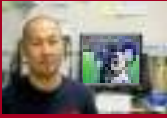


# レトロトランスポゾン挿入位置による優良ブドウ樹選抜法の開発

○ 鈴木 俊二・高柳 勉

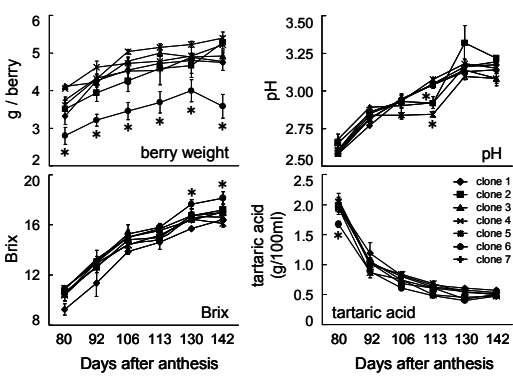
山梨大学ワイン科学研究センター果実遺伝子工学研究部門

email: suzukis@yamanashi.ac.jp

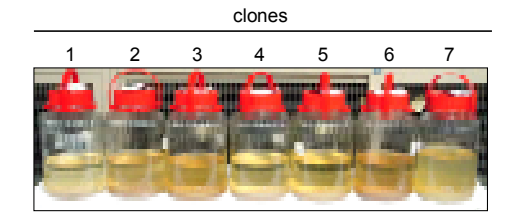


**【目的】** ブドウは、一般的に、接木および挿し木で繁殖させるため、同じ品種は同一の遺伝子を有する「クローン」として栽培されてきた。しかしながら、我々が長年蓄積したデータは、ブドウ園によって、あるいは、同じブドウ園でも樹によって、ブドウ果実の形質やその果実から醸造されるワインの品質に差異が認められることを示した。そこで、我々は、山梨県内のブドウ園から10余りの甲州ブドウ樹を集め、実験圃場に移植し、現在までの20年間、これらを極めて厳密に同一条件下で栽培してきた。樹齢が20年となった一昨年および昨年、ブドウ果実の形質を比較した結果、それぞれの樹により、果粒の重さ、糖度に相違が認められた。加えて、それら果実から同条件下で醸造したワインは、色調、味、匂いといった品質および官能的な違いが確認された。これらの結果から、我々は「同一品種間でも遺伝子レベルで異なる樹(以後、遺伝的系統と記す)が存在する」という仮説を打ち立てた。本発表では、ゲノムDNAへのレトロトランスポゾン挿入により発生する遺伝的系統を示し、遺伝的系統とブドウ果実の形質およびそれから醸造されるワイン品質との相関関係を検討した。

**【材料および方法】** 実験圃場で厳密に栽培・管理された、栽培地の異なる7つの甲州ブドウ樹(クローン1-7と記す)を供試した。収穫時期まで経時的に果実をサンプリングし、果粒の重さ(果粒重)、果汁に含まれる糖度(Brix)、pHおよび総酸を測定した。収穫時期の果実から同条件下でワインを醸造し、比重、アルコール分、エキス分、pH、全フェノール含量、非フラボノイドフェノール含量およびフラボノイド含量を測定した。次に、ゲノム上に存在する8種のレトロトランスポゾンおよびレトロエレメントのDNA配列から、外向きプライマーを製作した。外向きプライマーのすべての組み合わせで **Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP)** 解析<sup>1)</sup> を行ない、レトロトランスポゾンの挿入位置によるDNA多型を抽出した。



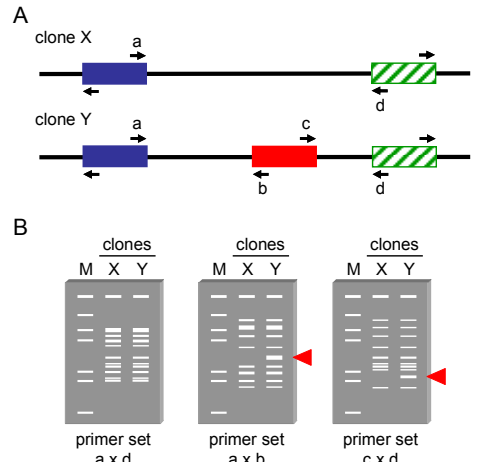
**Figure 1 Comparison of fruit characteristics among Koshu clones.** Berries were collected from 80 days after anthesis to harvest time. Fruit characteristics (berry weight, Brix, pH, and tartaric acid) were measured. Bars indicate means  $\pm$  standard deviations of duplicate experiments. \*  $p < 0.05$ , compared with other clones.



**Figure 2 Comparison of the color of Koshu wines.** Fermentation was performed at 15 °C for one month and half.

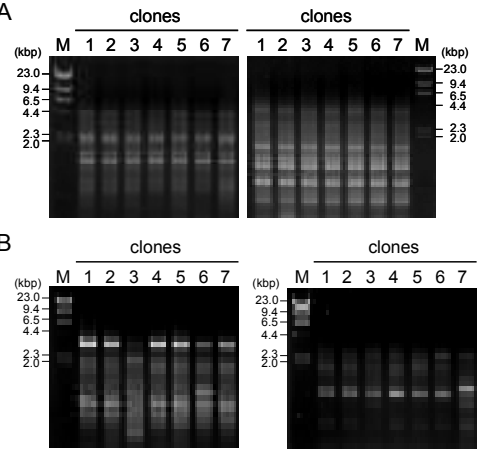
clone no.	specific gravity	alcohol (%)	extract (g/L)	pH	total phenol (mg/L)	non-flavonoid phenols (mg/L)	flavonoid phenols (mg/L)
1	0.991	13.6	29.7	2.86	180.3	136.7	43.6
2	0.992	13.5	32.0	2.83	178.2	125.6	52.6
3	0.991	13.5	29.2	2.81	174.4	124.4	50.0
4	0.992	13.2	30.9	2.81	140.3a*	96.1a	44.2
5	0.992	13.5	31.8	2.82	163.2	118.3	44.9
6	0.993	13.3	33.8	2.84	178.6	147.8	30.8a
7	0.993	13.4	34.1	2.88	160.7	115.6	45.1

\* Means with letters were significantly different at from other clones ( $p < 0.05$ ).

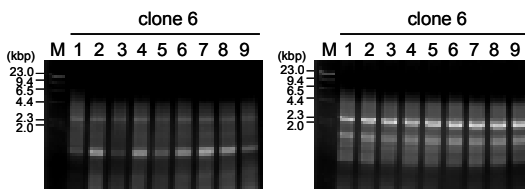


**Figure 3 Schematics of IRAP analysis.** (A) Primer maps to detect polymorphic band patterns. a, b, c, and d, retrotransposon-specific primers. These primers were designed to extend outward from ends of retrotransposon sequence. Lines, genomic sequences; Boxes, retrotransposons. (B) Diagrammatic representation of band patterns amplified by PCR using primer a, b, c, and d. A primer set a  $\times$  d exhibits a monomorphic band pattern between clones X and Y. Primer sets a  $\times$  b or c  $\times$  d produce polymorphic band patterns between clones X and Y. Arrowhead, a polymorphic band; M, molecular size markers.

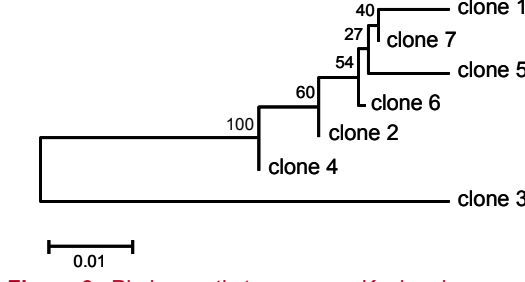
Names	Sequences	Accession	Source	Corresponding
GRET1-L	GTATCCGTCGGGAGGTATTG	AB242301	gag-pol	98-79
GRET1-R	CGAAGAAGAAGGGGATCTCTC	AB242301	LTR	7863-7882
TY1-L1	CCGTAACCTCGAAACCAAGT	DQ644607	polyprotein	101-82
TY1-R1	GCTTGTTTCTCTGGGCAAT	DQ644607	polyprotein	791-810
TY1-L2	TACCTTCTGCTCATTGCGCT	DQ644606	polyprotein	93-74
TY1-R2	GCAACTCTTGTGCGCTGCA	DQ644606	polyprotein	889-908
TY1-L3	TAAAGCTCGGAAATGCAAGT	DQ644605	polyprotein	312-293
TY1-R3	CTCAACAGCTGATCTGCCAA	DQ644605	polyprotein	988-1007
TY1-L4	ATGCTCGAGGTGATTGCTT	DQ644604	polyprotein	145-126
TY1-R4	TAGTTGCCCTGCCTAGTGCT	DQ644604	polyprotein	851-870
TVV1-L	TCAGCTCAAGAAGGAAACA	AF478389	LTR	510-489
TVV1-R	TGCTCGGTTGCTCCTATC	AF478389	gag-pol	1080-1099
RLE-L	TACAAGCATGCTCGAGGTGG	Y12558	RAPD	100-81
RLE-R	TCAACAGCAAAATTCAGGGCC	Y12558	RAPD	623-642
VINE1-L	TTGTGAAGACTCCAGCTCA	AF116598	LTR	1259-1239
VINE1-R	GTCCAGCAGCCAAAATA	AF116598	LTR	3520-3549



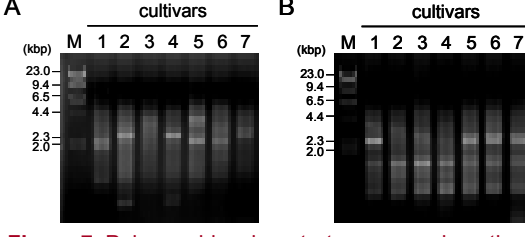
**Figure 4 Polymorphism by retrotransposon insertion on the genome among Koshu clones.** (A) Representative gel pictures of monomorphic band patterns. Left, a GRET1-L  $\times$  GRET1-L primer set; right, a TY1-L1  $\times$  TVV1-R primer set. (B) Representative gel pictures of polymorphic band patterns. Left, a TY1-R2  $\times$  TY1-R3 primer set; right, a TY1-R1  $\times$  VINE1-R primer set. Molecular size markers (M) were run in the left or the right lanes. Data for all primer sets are not shown.



**Figure 5 Monomorphism by retrotransposon insertion on the genome of individual grapevines in a Koshu clone.** PCR using 24 primer sets, which exhibited polymorphic band patterns among Koshu clones, was performed with nine individual grapevines (nos. 1-9) of clone 6. Representative gel pictures of monomorphic band patterns were shown. Left, a GRET1-L  $\times$  TY1-R1 primer set; right, a GRET1-L  $\times$  TVV1-L primer set. Molecular size markers (M) were run in the left lanes. Data for all primer sets are not shown.



**Figure 6 Phylogenetic tree among Koshu clones.** Bootstrap values are marked on the branches. Bar indicates 1% and dissimilarity.



**Figure 7 Polymorphism by retrotransposon insertion on the genome among *V. vinifera* cultivars.** (A) PCR using 24 primer sets, which exhibited polymorphic band patterns among Koshu clones, was performed. A representative gel picture of polymorphic band patterns was obtained by PCR using a GRET1-L  $\times$  TY1-R1 primer set. (B) PCR using 112 primer sets, which exhibited monomorphic band patterns among Koshu clones, was performed. A representative gel picture of polymorphic band patterns was obtained by PCR using a GRET1-L  $\times$  GRET1-L primer set. Molecular size markers (M) were run in the left or the right lanes. Lanes 1, Cabernet Sauvignon; 2, Chardonnay; 3, Riesling; 4, Pinot Noir; 5, Merlot; 6, Muscat Bailey A (a hybrid of *V. vinifera* cv. Muscat Hamburg  $\times$  *V. labrusca* cv. Bailey); 7, Koshu clone 7. Data for all primer sets are not shown.

**【結果および考察】** IRAP解析により、栽培地の異なる甲州ブドウ樹間にDNA多型が認められた。DNA多型に基づくクラスター解析は、調査を行った甲州ぶどう樹間に少なくとも3つのクラスターが存在する可能性を示した。以上の結果は、同一ブドウ品種内でも遺伝的系統が存在することを示唆しており、我々の仮説を科学的に証明したことを意味する。現在山梨県内に栽培されている甲州ブドウ樹にいくつもの遺伝的系統が存在するの、大規模調査を行う予定である。果実の果粒重および糖度、ワインの全フェノール含量、非フラボノイドフェノールおよびフラボノイド含量で、甲州ブドウ樹間に相違が認められたが、遺伝的系統との明らかな相関関係は認められなかった。現在、供試ブドウ樹を増やすことで両者の相関関係を再検討している。

本発表では、同一ブドウ品種内に存在する遺伝的系統をレトロトランスポゾン配列プライマーで識別する技術を確立するに到ったが、この方法では複数のバンドが同時に増幅されるため、実用的な遺伝子マーカーとしては推奨しがたい。現在、DNA多型に関するレトロトランスポゾンのゲノム上の挿入位置を解析中である。ブドウのゲノムDNA配列を遺伝子マーカーとして用いることで実用的な遺伝子マーカーが構築できるものと思われる。

**【参考文献】**  
1. Kaleland, R. and A.H. Schulman 2006. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. Nature Protocol 1: 2478-24