

[研究報文]

甲州三尺 × Riesling 交配品種のDNA解析

後藤 (山本) 奈美

国税庁醸造研究所、〒739 広島県東広島市鏡山3-7-1

1996年11月14日受理

DNA Analysis of Koshu-Sanjaku, Riesling,
and Their Crossed Cultivars

Nami GOTO-YAMAMOTO

National Research Institute of Brewing, Kagamiyama 3-7-1,
Higashi-hiroshima 739, Japan

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis were applied to the grape cultivars Koshu-Sanjaku and Riesling, and to their crossed cultivars, Riesling Forte and Riesling Lion. RFLP analysis of the intergenic spacer region of their rDNA revealed that Koshu-Sanjaku and Riesling had 3 bands each, of which one band was common, Riesling Lion had all 5 bands of the parents, and Riesling Forte had one common band and one band of Riesling. In the case of RAPD analysis using three decamer oligonucleotides, OPA11, OPB06, and OPB18, as the primers, Riesling Lion and Riesling Forte exhibited the same banding patterns. The two crossed cultivars had four bands the same as Riesling, and one band the same as Koshu-Sanjaku. The other bands of the two crossed cultivars were same as both Riesling and Koshu-Sanjaku. Thus, RFLP and RAPD analysis suggested that Riesling Lion and Riesling Forte were progenies of Koshu-Sanjaku and Riesling.

Key words: DNA analysis, RFLP, RAPD, Koshu-Sanjaku, Riesling

緒 論

近年の分子生物学の進歩により、DNA配列の差異を比較的簡便に検出することが可能になり、多くの栽培植物の識別・同定や類縁関係の推定に利用されている。多型の検出方法としては、制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 解析が最初に実用化された(2, 4-6, 13, 18, 22, 26, 31)。最近はより簡便な方法としてPCRを用いたRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 解析がよく用いられている。RAPD解析によるブドウ品種の識別としては、Jean-Jaques et al. (15)、Gogorcena et al. (10)、Collins and Symons (9)、Tschammer and Zyprian(27)、Moreno et al. (19)、Grando et al. (12) 等の報告が出されている。Büscher et al. (7) は、従来から疑問があるとされていたMüller-ThurgauのRAPDパターンを、交配親とされている Riesling と Silvanerのパターンと比較し、花粉親は Silvaner ではないと推定している。

筆者は野生ブドウ及びブドウ栽培品種のDNA解析を進めているが、Rieslingと甲州三尺の交配品種であるRiesling Forte とRiesling Lion のRFLP解析及びRAPD解析を行ったところ、両品種のバンドはすべて親品種の少なくとも一方と一致することが明らかになったので、報告する。

材料と方法

供試材料 Riesling、甲州三尺、Riesling Forte、及びRiesling Lionの新葉は、サントリー株式会社山梨ワイナリーよりご提供戴いた。凍結保存した新葉より、前報(31)の方法で全DNAを抽出した。

RFLP解析 ブドウDNA 0.5 μ gをHindIII消化し、0.8%アガロースゲルで電気泳動して、Hybond-N+ ナイロンメンブラン (アマシャム株式会社) にアルカリブロットニングし、サザン

ハイブリダイゼーションを行った。プローブは、松本省吾先生 (現在岐阜大学) よりご譲渡戴いたブドウのリボゾーム遺伝子 (rDNA) の介在配列、pVvc-A (26) ³²Pラベルして用いた。メンブランの洗浄は、0.1 x SSC、65°Cで行った。

RAPD解析 RAPD解析には、OPERON社製のdecamer、OPA11、OPB06、OPB18をプライマーに用い、dNTP 200 μ M、プライマー0.2 μ M、テンプレートDNA 0.5 ng/ μ L、Taqポリメラーゼ (宝酒造) 0.1 U/ μ Lの条件でPCR反応を行った。dNTP及びPCRバッファーはPerkin-Elmer社 (販売、宝酒造) の製品を所定の濃度で使用した。一部の反応には、Clontech社製 Taq Start Antibody を使用した。PCR反応には、Perkin-Elmer社製PJ-480型サーマルサイクラーを用い、初期変性94°C、5分の後、変性94°C、1分、アニーリング35°C、2分、伸長72°C、3分の反応を45サイクル繰り返し、伸長を完了させるため72°Cで10分保持した後、反応液を4°Cで保存した。1.5%アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色でバンドを検出した。分子量マーカーとし

ては、 λ HindIII と DNA size standards-low range (pBR322/AvaII+pBR322/EcoRI, AvaII, Bio-Rad社製) を同じウェルで泳動した。

結 果

RFLP解析 RFLP解析の結果をFig. 1 に示す。写真ではやや不鮮明であるが、Rieslingと甲州三尺からはそれぞれ3本のバンドが検出され、最も高分子側の1本が共通であった。Riesling LionにはRieslingと甲州三尺に含まれるすべてのバンドと同じ泳動度のバンドが検出された。Riesling Forteからは、親品種に共通の1本を含むRieslingの高分子域の2本と同じ泳動度のバンドが検出された。一般に、rDNAは多コピーが反復配列をとっていることが知られており、また、Haas et al.

(14) は、FISH法でブドウの rDNAが染色体上の2カ所にコードされていることを報告している。Riesling LionとRiesling ForteのRFLPパターンが異なることから、ブドウの rDNAは複数のアレルにコードされているだけでなく Heterozygousであろうと推定される。

RAPD解析 PCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果をFig. 2 に示す。今回用いた3種類のプライマーでは、Riesling LionとRiesling Forte は同じRAPDパターンを示した。両交配品種のバンドのうち、4本はRieslingのみに、1本は甲州三尺のみに認められ、他のバンドは両親品種に共通であった。親品種の一方のみと一致するバンドには、左側にR (Riesling) またはK (甲州三尺) を記入した。

この結果及びRFLP解析の結果から、Riesling LionとRiesling Forte が甲州三尺とRieslingの交配品種であることが示唆された。

考 察

PCR反応における非特異的増幅を防ぐため、Taqポリメラーゼ抗体を用いて、初期変性以前にポリメラーゼ反応が進むのを防止する方法が考案されている(21)。RAPD解析ではしばしば再現性の低さが問題とされており(8, 11, 16)、また、筆者のブドウのRAPD解析では不鮮明なバンドが出る場合が多くあった。そこで、Taqポリメラーゼ抗体のTaqStart Antibodyの使用を検討したところ、OPA11とOPB06では鮮明なバンドが得られたが、OPB18ではかえって不鮮明な結果になった。Fig. 1のOPA11とOPB06はTaqStart Antibodyを使用、OPB18は不使用のデータである。

RAPDの再現性の問題は、低いアニーリング温度で、若干のミスマッチを許してPCR反応を行うことによる必然的な問題の他、サーマルサイクラーの精度や、DNAの純度(28)、特にPCR反

応を阻害する多糖類(20)のコンタミなどの実験条件に起因するのではないかと推察される。現在のところ、高精度のサーマルサイクラーと高純度のDNAを用い、再現性が高く、かつ多型の出やすいプライマーを選択することで、意味のあるRAPD解析が可能と考えられる。本実験では、RFLP同様、RAPD解析でも交配品種のすべてのバンドが親品種の少なくともどちらか一方と一致することが確認された。

現在、より精度の高い解析のためには、既知の配列を元に設計したプライマーを用いたPCR(STS-PCR)等が検討されている。ブドウにおいても、変異の多いマイクロサテライト領域の周辺配列をプライマーにしたSTS-PCR(1, 24, 25)や、RAPDで得られたバンドのシーケンスを用いたSTS-PCR(29, 30)の報告、及びPCR-RFLP(3)の報告がある。これらのDNAマーカーとアイソザイムを用いたブドウの遺伝子地図の作成(17)や、果実の色やマスカット香等の計量形質に関するRAPDマーカーの検討(23)も報告されており、ブドウにおいてもDNA解析の重要性は今後ますます高まるものと思われる。

要 約

甲州三尺、Riesling及びその交配品種であるRiesling LionとRiesling ForteのrDNAのRFLP解析、及びRAPD解析を行ったところ、いずれの場合も、両交配品種のバンドは親品種の少なくとも一方のバンドと一致することが明らかになった。

謝 辞

貴重な試料をご提供戴いたサントリー株式会社山梨ワイナリー、及びpVvc-Aをご譲渡戴いた松本省吾先生に深謝致します。また、ご指導、ご鞭撻戴いた梅田紀彦前室長及び岩野君夫室長、実験にご協力戴いた松田美砂さんに感謝致します。

引用文献

1. Botta, R., N. S. Scott, I. Eynard, and M. R. Thomas. Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars. *Vitis* 34: 99-102 (1995).
2. Bourquin, J. C., L. Otten, and B. Walter. Identification of grapevine root-stocks by RFLP. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série III* 312: 593-598 (1991).
3. Bourquin, J. C., L. Otten, and B. Walter. PCR-RFLP analysis of *Vitis*, *Ampelopsis* and *Parthenocissus* and its application to the identification of rootstocks. *Vitis* 34: 103-108 (1995).
4. Bourquin, J. C., A. Sonko, L. Otten, and B. Walter. Restriction fragment length polymorphism and molecular taxonomy in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 87: 431-438 (1993).
5. Bourquin, J. C., P. Tournier, L. Otten, and B. Walter. Identification of sixteen grape vine rootstocks by RFLP and RFLP analysis of nuclear DNA extracted from the wood. *Vitis* 31: 157-162 (1992).
6. Bowers, J. E., E. B. Bandman, and C. P. Meredith. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 266-274 (1993).
7. Büscher, N., E. Zyprian, O. Bachmann, and R. Blaich. On the origin of the grapevine variety Müller-Thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Vitis* 33: 15-17 (1994).
8. Büscher, N., E. Zyprian, and R. Blaich. Identification of grapevine cultivars by DNA analysis: Pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10mer primers. *Vitis* 32: 187-188 (1993).
9. Collins, G. G., and R. H. Symons. Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 105-112 (1993).
10. Gogorcena, Y., S. Arulsekhar, A. M. Dandekar, and D. E. Parfitt. Molecular markers for grape characterization. *Vitis* 32: 183-185 (1993).
11. Gogorcena, Y., and D. E. Parfitt. Evaluation of RAPD marker consistency for detection of polymorphism in apricot. *Sci. Hortic.* 59: 163-167 (1994).
12. Grando, M. S., L. De Micheli, L. Biasetto, and A. Scienza. RAPD markers in wild and cultivated *Vitis vinifera*. *Vitis* 34: 37-39 (1995).
13. Guerra, B., and C. P. Meredith. Comparison of *Vitis Berlandieri* x *Vitis riparia* rootstock cultivars by restriction fragment length polymorphism analysis. *Vitis* 34: 109-112 (1995).
14. Haas, H. U., and H. Budahn, and G. Alleweldt. *In situ hybridization in Vitis vinifera* L. *Vitis* 33: 251-252 (1994).
15. Jean-Jaques, I., A. Defontaine, and J. N. Hallet. Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis* 32: 189-190 (1993).
16. Koller, B., A. Lehmann, J. M. McDermott, and C. Gessler. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 85: 901-904 (1993).
17. Lodhi, M. A., M. J. Daly, G. N. Ye, N. F. Weeden, and B. I. Reisch. A molecular marker based linkage map of *Vitis*. *Genome* 38: 786-794 (1995).

18. Mauro, M.-C., M. Strefeler, N. F. Weeden and B. I. Reisch. Genetic analysis of restriction fragment length polymorphisms in *Vitis*. *J. Heredity* 83: 18-21 (1992).
19. Moreno, S., Y. Gogorcena, and J. M. Ortiz. The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Hort.* 62: 237-243 (1995).
20. Pandey, R. N., R. P. Adams, and L. E. Flournoy. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14: 17-22 (1996).
21. Sharkey, D. J., E. R. Scalice, K. G. Christy Jr., S. M. Atwood, and J. L. Daiss. Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction. *Bio/technol.* 12: 506-509 (1994).
22. Striem, M. J., P. Spiegel - Roy, G. Ben-Hayyim, J. Beckmann, and D. Gidoni. Genome DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* by the use of multi-loci probes. *Vitis* 29: 223-227 (1990).
23. Striem, M. J., G. Ben-Hayyim, and P. Spiegel-Roy. Developing molecular genetic markers for grape breeding, using polymerase chain reaction procedures. *Vitis* 33: 53-54 (1994).
24. Thomas, M. R., and N. S. Scott. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* 86: 985-990 (1993).
25. Thomas, M. R., P. Cain, and N. S. Scott. DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Mol. Biol.* 25: 939-949 (1994).
26. Thomas, M. R., S. Matsumoto, P. Cain, and N. S. Scott. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 86: 173-180 (1993).
27. Tschammer, J., and E. Zyprian. Molecular characterization of grapevine cultivars of Riesling-type and of closely related Burgundies. *Vitis* 33: 249-250 (1994).
28. Weeden, N. F., G. M. Timmerman, M. Hemmat, B. E. Kneen, and M. A. Lodhi. Inheritance and reliability of RAPD markers. *In: Proceedings of the joint plant-breeding symposium series. Applications of RAPD technology to plant breeding.* pp. 12-17. Crop Science Society of America, American Society for Horticultural Science and American Genetic Association (1992).
29. Xu, H., and A. T. Bakalinsky. Identification of grape (*Vitis*) rootstocks using sequence characterized amplified region DNA markers. *HortSci.* 31: 267-268 (1996).
30. Xu, H., D. J. Wilson, S. Arulsekhar, and A. T. Bakalinsky. Sequence-specific polymerase chain reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprinting grape (*Vitis*) rootstocks. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 714-720 (1995).
31. Yamamoto, N., 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).

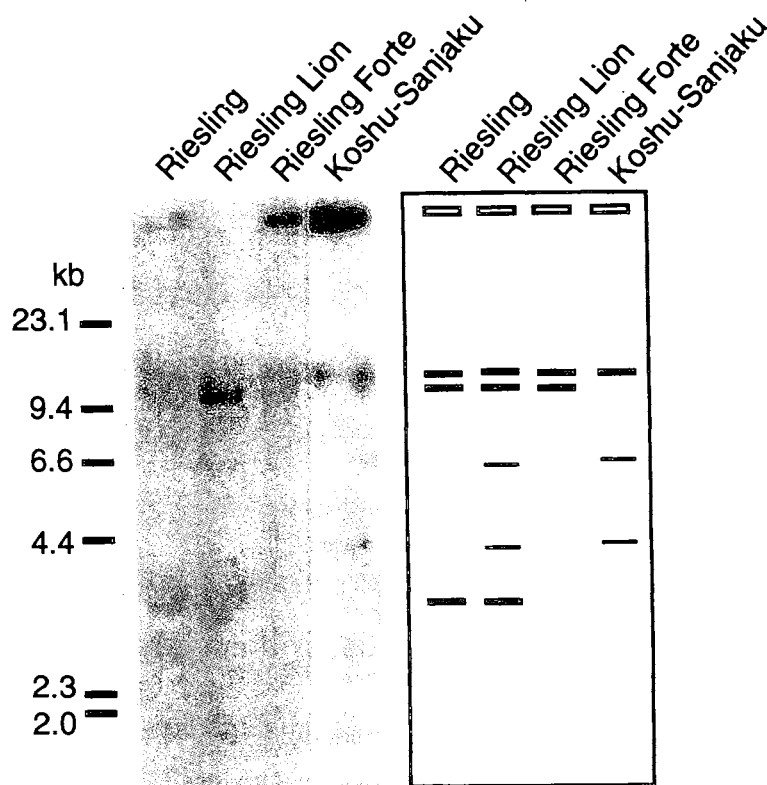


Fig. 1. RFLP analysis of intergenic spacer region of rDNA of Koshu-Sanjaku, Riesling, and their crossed cultivars.

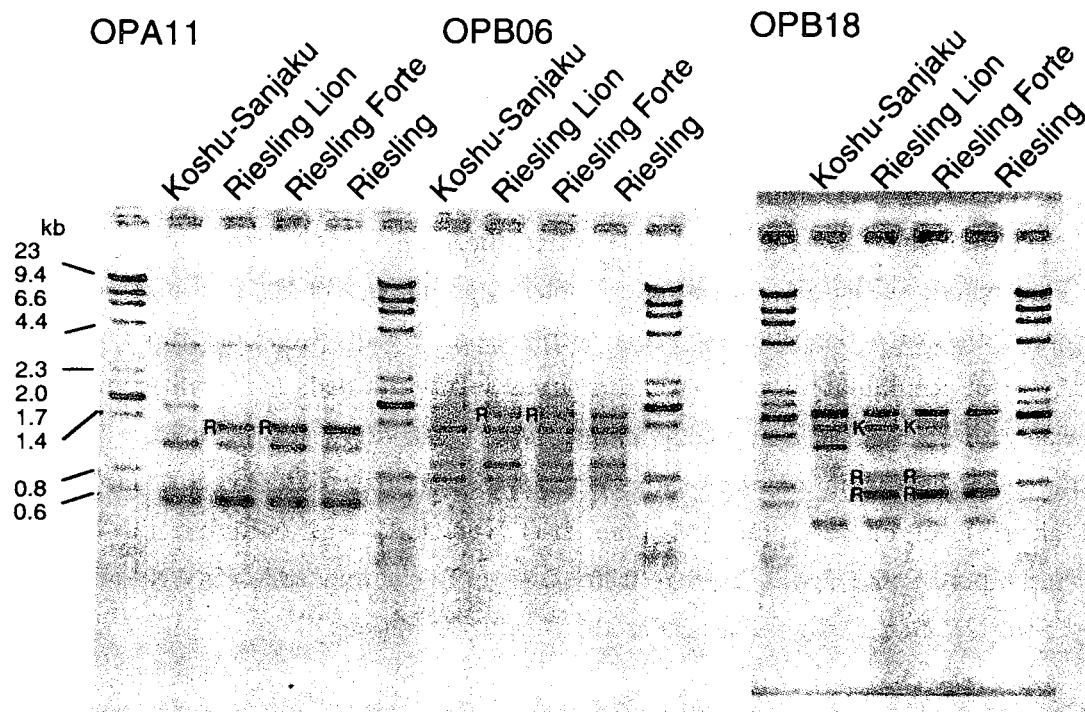


Fig. 2. RAPD analysis of Koshu-Sanjaku, Riesling, and their crossed cultivars using OPA11, OPB06, and OPB18 as the primers