

[研究報文]

アイソザイムバンデングパターンによるブドウ品種の識別

山川 祥秀・田中 浩毅
山梨大学醸酵化学研究施設
400 甲府市北新1丁目13-1

[Research Note]

Differentiation of Grapevine Cultivars by Isozyme Banding Pattern

Yoshihide YAMAKAWA and Hiroki TANAKA
The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University,
Kofu, Yamanashi 400, Japan

The electrophoretic study of isozymes, which is a very useful tool for obtaining genetic information, has been applied to analyzing the phylogeny and the identification and differentiation of fruit crops such as citrus, peach, persimmon, and pineapple.

We applied this technique to the grapevine to differentiate the cultivars and to analyze the differences between them.

Green shoot tips of cultivars to be surveyed were collected at the leafing stage and homogenized in a mortar and pestle. The homogenates were filtered through nylon cloth (30 μ m) and centrifuged 10 minutes; the extracts were stored at -20°C.

Electrophoresis was carried out using the vertical slab-format PAGE, the resolving gels containing 7.5% acrylamido and the stacking gels containing 2.85% acrylamido. The electrode buffers were 0.005M Tris and 0.038M glycine. The enzymes assayed were esterase (EST) and peroxidase (POD). The gels were incubated until the isozyme bands developed sufficient intensity to permit scoring.

EST and POD activity was suitable for the identification or differentiation of *Vitis vinifera* cultivars based on the differences in the migration among isozyme

bands.

Key words : grapevine, isozyme, EST, POD

(Accepted for publication 28 July 1993)

アイソザイム (Isozyme) とは、同じ作用活性・基質特異性を持ち、同じ名前の酵素であるが、異なった分子構造と分子量を持った一群の酵素タンパク質に与えられた名前である。アイソザイムの分子構造の差異はすべて遺伝子の支配を受けていることから、電気泳動のアイソザイムバンデングパターンを解析することによって、各種植物の品種の識別、同定、類縁関係を推察することができるかとされている。

従来からのブドウ品種の識別や同定は、環境により大きな変化を受ける樹、枝、葉、花、果房、果粒などの形態的および生態的性質 (1) を基本に行われており、性質調査には時間と経験を必要とし、最終決定には熟練的判断も必要としている。

アイソザイムバンデングパターンによるブドウ品種の同定は、W.H.Wolfe (2) により7種のアイソザイムによる結果が、R.E.Subdenら (3) により12種のアイソザイムによる結果が報告されている。また、M.A.Walkerら (4) によりカルフォルニア大デイビス校保存台木のアイソザイム解析の結果からSO4台木の誤りが訂正された報告がある。

一方、遺伝子 (DNA) そのものを解析する RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, 制限酵素断片長多型) により各種植物の品種の同定、識別、類縁関係を決定する方法が開発され、ブドウにおいては R.Blaich (5) や M.Yamamotoら (6) の報告がある。しかしながら、この最新で適確なRFLP法は、DNAを扱う熟練した技術、加えてDNA解析の装置、試薬と器具を必要とし、どこの研究室においても容易に採用できる方法とはなっていない。

本報告では、簡単な試料調整、短時間で操作も簡単、経費的にも安価なポリアクリルアミド電気泳動法を使用し、新梢先端部を材料とし、エステラーゼ (EST) とパーオキシダーゼ (POD) の2種類のアイソザイムバンデングパターンを解析することにより、ブドウ品種を識別することのできたので、その結果について報告する。

実験方法

[供試材料] 山梨大学発酵化学研究施設のブドウ育種試験地に植栽されている25のブドウ品種 (Fig. 2参照) の伸長中の新梢先端部5 cm程度を用いた。試料採取時期は5月上旬から7月下旬まで可能であり、採取試料は酵素調整時までビニール袋に入れ、 -20°C で保存した。[アイソザイムの抽出] 白石 (7) の方法を準用して、新梢先端部100mg、抽出

用バッファー 1ml (0.1M Tris-HCl (pH 7.5), 0.005M Na₂-EDTA, 25%グリセリン : 1% Tween-80 : 0.01M DTTを3 : 2 : 1)、PVPP100mgを加え、乳鉢で少量のケイ砂と共によく摩砕した。摩砕物を30 μ mのナイロンメッシュクロスで濾過、遠心分離 (4000rpm, 10min.)、その上澄液を電気泳動用試料とした。

[電気泳動法] スラブゲル電気泳動装置 (MARYSOL, KS-8000) を用いる平板アクリルアミドゲル垂直電気泳動法で、ゲルとして2.85%濃縮用、7.5%分離用アクリルアミドゲル、電極槽溶液として0.005M Tris, 0.038M グリシン緩衝液 (pH 8.3) を用いた。サンプル溝ごとに40 μ l 前後の試料を乗せ、上槽緩衝液にBPB溶液を加え、30mA定電流で、BPBバンドがゲル下端約5mmに達するまで泳動を続けた。

[活性染色法] 電気泳動終了後、直ちに白石 (7) の方法で活性染色を行い、染色終了後は50%エタノールでバンドを固定した。

エステラーゼ (EST) の染色は、0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.5) 100ml、2% α -ナフチルプロピオネートのエタノール溶液 2ml、1.86% α -ナフチルアセテートのエタノール溶液 1ml、ファーストブルー RR 塩 100mgを用い、37°Cでバンドが現れるまで染色した。

パーオキシダーゼ (POD) の染色は、0.01M Tris-酢酸緩衝液 (pH 4.5) 80ml、0.01M 3-アミノ-9エチルカルバゾルと0.01M β -ナフトールのアセトン溶液 20ml、3%過酸化水素水 1mlを用い、室温でバンドが現れるまで染色した。

結果および考察

アイソザイムバンディングパターンは、同一の酵素抽出法、同一の電気泳動法を行い、活性染色の基質試薬を替えることにより、広く各種酵素に適用できる簡便な方法である。しかし、試料の摩砕と遠心分離という簡単な酵素抽出を行っただけで、酵素タンパク質を精製していないので、酵素の種類によっては必ずしも鮮明なバンディングパターンが得られない場合がある。

本実験においては、W.H.Wolfe (2) と R.E.Subden (3) が報告しているアイソザイムの14の酵素について、新梢先端部、未熟果粒、若葉から酵素を抽出、電気泳動、活性染色を試みた。そのうち、解析可能なアイソザイムバンディングパターンが得られたのはアルコール脱水素酵素 (ADH, alcohol dehydrogenase)、エステラーゼ (EST, esterase)、パーオキシダーゼ (POD, peroxidase) の3酵素であった。供試した試料のうち、伸長中の新梢先端部を試料としたESTとPODの2酵素において、鮮明なバンディングパターンを得ることができ、この2酵素のパターンを組み合わせることにより、供試

25品種の識別ができ、品種同定が可能であった。試料とした伸長中の新梢先端部は、5月上旬から7月下旬まで採集が可能で、 -20°C で1年間は酵素活性に変化は見られなかった。

はじめに、ESTのバンディングパターンの写真をFig. 1に、供試25品種のバンディングパターン模式図をFig. 2に示した。

25の供試品種のEST活性染色においては、バンドの濃淡はあったが、15か所の位置にバンドが検出され、バンドの少ない品種で5本、多い品種で8本であった。

Cabernet Sauvignon と Semillon、Pinot Blanc と Riesling においては、全く同じパターンを示したが、他の21の供試品種においては、同じパターンを示すものはなかった。しかし、活性染色バンドに濃淡があり、相対的な移動距離 (Rf値) が接近しているバンドもあったことから、電気泳動する際には抽出酵素濃度を変えて、いくつかのバンデングパターンから総合的に判断する必要があった。また、Cabernet Sauvignon と Semillon、Pinot Blanc と Riesling、あるいは似通ったパターンを示す品種については、後述するPODのバンデングパターンを併用する必要があった。

Vitis vinifera に属する12品種は、1, 2, 10の3本のバンドの存在が共通であった。甲州、甲州三尺、善光寺の3品種には1のバンドが欠落しており、*V. vinifera* に存在しておらず、野生品種に共通して存在していた3のバンドが存在しており、純粋な*V. vinifera* とはバンデングパターンを異にしていた。特に、甲州においては、野生品種に共通して存在していたもう1本のバンド9が存在していた。

交配品種である Muller Thurgau (Riesling×Sylvarner)、当育種試験地作出のヤマ・ソービニオン (山ブドウ×Cabernet Sauvignon) (8)、ヤマ・メルロー (山ブドウ×Merlot) (9)、ヤマ・セミヨン (山ブドウ×Semillon) (10) においては、両親品種から受け継がないバンドはあったが、両親品種以外のバンドは出現しなかった。

山ブドウ (*Vitis coignetiae*)、マンシュウヤマブドウ (*Vitis amurensis*)、サンカクヅル (*Vitis flexuosa*) の雌雄異株の野生品種においては、それぞれの品種の雌雄両株で良く似たパターンを示していたが、雌性株が1本多いバンドをもっており、その違いで区別することができた。

次に、PODのバンデングパターンの写真をFig. 3に、供試25品種のバンデングパターン模式図をFig. 4に示した。

25の供試品種のPOD活性染色においては、バンドの濃淡はあったが、7か所の位置にバンドが検出され、バンドの少ない品種で2本、多い品種で5本であった。

ESTに比べ、同じパターンを示す品種が多く、*V. vinifera* においては、Cabernet Sauvignon と Cabernet Franc、Semillon と Chardonnay、Pinot Noir と Pinot Blanc と Sauvignon Blanc と Saint Emilion、Riesling と Muller Thurgau が同じパ

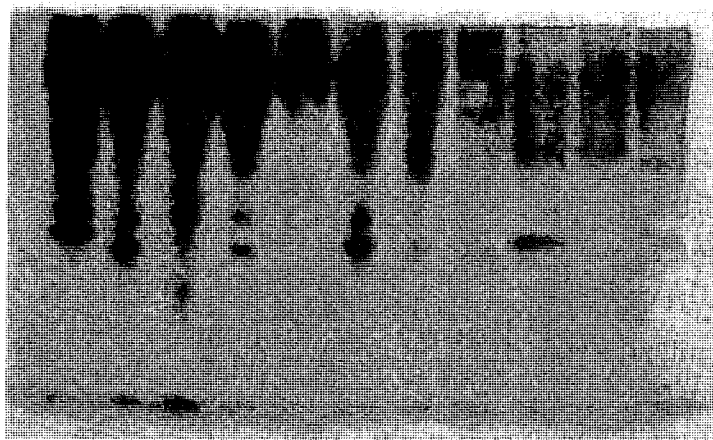


Fig.1 Esterase(EST) isozyme banding pattern of grapevine cultivars.

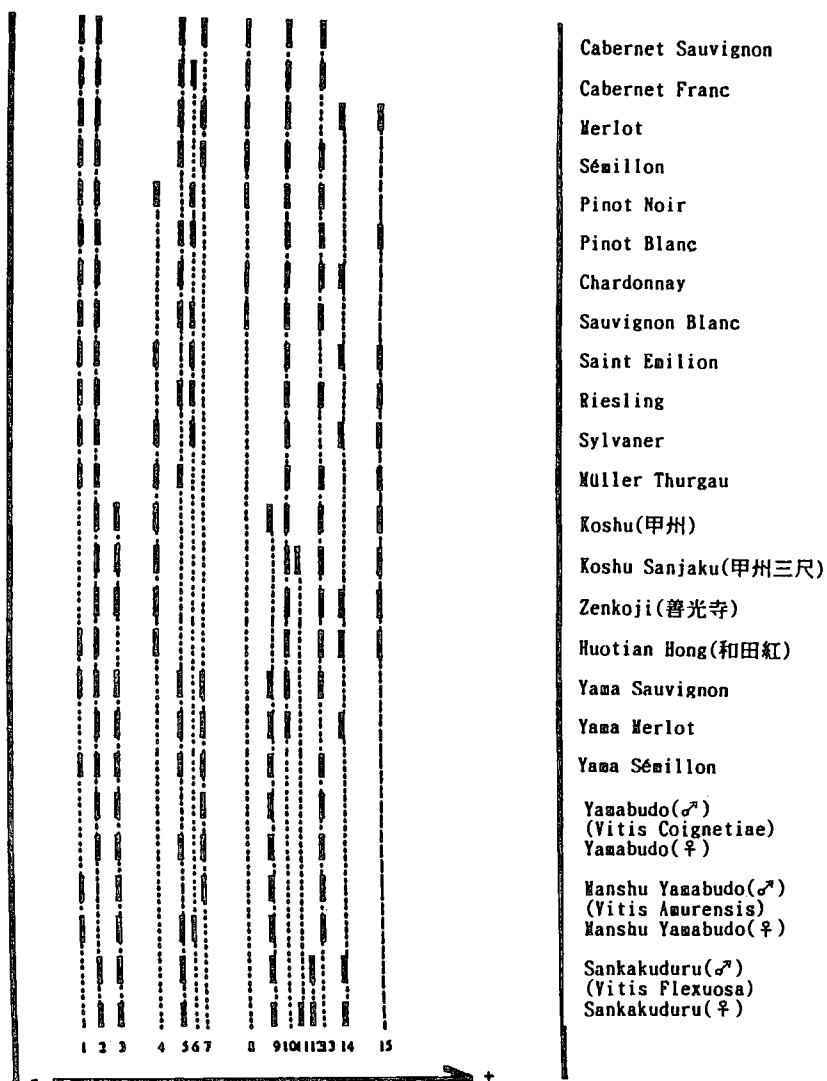


Fig.2 Schematic zymograms for esterase(EST) isozyme of grapevines.

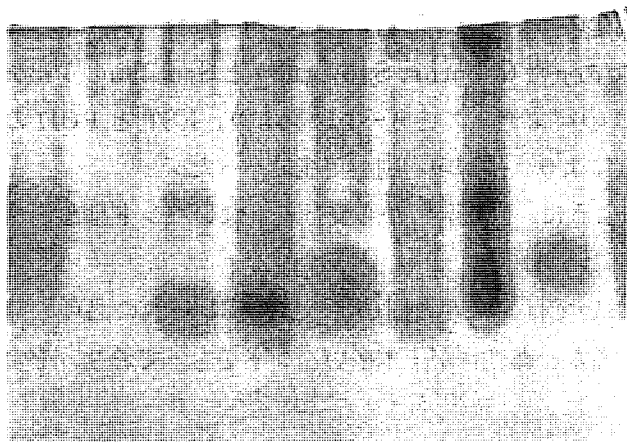


Fig. 3 Peroxidase(POD) isozyme banding pattern of grapevine cultivars.

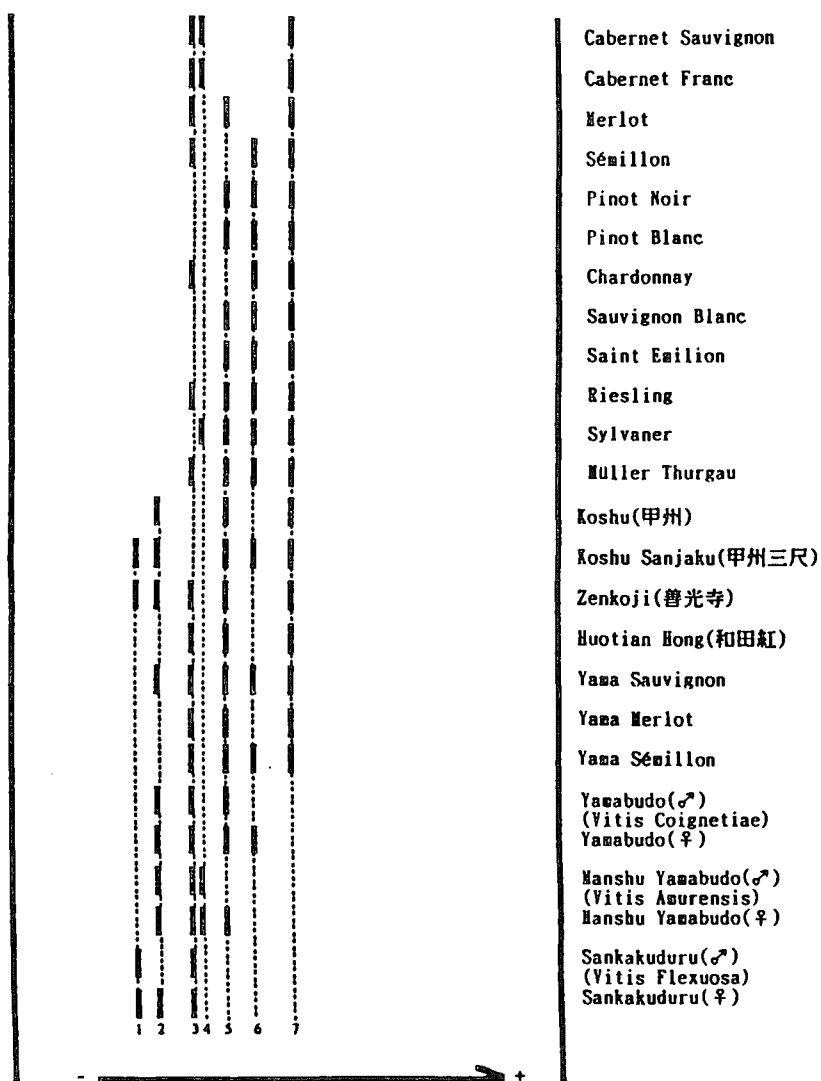


Fig. 4 Schematic zymograms for peroxidase(POD) isozyme of grapevines.

ターンを示していた。これらの品種間Tのパターンで識別が可能であった。

ESTのバンデングパターンが同じであったCabernet SauvignonとSemillon、Pinot BlancとRieslingにおいては、PODのバンデングパターンが異なり、ESTとPODのバンデングパターン組み合わせることにより、品種の識別が可能であった。

交配4品種においては、ESTと同じように、両親品種から受け継がないバンドはあったが、両親品種以外のバンドは出現してこなかった。

山ブドウを初めとした野生品種においては、ESTと同じように、それぞれの品種の雌雄両株で良く似たパターンを示しているが、雌性株が1本多いバンドをもっており、その違いで区別することができた。

以上、ESTとPODのバンデングパターンを比較することにより、供試25品種を識別できることを報告してきたが、この場合、活性染色バンドを鮮明に取ることが基本的な条件になっている。写真に示したように、活性染色バンドに濃淡があり、相対的な移動距離が接近していたバンドもあったことから、電気泳動する際には試料量を変えて、いくつかのバンデングパターンからバンドを判別する必要があるがあった。

この方法は、ブドウ品種に疑問がある場合に、その識別には簡単で有効な方法であると思われた。ブドウ品種を同定する場合には、バンドの本数や相対的な移動距離(Rf値)だけでなく、従来からある形態的(葉型や果粒の形状など)・生態的(果皮色など)性質も併用して、さらに推定されるブドウ品種も加えて、同一条件におけるバンデングパターンの一致からブドウ品種を判定する必要があるものと思われた。

要 約

遺伝的情報によって支配されているアイソザイムの電気泳動バンデングパターン解析は果樹の類縁関係や品種の同定・識別に利用されている。

この方法をブドウ品種の識別に適用を試みた。25品種の伸長中の新梢先端部を試料として採取、これを乳鉢で摩砕、ナイロクロスで濾過、遠心分離して酵素液試料とした。泳動ゲルには2.85%濃縮用、7.5%分離用アクリルアミドを用い、電極槽溶液にはトリス・グリシン緩衝液を使ったスラブゲル電気泳動を行い、エステラーゼ(EST)とパーオキシダーゼ(POD)の活性染色を行い、これらのバンデングパターンを得た。

エステラーゼとパーオキシダーゼのバンデングパターンを組合わせて解析することにより、ブドウ品種の同定・識別が可能であることが示唆された。

文 献

1. 山梨県果樹試験場. 種苗特性分類調査報告書 ブドウ (醸造用・台木用) (1984).
2. Wolfe, W.H. Identification of grape varieties by isozyme banding patterns. *Am.J.Enol.Vitic.* 27 : 68-73 (1976).
3. Subden, R.E., A.Krizus, S.C.Lougheed and K.Carey. Isozyme characterization of *Vitis* species and some cultivars. *Am.J.Enol.Vitic.* 38 : 176-181 (1987).
4. Walker, M.A. and J.M. Boursiquot. Ampelographic and isozyme data correcting the misnaming of the grape rootstock SO4 at the University of California, Davis. *Am.J.Enol.Vitic.* 43 : 261-265 (1992).
5. Blaich, R. The analysis of restriction fragment length polymorphism as a tool for the differentiation of grape cultivars. *Riv. Vitic. Enol.* 42 : 33-35 (1989).
6. Yamamoto, M., 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).
7. 白石 進. アイソザイム分析法—その実際と木材遺伝育種研究への利用—, 木材の育種, 142 : 23-25, 143 : 34-38 (1987).
8. 山川祥秀・守屋正憲・穴水秀教. 交雑新品種・赤ワイン用ぶどう 'ヤマ・ソービニオン' の品種特性について, *J.Inst.Enol.Vitic.Yamanashi Univ.* 24 : 15-24 (1989).
9. 山川祥秀・守屋正憲・穴水秀教. 交雑新品種・赤ワイン用ぶどう 'ヤマ・メルロー' の品種特性について, *J.Inst.Enol.Vitic.Yamanashi Univ.* 25 : 27-37 (1990).
10. 山川祥秀・田中浩毅. 交雑新品種・赤ワイン用ぶどう 'ヤマ・セミヨン' の品種特性について, *J.Inst.Enol.Vitic.Yamanashi Univ.* 26 : 27-34 (1991).