

【学術資料】

幼苗緑枝接ぎと遺伝子診断を用いた ブドウ新品種の早期育成方法

小林正幸・上野俊人・向山佳代・手塚誉裕

キーワード：ブドウ，接ぎ木，育種，遺伝子診断

目 的

山梨県は、ブドウの生産量が全国 1 位であり、令和 5 年度の生産額は 446 億円と平成 30 年度比で 133%と増加傾向にある^{1,2)}。この好調を牽引したのが大粒で皮ごと食べられる黄緑色品種の‘シャインマスカット’である。近年では、この‘シャインマスカット’の人気を受け、各ブドウ産地において、‘シャインマスカット’を親に持つ赤色系品種が育成されている。本県では香りが豊かで食味の評価が非常に高い‘サンシャインレッド’³⁾、長野県では‘長果 G11’（商標登録名：クイーンルージュ[®]）⁴⁾、島根県では‘神紅’⁵⁾、と各県でオリジナル品種として普及が始まり、ブドウ産地間でブランド競争が激しさを増している。

このような背景から市場関係者や生産者から、次の新品種として、皮ごと食べられる黒色系ブドウが強く求められている。また他県でも黒色系ブドウの育種に力を入れているため、一刻も早い育成が望まれている。

しかし、新品種を育成するには、交雑した種子を播種してから、発芽した実生を台木に接ぎ木し、果実品質や栽培特性を複数年間調査する必要がある、長い年月を要している。

そこで、本研究ではブドウの早期育成を目指し、交雑実生が初結実するまでの期間を短縮できる接ぎ木方法を検討した。さらに、黒色系ブドウをより早い生育段階で選抜するため、ブドウ果皮色の遺伝的な決定要因である着色遺伝子型を利用した選抜方法を検討した。

材料および方法

1. 接ぎ木方法の違いが結実および管理作業に及ぼす影響

1) 供試個体

2019 年および 2020 年に交雑して得られた交雑種子から発芽した実生を供試し、2021 年から 2023 年に試験を行った。交雑実生の播種は 1 月に育苗用成形培地（OASIS）で行い、播種後はガラス温室（最低温度 12℃以上、灌水条件 1 日 30 分）で養成した。そのうち高接ぎ、休眠枝接ぎ、緑枝接ぎに供試する交雑実生は、4 月に育苗施設（鉄骨ガラス施設）に定植し養成した。

2) 接ぎ木方法

本試験では、幼苗緑枝接ぎ、高接ぎ、休眠枝接ぎ、慣行として緑枝接ぎを用いた（第 1 図）。各接ぎ木方法の育成工程を第 1 表に示した。台木は、いずれの試験区においてもリパリア・ルペストリス 101-14 を供試した。

(1) 幼苗緑枝接ぎ

穂木は、種子から発芽後 60 日程度の交雑実生の緑枝を供試した。台木は落葉後の 1 月から 2 月に

休眠枝を採取し、3月に長さを15 cmから25 cm程度に調整後、育苗資材ジフィーセブンC（株式会社サカタのタネ）に挿し木した。接ぎ木は交雑から2年目の4月から5月に台木の中央を縦に割り、くさび形に削ったつぎ穂をさし込んで、接ぎ木部をパラフィルムで結縛した⁶⁾。活着した交雑実生は1年間育苗施設で養成し、交雑から3年目に選抜ほ場に定植した。

(2) 高接ぎ

穂木は、育苗施設で養成した2年目の交雑実生の緑枝を供試した。台木は、あらかじめ選抜ほ場で養成した短梢剪定栽培樹を供試した。接ぎ木は交雑から3年目に行った。接ぎ木方法は幼苗緑枝接ぎと同様である。

(3) 休眠枝接ぎ

穂木は、育苗施設で1年間養成し落葉後の2月から3月に採取し、4℃で貯蔵しておいた交雑実生の休眠枝を供試した。台木は、育苗施設に挿し木し、2年間養成した台木を供試した。接ぎ木は交雑から3年目に行った。接ぎ木方法は幼苗緑枝接ぎと同様である。活着した交雑実生は1年間育苗施設で養成し、交雑から4年目に選抜ほ場に定植した。

(4) 緑枝接ぎ

穂木は、育苗施設で養成した2年目の緑枝を供試した。台木は、育苗施設に挿し木し、2年間養成した台木を供試した。接ぎ木は交雑から3年目に行った。接ぎ木方法は幼苗緑枝接ぎと同様である。活着した交雑実生は1年間育苗施設で養成し、交雑から4年目に選抜ほ場に定植した。

3) 栽培管理

接ぎ木後2ヶ月程度は活着率向上のため、2週間に1度の割合で台芽をかいだ。選抜ほ場定植後は、一文字整枝短梢剪定栽培とした。

4) 管理作業時間

作業時間については、幼苗緑枝接ぎ区、高接ぎ区、緑枝接ぎ区の各20個体において、‘芽かき’、‘誘引’、‘新梢管理’の各作業に要した時間を計測した。

2. 遺伝子診断による黒色系ブドウの早期選抜

1) DNA 精製

発芽後30日程度の交雑実生の子葉において、重量を10 mg, 20 mg, 40 mg, 70 mgの4水準に分けて採取し、葉の面積を測定した。測定した子葉を液体窒素とマルチビーズクラッシャー（安田器械株式会社）で破碎後、-80℃で保存した。DNAの精製はDNeasy[®] Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いた。

2) PCR 反応

PCR反応液は、KOD One[®]PCR Master Mix-Blue-（東洋紡株式会社）を用いた。テンプレートは、精製DNA 1.0 μ l, Master Mix 5.0 μ l, プライマー各10 μ Mを加えて全量を10 μ lとした。本試験では *VvMYBA1a* (ハプロタイプ: HapA)⁷⁾と *VIMYBA2* (ハプロタイプ: HapE2)⁷⁾の2種類の着色関連遺伝子の有無を調べ、果皮が黒色となる交雑実生を選抜した。使用したプライマー⁷⁾を第2表に示した。PCR条件はプレヒーティングを95℃で3分間行い、変性94℃で30秒、アニーリング60℃で30秒、伸長72℃で30秒を36回繰り返した後、72℃で5分間加熱した。

3) 電気泳動

PCR産物5 μ lをDNA蛍光染色試薬としてミドリグリーンアドバンス（日本ジェネティクス株式会社）を含む1.5%アガロースゲルで電気泳動を行った。Tris-acetate-EDTAを泳動bufferとして100Vで25分泳動した後、紫外線照射下で診断を行った。

結果および考察

1. 接ぎ木方法の違いが結実および管理作業に及ぼす影響

試験結果を第3表に示した。活着率は、緑枝接ぎ区が88%と最も高かった。次いで幼苗緑枝接ぎ区が81%、高接ぎ区が76%だった。休眠枝接ぎ区が63%と最も低かったが、本試験で用いた休眠枝の中には枝幅が2 mm程度と細い枝もあり、充実不良が活着率低下に影響したと考えられた。休眠枝接ぎの活着率を上げるには充実した休眠枝を用いることが望ましいと示唆された。

各接ぎ木方法の交雑から初結実までの期間は、幼苗緑枝接ぎ区と高接ぎ区が4年間となり、慣行の緑枝接ぎ区より、1年早かった。休眠枝接ぎ区と緑枝接ぎ区は5年間だった。交雑から4年目の結実率は、幼苗緑枝接ぎ区が15%と最も高かった。幼苗緑枝接ぎは、休眠枝接ぎや緑枝接ぎと比べ、穂木の養成期間が短く、1年早く苗木として養成できるため、結実までの期間も早くなったと考えられた。

各接ぎ木方法の管理作業時間を第2図に示した。管理作業は高接ぎ区が最も多くの時間を要し、幼苗緑枝接ぎ区と緑枝接ぎ区は、差は見られなかった。‘芽かき’と‘誘引’は、いずれの試験区においても、差は見られなかったが、‘新梢管理’は幼苗緑枝接ぎ区と緑枝接ぎ区が20個体あたり50分程度だったのに対し、高接ぎ区は111.6分と、多くの時間を要した。高接ぎ区は、接ぎ木の間隔が15 cmから25 cmと狭いため、新梢が混みやすく、整理するのに多くの時間を要した。

2. 遺伝子診断による黒色系ブドウの早期選抜

葉の重量が遺伝子診断の結果に及ぼす影響を第4表、MYB遺伝子診断の電気泳動結果を第3図に示した。葉の重量が10 mgでは、精製したDNAの品質が低く、PCRによる増幅も確認できなかった。葉の重量が20 mg(葉面積1.1 cm²)以上では、高品質のDNAを精製でき、電気泳動によりMYB遺伝子型の診断が明確に判断できた。ブドウの果皮色は、着色遺伝子座に存在するMYBアレルの組合せによって決定する。本試験では着色機能が高いハプロタイプHapE2を有する交雑実生を幼苗の段階で選抜できた。

以上の結果から、幼苗緑枝接ぎとMYB遺伝子診断を組み合わせることで、着色に優れる交雑実生を効率的かつ早期に選抜できると考えられた。



幼苗緑枝接ぎ



高接ぎ



休眠枝接ぎ



緑枝接ぎ

第1図 本試験で用いた接ぎ木方法

第1表 交雑実生の育成工程

接ぎ木方法		1年目				2年目	3年目	4年目
		5月	11月	1月	2～3月	4月	3～5月	3月
幼苗緑枝接ぎ	交雑実生	交雑	採種	播種	ガラス温室で養成	幼苗の新梢を台木に接ぎ木後、育苗施設で養成	選抜圃場に定植	
	台木				ガラス温室にて育苗資材に挿し木			
高接ぎ	交雑実生	交雑	採種	播種	ガラス温室で養成	育苗施設で養成	選抜圃場で養成しておいた短梢剪定樹に高接ぎ	
	台木	選抜圃場で養成						
休眠枝接ぎ	交雑実生	交雑	採種	播種	ガラス温室で養成	育苗施設で養成	落葉後の休眠枝を台木に接ぎ木後、育苗施設で養成	選抜圃場に定植
	台木				育苗施設にて畝に挿し木	育苗施設で養成		
緑枝接ぎ	交雑実生	交雑	採種	播種	ガラス温室で養成	育苗施設で養成	台木に接ぎ木後、育苗施設で養成	選抜圃場に定植
	台木				育苗施設にて畝に挿し木	育苗施設で養成		

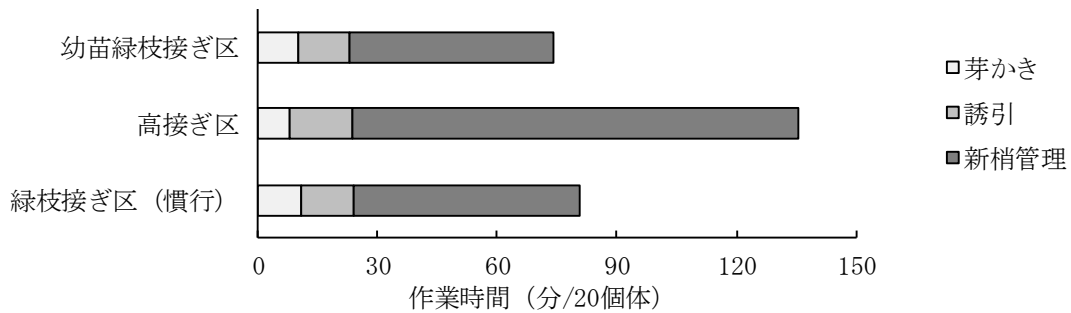
第2表 本試験で用いたプライマー^z

遺伝子名	Haplotype	配列 (5' → 3')	増幅 サイズ(bp)
<i>VvMYBA1a</i>	HapA	AGACGCGAGGTAACAACAACAC GAGACCAGCTCCTTCTCTAA	181
<i>VIMYBA2</i>	HapE2	GCTGAGCATGCTCAAATGGAT TCCCACCATATGATGTCACCC	161

^z Azumaら (2020)第3表 接ぎ木方法が活着率および結実に与える影響(2021～2023)^z

試験区	活着率	交雑から初結実 までの期間	交雑から4年目 の結実率
幼苗緑枝接ぎ区	81 %	4 年	15 %
高接ぎ区	76 %	4 年	4 %
休眠枝接ぎ区	63 %	5 年	0 %
緑枝接ぎ区 (慣行)	88 %	5 年	0 %

^z 幼苗緑枝接ぎ区 n=140, 高接ぎ区 n=117, 休眠枝接ぎ区 n=104, 緑枝接ぎ法 n=194



第2図 年間の管理作業時間の比較 (2023)^z

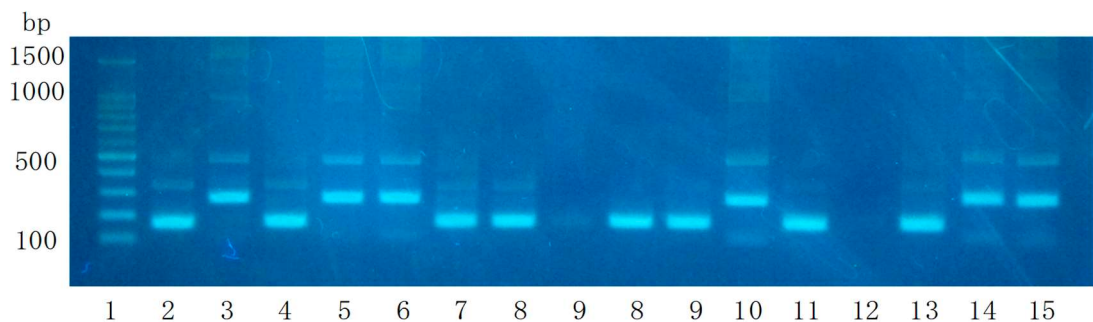
^z 作業回数：9回/年（4～9月）

第4表 検定に用いる子葉の重量と遺伝子診断の結果

葉の重量 (mg)	10	20	40	70
葉面積 (cm ²)	0.5	1.1	2.3	4.2
遺伝子診断 ^z	×	○	○	○

^z DNA濃度の測定とPCR後の電気泳動結果で判定

○：診断可能、×：診断不可



第3図 ハプロタイプHapE2の電気泳動結果

レーン1; 100bp DNA Ladder Marker

レーン2; ポジティブコントロール (HapE2を有する既存品種)

レーン3-15; 交雑実生

引用文献

- 1) 山梨県 (2018). 平成 30 年度山梨県農業及び水産業生産額実績.
- 2) 山梨県 (2023). 令和 5 年度山梨県農業及び水産業生産額実績.
- 3) 内藤一考・小林和司・雨宮秀仁・塩谷諭史・山下浩輝・両角斉彦 (2019). 大粒で食味良好な赤色のブドウ新品種「甲斐ベリー 7」の開発. 山梨県果樹試験場成果情報.
- 4) 長野県果樹試験場 (2017). ぶどう品種「ブドウ長果 11」の育成. 技術情報.
- 5) 坂本太智・板倉考夫・内田吉紀・安田雄治・持田圭介・中谷美里・梅野康行・姫宮雅美・杉山万里 (2020). ブドウ新品種「神紅」の育成とその特性. 島根農技研報 47:29-38.
- 6) 猪崎政敏・丸橋亘 (1989). 果樹繁殖法. P. 71-75
- 7) Azuma, A., A. Kono and A. Sato (2020). Simple DNA marker system reveals genetic diversity of MYB genotypes that determine skin color in grape genetic resources. Tree Genetics and Genomes. 1

