

[Research Note]

ブドウ品種北醇と Muscat Hamburg-Amurensis (MH-AM) の
Simple Sequence Repeat (SSR) 解析後藤 (山本) 奈美¹・沼田美子代¹・古川準三²¹独立行政法人 酒類総合研究所 〒739-0046 東広島市鏡山 3-7-1²北海道ワイン株式会社 〒047-8677 小樽市朝里川温泉 1-130

Characterization of Hokuju (Beichun) and Muscat Hamburg-Amurensis (MH-AM)

by Simple Sequence Repeat (SSR) Analysis

Nami GOTO-YAMAMOTO¹, Mineyo NUMATA¹, and Junzo FURUKAWA²¹National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-0046, Japan²Hokkaido Wein Co., Ltd., 1-130, Asarigawa-Onsen, Otaru, Hokkaido 047-8677, Japan

Hokuju in Japanese, or Beichun in Chinese, is a grape variety bred in China by crossing *Vitis amurensis* and Muscat Hamburg. There are speculations that Muscat Hamburg-Amurensis (MH-AM) cultivated in Hokkaido, the northern part of Japan, is Beichun or its seedling. This study showed that the SSR data at 14 loci of MH-AM are identical to those of Beichun and therefore, MH-AM and Beichun are the same cultivar. In addition, Beichun has both alleles from Muscat Hamburg except for one locus, and from *V. amurensis* or related wild grape accessions. Principal coordinate analysis was carried out based on a distance matrix calculated from the SSR data, and the result showed that Beichun was plotted close to both Muscat cultivars and *V. amurensis* or related wild grape accessions.

Key words: Hokuju, Beichun, Muscat Hamburg-Amurensis, SSR

緒言

野生ブドウは、耐病性、耐寒性などの優れた栽培特性を示す貴重な遺伝資源であり、その特性を活かすため、*Vitis vinifera* 品種との交配育種が種々試みられている。その一つ、北醇は 1950 年代に中国北京植物園で育種された *Vitis amurensis* と *V. vinifera* cv. Muscat Hamburg (=Black Hamburg × Muscat of Alexandria) との交配品種で、耐寒性、耐病性に優れ、中国ではワイ

ン用、生食用に栽培されている(李ら 1992、永田 2003)。

北醇は日本にも導入され、耐寒性に優れることから福島県のほか、北海道でもワイン用に栽培されている (<http://www.pref.yamanashi.jp/wine/toukei05.html>)。さらに、中国から種子を導入して選抜育種した‘北醇実生 3号’も栽培されている(永田 2003)。一方、北海道には Muscat Hamburg-Amurensis (MH-AM) の名で栽培されているブドウ品種があるが、両者の関係が明らかでない。そこで、DNA の Simple Sequence Repeat (SSR) 解析を行い、北醇と MH-AM が同一品種かどうか、ま

2013 年 7 月 8 日受理

た北醇が両交配親の対立遺伝子配列 (アレル) を持っているか、等を検討した。

材料と方法

供試ブドウ

北醇及びMH-AMの葉は北海道ワイン株式会社で入手、Muscat Hamburgは酒類総合研究所の実験圃場から新葉を採取した。*V. amurensis* (チョウセンヤマブドウ)、*V. coignetiae* (ヤマブドウ) は、大阪府立大学 (当時)、堀内昭作教授、望岡亮介先生 (現在、香川大学教授) から分譲された新葉を使用した。同時に、池田町ブドウ・ブドウ酒研究所から分譲された野生ブドウ4系統 (Ikeda 1~Ikeda 4) も解析に使用した。ブドウDNAは新葉または成葉からCsCl超遠心法 (Yamamoto et al. 1991) またはDNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) で精製した。

SSR解析

SSR解析の方法は、前報 (後藤 (山本) ら 2008) と同様、Table 1 に示す14種類のSSR遺伝子座について、蛍光ラベルしたプライマーを用いてPCRを行い、ABI社製キャピラリーシーケンサーでフラグメントを検出した。なお、フラグメントが1本しか検出されない場合は、同じ長さの2本を持つ (ホモザイガスである) と仮定して解析を行った。

SSR解析に基づく距離の計算と主座標分析

SSR解析に基づく供試品種及びサンプル間の距離の計算には、以前に分析したCabernet Sauvignon、Chardonnay、Muscat of AlexandriaのSSRデータ、並びに、報告されているMuscat of Alexandriaの一部のSSRデータ (Crespan and Milani 2001)、Muscat Hamburg (Sanchez-Escribano et al. 1999, Crespan and Milani 2001)、*V. amurensis* (Table 1 の2~4)、*V. coignetiae* (Table 1 の2、3) (Lamboy and Alpha, 1998) のデータも用いた。この際、研究グループによってSSRデータに若干のズレがあることから、共通に分析されているCabernet Sauvignonなどの品種のデータを参考に、当所の分析結果に合わせて補正を行った。各サンプル間の距離は、GenAlEx v.6.5ソフトウェア (Peakall and Smouse 2006) を用い、'codominant genotypic distance' として計算した。このアルゴリズムでは、ある遺伝子座のアレルに (i, j, k, l) の4種類がある場合、この遺伝子座での2倍

体の2サンプル間の距離 d は、次のように定義される。

$$d^2(ii, ii) = 0, d^2(ij, ji) = 0, d^2(ii, ij) = 1, d^2(ij, ik) = 1, \\ d^2(ij, kl) = 2, d^2(ii, jk) = 3, d^2(ii, jj) = 4$$

また、全遺伝子座での2サンプル間の距離は、各遺伝子座での距離の和と定義される。さらに、今回のデータには欠損値があるため、欠損する距離には平均値を充てる 'interpolate missing' オプションを使用した。

この方法で得られた距離行列を視覚化するため、今ソフトウェアを用いて主座標分析を行った。分析には、'distance - not standardized' 法を使用した。

結果と考察

1. SSR解析

SSR解析の結果をTable 1に示す。北醇とMH-AMは、14のSSR遺伝子座ですべて一致する結果を示したことから、同じ品種であることが確認された。

今回分析したMuscat Hamburg 1のデータと、Sanchez-Escribano et al. (1999) のMuscat Hamburg 2のデータを比較すると、分析誤差の可能性のある1塩基の差は除いて、24ヶ所のうち9ヶ所で異なっており、両者は品種レベルで異なると考えられた。

VrZAG47では北醇・MH-AM (以下、北醇) とMuscat Hamburgで一致するフラグメントが検出されなかったが、他の13遺伝子座では、北醇の少なくとも片方のデータが、今回の分析または既報のMuscat Hamburgのデータと一致した。このうち、既報のデータとのみ一致したものが2遺伝子座 (VVMD7及びVrZAG62) あったが、今回分析したデータのみと一致したものはなかった。VrZAG47の160 (北醇) と162 (Muscat Hamburg 2) の違いを、分析誤差か確実な差違かを判断するのは難しいが、北醇はMuscat Hamburgまたはそれに近い品種から得られた交配品種であることが確認された。また、今回分析したMuscat Hamburg 1は品種名が誤っている可能性が高いと考えられる。

北醇のもう一方の親である*V. amurensis*には、DNA多型の異なる多数の系統があると考えられ、交配親となった系統のSSRデータは不明である。また、*V. amurensis*と*V. coignetiae*はRAPD解析による類縁関係が近いという報告 (Grando et al. 1996) や、SSR及びAFLP解析の結果から、*V. amurensis*には*V. coignetiae*と同じクラスターに含まれる系統と*V. thumbergii* (エ

Table 1 SSR alleles (length in base pairs) of MH-AH and other cultivars/species

Cultivar	VVS1		VVS2		VVS3		VVS4		VVMD5		VVMD6		VVMD7	
Beichun	179	<u>182</u>	146	146	<u>210</u>	216	167	<u>178</u>	<u>233</u>	235	205	208	240	246
MH-AM	179	<u>182</u>	146	146	<u>210</u>	216	167	<u>178</u>	<u>233</u>	235	205	208	240	246
Muscat Hamburg 1	179	179	131	146	216	216	167	174	225	235	188	205	248	248
Muscat Hamburg 2 ¹	179	188	131	146	216	216	167	174	229	235	205	208	246	248
<i>V. amurensis</i> 1	192	192	132	140	218	218	172	176	<u>233</u>	<u>233</u>	208	<u>208</u>	238	238
<i>V. amurensis</i> 2 ²			125	136			172	176			208	<u>208</u>	238	238
<i>V. amurensis</i> 3 ²			127	140			172	<u>178</u>			206	206	238	250
<i>V. amurensis</i> 4 ²			121	126			172	176			206	<u>208</u>	238	238
<i>V. coignetiae</i> 1	180	<u>182</u>			<u>210</u>	214	178	180	231	237			242	242
<i>V. coignetiae</i> 2 ²			129	<u>146</u>			172	186			206	214	242	242
<i>V. coignetiae</i> 3 ²			125	152			180	184			214	214	238	250
Ikeda 1	<u>182</u>	189	129	129	214	214	176	<u>178</u>	231	<u>233</u>	<u>208</u>	212	244	249
Ikeda 2	<u>182</u>	195	121	140	<u>210</u>	<u>210</u>	176	179	231	<u>233</u>	205	<u>208</u>	238	238
Ikeda 3	<u>182</u>	192	121	129	<u>210</u>	<u>210</u>	176	175	231	237	<u>208</u>	<u>208</u>	237	247
Ikeda 4	<u>182</u>	<u>182</u>	127	127	<u>210</u>	214	170	179	222	<u>233</u>	<u>208</u>	<u>208</u>	241	243
Cabernet Sauvignon	179	179	135	148	210	216	167	174	229	237	205	205	238	238
Chardonnay	181	188	133	139	210	216	167	172	231	235	198	207	238	242
Muscat of Alexandria ³	179	179	129	146	216	216	167	174	225	229	187	207	248	250

Cultivar	VVMD8		VrZAG21		VrZAG47		VrZAG62		VrZAG64		VrZAG79		VrZAG83	
Beichun	135	<u>150</u>	189	193	<u>160</u>	<u>160</u>	188	191	<u>131</u>	135	<u>252</u>	<u>252</u>	<u>158</u>	189
MH-AM	135	<u>150</u>	189	193	<u>160</u>	<u>160</u>	188	191	<u>131</u>	135	<u>252</u>	<u>252</u>	<u>158</u>	189
Muscat Hamburg 1	135	135	189	200	155	155	185	193	135	157	244	252	189	189
Muscat Hamburg 2 ¹			188	204	155	162	185	191	135	188	236	252		
<i>V. amurensis</i> 1	<u>150</u>	156	195	195	168	168	184	186	133	139	250	254	160	<u>189</u>
<i>V. amurensis</i> 2 ²	146	154												
<i>V. amurensis</i> 3 ²	144	154												
<i>V. amurensis</i> 4 ²	146	163												
<i>V. coignetiae</i> 1	148	166	195	195					135	146	236	256		
<i>V. coignetiae</i> 2 ²	152	152												
<i>V. coignetiae</i> 3 ²	144	184												
Ikeda 1	<u>150</u>	152	195	195	166	170	190	191	127	<u>135</u>	250	250	<u>158</u>	191
Ikeda 2	143	143	195	195	158	168	186	190	135	<u>135</u>	236	264	130	<u>189</u>
Ikeda 3	162	172	195	195	168	170	186	186	133	<u>135</u>	236	256		
Ikeda 4	152	162	195	195	158	<u>160</u>	186	189	<u>131</u>	148	<u>252</u>	<u>252</u>	160	191
Cabernet Sauvignon	136	151	198	204	151	166	187	193	135	155	244	244	201	201
Chardonnay	134	140	198	204	157	166	187	195	155	160	240	242	189	201
Muscat of Alexandria ³	134	134	188	204	155	171	185	203	135	139	244	252		

¹VVS1~VVMD7, Sanchez-Escribano et al. (1999); VrZAG21~VrZAG79, Crespan and Milani (2001)

²Lamboy and Alpha (1998)

³VrZAG21~VrZAG79, Crespan and Milani (2001)

SSR data in bold show shared alleles with Beichun/MH-AM and Muscat Hamburg. SSR data with underline show shared alleles with Beichun/MH-AM and wild grape accessions.

Ikeda 1 - 4 are unidentified wild grapes donated by Ikedacho Budou Budoushu Kenkyu-Sho (Tokachi Wine), Hokkaido.

ビヅル) と同じクラスターに含まれる系統があることを示す報告 (Aradhya et al. 2008) がある。そこで今回は、*V. amurensis*、*V. coignetiae* の分析結果、及び既報のデータの他、北海道の池田町ブドウ・ブドウ酒研究所から分譲された未同定の野生ブドウも供試した。その結果、14 のうち 10 の遺伝子座で北醇の少なくとも片方のデータが今回の分析または既報の野生ブドウのデータと一致した。従って、北醇は Muscat Hamburg または近縁品種の遺伝子配列と、*V. amurensis* または近縁の野生ブドウの遺伝子配列の双方を持つと考えられた。

2. SSR 解析に基づく距離の算出と主座標分析

今回分析をした *V. coignetiae* 1 からは、VVS2, VVND6, VrZAG47, VrZAG62, 及び VrZAG83 で 3 本のフラグメントが検出され、キメラである可能性が示唆された。これらの SSR データについては距離の計算ができないことから、今回は解析に用いないこととした。

SSR 解析結果に基づく各サンプル間の距離を GenAlEx v.6.5 を用いて算出した。この距離行列から主座標分析を行い、第 1 座標と第 2 座標、及び第 1 座標と第 3 座標による散布図を Fig. 1 に示す。変動の 40.32% を説明する第 1 座標によって栽培品種と野生ブドウが分離した。また、第 2 座標 (17.86%) 及び第 3 座標 (13.19%) によって、栽培品種のうち、マスカット系品種とカベルネ・ソービニオン、シャルドネが

分離した。*V. amurensis* と *V. coignetiae* は、第 3 座標によって分離したが、第 2 座標では非常に近い位置にプロットされる個体もあった。未同定の野生ブドウはこの 2 種に近い比較的広い範囲にプロットされ、野生ブドウの個体間には、栽培品種の品種間に相当する差違があることが示された。

北醇は栽培品種グループの野生ブドウ寄りであり、かつマスカット系品種に近い位置にプロットされ、この品種が Muscat Hamburg と *V. amurensis* の交配品種であることと矛盾しない結果となった。

要 約

北醇は中国で育成された *Vitis amurensis* と *V. vinifera* cv. Muscat Hamburg の交配品種で、北醇及びその実生は日本にも導入されている。北海道で MH-AM として栽培されている品種は北醇またはその実生であると考えられるが、由来が明らかでないことから SSR 解析を行った。その結果、北醇と MH-AM は解析した 14 の SSR 遺伝子座すべてで一致し、同じ品種であることが確認された。さらに、北醇の少なくとも一方の SSR データは、1 遺伝子座を除いて Muscat Hamburg と一致すること、*V. amurensis*、*V. coignetiae*、及び未同定の野生ブドウとも共通のアレルが多いこと、並びに主座標分析から、北醇が Muscat Hamburg 及び *V. amurensis* の交

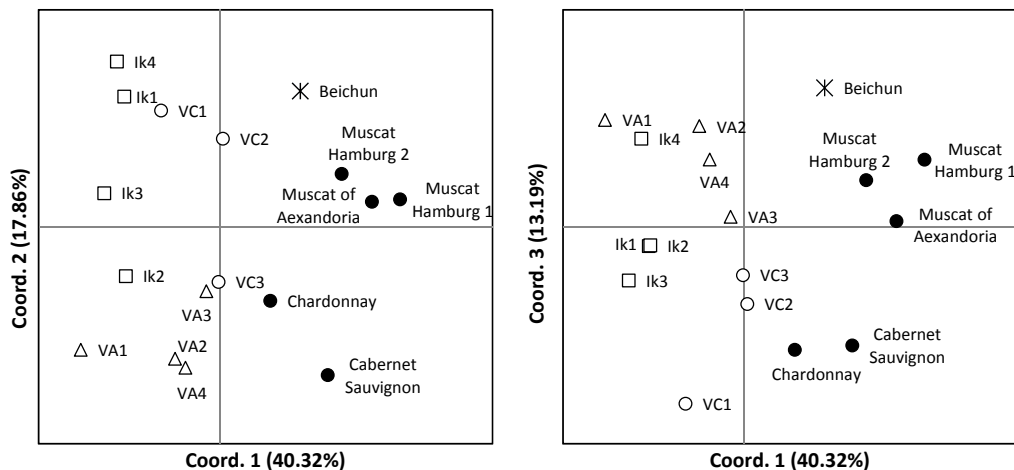


Fig. 1. Principal coordinate analysis based on the SSR analysis (Table 1).

‘Codominant genotypic distance’ between each two samples was calculated with GenAlEx software using ‘interpolate missing’ option.

Principal coordinate analysis was carried out from the codominant genotypic distances using ‘distance – not standardized’ method.

VA, *V. amurensis*; VC, *V. coignetiae*; Ik, unidentified wild grapes donated from Ikedacho Budou Budoushu Kenkyu-Sho, Hokkaido.

配品種であることとほぼ矛盾しない結果が得られた。

謝 辞

野生ブドウの試料をご提供戴いた池田町ブドウ・ブドウ酒研究所、並びに北醇についてご教示戴いた香川大学教授、望岡亮介先生に深謝致します。

文 献

- Aradhya, M., A. Koehmstedt, B.H. Prins, G.S. Dangl, and E. Stover. 2008. Genetic structure, differentiation and phylogeny of the genus *Vitis*: Implications for genetic conservation. *Acta Hort.* 799: 43-49.
- Crespan, M., and N. Milani. 2001. The Muscats: a molecular analysis of synonyms, homonyms and genetic relationships within a large family of grapevine cultivars. *Vitis* 40: 23-30.
- Grando, M.S., L. De Micheli, and A. Scienza, 1996. Characterization of *Vitis* germplasm using random amplified polymorphic DNA markers. *Genet. Resources Crop Evol.* 43: 187-192.
- Lamboy, W.F., and C.G. Alpha. 1998. Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis* L.) species. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 123: 182-188.
- Peakall, R. and P.E. Smouse. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: 288-295.
- Sanchez-Escribano, E.M., J.P. Martin, J. Carreno, and J.L. Cenis. 1999. Use of sequence-tagged microsatellite site markers for characterizing table grape cultivars. *Genome* 42: 87-93.
- Yamamoto, N., G. Ono, K. Takashima, and A. Totsuka. 1991. Restriction fragment length polymorphisms of grapevine DNA with phenylalanine ammonia-lyase cDNA. *Japan. J. Breed.* 41: 365-368.
- 後藤（山本）奈美、沼田美子代、島本 敏、望岡亮介、細見彰洋. 2008. ブドウ‘紫’と‘甲州’の SSR 解析及びアントシアニン分析による比較. *J. ASEV Jpn.* 19: 114-118.
- 永田勝也. 2003. 「新特産シリーズ、ヤマブドウ」農文協. p. 52-53.
- 李世誠、堀内昭作、望岡亮介、松井弘之. 1992. 東アジア原産野生ブドウに関する諸問題（2）. *農業及び園芸* 67: 1277-1279.2.