気泳動装置 (アドバンス社、Mupid など)、紫外線照射装置、写真撮影

## 装置など

### <使用するプライマーセット>

品種識別に使用するマーカーセットの一つ TsuVv016 を使用する（表 1）。

### <基本操作>

- (1) 以下のように PCR 反応液を調製する。

Go Taq® Colorless Master Mix	
もしくは Go Taq® Green Master Mix	5.0µl
SSR プライマー溶液	1.0µl
滅菌超純水	3.0µl
サンプル DNA 溶液	1.0µl
合計	10.0µl

- (2) PCR システム ProFlex™ PCR System 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∞。

- (3) PCR 産物を 4µl 程度、2.0%アガロースゲル電気泳動して増幅を確認する。図 4 に電気泳動像の一例を示す。増幅がみられないサンプルは DNA の品質が不十分である可能性があるため、DNA を再抽出する。

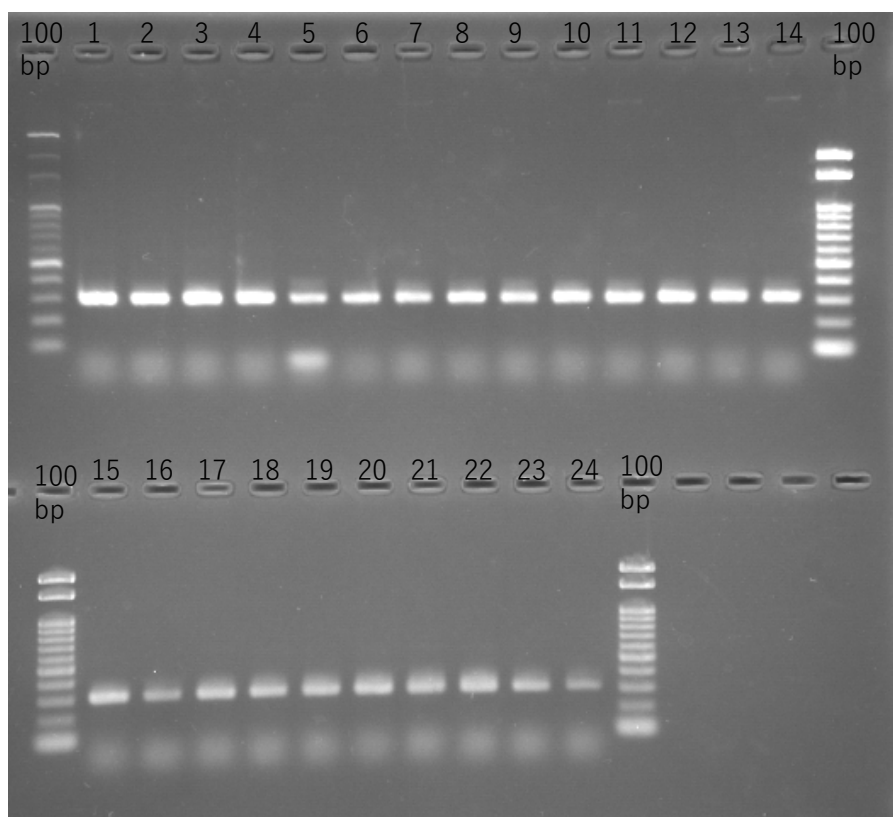


図4 プライマーセット TsuVv016 を用いた PCR 産物のアガロース電気泳動像の一例。レーン 1 から 24 はブドウ果皮から抽出した DNA を鋳型として PCR 増幅した産物。各段両端のレーンは 100bp DNA ラダーマーカー

### 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 (抽出 DNA 溶液の濃度が 5ng/μl を超えていれば 1/10TE バッファーで 5ng/μl に調製し、濃度が 0.2~5 ng/μl の範囲のサンプルは原液を使用する)、Go Taq® Colorless Master Mix



(Promega 社) もしくは Go Taq® Green Mastar Mix (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 ProFlex™ PCR System (ABI 社)

<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)
TsuVv001	Fam	AGAAA	101	2	10	TAAGCAACCACTTCGGGAAT gtttctTCACTGGCACTCACATTTCA	55
TsuVv002	Vic	AAGGA	256	4	11	GCCAACCGCTGAACATTTAT gtttctCTTTACATGCACGCCACTGT	55
TsuVv003	Ned	GAAAA	158	3	5	TTGTGGAATGTGGACCTTGA gtttctTCATCACACCGTCCTAACCA	60
TsuVv013	Fam	GAGAG	104	2	4	GAAGGTCTGGCAGTTGGGTA gtttctCAAAGCCGCATCTCACACTA	55
TsuVv014	Vic	AAAAT	223	3	1	ACCCATCTGAAAGCAATGGA gtttctTGCAGGCTCTTTCCAAGATT	55
TsuVv016	Fam	AAGGA	300	2	8	AGGTTGCAGTGGAGACACCT gtttctACCTCATATGATTGGCATGG	55
TsuVv019	Fam	AAAT	295	3	unknown	CAAGCTTGGATTGTCCTTCC gtttctCCCAAAGTTTTGGTGCAAG	55
TsuVv025	Fam	ACCTT	210	2	18	ATCTCACCTCCATTTGTGC gtttctGGGCTGACACAATTTTCCAC	55
TsuVv030	Ned	AAAT	218	3	7	TCTGAAGCTGAGCGAACTGA gtttctGTTTGGTTGCCGTGAAGAGT	55
TsuVv031	Fam	CTTC	275	3	1	ATTCACAACCCAAAGCCAAC gtttctTGAGGGAGGAGGGGATTACT	55
TsuVv047	Vic	AGAA	238	2	16	ATGCCAGGTCCAGTCGATAC gtttctTCCCAACTACAACCACACAGA	55
VrZAG83	Ned	TC	158	6	4	GGCGGAGGCGGTAGATGAGAGGGCG gtttctACGCAACGGCTAGTAAATACAACGG	55

<基本操作>

- (1) 以下のように PCR 反応液を調製する。

Go Taq® Colorless Master Mix

もしくは Go Taq® Green Master Mix 5.0µl

SSR プライマー溶液 1.0µl

滅菌超純水 3.0µl

サンプル DNA 溶液 1.0µl

合計 10.0µl

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

- 94°C5 分間熱変性。
- 94°C1 分間、55°C1 分間、72°C1 分間の反応を、35 サイクル。
- 72°C7 分間の反応後、10°C で∞。

ただし、TsuVv003 については、アニーリング温度を 60°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 5 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>

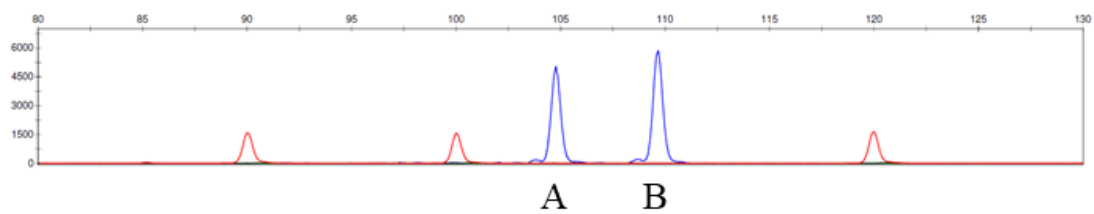
- (1) 3. の(1)の条件で基準品種を増幅する。
- (2) PCR フラグメント精製キットを用いて増幅産物を精製する。
- (3) 精製産物を混合し、1/10TE バッファー等で 100～2000 倍に希釈したものを 10 $\mu$ l 程度ずつ分注する。分注したチューブには、調製日を記入し超低温フリーザー等に遮光して保存し、概ね 2 年以内を目処に使用する。

表2 スタンダードセット用基準品種

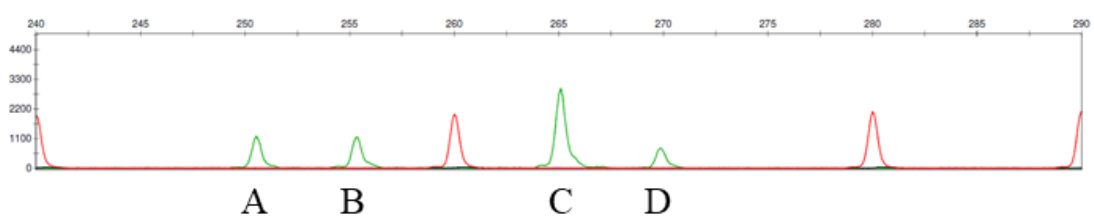
メーカー名	蛍光色素	基準品種	フラグメント パターン
TsuVv001	Fam	マスカット・ベリーA	A/B
TsuVv002	Vic	甲州、コンコード、デラウェア	A/B/C/D
TsuVv003	Ned	デラウェア、マスカット・ベリーA	A/B/C
TsuVv013	Fam	キャンベルアーリー	A/B
TsuVv014	Vic	甲州、マスカット・ベリーA	A/B/C
TsuVv016	Fam	マスカット・ベリーA	A/B
TsuVv019	Fam	デラウェア、マスカット・ベリーA	A/B/C
TsuVv025	Fam	キャンベルアーリー	A/B
TsuVv030	Ned	巨峰	A/B/C
TsuVv031	Fam	ポートランド、マスカット・ベリーA	A/B/C
TsuVv047	Vic	キャンベルアーリー	A/B
VrZAG83	Ned	甲州、コンコード、デラウェア	A/B/C/D/E/F

図5 スタANDARDセット波形図

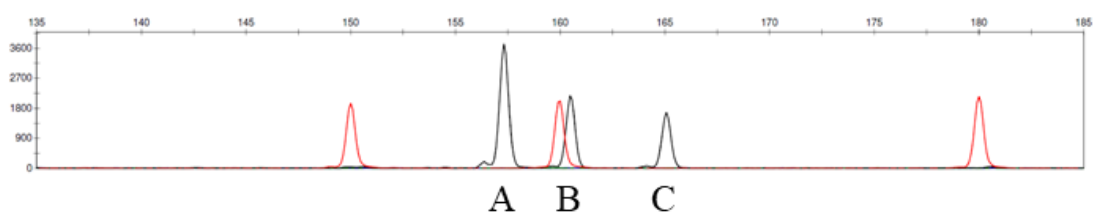
TsuVv001



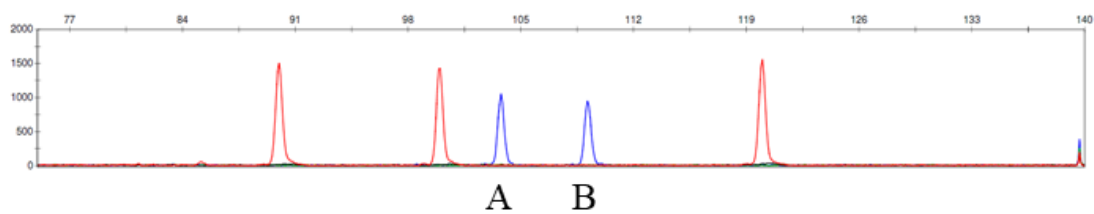
TsuVv002



TsuVv003



TsuVv013



TsuVv014

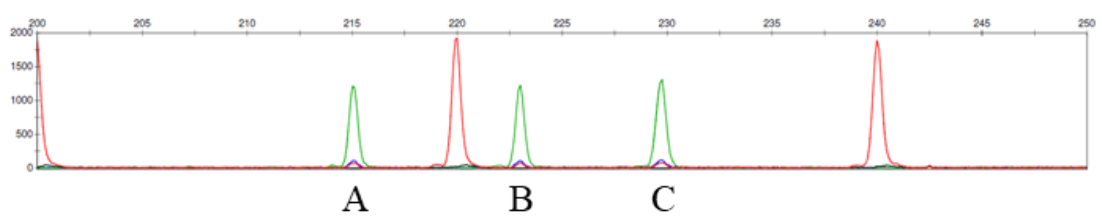
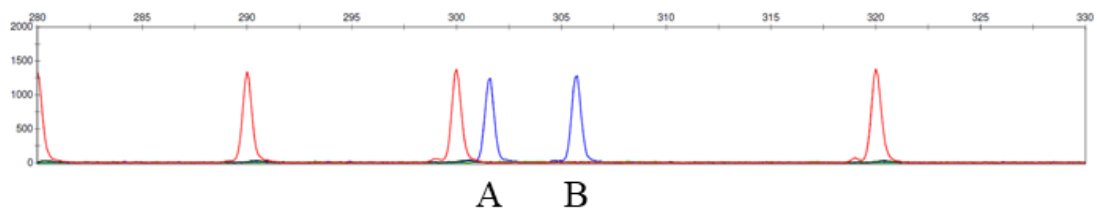
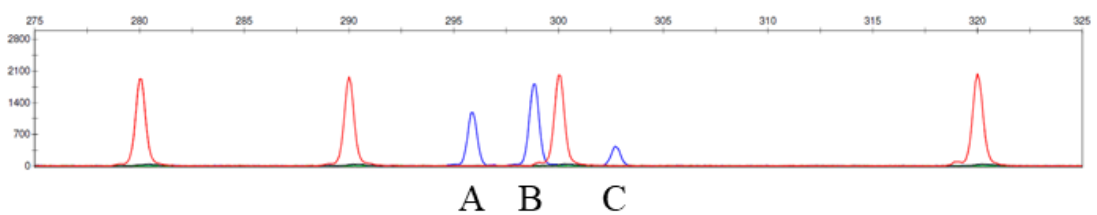


図5 スタンダードセット波形図 (続き)

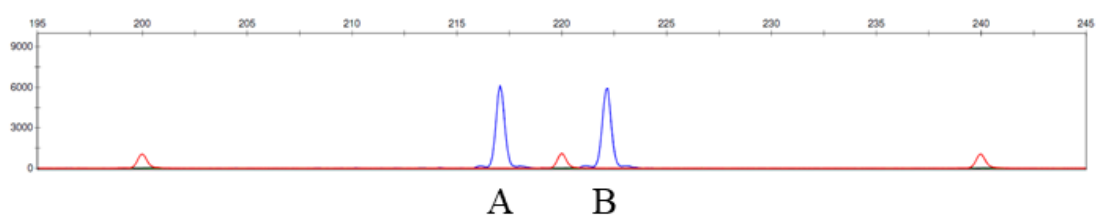
TsuVv016



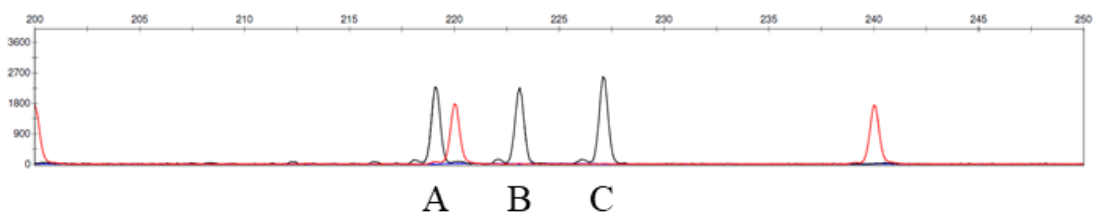
TsuVv019



TsuVv025



TsuVv030



TsuVv031

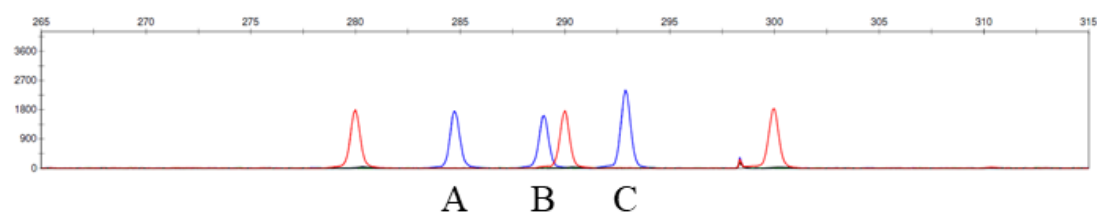
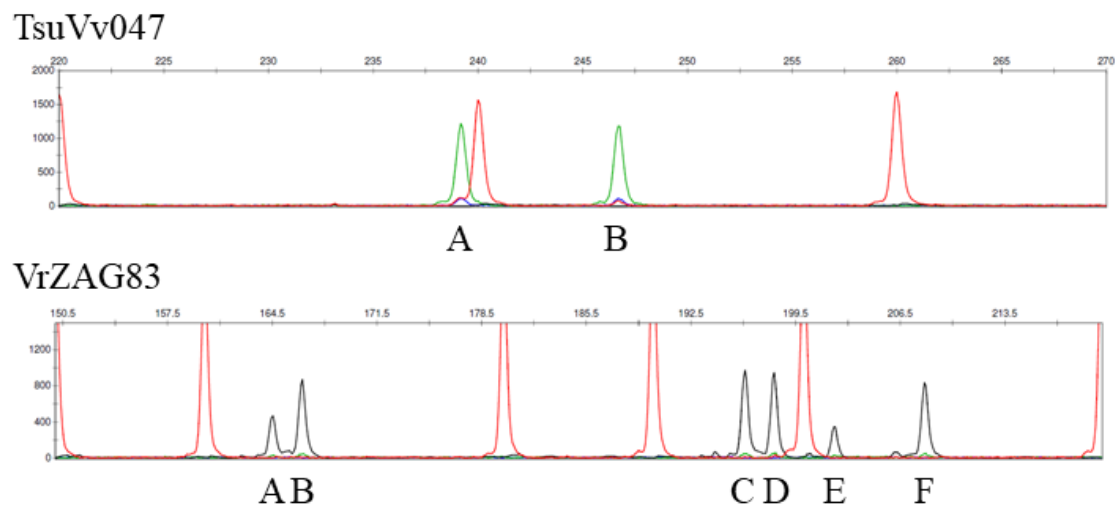


図5 スタンダードセット波形図 (続き)



## 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 (ABI 社)、1/10TE バッファー、Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer (ABI 社)、SeqStudio Cartridge (ABI 社)、SeqStudio Cathode Buffer Container (ABI 社)、Hi-Di Formamide (ABI 社)、GeneScan™ 400HD ROX™ サイズスタンダード (ABI 社)、GeneMapper ソフトウェア (ABI 社)、PCR システム ProFlex™ PCR System (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 プレートに入れ、混合する。
- (3) PCR システム ProFlex™ PCR System 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 分以上静置する。
- (4) Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer のプロトコールに従い、SeqStudio Cartridge、SeqStudio Cathode Buffer Container 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

- ① 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。
- ② 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。
- ③ 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、供試品種数が増えると、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。

- ④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ので、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ので、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
キャンベルアーリー	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、11 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 と VrZAG83 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 は存在染色体が不明である。

著作権に関する事項：

本技術に掲載された内容は、「私的使用」または「引用」など著作権法上認められた場合を除き、無断で転載、複製、販売などの利用はできません。

免責事項：

利用者が記載された技術を利用したこと、あるいは技術を利用できないことによる結果について、一切責任を負いません。

特許権等：

本技術については、特許出願中です。

2021年1月27日 初版