

アズキの品質と収量に關与する  
量的形質遺伝子座の特定

令和 5 年

(2023)

帯広畜産大学大学院畜産学研究科

畜産科学専攻博士後期課程

長岡 寛知

Identification of quantitative trait loci controlling  
seed quality and yield-related traits  
in adzuki bean (*Vigna angularis*)

2023

Hirokazu NAGAOKA

Doctoral Program of Animal Science and Agriculture  
Graduate School of Animal and Veterinary Sciences and Agriculture  
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

# 目 次

第1章 緒 論	1
1-1 本 研 究 の 背 景	1
1-2 「エリモショウズ」と「しゅまり」の 交配組合せから選抜された「紫さやか」の特性	3
1-3 本 研 究 の 目 的	4
第2章 「紫さやか」のゲノム解析とDNA マーカーの開発	8
2-1 緒 言	8
2-2 材 料 と 方 法	9
2-3 結 果	1 3
2-4 考 察	2 2
第3章 アン色に関与する量的形質遺伝子座の検出	5 4
3-1 緒 言	5 4
3-2 材 料 と 方 法	5 6
3-3 結 果	5 8
3-4 考 察	6 3
第4章 収量関連形質と機械化栽培適性に関与する 胚軸長の量的形質遺伝子座の解析	8 1
4-1 緒 言	8 1
4-2 材 料 と 方 法	8 3
4-3 結 果	8 4
4-4 考 察	8 9

第5章 総合考察	1 1 4
5－1 本研究で特定した QTL のゲノムポジション	1 1 4
5－2 MAS 法に利用できる DNA マーカーの開発	1 1 6
5－3 今後への展開	1 1 7
Summary	1 2 0
謝 辞	1 2 4
引用文献	1 2 6

# 第1章 緒 論

## 1-1 本研究の背景

### 1-1-1 アズキの生産

アズキ (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi) は、日本をはじめ、中国、韓国、台湾などの東アジア諸国で古くから栽培されてきた重要な作物である (Lumpkin and McClary 1994)。日本では、60%の自給率を維持しており、国内のマメ科として、ダイズに次ぐ生産量となっている。栽培面積は、2015年以降、おおよそ25,000ha前後で推移している (農林水産省 2022)。このうち、北海道の栽培面積は、20,000ha前後と国内の80%を占め、その収穫量は全国の約90%を占めている (農林水産省 2022)。

北海道における基幹品種「エリモシヨウズ」(村田ら 1985) は、1981年に北海道立十勝農業試験場 (現北海道立総合研究機構農業研究本部十勝農業試験場) で育成された品種である。当該品種の全道作付面積は、1995年には約30,000haとなり、全道のアズキ作付面積の87%を占めた (北海道農政部 2022)。当該品種は、耐冷性が強く、多収性で広域適応性を有することに加えて、アンの風味と色が良く、煮熟性が高いなど加工適性が優れることも評価されて、日本の市場に受け入れられた。しかし、「エリモシヨウズ」は、重要病害の一つであるアズキ落葉病菌 (*Cadophora gregata* f. sp. *adzukicola*) によって引き起こされる「落葉病」に感受性で、落葉病の発生年には大きく減収するリスクがある。落葉病は、1970年代にアズキの過作が要因で主産地の十勝地方で大発生し、多発年には罹病率が全道のアズキ栽培面積の50%前後まで達した。また、その被害は甚大で、生

育初期の罹病が原因で 50%以上の減収となった（藤田 2007）．現在では、落葉病害抵抗性品種「きたろまん」と「エリモ 167」などの導入と長期輪作の励行により（青山ら 2009，佐藤・堀内 2017），北海道における罹病率は 5 %程度まで減少している．このような状況におかれて「エリモショウズ」は，最近では全道のアズキ栽培面積の 33%まで減少している（北海道農政部 2022）．そのために，「エリモショウズ」の供給量はその需要を満たしていない．

2000 年に十勝農業試験場で育成された品種「しゅまり」は，落葉病に加えて，茎疫病菌（*Phytophthora vignae* f. sp. *adzukicola*）による茎疫病と萎凋病菌（*Fusarium oxysporum* f. sp. *adzukicola*）による萎凋病への抵抗性が強く，アンの風味と加工適性は「エリモショウズ」並であるが，アン色が実需者から，「エリモショウズ」よりも紫色で高い評価を得ている（藤田ら 2002）．一方で，開花時の低温あるいは高温による不稔が発生しやすいために，収量の不安定性が問題となっている．2004 年には，3,500ha（全道作付比率 11%）となったが，この年をピークに，最近では 300ha（全道作付比率 2%）までに減少している（北海道農政部 2022）．

北海道産のアズキの高品質で安定供給のためには，新品種の開発が期待されている．北海道のアズキの新品種が具備すべき形質として，耐冷性，収量性，味や香りなどの風味やアン色，および煮熟性などの加工適性，落葉病の抵抗性が挙げられる．収量の安定化のためには，「エリモショウズ」並の収量性と耐冷性が求められている．さらに気候変動の影響で，近年，高温登熟条件により子実が小粒化し，粒大の製品基準（4.5 mm以上）を満たさない粒選別屑の多発が問題となっている（長岡ら 2020）．このリスクを軽減するためには，平年時に粒径が 4.5 mm～5.5 mmで，かつ百粒重が 14g

～16g の範囲に収まる粒大の品種が求められている(長岡 未発表). また, 現在の農業生産者の人口は減少傾向となり人手不足であることから, 栽培体系は省力化が望まれており, 機械化栽培適性の向上も欠かせない(長岡ら 2018).

## 1-2 「エリモショウズ」と「しゅまり」の交配組合せから選抜された「紫さやか」の特性

アズキ品種「紫さやか」は, 「エリモショウズ」と「しゅまり」の交雑後代から選抜された落葉病抵抗性、耐冷性, 大粒かつアン色が紫色で加工適性が高く, さらに機械化栽培適性が高いなどの特性を有する(長岡ら 2020).

「紫さやか」の落葉病抵抗性は, 現地選抜圃での耐病性検定とレース 1 と 3 の抵抗性の DNA マーカーPg118 を用いた抵抗性遺伝子 *Pga1* の判定(Suzuki *et al.* 2013) により確認されている(長岡ら 2020). また, 「紫さやか」の耐冷性は, 標準栽培圃場における子実収量に対する耐冷性現地選抜圃場における子実収量の比で, 90%と対照品種の「エリモショウズ」の 92%(3ケ年の平均)と同等の耐冷性“中”である(長岡ら 2020).

「紫さやか」の百粒重(3ケ年の平均)は, 15.2g で, 「エリモショウズ」(13.3g) の 1.14 倍, 「しゅまり」(14.2g) の 1.07 倍である. 「紫さやか」の粒アン色の特徴である色相角(h)は 20.0 で, 対照品種の「しゅまり」(20.0)と同等の紫色と評価された(長岡ら 2020). さらに, 味と香りや煮熟性などの加工適性は, 「エリモショウズ」並である(長岡ら 2020). さらに, 「紫さやか」の倒伏耐性は, 3ケ年の試験栽培で「エリモショウズ」と「しゅまり」より強いことが示されている(長岡ら 2020). 一方で,

収穫時の機械化適性に影響する最下着莢節位高と関わる胚軸長は（島田 2009），3ケ年の試験栽培で「紫さやか」では 6.3 cm となり，「エリモシヨウズ」（2.7 cm）と「しゅまり」（5.1 cm）より長いことが示されている（長岡ら 2020）．しかし，「紫さやか」の品質と収量性あるいは胚軸長に関する遺伝的制御機構は不明である．

### 1-3 本研究の目的

#### 1-3-1 アズキの交雑育種に求められる簡便かつ効率的な選抜法の開発

アン色あるいはアン色と関わる種皮色は，日射量，登熟期の気温などの栽培環境によって大きく変動する（浅間・北村 1984，藤田・島田 1991，長岡ら 2004）．そのために，種皮色とアン色については，複数環境での評価が必要とされ，交雑後代の遺伝的に固定した後期世代から，選抜されてきた．さらに，アン色の評価のためには，収穫，乾燥，脱穀，選別，煮熟，製アンに至る各過程で膨大な時間と労力を要する．また，色彩色差計による  $L^*C^*h$  表色系（Hunter 1942, Little 1975）の測定と官能評価試験が必要となる．また，機械化栽培適性に関わる胚軸長，収量に関わる開花始，主茎長，主茎節数，子実重，粒大などの選抜も，生育期間中の気温などの栽培環境によって大きく変動するため（村田 2010，佐藤 2010，沢田ら 2000），複数環境での評価に関わる膨大な時間と労力を必要とされてきた．そのために，交雑後代の初期世代から，アン色や胚軸長をはじめとする量的形質を簡易的に選抜するマーカー支援選抜（Marker assisted selection：MAS）法の開発が望まれている．



これまでにアズキで実用化された MAS 法としては、落葉病抵抗性遺伝子 *Pga1* の選抜マーカーとして PCR 法に基づく Pg118 のみにとどまっている (Suzuki *et al.* 2013). そのため、より広範な農業形質について、初期世代から、高精度で迅速に選抜できる MAS 法の開発が期待されている.

### 1-3-2 アズキのゲノム研究の基盤

MAS 法を収量関連形質と機械化栽培適性、ならびに種皮色とアン色など複数の遺伝子の関与が予想される量的形質に利用するには、それぞれの対象形質に関して量的形質遺伝子座 (Quantitative trait loci: QTL) の解析を実施し、関与する QTL の数や染色体上の座乗位置、それら各形質値への寄与率、対立遺伝子の作用などの遺伝育種学的研究の基礎を解明する必要がある. さらに、これらの形質を制御している遺伝子と密接に連鎖した DNA マーカーの開発が必要となる.

アズキの全ゲノム解読の最初の試みとして、韓国の栽培品種「Gyeongwon」の全ゲノムの 67.5%に相当する 444.4 Mbp が報告された (Kang *et al.* 2015). これに続いて、北海道の栽培品種「しゅまり」の全ゲノムの 95.1%に相当する 522.8 Mbp が報告された (Sakai *et al.* 2015). このゲノム配列に基づいて、30,507 の遺伝子配列を推定し、ほぼ完全なアズキゲノムの解読に成功した (Sakai *et al.* 2015).

アズキの遺伝解析に利用できる DNA マーカーには、196 種の Simple Sequence Repeat (SSR) マーカーが作成された (Han *et al.* 2005). 当該 DNA マーカーを用いて、開花始、草型、粒大、種皮色などに関与する遺伝解析が報告されている. (Aoyama *et al.* 2011, Horiuchi *et al.* 2015, Isemura *et al.* 2007, Kaga *et al.* 2008, Mori *et al.* 2021, Yamamoto

*et al.* 2016). しかし、北海道の品種間では、遺伝的に近縁なためこれらの SSR マーカーの多型検出率が 20%以下と低い (川合ら 2018). そのため、本研究の第 3 章と第 4 章で取り組む、北海道の品種間の組換え自殖系統をマッピング集団に用いた QTL 解析では、マーカーの作出が問題となる. 近年、次世代シーケンサーの登場により、近縁な品種間のゲノム配列を明らかにして、一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism: SNP) や挿入・欠失 (Insertion and Deletion: InDel) などの多型情報をゲノムワイドに短期間で得ることが可能になった. SNP や InDel は、MAS 法で有用形質の選抜において DNA マーカーとして広く使用されている (Rafalski 2002, Riahi *et al.* 2013). アズキにおいても、web 上で公開されている全ゲノム配列データ (Sakai *et al.* 2016) を基に、目的とするゲノム領域に DNA マーカーを新たに作成することも可能となった.

### 1-3-3 本研究の目的と概要

本研究論文は、5 章から構成されている. 第 1 章 (本章) では、アズキ栽培の現状と品種の重要性、ならびにアズキの育種における選抜方法の問題点とその解決のためにゲノム研究基盤の活用法について論じた.

第 2 章では、比較的近縁な北海道のアズキ品種間で利用可能な DNA マーカーの開発を目指し、「紫さやか」と「エリモショウズ」ならびに「しゅまり BT」の全ゲノムを次世代シーケンサーでリシークエンス解析し、DNA マーカーの基盤となる SNP および InDel の検出し、PCR に基づく DNA マーカーを開発した. 第 3 章では、第 2 章で作成した DNA マーカーを用いて、「紫さやか」と「エリモショウズ」間の交雑に由来する組換え自殖系統を北海道十勝地方の気象条件の異なる 2 地点で 2 カ年にわたり試験栽培した. 各

試験区の各系統の種皮色とアン色と関連する煮豆色（未発表）に基づいて、各形質に関わる QTL 解析を行った．続いて，第 4 章では，収量性に関わる開花始，主茎長，主茎節数，分枝数，子実重，着莢数，一莢内粒数，百粒重に加えて機械化栽培適性に関わる胚軸長の QTL 解析を行った．第 5 章では，本研究で得られたアズキの育種対象となる各形質の遺伝的制御機構を整理するとともに，「紫さやか」に集積した有用遺伝子をまとめた．さらに，本研究で明らかにした各形質と連鎖する DNA マーカーについて、マーカー選抜育種への利用の可能性について論じた．

## 第2章 「紫さやか」のゲノム解析と DNA マーカーの開発

### 2-1 緒 言

アズキの DNA マーカーのリソースには、日本在来種 (*V. angularis*) とネパールの野生種 (*V. nepalensis*) 間に開発された 196 種の Simple Sequence Repeat (SSR) マーカーがある (Han *et al.* 2005). これまでに、当該マーカーを用いた連鎖地図に基づいて、重要形質に関わる主働遺伝子と量的形質遺伝子座 (Quantitative trait loci, QTL) がマップされてきた (Aoyama *et al.* 2011, Horiuchi *et al.* 2015, Isemura *et al.* 2007, Kaga *et al.* 2008, Mori *et al.* 2021, Yamamoto *et al.* 2016). しかし、比較的近縁な北海道の品種間では、これらの DNA マーカーの多型頻度は、20%以下と低いことが (川合ら 2018)、第3章と第4章で取り組む「紫さやか」と「エリモショウズ」間の交雑組合せに由来する組換え自殖系統をマッピング集団に用いた QTL 解析では問題となる.

最近になって、近縁な個体間や品種間のゲノム配列を次世代シーケンシング技術で解読して、一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism: SNP) や挿入・欠失 (Insertion and Deletion: InDel) などの多型情報をゲノムワイドに得ることが可能になった. これらの SNP と InDel は、真核生物のゲノムに存在する最も多くの DNA 多型となっている (Galeano *et al.* 2009, Hillier *et al.* 2008, Hyten *et al.* 2010a, 2010b, Lai *et al.* 2010, Salathia *et al.* 2007, Subbaiyan *et al.* 2012, Wang *et al.* 1998). 近年、InDel は DNA マーカーのリソースとして、DNA マーカーの作成が比較的容易で、かつ作成費用が安価なことから、注目されている (Vasemagi *et al.* 2010). さらに、BWA ソフトウェアを用いたゲノムワイドな解析に

より、大量の InDel を迅速に同定することが可能となった (Li and Durbin 2009).

アズキでは「しゅまり」の全ゲノム配列が、リファレンスゲノムとして VIGNA GENOME SERVER (<https://viggs.dna.affrc.go.jp>) に公開されている (Sakai *et al.* 2016). したがって、対象とする品種のリシーケンス解析データを取得できれば、効果的にゲノムワイドな InDel マーカーを作成することが可能となった.

本章では、アズキ品種「紫さやか」とその両親である「エリモショウズ」と「しゅまり BT」の全ゲノムリシーケンス解析を行い、InDel と SNP の変異解析に基づいた DNA マーカーの開発を目的とした.

## 2-2 材料と方法

### 2-2-1 植物材料

アズキ品種「しゅまり BT」(仮称), 「エリモショウズ」, 「紫さやか」を供試した. 「しゅまり BT」と「エリモショウズ」は、北海道立総合研究機構中央農業試験場遺伝資源部(北海道滝川市)から提供された原原種栽培を経て、2005 年に十勝農業協同組合連合会(北海道帯広市)の原種から提供された「しゅまり」と「エリモショウズ」に由来する. 本研究では、十勝農業協同組合連合会から両品種の種子を分譲いただいた後に自家採種で種子を維持し、「しゅまり BT」は 2020 年度, 「エリモショウズ」は 2017 年度にそれぞれ採種した種子を供試した. 「紫さやか」は 2017 年度に採種した種子を供試した.

### 2-2-2 DNA の抽出

2018 年 5 月に「エリモショウズ」と「紫さやか」の幼植物体 10 個体、2021 年 10 月に「しゅまり BT」は 3 個体から、それぞれ等量の幼葉をサンプリングしバルク化した。「紫さやか」と「エリモショウズ」は DNeasy Plant Maxi Kit (キアゲン社), 「しゅまり BT」は ISOSPIN Plant DNA (ニッポン・ジーン社) を用いて、各キットに示されたプロトコルに従い、DNA を抽出した。

### 2-2-3 ライブラリーの作成とシーケンス

抽出した DNA は、Library Prep Kit (NEBNext 社) を用いて、配列ライブラリーに調整した。配列ライブラリーを用いて、Illumina HiSeq システム (イルミナ社) によって、リード長 150 bp のペアエンドシーケンスを行った。なお、次世代シーケンスとアノテーション解析は、フィルジェン株式会社 (愛知県名古屋市) に委託した。

### 2-2-4 SNP と InDel の検出とアノテーション解析

得られた 3 品種の塩基配列データについて、BWA 0.7.09 ソフトウェア (Li and Durbin 2009) を用いてリファレンス配列 (Vigna Genome Server, VIGGS ; <https://viggs.dna.affrc.go.jp/>, Sakai *et al.* 2016) にマッピングした。次に、得られたリシーケンスデータについて、GATK 4.1.4.1 ソフトウェア (McKenna *et al.* 2010) を用いてリファレンス配列との間の変異箇所を検出し、SAMtools software 0.1.19 ソフトウェア (Li *et al.* 2009) を用いて SNP と InDel を検出した。得られた SNP と InDel をフィルタリング処理によって、Depth (DP) < 30, Mapping Quality (MQ) < 40,

Quality by Depth (QD) < 5, Genotype (GT) のヘテロ箇所を除去した.

フィルタリング処理で得られた SNP と InDel について, ANNOVAR (Wang *et al.* 2010) を用いて, アノテーション解析し, 遺伝子間領域 (インタージェニック), 上流配列 (遺伝子の 1 kb 上流に位置する SNP と InDel), 下流配列 (遺伝子の 1 kb 下流に位置する SNP と InDel), 非翻訳領域 (Untranslated region: UTR), イントロン, コーディング領域 (Coding sequence: CDS) に類別した. 続いて, CDS 内の変異については, 非同義置換, フレームシフト, エキソン内に終止コドンの生じた変異あるいはストップコドンの消失等に類別した.

## 2-2-5 PCR ベースの DNA マーカーの開発

### 2-2-5-1 DNA の抽出

「しゅまり BT」, 「エリモショウズ」, 「紫さやか」を供試した. 各品種 3 個体の幼葉をバルク化して, 臭化セチルトリメチルアンモニウム (Cetyltrimethylammonium bromide: CTAB) 法 (Murray and Thompson 1980) を用いて, DNA を抽出した.

### 2-2-5-2 InDel マーカーの開発

「紫さやか」と「エリモショウズ」間に特定された 4 bp 以上の InDel を選択した. 対象 InDel 含む配列を増幅するプライマーを, Primer3 Plus ソフトウェア (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) を用いて, アニーリング温度を 50~65°C (通常温度, 60°C), 増幅産物長を 100bp から 450bp となるよう設計した.

### 2-2-5-3 CAPS マーカーと dCAPS マーカーの開発

InDel マーカー間のギャップ内の SNP を対象として, CAPS マーカーと dCAPS マーカーをソフトウェアプログラム dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/>, Neff *et al.* 2002)を用いて, 作成した. 続いて, 対象 SNP に隣接する適切な PCR プライマーはソフトウェア Primer3Plus を用いて設計した.

### 2-2-5-4 PCR 反応と制限酵素処理

InDel マーカーならびに CAPS と dCAPS マーカーの PCR 反応液の組成は, 2  $\mu$  L の DNA, 5  $\mu$  L の GoTaq® Master Mix (プロメガ社), それぞれ 0.5  $\mu$  L のフォワードプライマーとリバースプライマー (10 pmol), 2  $\mu$  L の滅菌水を含む合計 10  $\mu$  L の反応液で行った.

増幅条件は, 94°C で 2 分間の処理の後に, 94°C で 30 秒間の熱変性, 表 2-3 と表 2-4 に示したアニーリング温度で 30 秒間のアニーリング, 72°C で 30 秒間の伸長反応を 35 サイクルした後, 72°C で 5 分間の最終処理をした. 制限酵素処理は酵素メーカーの推奨に従った.

### 2-2-5-5 電気泳動

InDel のサイズが 10bp 以上のマーカーについては, 3 %アガロースゲル, 4 bp から 9 bp のマーカーについては, 6 %アクリルアミドゲル, CAPS と dCAPS マーカーについては, 2 %アガロースゲルを用いて電気泳動した. 電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色し, UV イルミネーター上で観察した.



## 2-3 結 果

### 2-3-1 リシーケンス解析

3 品種のリシーケンスデータの概要を表 2-1 に示した。リードペア数は、「しゅまり BT」では 78,691,700,「エリモショウズ」では 88,007,196,「紫さやか」では 95,338,513 となった。フィルタリング処理後のデータ量は, 23.6G (「しゅまり BT」), 26.3G (「エリモショウズ」), 28.5G (「紫さやか」) となった。このうち, 98.1% (「しゅまり BT」), 98.3% (「エリモショウズ」), 98.2% (「紫さやか」) が, リファレンス配列にマップされた。その結果, マッピングリード数は, 155,561,758 (「しゅまり BT」), 172,478,429 (「エリモショウズ」), 186,461,625 (「紫さやか」) となり, 平均デプス (深度) は, それぞれ 36.6 (「しゅまり BT」), 44.0 (「エリモショウズ」), 46.7 (「紫さやか」) となった。リファレンス配列に対する 1×カバレッジ率は, それぞれ 98.9% (「しゅまり BT」), 98.5% (「エリモショウズ」), 98.9% (「紫さやか」), 4×カバレッジ率は, それぞれ 98.2% (「しゅまり BT」), 97.7% (「エリモショウズ」), 98.2% (「紫さやか」) となった。

### 2-3-2 SNP と InDel の検出数と密度

品種間のゲノムワイドな変異解析の結果を表 2-2 に示した。

#### 2-3-2-1 「しゅまり」と「しゅまり BT」間の変異解析

両品種間に, 2,745 SNP と 1,281 InDel を検出した。染色体ごとの SNP 密度は, 第 11 染色体 (Chr11) 以外の 10 本の染色体では, 137.8kb/SNP (Chr7) ~ 215.2 kb/SNP (Chr9) とほぼ一定だった。Chr11 では 462.1kb/SNP

と他の染色体と比較して半分以下の密度となった．いずれの染色体上においても，SNP は偏りなく，ほぼ均一に検出された（図 2－1）．また，染色体ごとの InDel 密度は，302.1 kb/InDel (Chr8) ～447.1 kb/InDel (Chr9) とほぼ一定で SNP の約半分の密度となった．SNP と同様に，Chr11 では，1560.8 kb/InDel となり，他の染色体の 3 分の 1 以下の密度となった．SNP と同様に，いずれの染色体上においても，InDel は偏りなく，ほぼ均一に検出された（図 2－2）．

## 2－3－2－2 「しゅまり BT」と「エリモショウズ」間の変異解析

両品種間に，66,169 SNP と 18,030 InDel を検出した（表 2－2）．染色体ごとの SNP 密度は，208.9 kb/SNP (Chr6) ～2.7 kb/SNP (Chr9) と染色体によって 80 倍近く差異があった．10 SNP/100kb 以上の検出された高密度領域として，Chr1 (4.2～9.3Mb, 11.2～12.6Mb, 12.8～15.5Mb, 31.5～42.5Mb, 46.9～51.2Mb, 60.0～62.1Mb)，Chr3 (0.1～3.4Mb, 4.1～6.5Mb, 12.8～13.9Mb, 14.1～31.5Mb, 32.1～38.2Mb, 41.9～43.5Mb)，Chr4 (1.3～3.4Mb, 3.6～10.4Mb, 52.7～54.1Mb)，Chr7 (31.6～32.3Mb)，Chr8 (5.6～9.3Mb, 41.3～47.0Mb)，Chr9 (5.9～9.1Mb, 9.3～23.8Mb, 24.0～26.0Mb, 27.1～37.4Mb)，Chr10 (3.6～6.9Mb, 23.8～24.8Mb, 25.0～27.3Mb, 27.5～28.9Mb)，Chr11 (0.1～7.3Mb, 35.0～36.7Mb) の計 28 領域が見出された（図 2－3）．

一方，染色体ごとの InDel 密度は，131.7kb/InDel (Chr6) ～7.6 kb/InDel (Chr9) と染色体によって 15 倍近く差異があった．InDel の高密度領域（10 InDel/100kb 以上）は，Chr1 (4.2～9.3b, 46.9～51.2Mb, 60.0～63.2Mb)，Chr3 (0.1～3.4Mb, 23.9～31.5Mb, 32.1～34.5Mb)，Chr9 (6.3～25.9Mb, 27.1～37.4Mb)，Chr10 (26.7～28.9Mb)，Chr11 (34.9～36.7Mb)

の計 10 領域が見出された (図 2-4). これら InDel 高密度領域は, SNP の高密度領域のうちの 10 領域と一致した.

#### 2-3-2-3 「しゅまり BT」と「紫さやか」間の変異解析

「紫さやか」と「しゅまり BT」間には, 29,394 SNP と 9,109 InDel を特定した (表 2-2). 染色体ごとの SNP 密度は, 658.5kb/SNP (Chr3) ~ 1.5 kb/SNP (Chr9) と染色体によって 439 倍近く差異があった. SNP 高密度領域として, Chr1 (4.2~9.3Mb, 60.0~62.1Mb), Chr4 (52.7~54.1Mb), Chr8 (41.3~47.0Mb), Chr9 (5.9~9.1Mb, 9.3~23.8Mb, 24.0~26.0Mb, 27.1~37.4Mb), Chr10 (3.6~6.9Mb, 23.8~24.8Mb, 25.0~27.3Mb, 27.5~28.9Mb), Chr11 (4.8~7.3Mb) の計 13 領域が見出された (図 2-5).

染色体ごとの InDel 密度は, 233.7kb/InDel (Chr6) ~ 7.6kb/InDel (Chr9) と染色体によって 30 倍近く差異があった. InDel 高密度領域として, Chr1 (4.2~9.3b, 60.0~63.2Mb), Chr9 (6.3~25.9Mb, 27.1~37.4Mb) の 4 領域が見出された (図 2-6). これら InDel 高密度領域は, SNP の高密度領域のうちの 4 領域と一致した.

#### 2-3-2-4 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の変異解析

「紫さやか」と「エリモショウズ」間には, 36,775 SNP と 8,921 InDel を特定した (表 2-2). 染色体ごとの SNP 密度は, 15171.9 kb/SNP (Chr2) ~ 2.7 kb/SNP (Chr3) と染色体によって 5,622 倍近く差異があった. SNP 高密度領域 (10 SNP/100kb 以上) として, Chr1 (11.2~12.6Mb, 12.8~15.5Mb, 31.5~42.5Mb, 46.9~51.2Mb), Chr3 (0.1~3.4Mb, 4.1~6.5Mb, 12.8~13.9Mb, 14.1~31.5Mb, 32.1~38.2Mb, 41.9~43.5Mb), Chr4 (1.3~3.4Mb,

3.6～10.4Mb), Chr7 (31.6～32.3Mb), Chr8 (5.6～9.3Mb), Chr10 (3.6～6.9Mb, 23.8～24.8Mb, 25.0～27.3Mb, 27.5～28.9Mb), Chr11 (0.1～4.7Mb, 35.0～36.7Mb) の計 20 領域が見出された (図 2-7).

染色体ごとの InDel 密度は, 9103.1kb/InDel (Chr2) ～ 12.4 kb/InDel (Chr3) と染色体によって 734 倍近く差異があった. InDel 高密度領域として, Chr1 (46.9～51.2Mb), Chr3 (0.1～3.4Mb, 23.9～31.5Mb, 32.1～34.5Mb), Chr10 (26.7～28.9Mb), Chr11 (34.9～36.7Mb) の計 6 領域が見出された (図 2-8) これら InDel 高密度領域は, SNP 高密度領域のうちの 6 領域と一致した.

### 2-3-3 「紫さやか」に特定された「エリモショウズ」と「しゅまり BT」由来の SNP と InDel のゲノムポジション

「紫さやか」のゲノム配列について, 「しゅまり BT」と「エリモショウズ」由来の SNP と InDel のゲノムポジションを図 2-9 と図 2-10 に示した. 「紫さやか」と「しゅまり BT」間の多型, すなわち, 「エリモショウズ」型 SNP/InDel が, Chr2 (0.1～45.5 Mb), 5 (0.1～37.3 Mb), 6 (0.1～38.8 Mb), および 9 (0.1～37.3 Mb) に検出された. 一方, 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の多型, 即ち, 「しゅまり BT」型 SNP/InDel が, Chr3 (0.1～43.4 Mb), 4 (0.1～10.3 Mb), 10 (0.1～6.8 Mb, 23.7～28.8 Mb) に検出された.

### 2-3-4 「紫さやか」に特定された「エリモショウズ」と「しゅまり BT」由来の InDel の長さと頻度

「紫さやか」の InDel について, 「エリモショウズ」型の挿入と欠失の

数は、それぞれ 4,573 と 4,348 とほぼ同数で合計 8,921 となった。これら InDel のサイズは 1~210 bp となった。InDel の 49% (4,371) は 1 bp の挿入と欠失で、続いて、2~4 bp で 32% (2,855)、そして 5~9 bp で 9% (803)、10bp 以上では 10% (892) となった (図 2-11)。

「しゅまり BT」型では、4,514 の挿入と 4,595 の欠失で合計 9,109 の InDel が検出された。InDel のサイズは 1~253 bp となった。内訳は、1 bp の InDel が 43% (3,917)、2~4 bp が 32% (2,915)、5~9 bp が 9% (820)、10 bp 以上が 15% (1,366) となった。

## 2-3-5 SNP と InDel のアノテーション解析

### 2-3-5-1 「しゅまり」と「しゅまり BT」間の SNP と InDel のアノテーション解析

「しゅまり BT」の全 SNP 3,760 種のうち、遺伝子間領域に 2,970 SNP、イントロンに 495 SNP、上流配列に 226 SNP、下流配列に 198 SNP が検出された (図 2-12.A)。また、5' -非翻訳領域 (5' -UTR) には 83 SNP、3' -非翻訳領域 (3' -UTR) には 69 SNP が検出された。さらに、CDS 内に 143 SNP が検出され、そのうち 57 SNP が同義置換、86 SNP が非同義置換に類別された。

「しゅまり BT」の全 InDel 1,731 種のうち、遺伝子間領域に 1,047 InDel、イントロンに 287 InDel、上流配列に 163 InDel、下流配列に 131 InDel が検出された (図 2-13.A)。また、5' -UTR には 45 InDel、3' -UTR には 22 InDel が検出された。さらに、CDS 内に 36 InDel が検出され、そのうち 31 InDel はフレームシフト、1 InDel がナンセンス変異、2 InDel がス

ストップロス変異となった。

#### 2-3-5-2 「エリモショウズ」と「しゅまり BT」間の SNP と InDel のアノテーション解析

両品種間の全 SNP 75,881 種のうち、遺伝子間領域に 51,760 SNP、イントロンに 8,979 SNP、上流配列に 4,399 SNP、下流配列に 4,158 SNP が検出された（図 2-12.B）。また、5'-UTR には 1,350 SNP、3'-UTR には 1,643 SNP が検出された。さらに、CDS 内に 3,592 SNP が検出され、そのうち 1,357 SNP が同義置換、2,190 SNP が非同義置換、70 SNP がナンセンス変異、30 SNP がストップロス変異となった。

両品種間の全 InDel 21,056 種のうち、遺伝子間領域に 11,791 InDel、イントロンに 2,998 InDel、上流配列に 2,332 InDel、下流配列に 2,891 InDel が検出された（図 2-13.B）。また、5'-UTR には 381 InDel、3'-UTR には 381 InDel が検出された。さらに、CDS 内に 282 InDel が検出され、そのうち 191 InDel はフレームシフト、7 InDel がナンセンス変異、5 InDel がストップロス変異となった。

#### 2-3-5-3 「紫さやか」と「しゅまり BT」間の SNP と InDel のアノテーション解析

両品種間の全 SNP 40,629 種のうち、遺伝子間領域に 26,895 SNP、イントロンに 5,328 SNP、上流配列に 2,125 SNP、下流配列に 2,134 SNP が検出された（図 2-12.C）。また、5'-UTR には 1,018 SNP、3'-UTR には 833 SNP が検出された。さらに、CDS 内に 2,296 SNP が検出され、そのうち 889 SNP が同義置換、1357 SNP が非同義置換、41 SNP がナンセンス変異、19

SNP がストップロス変異となった。

両品種間の全 InDel 11,060 種のうち、遺伝子間領域に 6,099 InDel, イン트ロンに 1,700 InDel, 上流配列に 1,370 InDel, 下流配列に 1,273 InDel が検出された (図 2-13.C)。また、5' -UTR には 255 InDel, 3' -UTR には 234 InDel が検出された。さらに、CDS 内に 129 InDel が検出され、そのうち 72 InDel はフレームシフト, 4 InDel がナンセンス変異, 3 InDel がストップロス変異となった。

#### 2-3-5-4 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の SNP と InDel のアノテーション解析

両品種間の全 SNP 35,252 種のうち、遺伝子間領域に 24,865 SNP, イン트ロンに 3,651 SNP, 上流配列に 2,274 SNP, 下流配列に 2,024 SNP が検出された (図 2-12.D)。また、5' -UTR には 332 SNP, 3' -UTR には 810 SNP が検出された。さらに、CDS 内に 1,296 SNP が検出され、そのうち 413 SNP が同義置換, 833 SNP が非同義置換, 29 SNP がナンセンス変異, 11 SNP がストップロス変異となった。

両品種間の全 InDel 9,996 種のうち、遺伝子間領域に 5,692 InDel, イン트ロンに 1,298 InDel, 上流配列に 962 InDel, 下流配列に 1,618 InDel が検出された (図 2-13.D)。また、5' -UTR には 126 InDel, 3' -UTR には 147 InDel が検出された。さらに、CDS 内に 153 InDel が検出され、そのうち 81 InDel はフレームシフト, 3 InDel がナンセンス変異, 2 InDel がストップロス変異となった。

## 2-3-8 PCR ベースの DNA マーカーの作成

### 2-3-8-1 InDel マーカーの作成

「紫さやか」と「エリモショウズ」間には、10bp 以上の 2,039 InDel が見出された。このうち、約 5 Mbp 間隔で選定した 50 個の InDel について、DNA マーカー化を試みた（表 2-4）。このうち、32 種の InDel マーカーで、両品種間に多型を確認できた（表 2-4、図 2-16）。残りは、増幅産物が、単型となった 12 種、ラダーとなったマーカー 4 種、増幅産物サイズの異なった 1 種、そして増幅されなかった 1 種となった。

次に、10bp 以上の InDel の染色体上のギャップ 10 領域をカバーするため、4 から 9 bp 間の InDel を選定した。このうち、3 種で両品種間に多型を確認した（表 2-4、図 2-17）。残りは、増幅産物が単型となった 5 種、増幅産物サイズの異なった 2 種、そして増幅しなかったマーカー 1 種となった。

### 2-3-8-2 CAPS マーカーと dCAPS マーカー

2-2-8-1 で開発した InDel マーカーのギャップをカバーするために、16 個の SNP をマーカー化するために選定した。このうち、9 個の SNP に基づいて、CAPS マーカーを設計した。その結果、AZ10\_0.8M\_CA で両品種間に多型を確認した（表 2-5、図 2-18）。7 マーカーは、増幅産物は得られたが、予測された制限酵素で切断されなかった 6 マーカーと切断箇所が異なった 1 マーカー、さらに増幅されなかった 1 マーカーとなった。残りの 7 個の SNP に基づいて、dCAPS マーカーを設計した。その結果、AZ02\_40.2M\_DC と AZ04\_22.7M\_DC で両品種間に多型を確認した（表 2-5、



図 2-18). 残り 5 マーカーは, いずれも増幅産物が得られたが, 予測された制限酵素で切断されなかった 4 マーカー, 切断箇所の異なった 1 マーカーとなった.

### 2-3-8-3 DNA マーカーのカバーするゲノム領域

本研究によって開発した 38 個の DNA マーカーが, 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の SNP と InDel の特定されたゲノム領域をカバーしているかを確認するために, 比較地図を図 2-19 に示した. その結果, 38 個の DNA マーカーは, 合計で 219 Mb をカバーし, SNP と InDel の特定されたゲノム領域全域を約 5 Mb 間隔でカバーすることが確認できた.

### 2-3-6 「しゅまり BT」, 「エリモショウズ」, 「紫さやか」に特定された遺伝子の機能的変異のハプロタイプ

「しゅまり」と「しゅまり BT」間で機能的変異が見出された 65 遺伝子のうち, 29 遺伝子が, 「エリモショウズ」と「紫さやか」を加えた 4 品種で「しゅまり BT」特異的な機能的変異遺伝子となった.

「エリモショウズ」と「しゅまり BT」間には, 732 個の機能的に変異した遺伝子が見出された. そして, 「紫さやか」には, 「エリモショウズ」由来の 307 遺伝子と「しゅまり BT」由来の 425 遺伝子が同定された (図 2-14). また, 「エリモショウズ」由来の機能的変異遺伝子の 58%に相当する 178 個の遺伝子が Chr9 に多く分布した (図 2-14). さらに, 遺伝子は Chr9 全域に散在した. 一方, 「しゅまり BT」由来の機能変異遺伝子の 36%に相当する 154 個の遺伝子が Chr3 に分布した (図 2-14). さらに, 遺伝子は Chr3 全域に散在した.

### 2-3-7 落葉病抵抗性遺伝子 *Pga1* の候補遺伝子の解析

アズキ全ゲノム配列 (Sakai *et al.* 2016) には、植物の病害抵抗性遺伝子の 1 種である核酸結合部位 (NBS) とロイシンリッチリピート (LRR) (Kang *et al.* 2012) を有する 43 個の NBS-LRR 遺伝子がコードされていた。このうち、*Pga1* の選抜マーカー Pg118 のプライマー配列 (Suzuki *et al.* 2013) の位置する Chr3 の 1,833,819~1,834,442bp (図 2-15.A) から 958kbp 内には、「Vigan.03G012100.01」, 「Vigan.03G012200.01」, 「Vigan.03G012900.01」, 「Vigan.03G013000.01」, 「Vigan.03G013100.01」の 5 個が直列状にクラスターを形成していた (図 2-15.B・C)。このうち、「Vigan.03G013100.01」 (Chr03:1,002,833~1,003,779) の 172 個のアミノ酸をコードする第 2 エキソン内に抵抗性品種の「しゅまり」, 「しゅまり BT」, 「紫さやか」と感受性品種の「エリモショウズ」間に 15 個の SNP が検出された。これらの SNP によって 10 個のアミノ酸に置換が生じていた (図 2-15.D)。残りの 4 個の NBS-LRR 遺伝子のコード領域には、いずれの品種間にも SNP あるいは InDel は検出されなかった。

## 2-4 考 察

### 2-4-1 「しゅまり BT」のゲノム配列

本研究により、「しゅまり BT」には、「しゅまり」との間に 2,745 個の SNP と 1,281 個の InDel が生じていることが示された。これら変異の合計は、32kb となり、全ゲノムの 0.007% に相当した。SNP と InDel のポジションは、第 11 染色体では、33.2Mb のギャップがあり疎になったが、他の

染色体には、散在した。これらの変異のうち、67 個の SNP と 36 個の InDel が、62 個の遺伝子（0.2%）のアミノ酸配列に変異を生じていた。これら機能的変異の生じていた遺伝子は、すべての染色体に散在していた。さらに、「しゅまり」、「エリモショウズ」、「紫さやか」は共通のアミノ酸配列で、「しゅまり BT」のみ変異が生じていた 29 個の機能遺伝子はすべての染色体に散在していた。これらの遺伝子の機能的変異が、何らかの農業特性に影響するかは今後の課題である。

#### 2-4-2 「紫さやか」に伝達された両親に由来する機能的な変異遺伝子

本研究により、「紫さやか」には、「エリモショウズ」由来の 29,394 個の SNP と 9,109 個の InDel、「しゅまり BT」由来の 36,775 個の SNP と 8,921 個の InDel が伝達されていることが示された。これらのうち、両親間で機能的な変異のある遺伝子として、「エリモショウズ」由来の 307 遺伝子、「しゅまり BT」由来の 425 遺伝子が、それぞれ、「紫さやか」に伝達されていることが判明した。

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*), ならびにイネ (*Oryza sativa* L.) やトウモロコシ (*Zea mays* L.) の Cold Regulated Gene 413 (COR413) 遺伝子は、低温ストレスの耐性を向上させる転写因子のタンパク質ファミリーである (Breton *et al.* 2003, Okawa *et al.* 2008)。また、インゲンマメ (*Phaseolus lunatus*) とソラマメ (*Vicia faba* L.) の COR413 遺伝子が、低温ストレス応答に関与する (Li *et al.* 2015, Lyu *et al.* 2021)。本研究では、「紫さやか」の Similar to cold-regulated 413 inner membrane protein 2, chloroplastic-like isoform X2. [XP\_004504237.1, *Cicer arietinum*] と定義された「Vigan.01G105300.01」が、「エリモショ

ウズ」由来の変異遺伝子であることが示された。今後、当該遺伝子の機能変異が、アズキの冷温感受性に関わるかの検証が必要である。

Chalcone synthase (CHS) は、植物のアントシアニンなどのフラボノイドの生合成酵素遺伝子の一つである (Koes *et al* 1986)。CHS は、フラボノイドの基本骨格の合成となる最初の段階を触媒し、1 分子の p-クマロイル CoA (*p*-coumaroyl-CoA) に 3 分子のマロニル (CoAmalonyl-CoA) を逐次的に縮合させ、カルコンを生成する (Hahlbrock and Scheel 1989, Nakayama *et al.* 2019)。フラボノイドは、花の色素、種皮色、抗生物質、紫外線保護物質、防虫物質など植物で様々な重要な役割を持つ多様な代謝産物である (Hahlbrock and Scheel 1989)。また、CHS は、植物が病原菌に感染したときに植物体内で生合成される防御物質ファイトアレキシンの合成にも関与する (Ryder *et al.* 1987)。アズキゲノム中には、7 個の CHS 遺伝子がコードされており (Sakai *et al.* 2016)、このうち 3 個の CHS 遺伝子「Vigan.01G206200.01」, 「Vigan.10G101300.01」, 「Vigan.10G233700.01」と 2 個の Similar to Uncharacterized protein 遺伝子「Vigan.04G232000.01」, 「Vigan.06G060400.01」の計 5 個の遺伝子の発現量がフラボノイドの合成量と相関する (Chu *et al.* 2021)。さらに、これら 5 遺伝子の発現量は、栽培種の赤アズキと在来種の黒アズキで異なる (Chu *et al.* 2021)。このうち、*VaCHS4* と一致する「Vigan.10G233700.01」(Similar to Chalcone synthase 17. [P49440, *Phaseolus vulgaris*]) のハプロタイプが、「紫さやか」と「しゅまり BT」で一致し、「エリモシヨウズ」とは異なった (図 2-20)。今後、当該遺伝子のアミノ酸配列の違いが、「紫さやか」と「エリモシヨウズ」間、あるいは「しゅまり BT」と「エリモシヨウズ」間のアズキの種皮色に関わる可能性の検証が必要となる。

#### 2-4-3 「紫さやか」の落葉病抵抗性遺伝子 *Pga1* の候補遺伝子は、「Vigan.03G013100.01」である

アズキゲノム中にコードされる 43 個の NBS-LRR 遺伝子のうち、「紫さやか」の両親間に機能的な変異のある遺伝子は、「Vigan. 03G013100. 01」と「Vigan. 11G015800. 01」の 2 遺伝子であった。このうち、「Vigan. 03G013100. 01」は、「しゅまり BT」に由来し、かつ落葉病抵抗性遺伝子 *Pga1* の選抜マーカーPg118 の 0.9 Mb の位置にコードされたことから (Suzuki *et al.* 2013), *Pga1* の原因遺伝子の可能性が高い。

一方、「Vigan. 11G015800. 01」は、「エリモショウズ」に由来した。これまでに、当該遺伝子領域には、病害抵抗性に関する遺伝子座は報告されていない。今後、「エリモショウズ」に由来する当該遺伝子座が、何らかの病害抵抗性に関わるかを解明する必要がある。

#### 2-4-4 219 Mb をカバーする PCR ベースの DNA マーカー38 個の開発

本章によって、第 1 染色体の 41.4 Mb (リファレンスの 61.7%), 第 3 染色体の 40.9 Mb (94.2%), 第 4 染色体の 32.7 Mb (60.6%), 第 7 染色体の 32.6 Mb (97.9%), 第 8 染色体の 11.2 Mb (23.9%), 第 10 染色体の 23.9 Mb (83.0%), 第 11 染色体の 36.3 Mb (95.3%) をそれぞれ開発し、これらの DNA マーカーによって、合計で 219 Mb (46.5%) をカバーすることができた。一方で、第 2 染色体、第 5 染色体、第 6 染色体、第 9 染色体には、マーカーソースとなりうる InDel あるいは SNP がほとんど検出されなかったことから、遺伝的均一性の高いゲノム領域と言えた。これら遺伝的均一性の高いゲノム領域は、育種の過程で重要形質に関して遺伝的に固定した領域か否かについては、検証が必要である。

表 2－1．本研究で解析したアズキ品種「しゅまり BT」と「紫さやか」と「エリモショウズ」の全ゲノムリシークエンスデータの概要

		しゅまりBT	エリモショウズ	紫さやか
リードペア数		78,691,700	88,007,196	95,338,513
データボリューム	(G)	23.6	26.3	28.5
フィルタリング後のリード数		155,561,758	172,478,429	186,461,625
フィルタリング後の塩基数	(bp)	513,037,741	513,874,158	513,351,397
マッピング率	(%)	98.1	98.3	98.2
Q30	(%)	89.8	91.4	93.6
平均デプス（深度）	(倍)	36.6	44.0	46.7
1×カバレッジ率	(%)	98.9	98.5	98.9
4×カバレッジ率	(%)	98.2	97.7	98.2

表 2－2．品種間に特定された SNP と InDel の染色体ごとの数と密度

染色体	しゅまり／しゅまりBT				しゅまりBT／エリモショウズ				しゅまりBT／紫さやか				エリモショウズ／紫さやか			
	SNP		InDel		SNP		InDel		SNP		InDel		SNP		InDel	
1	394	(170.3)	221	(303.3)	3,427	(19.6)	1,771	(37.9)	1,338	(50.2)	882	(76.1)	2,089	(32.1)	889	(75.5)
2	271	(168.1)	127	(359.7)	347	(131.2)	404	(112.7)	344	(132.3)	399	(114.1)	3	(15171.9)	5	(9103.1)
3	294	(147.7)	125	(347.5)	16,210	(2.7)	3,700	(11.7)	66	(658.5)	186	(233.7)	16,144	(2.7)	3,514	(12.4)
4	280	(192.9)	143	(378.6)	8,650	(6.3)	2,145	(25.2)	515	(105.0)	491	(110.1)	8,135	(6.6)	1,654	(32.7)
5	247	(151.5)	115	(323.8)	255	(146.6)	341	(109.6)	250	(149.5)	335	(111.6)	5	(7476.1)	6	(6230.1)
6	227	(171.2)	96	(404.0)	186	(208.9)	295	(131.7)	178	(218.3)	281	(138.3)	8	(4857.6)	14	(2775.8)
7	243	(137.8)	105	(318.8)	980	(34.2)	481	(69.6)	122	(274.6)	349	(96.0)	858	(39.0)	132	(253.8)
8	331	(142.0)	155	(302.1)	1,660	(28.3)	1,053	(44.6)	950	(49.4)	654	(71.8)	710	(66.1)	399	(117.7)
9	174	(215.2)	84	(447.1)	24,831	(1.5)	4,935	(7.6)	24,828	(1.5)	4,921	(7.6)	3	(12462.7)	14	(2670.6)
10	201	(143.4)	85	(339.4)	3,084	(9.4)	1,249	(23.1)	42	(687.8)	191	(151.2)	3,042	(9.5)	1,058	(27.3)
11	82	(462.1)	24	(1560.8)	6,539	(5.8)	1,656	(23.0)	761	(50.1)	420	(90.8)	5,778	(6.6)	1,236	(30.8)
合計	2,745	(171.7)	1,281	(367.9)	66,169	(7.1)	18,030	(26.1)	29,394	(16.0)	9,109	(51.7)	36,775	(10.0)	8,921	(52.8)

括弧内の数値は SNP または InDel の密度 (kb/SNP または kb/InDel) を示す。

表 2－3．本研究で設計した InDel マーカーと PCR 実験の結果

マーカー名	染色体	ポジション (bp)	アニーリング 温度 (°C)	NGSデータに基づいて予測された断片長 (bp)				本研究で得られた断片長 (bp)		
				しゅまりBT	紫さやか	エリモショウス <sup>♂</sup>	差	しゅまりBT	紫さやか	エリモショウス <sup>♂</sup>
AZ01_4.8M_ID	1	4,823,755	60	389	389	337	52	no data	600	600
AZ01_5.2M_ID	1	5,205,983	55	281	281	264	17	no data	300	300
AZ01_9.6M_ID	1	9,634,667	55	298	298	327	-29	298	298	327
AZ01_14.7M_ID	1	14,773,100	60	198	198	179	19	198	198	179
AZ01_31.6M_ID	1	31,691,795	60	264	264	232	32	264	264	232
AZ01_36.9M_ID	1	36,983,665	60	265	265	281	-16	265	265	281
AZ01_41.0M_ID	1	41,063,835	58	257	257	231	26	257	257	231
AZ01_47.4M_ID	1	47,418,656	58	281	281	243	38	281	281	243
AZ01_51.0M_ID	1	51,022,439	55	172	172	184	-12	172	172	184
AZ01_63.3M_ID	1	63,329,557	60	209	209	195	14	no data	220	220
AZ03_1.1M_ID	3	1,143,130	60	184	184	217	-33	184	184	217
AZ03_6.1M_ID	3	6,174,579	60	188	188	220	-32	188	188	220
AZ03_13.2M_ID	3	13,226,137	58	206	206	186	20	206	206	186
AZ03_18.7M_ID	3	18,748,975	55	258	258	248	10	258	258	248
AZ03_24.4M_ID	3	24,428,260	55	189	189	157	32	189	189	157
AZ03_29.9M_ID	3	29,980,244	55	226	226	280	-54	240	240	252
AZ03_34.8M_ID	3	34,800,573	60	244	244	234	10	244	244	234
AZ03_38.0M_ID	3	38,022,362	55	245	245	230	15	245	245	230
AZ03_41.8M_ID	3	41,852,172	60	223	223	187	36	ラダー	ラダー	ラダー
AZ03_42.0M_ID	3	42,078,207	50	234	234	255	-21	234	234	255



表 2 - 3 . 続き 1

マーカー名	染色体	ポジション (bp)	アニーリング 温度 (°C)	NGSデータに基づいて予測された断片長 (bp)				本研究で得られた断片長 (bp)		
				しゅまりBT	紫さやか	エリモショウス <sup>♂</sup>	差	しゅまりBT	紫さやか	エリモショウス <sup>♂</sup>
AZ04_1.8M_ID	4	1,818,476	50	295	295	271	24	295	295	271
AZ04_1.9M_ID	4	1,860,866	55,58,60,62	303	303	368	-65	ラダー	ラダー	ラダー
AZ04_6.9M_ID	4	6,958,599	58	296	296	276	20	296	296	276
AZ04_10.2M_ID	4	10,277,042	60	299	299	281	18	299	299	281
AZ04_30.0M_ID	4	30,094,693	50,55	141	141	149	-8	no data	130	130
AZ04_34.5M_ID	4	34,578,939	60	197	197	201	-4	no data	197	201
AZ05_2.5M_ID	5	2,546,347	60	132	132	128	4	no data	132	128
AZ06_2.2M_ID	6	2,292,974	55,58,60,62	195	195	199	-4	no data	190	190
AZ06_17.7M_ID	6	17,768,935	50,55	177	177	191	-14	no data	240	240
AZ06_26.0M_ID	6	26,061,439	50,55	177	177	191	-14	no data	240	240
AZ06_33.9M_ID	6	33,966,084	50,55,60	273	273	284	-11	no data	270	270
AZ06_35.6M_ID	6	35,659,844	55,58,60,62	187	187	181	6	no data	190	190
AZ07_0.4M_ID	7	408,517	55	128	128	152	-24	no data	128	152
AZ07_26.7M_ID	7	26,715,137	55,60	188	188	192	-4	no data	190	190
AZ07_31.7M_ID	7	31,789,798	60	233	233	219	14	233	233	219
AZ07_33.1M_ID	7	33,186,518	60	199	199	195	4	no data	199	195
AZ08_6.0M_ID	8	6,082,416	60	275	275	321	-46	275	275	321
AZ08_11.1M_ID	8	11,096,714	58	233	233	201	32	233	233	201
AZ08_17.2M_ID	8	17,197,446	55	246	246	234	12	246	246	234
AZ08_35.5M_ID	8	35,533,183	55	110	110	116	-6	no data	120	120

表 2 - 3 . 続き 2

マーカー名	染色体	ポジション (bp)	アニーリング 温度 (°C)	NGSデータに基づいて予測された断片長 (bp)				本研究で得られた断片長 (bp)		
				しゅまりBT	紫さやか	エリモショウス <sup>6</sup>	差	しゅまりBT	紫さやか	エリモショウス <sup>6</sup>
AZ09_0.8M_ID	9	853,974	60	183	183	177	6	no data	350	350
AZ09_11.1M_ID	9	11,191,034	60	232	232	250	-18	no data	230	230
AZ09_12.6M_ID	9	12,617,757	60	297	297	313	-16	no data	310	310
AZ09_14.6M_ID	9	14,671,303	60	344	344	322	22	no data	340	340
AZ09_24.5M_ID	9	24,591,731	55,60	156	156	146	10	ラダー	ラダー	ラダー
AZ09_27.2M_ID	9	27,260,753	60	471	471	319	152	no data	470	470
AZ09_32.4M_ID	9	32,484,894	60	132	132	154	-22	no data	130	130
AZ09_34.0M_ID	9	34,028,886	60	138	138	146	-8	no data	140	140
AZ10_4.6M_ID	10	4,698,107	65	349	349	415	-66	no data	349	415
AZ10_5.3M_ID	10	5,309,293	55,60	320	320	294	26	ラダー	ラダー	ラダー
AZ10_6.8M_ID	10	6,859,696	60	337	337	318	19	no data	350	350
AZ10_23.8M_ID	10	23,809,892	55	295	295	273	22	295	295	273
AZ10_28.5M_ID	10	28,576,003	60	225	225	197	28	225	225	197
AZ11_0.2M_ID	11	266,108	65	291	291	270	21	no data	291	291
AZ11_0.3M_ID	11	371,552	60	326	326	360	-34	no data	326	326
AZ11_4.5M_ID	11	4,514,909	60	344	344	322	22	no data	344	322
AZ11_5.4M_ID	11	5,433,556	60	254	254	284	-30	no data	290	290
AZ11_23.6M_ID	11	23,636,709	55,60,63	193	193	180	13	no data	180	180
AZ11_35.4M_ID	11	35,405,041	58	262	262	240	22	262	262	262
AZ11_36.5M_ID	11	36,550,315	60	264	264	367	-103	no data	264	367

表 2－4．本研究で設計した CAPS マーカーと dCAPS マーカーおよび PCR 実験の結果

マーカー名	マーカー の種類	染色体	ポジション (bp)	アニーリン グ温度(℃)	制限酵素	増幅産物の 長さ (bp)	NGSデータに基づいて 予測された制限断片長 (bp)			本研究で得られた断片長 (bp)		
							しゅまりBT	紫さやか	エモショウス <sup>o</sup>	しゅまりBT	紫さやか	エモショウス <sup>o</sup>
AZ02_5.5M_DC	dCAPS	2	5,538,013	50	<i>Hpa</i> II	136	136	136	111+25	136	136	136
AZ02_40.2M_DC	dCAPS	2	40,235,279	50	<i>Taq</i> I	131	106+25	106+25	131	106+25	106+25	131
AZ04_15.2M_CA	CAPS	4	15,220,343	50,55,60,62	<i>Ssp</i> I	319	319	319	179+140	無し	無し	無し
AZ04_22.7M_DC	dCAPS	4	22,760,818	55	<i>Taq</i> I	102	77+25	77+25	102	77+25	77+25	102
AZ04_31.5M_CA	CAPS	4	31,570,194	60	<i>Sac</i> II	647	647	647	380+297	647	647	647
AZ04_43.0M_CA	CAPS	4	43,039,859	60	<i>EcoR</i> I	627	627	627	474+153	627	627	627
AZ04_53.0M_CA	CAPS	4	54,015,000	60	<i>Hind</i> III	588	588	588	325+263	588	588	588
AZ10_0.8M_CA	CAPS	5	9,289,021	60	<i>Hha</i> I	516	516	516	316+200	516	516	516
AZ06_11.3M_DC	dCAPS	6	11,345,524	55,60	<i>BamH</i> I	111	111	111	86+25	110	110	110
AZ06_29.5M_DC	dCAPS	6	29,540,384	60	<i>Taq</i> I	126	101+25	101+25	126	126	126	126
AZ06_34.4M_DC	dCAPS	6	34,446,086	55	<i>Dpn</i> I	125	125	125	100+25	125	125	125
AZ07_17.5M_CA	CAPS	7	17,584,600	60	<i>Dpn</i> I	598	598	598	312+286	598	598	598
AZ08_24.4M_CA	CAPS	8	24,490,610	60	<i>Hinc</i> II	796	796	796	495+301	796	796	796
AZ10_0.8M_CA	CAPS	10	845,356	60	<i>Hinf</i> I	622	408+214	408+214	622	408+214	408+214	622
AZ11_0.2M_CA	CAPS	11	247,312	55	<i>Taq</i> I	878	878	878	467+411	800	800	800+401
AZ11_25.4M_DC	dCAPS	11	25,485,294	55	<i>EcoR</i> V	106	81+25	81+25	106	106	106	106

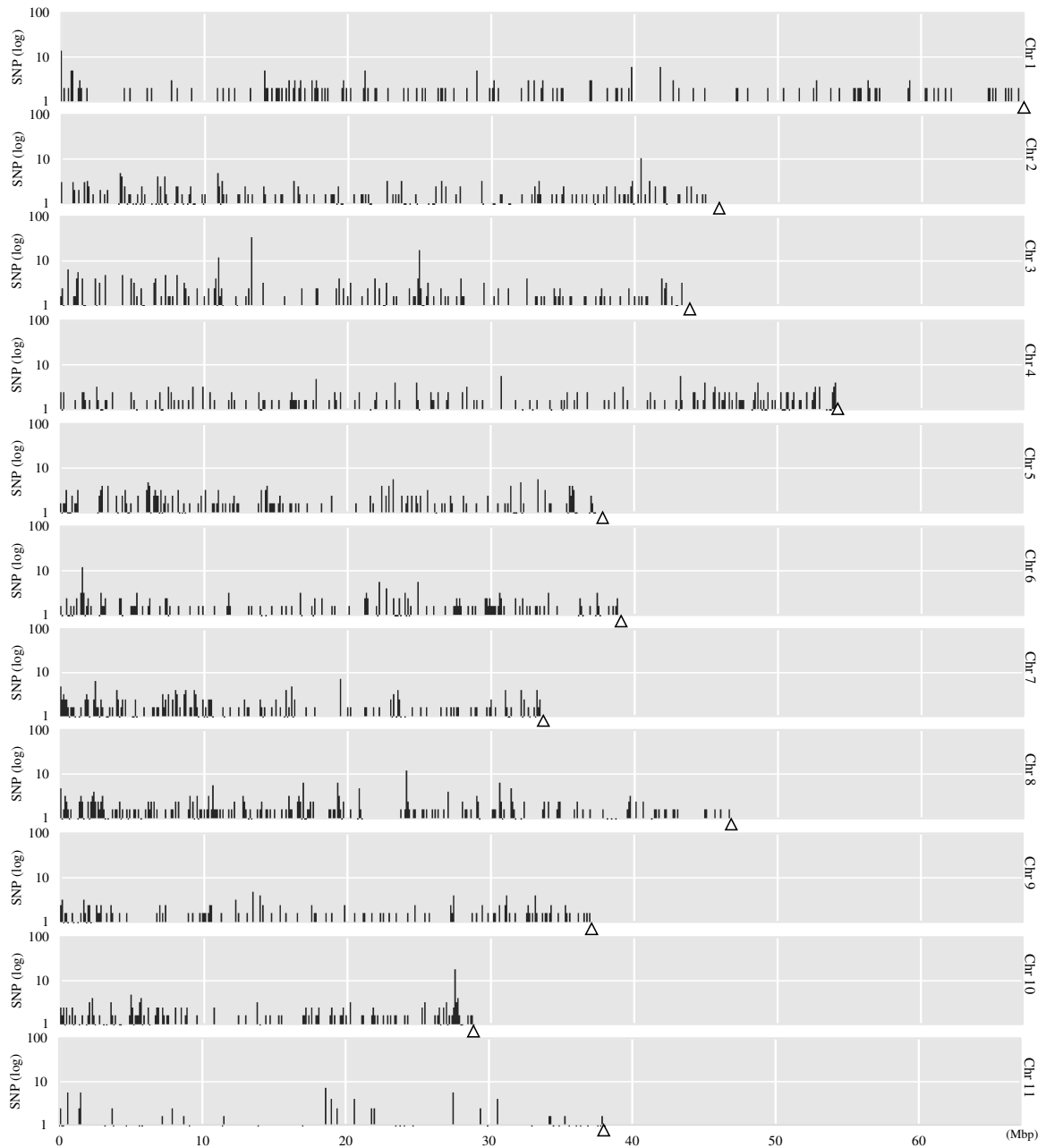


図 2-1. 「しゅまり」と「しゅまり BT」の全染色体における SNP の分布と密度.

各染色体について 100kb のウィンドウごとの SNP の数を示した.

三角は染色体の終わりを示した.

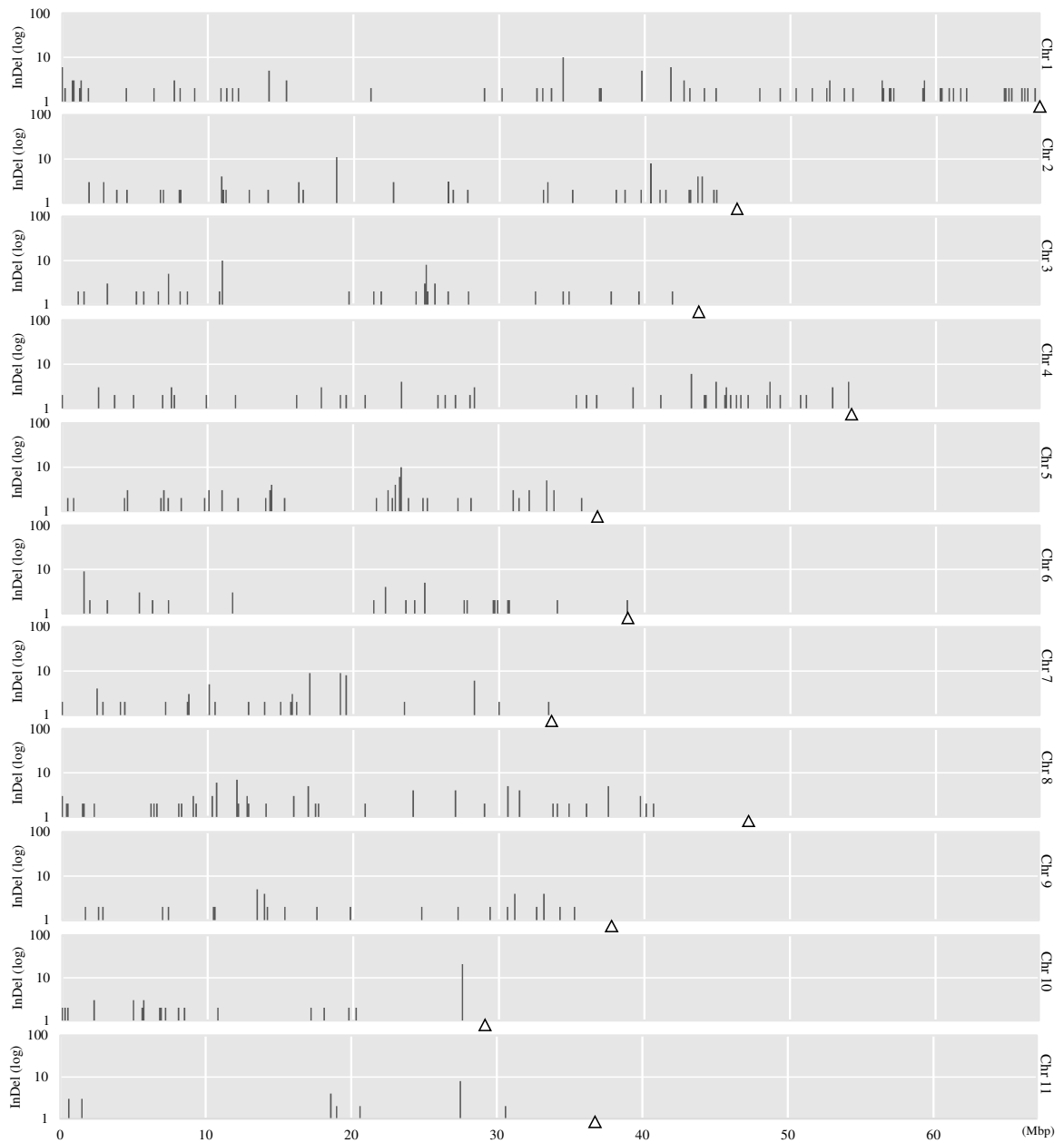


図 2-2. 「しゅまり」と「しゅまり BT」の全染色体における InDel の分布と密度.

各染色体について 100kb のウィンドウごとの InDel の数を示した.

三角は染色体の終わりを示した.

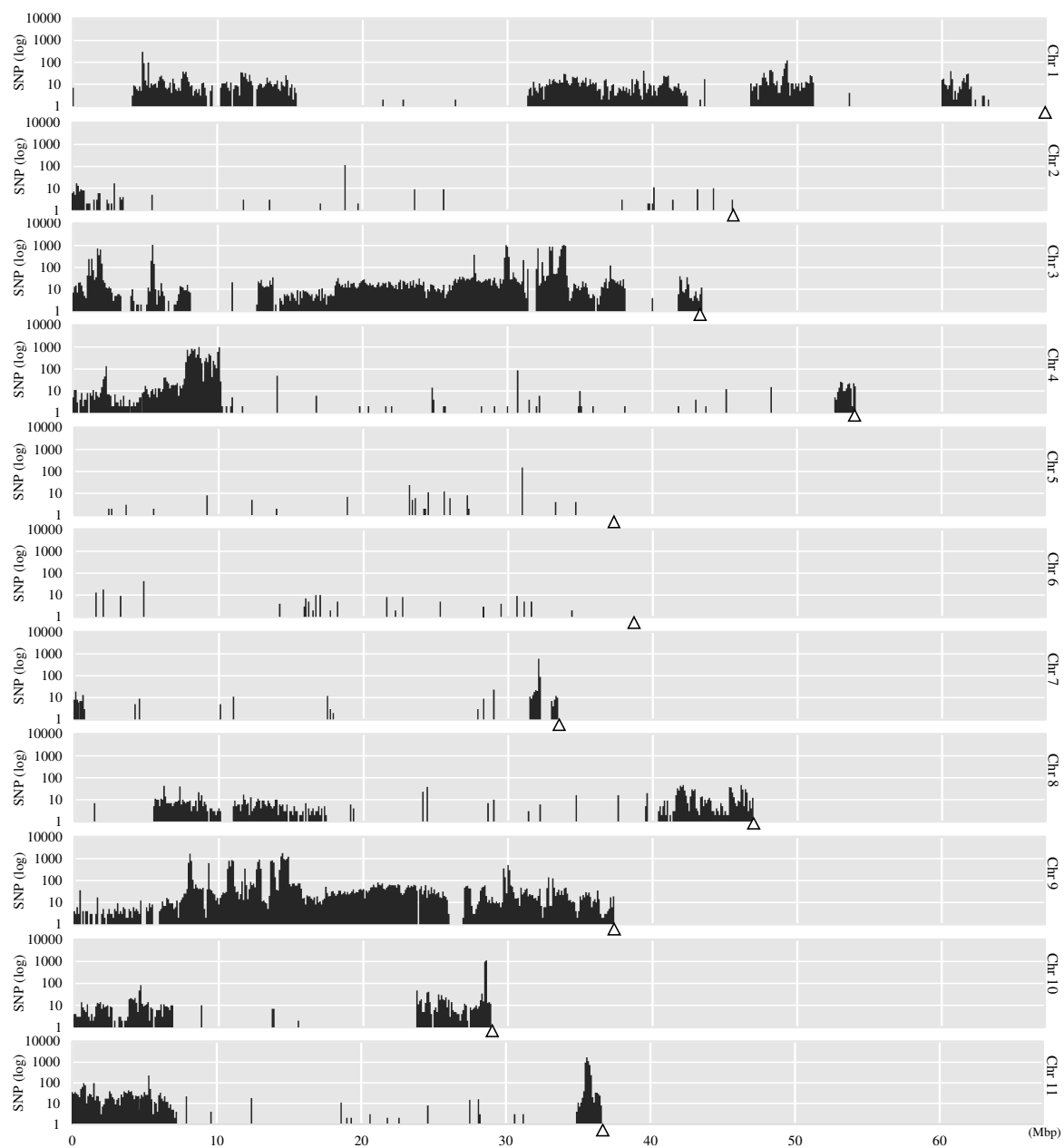


図 2 - 3 . 「しゅまり BT」と「エリモショウズ」の全染色体における SNP の分布と密度.  
各染色体について 100kb のウィンドウごとの SNP の数を示した.  
三角は染色体の終わりを示した.

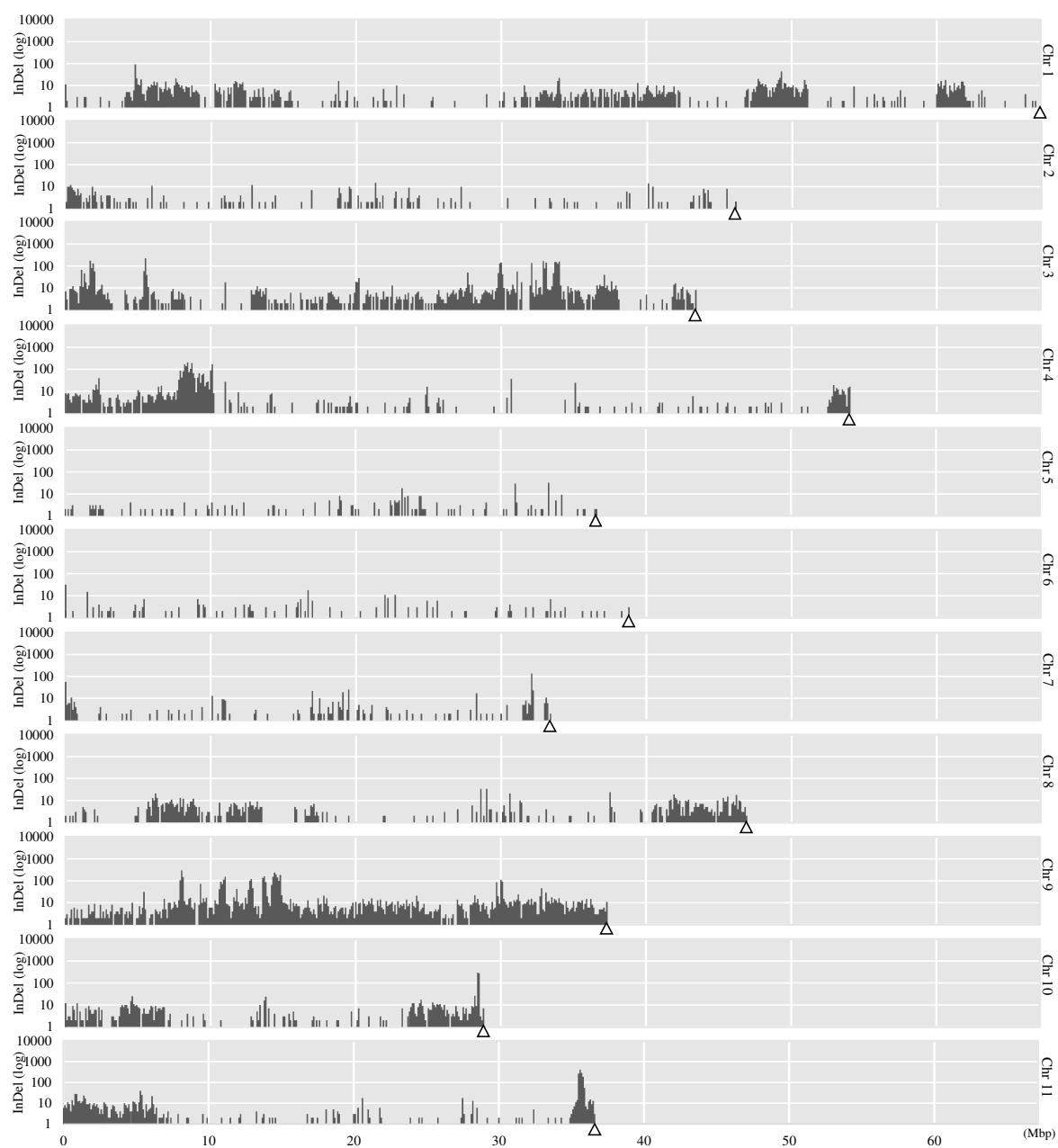


図 2-4. 「しゅまり BT」と「エリモショウズ」の全染色体における InDel の分布と密度.

各染色体について 100kb のウィンドウごとの InDel の数を示した.

三角は染色体の終わりを示した.

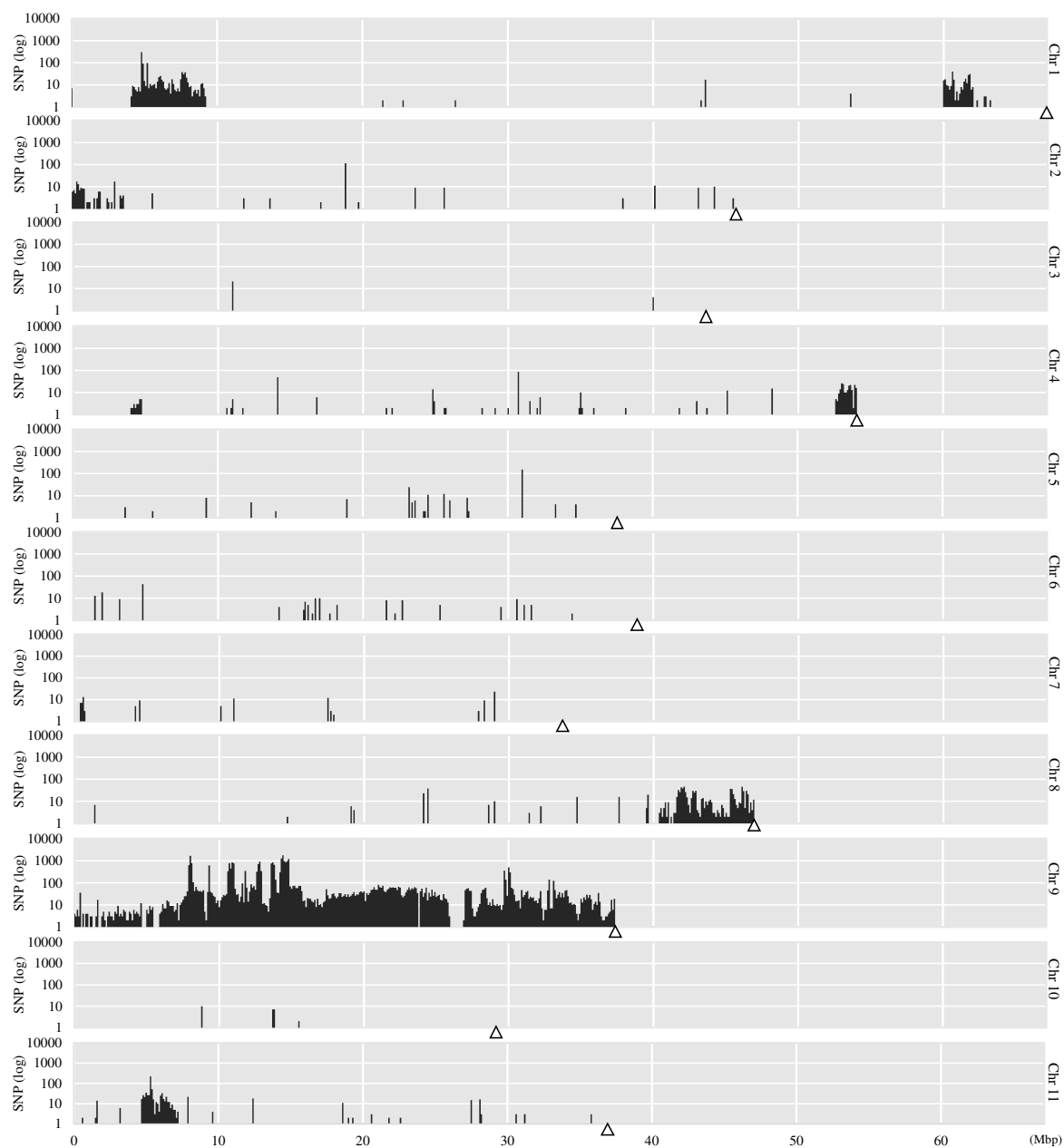


図 2 - 5. 「紫さやか」と「しゅまり BT」の全染色体における SNP の分布と密度。  
各染色体について 100kb のウィンドウごとの SNP の数を示した。  
三角は染色体の終わりを示した。



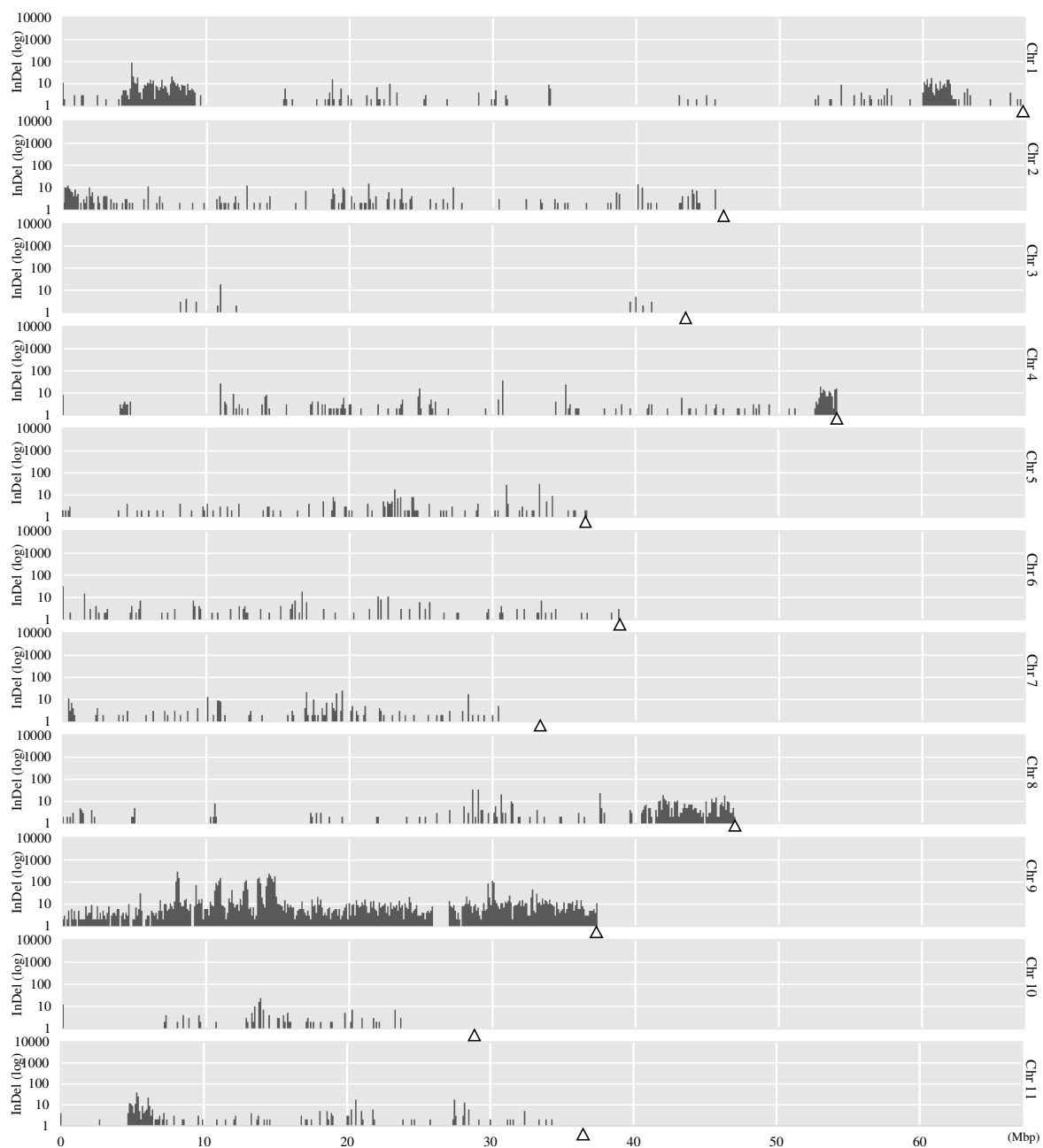


図 2-6.「紫さやか」と「しゅまり BT」の全染色体における InDel の分布と密度。  
各染色体について 100kb のウィンドウごとの InDel の数を示した。  
三角は染色体の終わりを示した。

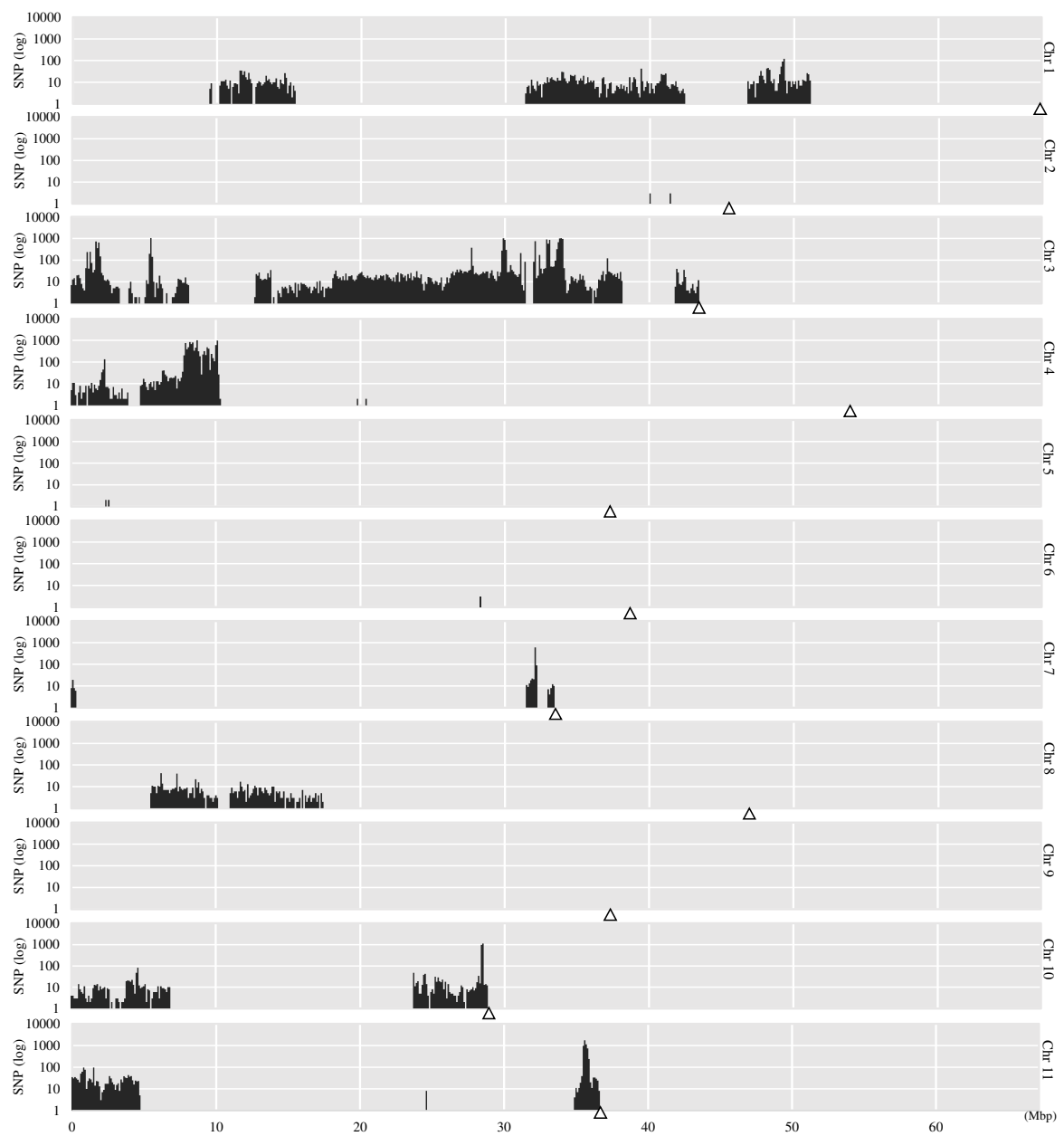


図 2-7. 「紫さやか」と「エリモショウズ」の全染色体における SNP の分布と密度。  
各染色体について 100kb のウィンドウごとの SNP の数を示した。  
三角は染色体の終わりを示した。

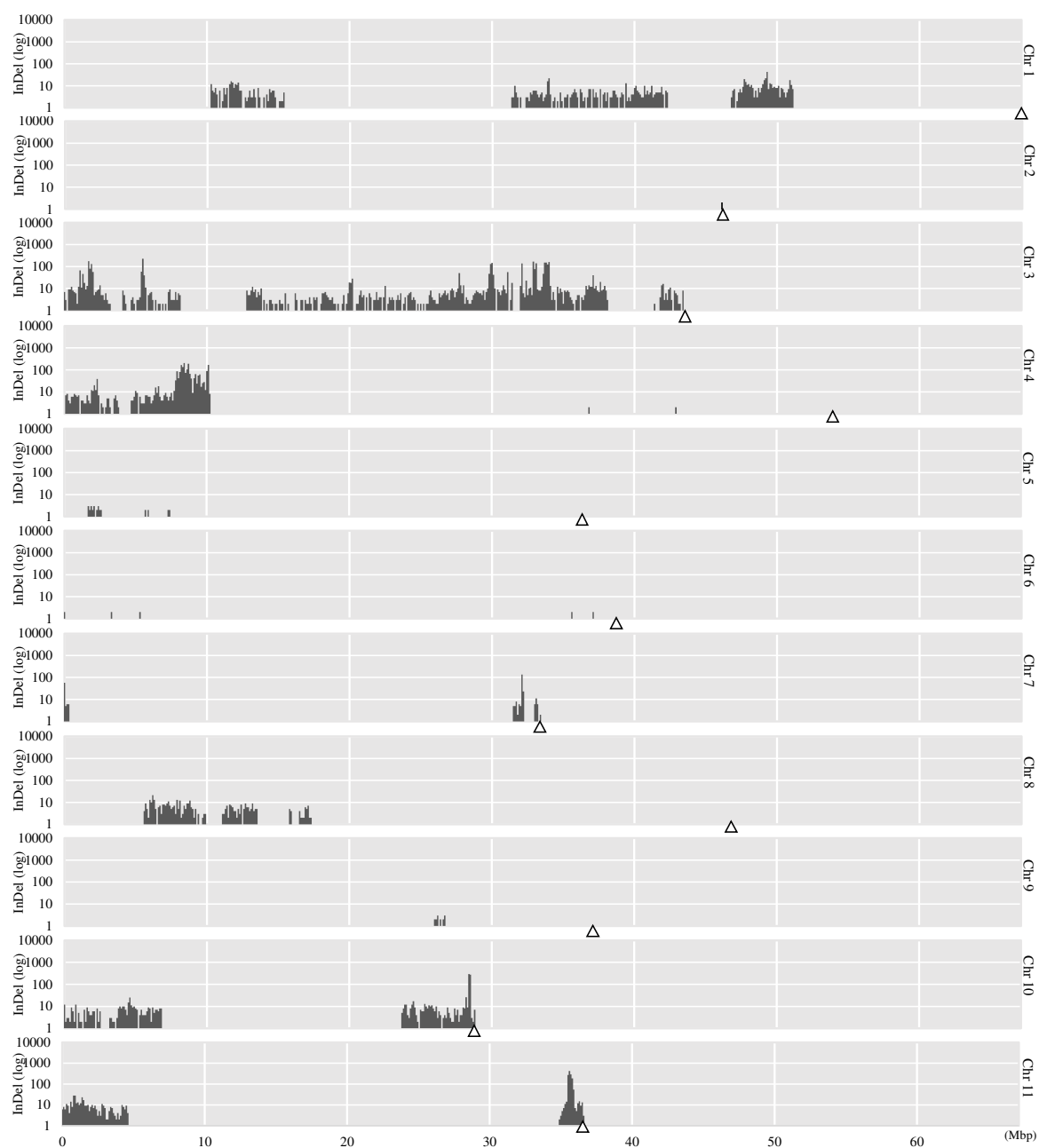


図 2-8.「紫さやか」と「エリモショウズ」の全染色体における InDel の分布と密度.

各染色体について 100kb のウィンドウごとの InDel の数を示した.  
三角は染色体の終わりを示した.

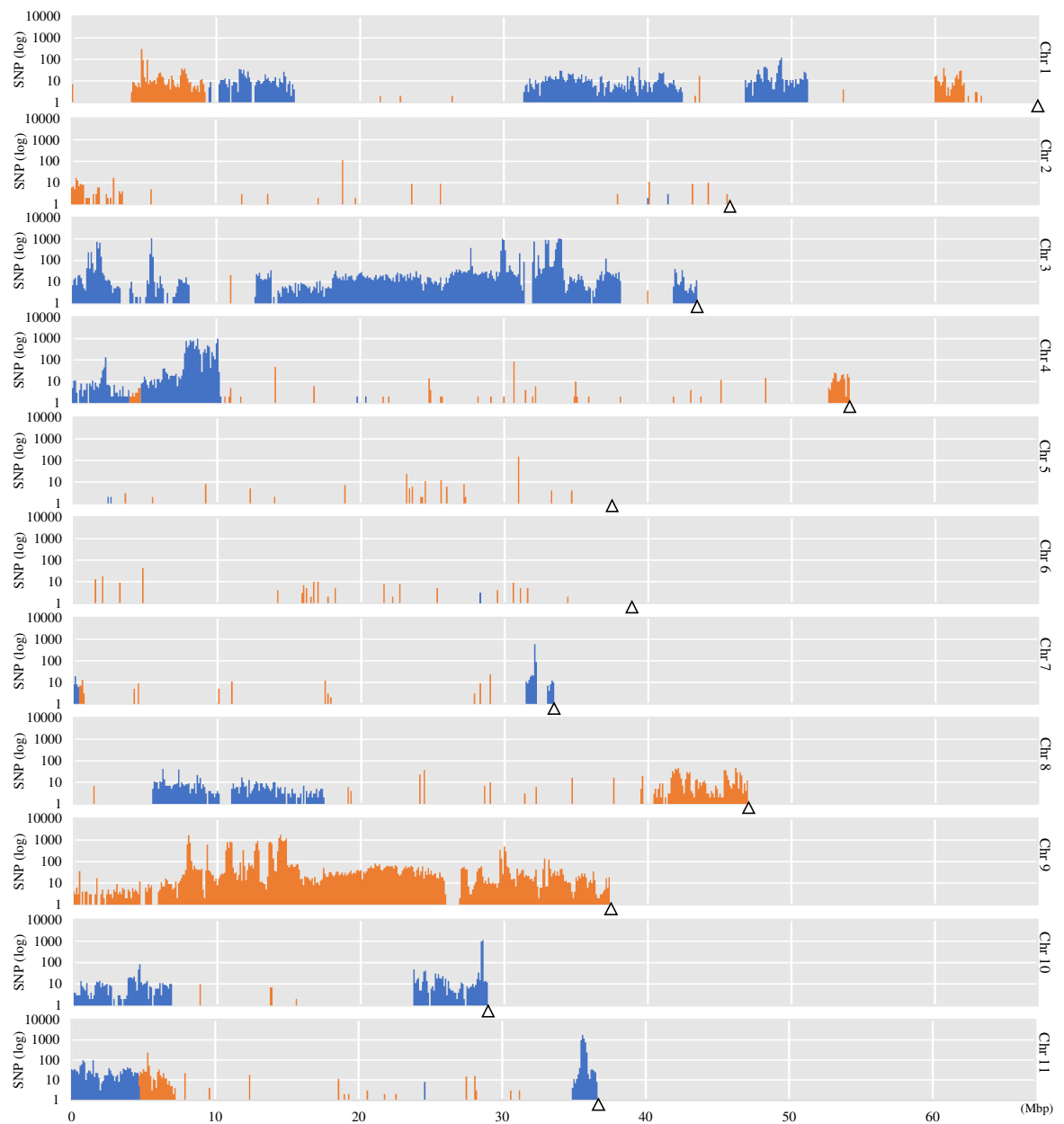


図 2 - 9 . 「紫さやか」と「しゅまり BT」（オレンジ色）および「紫さやか」と「エリモショウズ」（青色）の全染色体における SNP の分布と密度．各染色体について 100kb のウィンドウごとの SNP の数を示した．三角は染色体の終わりを示した．

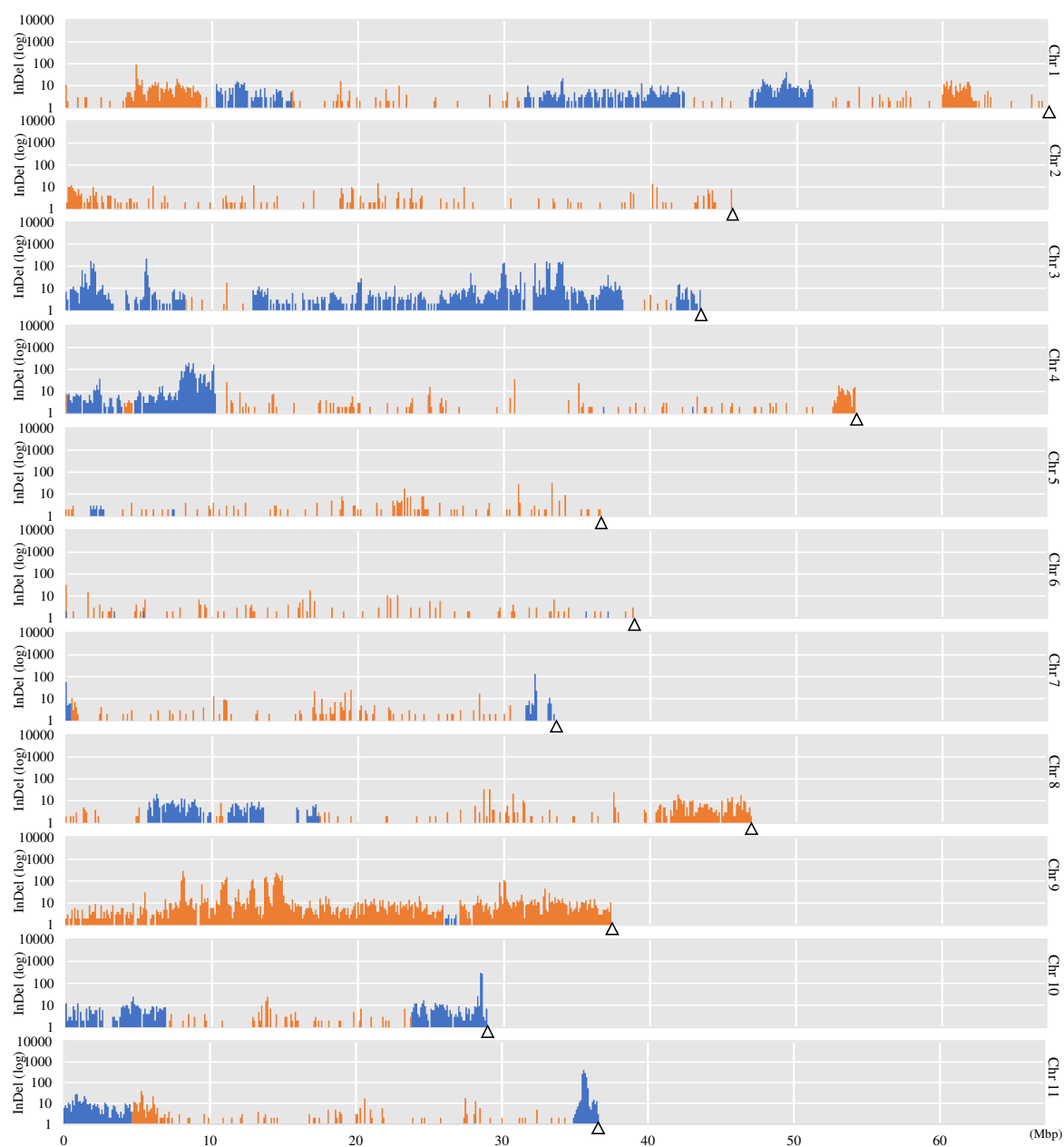


図 2-10. 「紫さやか」と「しゅまり BT」（オレンジ色）および「紫さやか」と「エリモショウズ」（青色）の全染色体における Indel の分布と密度．各染色体について 100kb のウィンドウごとの Indel の数を示した．三角は染色体の終わりを示した．

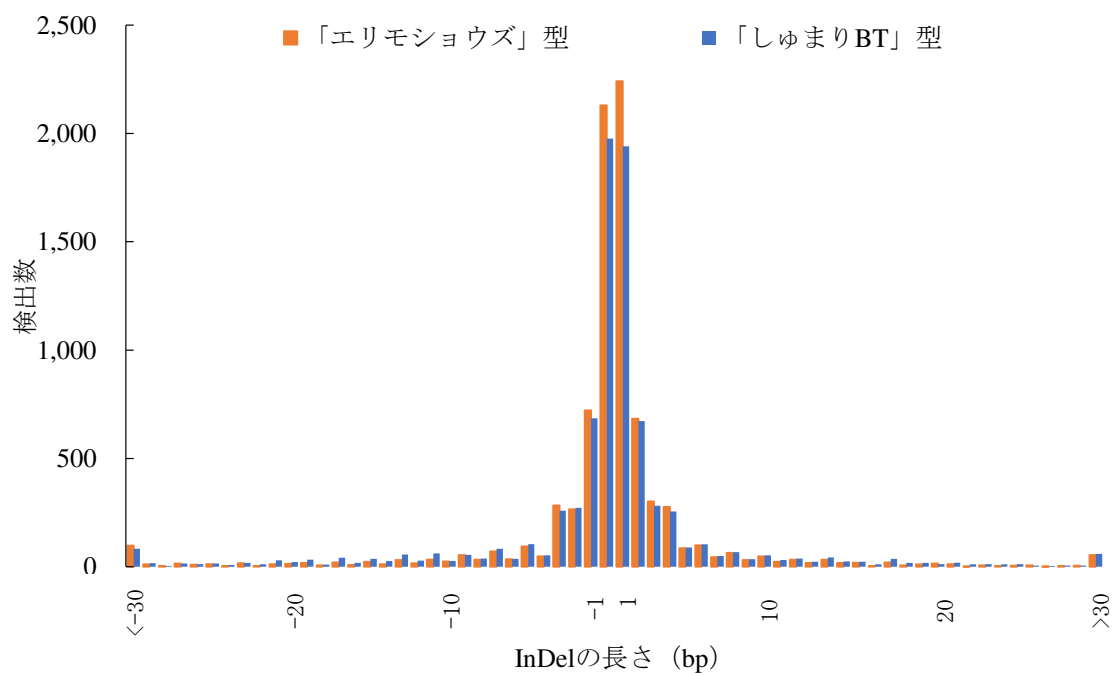


図 2-11. 「紫さやか」の「エリモショウズ」型 InDel と「しゅまり BT」型 InDel の長さの頻度分布.

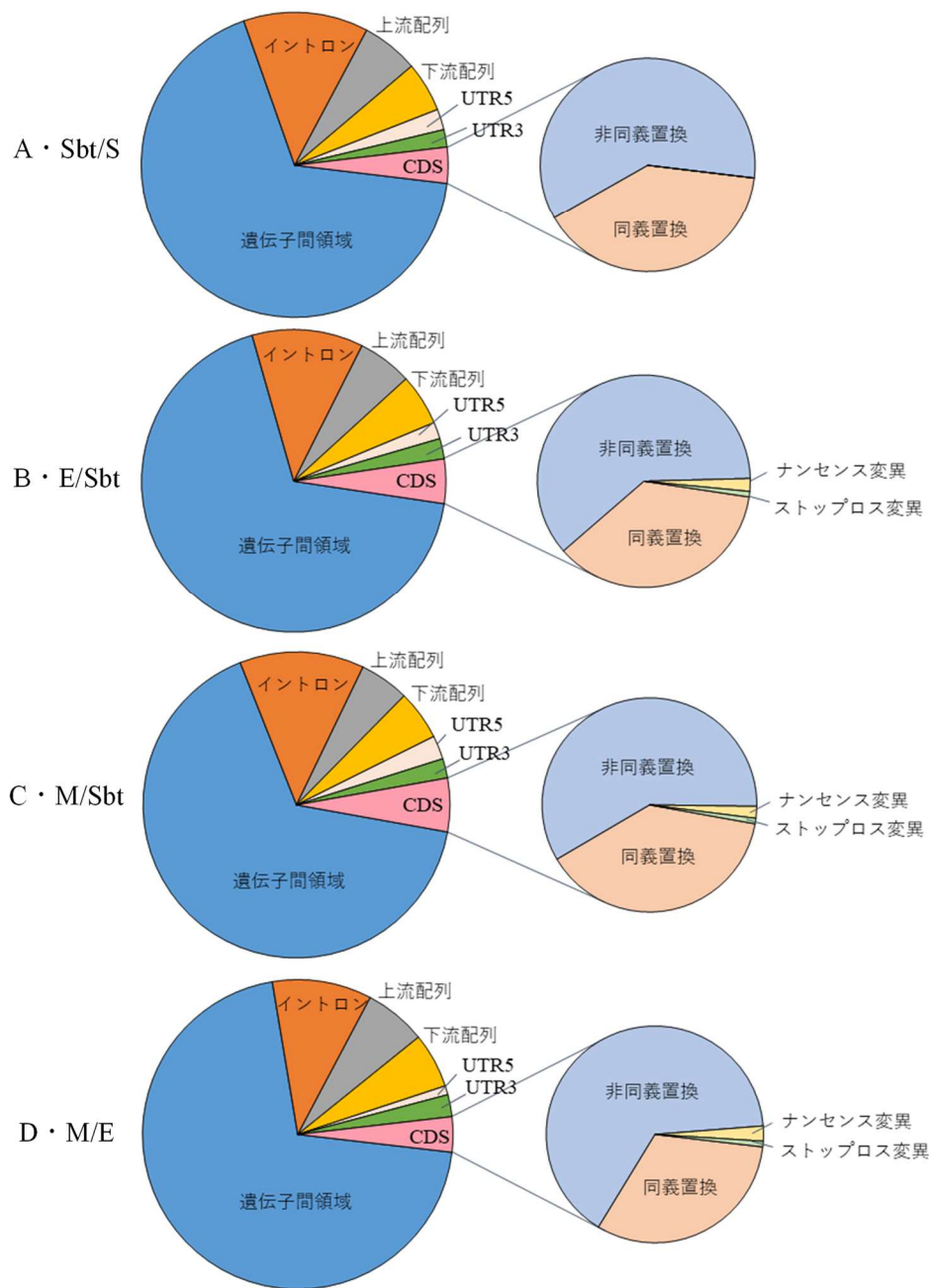


図 2-12. 各品種間で特定された SNP のアノテーション解析の結果.  
「しゅまり BT」と「しゅまり」間の SNP (A), 「エリモショウズ」と「しゅまり BT」間の SNP (B), 「紫さやか」と「しゅまり BT」(「エリモショウズ」型) 間の SNP (C), 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の SNP (D) を示す.  
UTR は非翻訳領域, CDS はコーディング領域を示す.

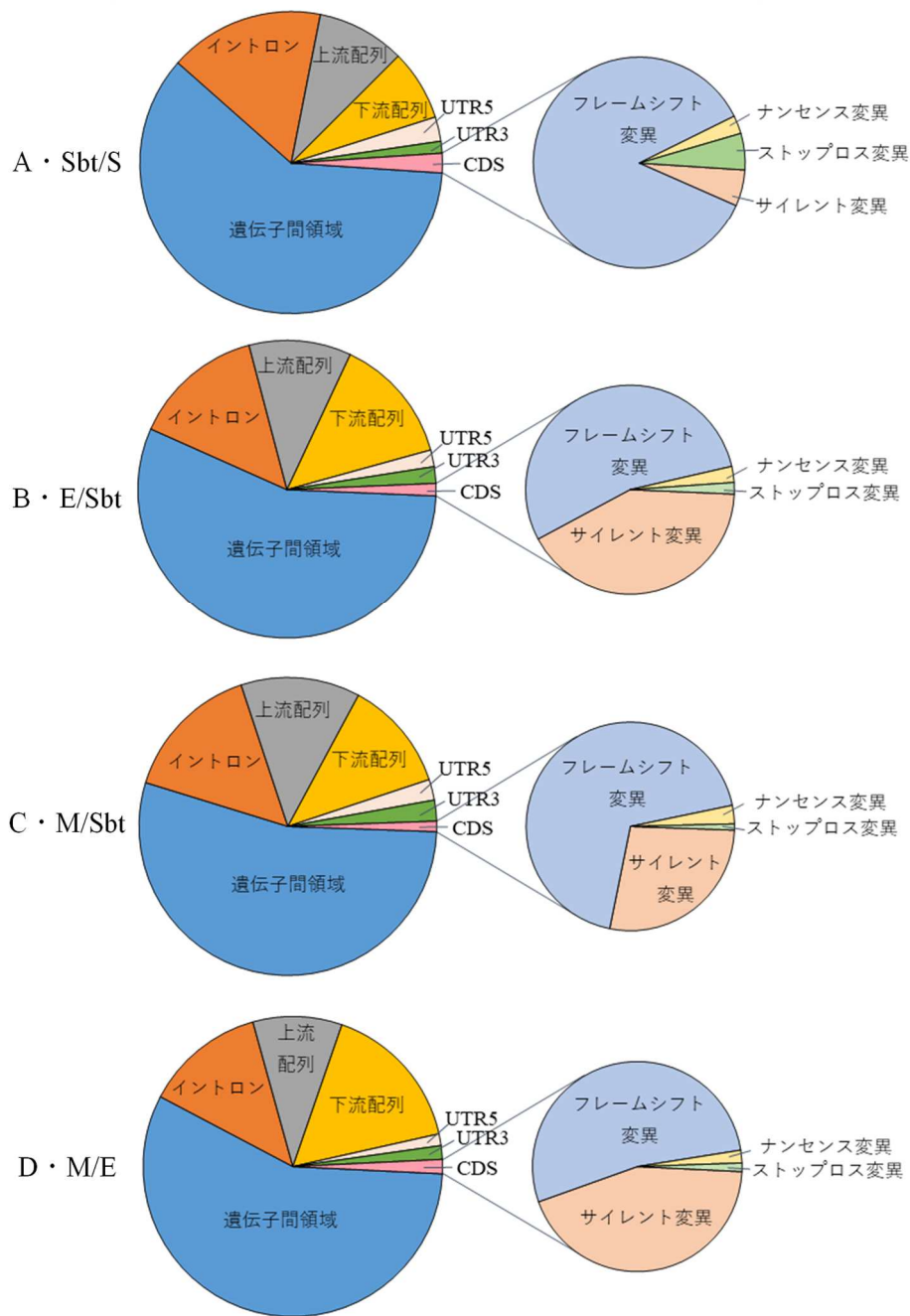


図 2-13. 各品種間で特定された InDel のアノテーション解析の結果.  
「しゅまり BT」と「しゅまり」間の InDel (A), 「エリモショウズ」と「しゅまり BT」間の InDel (B), 「紫さやか」と「しゅまり BT」(「エリモショウズ」型) 間の InDel (C), 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の InDel (D) を示す.

UTR は非翻訳領域, CDS はコーディング領域を示す.



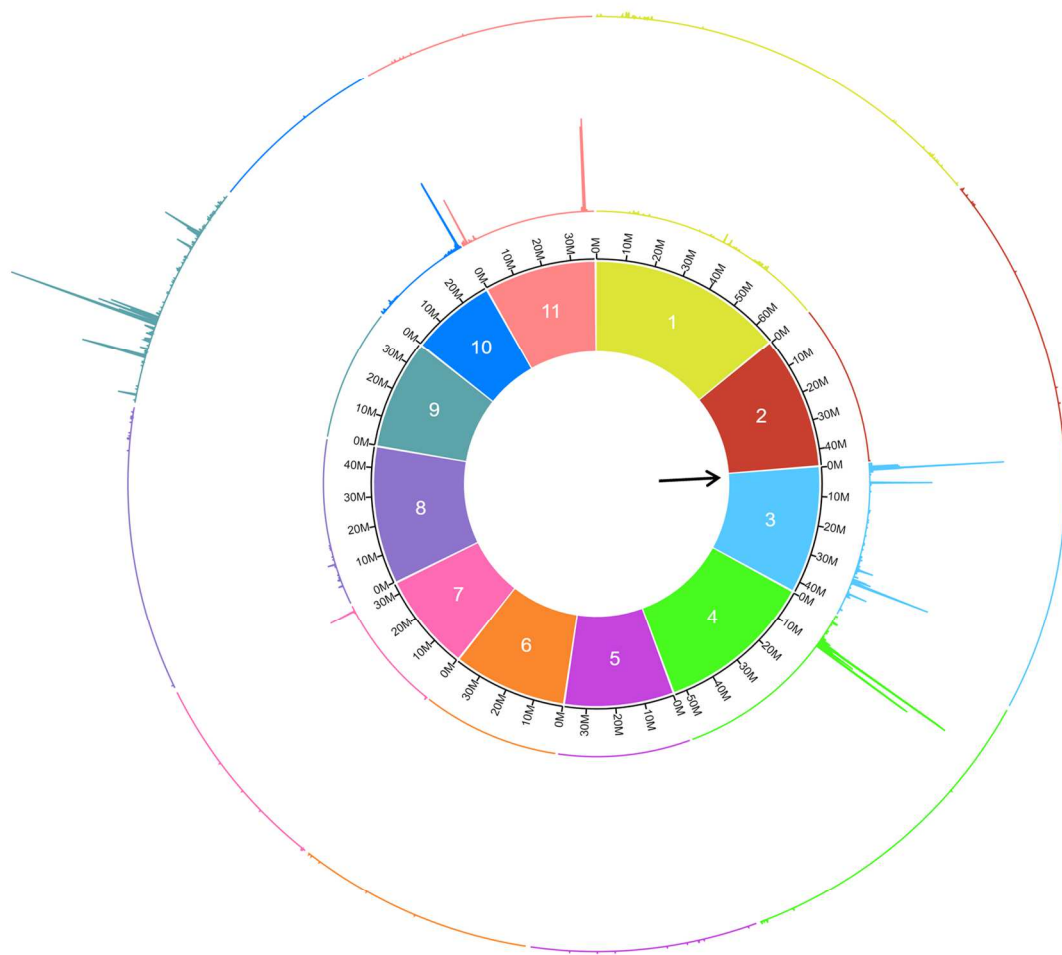


図 2-14. アズキ品種「紫さやか」の「しゅまり BT」と「エリモショウズ」間の機能的 SNP と InDel の 100kb のスライディングウインドウごとの頻度.

「しゅまり BT」型（内側）, 「エリモショウズ」型（外側）の機能遺伝子を示す. 矢印は落葉病抵抗性遺伝子 *Pga1* の候補遺伝子 Vigan.03G013100.01 のポジションを示す.

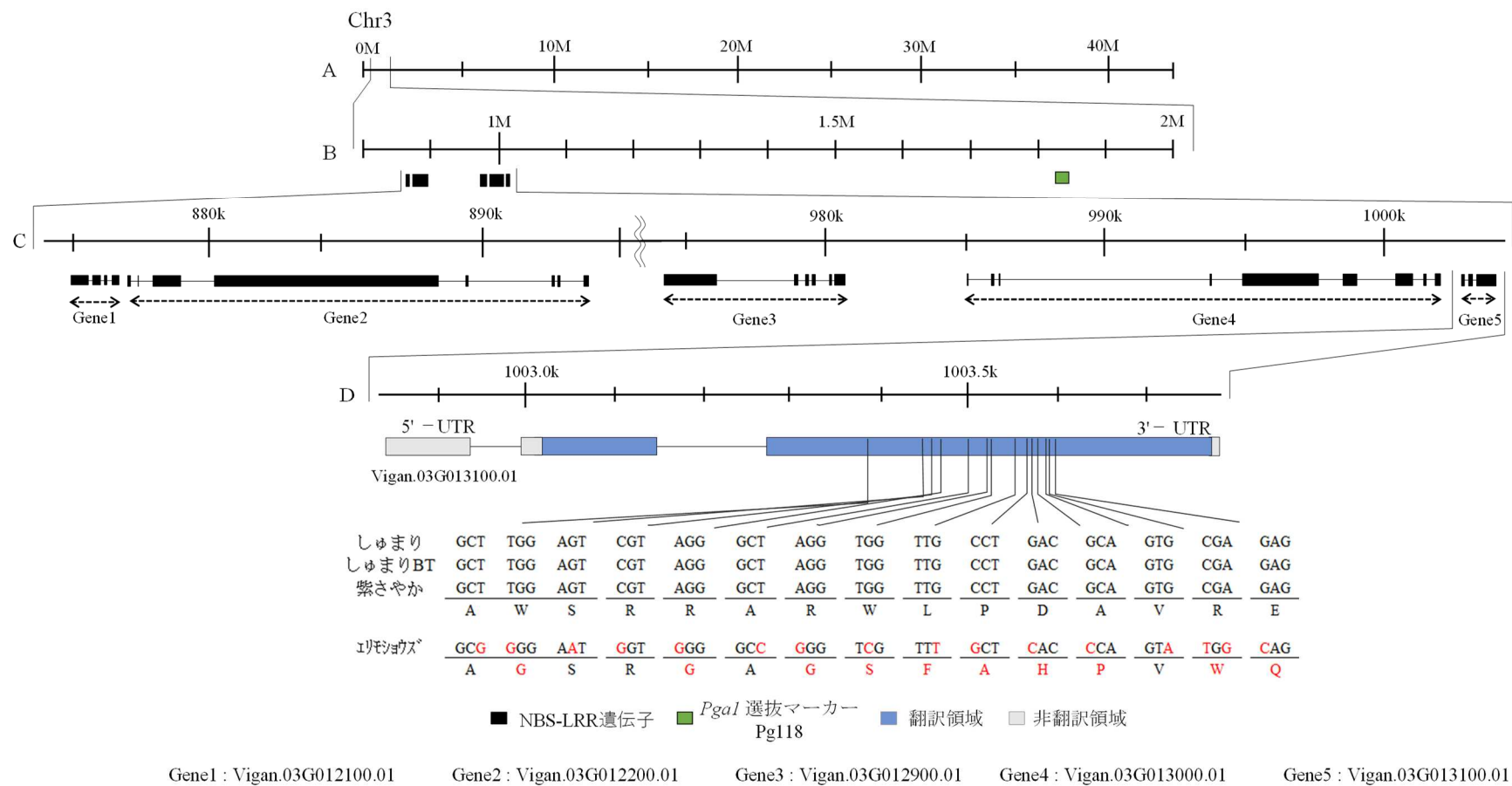


図 2 - 15. 第 3 染色体上の *Pga1* の選抜マーカーPg118 のゲノムポジション (A と B) とその近傍にコードされる NBS-LRR ドメイン遺伝子 Gene1~Gene5 (C), ならびに Gene5 (Vigan.03G013100.01) の SNP とアミノ酸変異 (D).

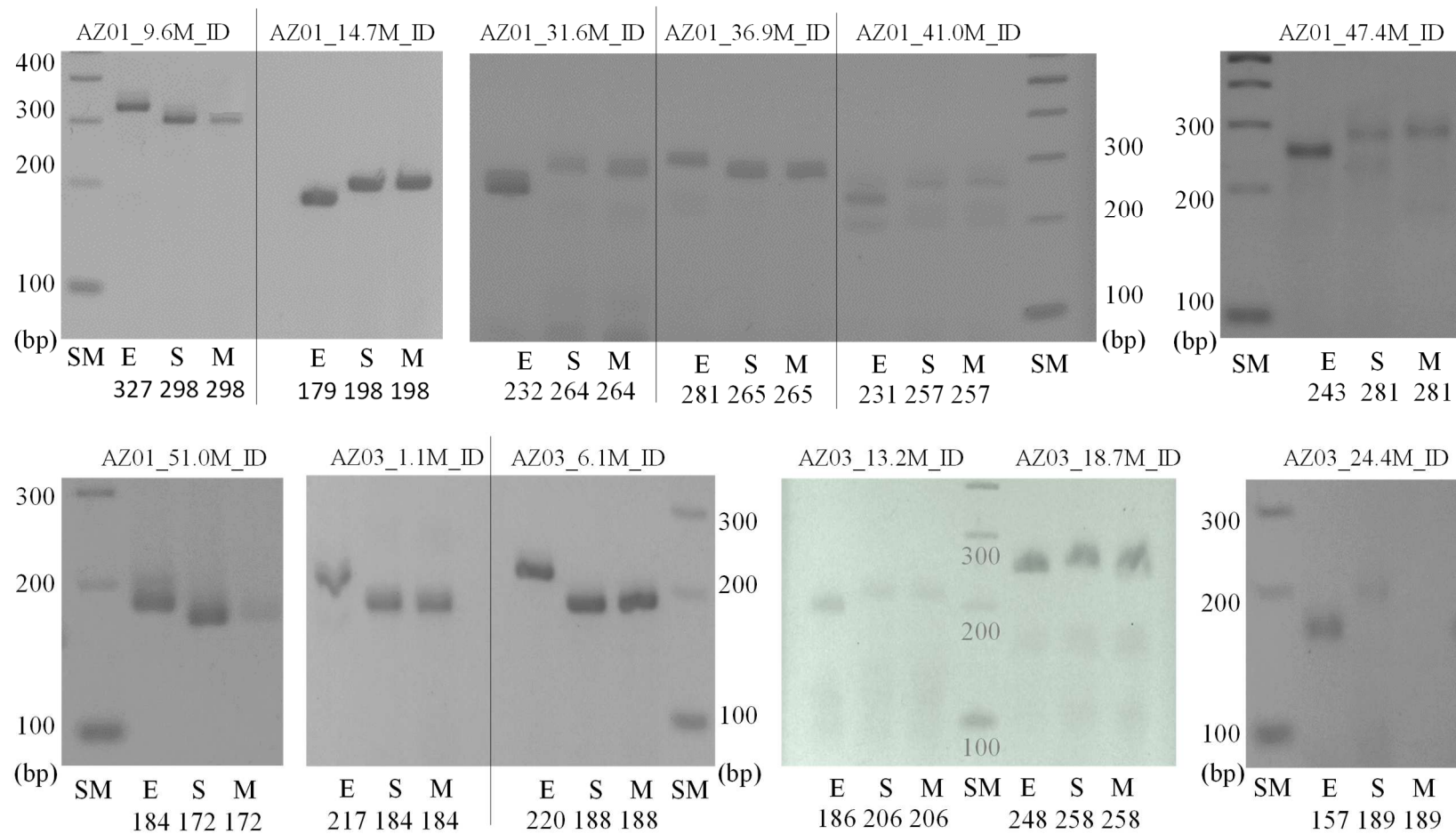


図 2-16. 品種間で多型が識別された 10bp 以上の InDel マーカーの電気泳動の結果.  
 E は「エリモショウズ」、S は「しゅまり BT」、M は「紫さやか」を表し、数値は増幅産物のサイズ (bp) を示した。SM はサイズマーカーを示した。

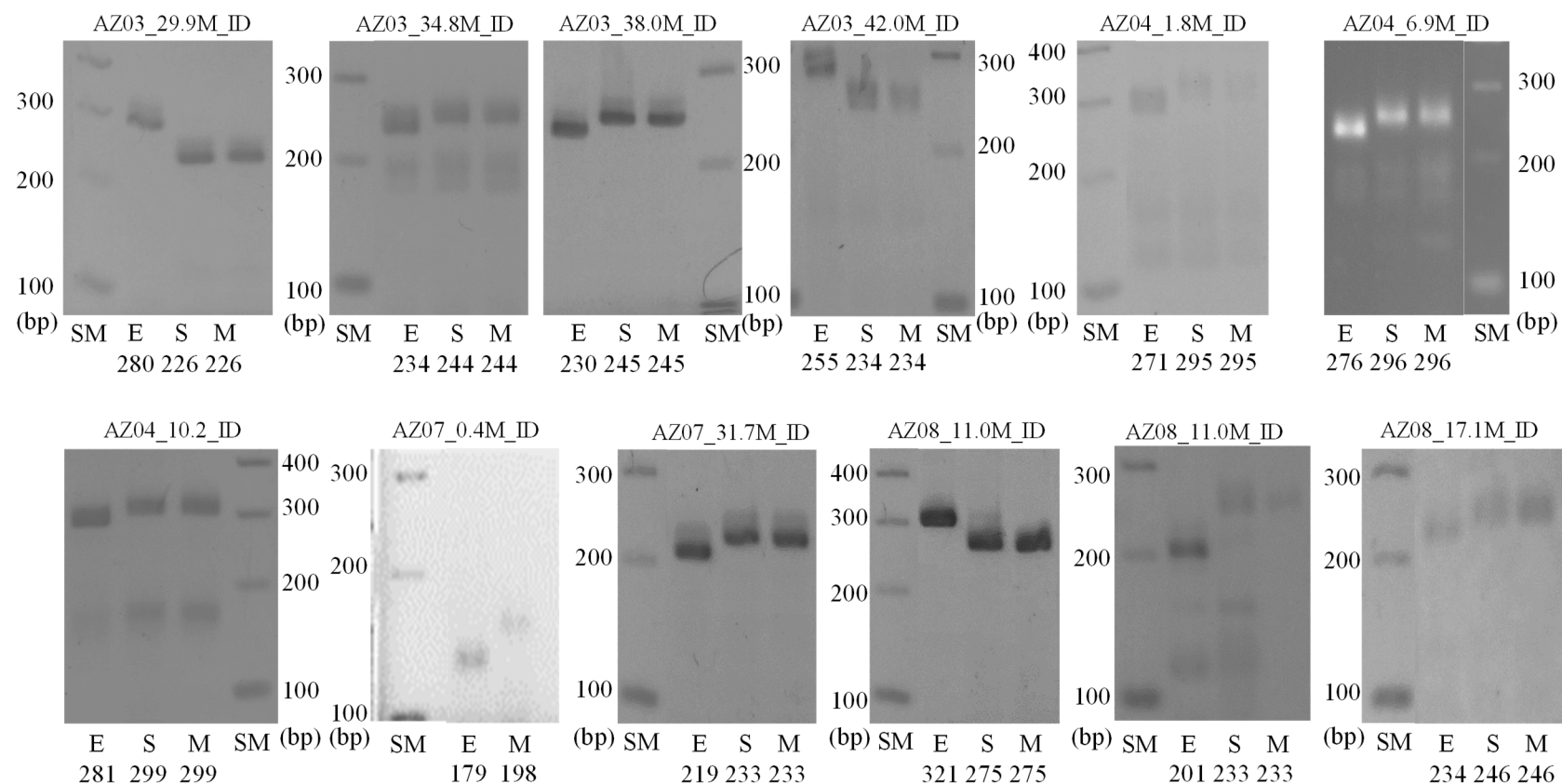


図 2-16. 続き 1.

E は「エリモショウズ」、S は「しゅまり BT」、M は「紫さやか」を表し、数値は増幅産物のサイズ (bp) を示した。SM はサイズマーカーを示した。

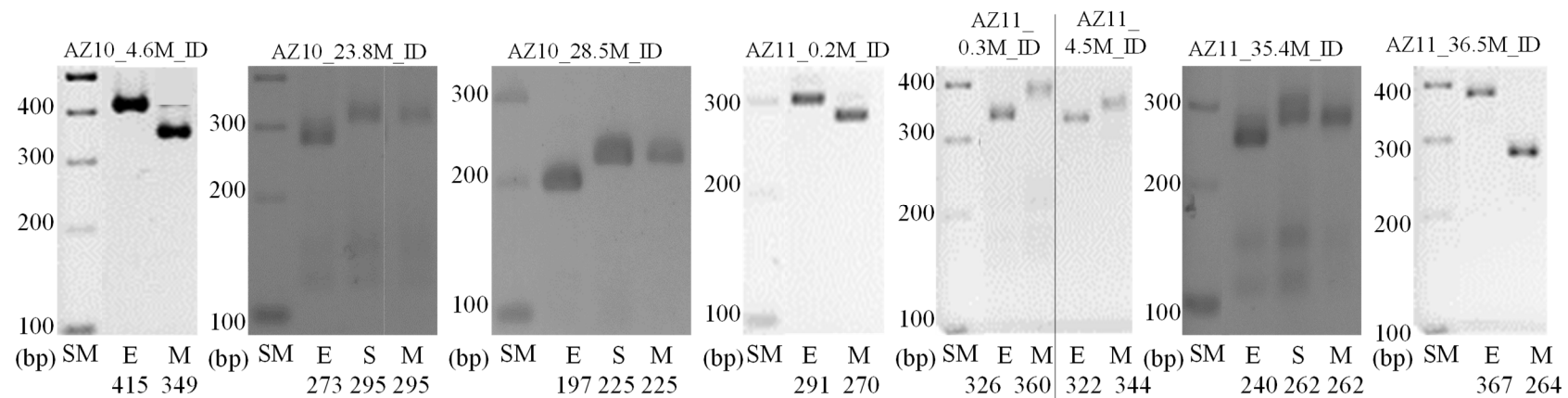


図 2-16. 続き 2.

E は「エリモショウズ」、S は「しゅまり BT」、M は「紫さやか」を表し、数値は増幅産物のサイズ (bp) を示した。SM はサイズマーカーを示した。

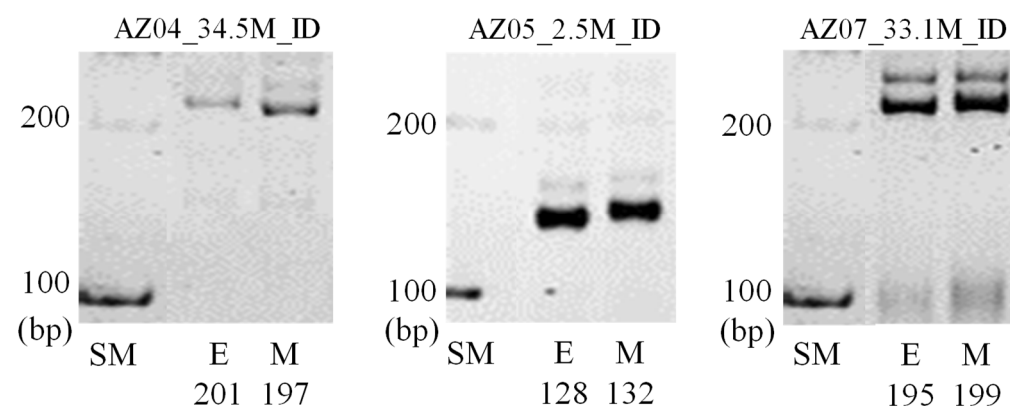


図 2-17. 品種間で多型が識別された 10bp 未満の InDel マーカーの電気泳動の結果. E は「エリモショウズ」、M は「紫さやか」を表し、数値は増幅産物のサイズ (bp) を示した. SM はサイズマーカーを示した.

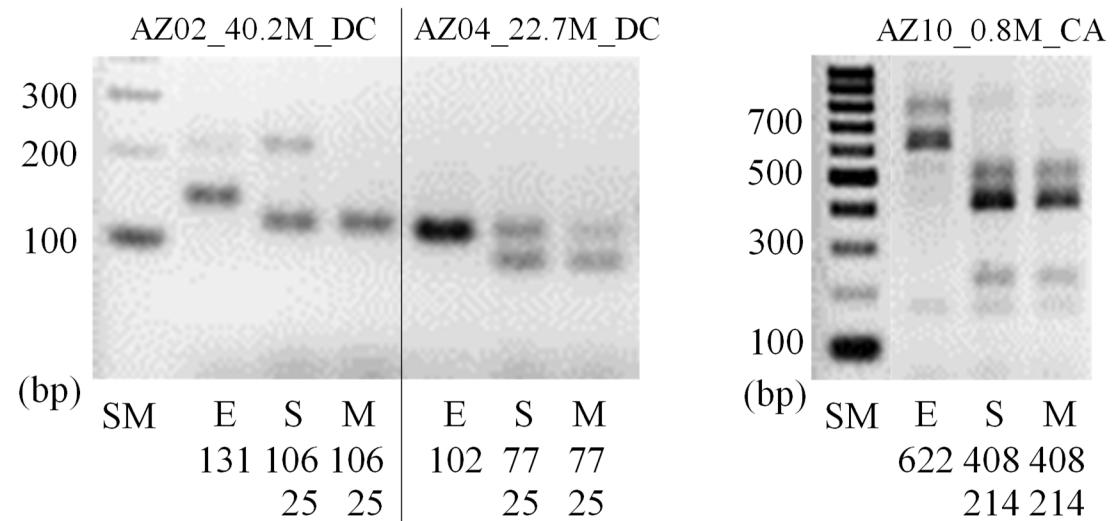


図 2-18. 品種間で遺伝子多型が識別された CAP マーカーと dCAPS マーカーの電気泳動の結果.

E は「エリモショウズ」、S は「しゅまり BT」、M は「紫さやか」を表し、数値は増幅産物のサイズと酵素処理切断後のサイズ (bp) を示した.

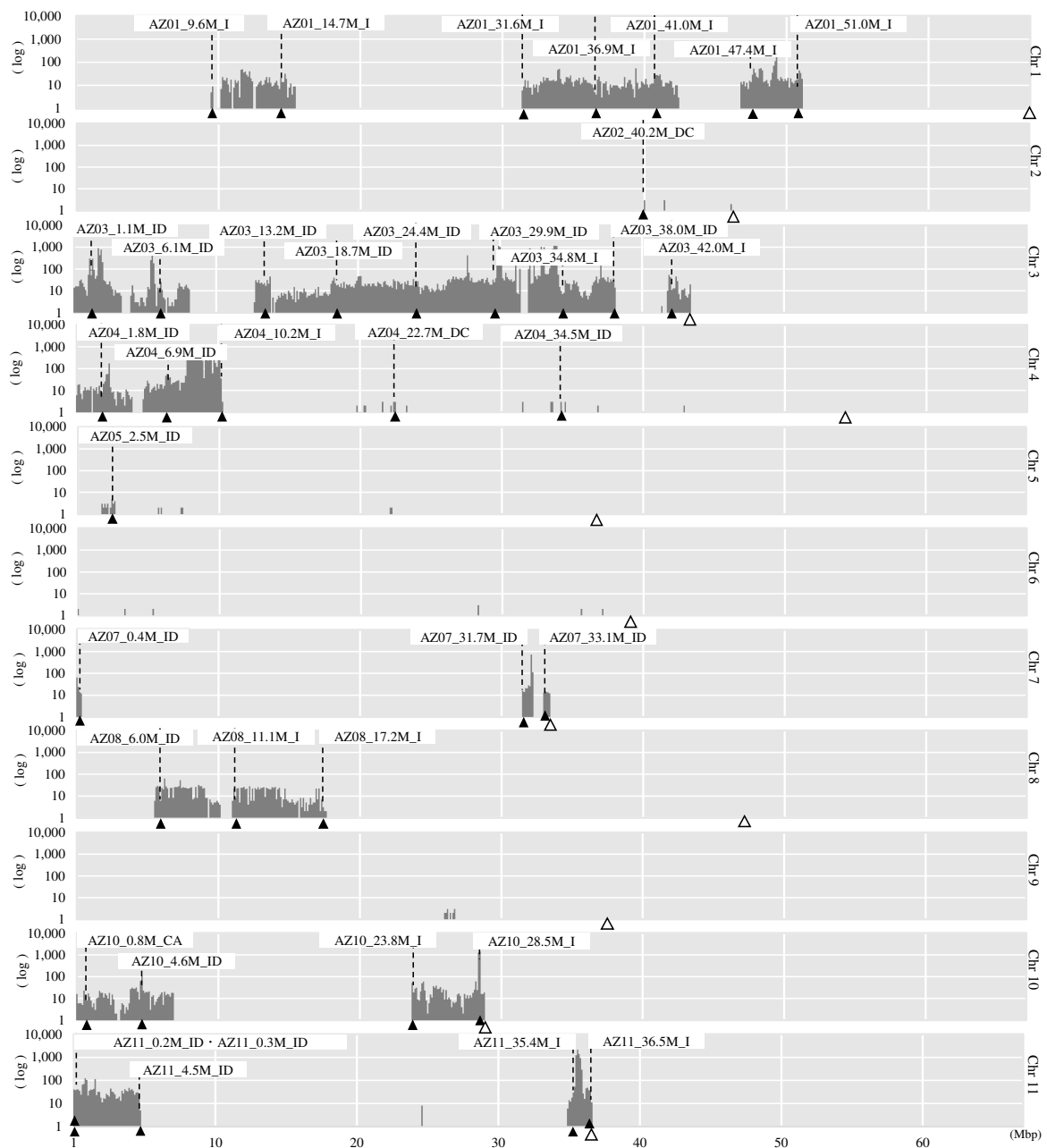


図 2-19. 全染色体における「紫さやか」と「エリモショウズ」間に特定した SNP と InDel の分布と密度ならびに本研究で作成した DNA マーカーのポジション.

各染色体について 100kb のウィンドウごとの SNP と Indel の数を示した. 白三角は染色体の終わりを示した.

DNA マーカーを作成したポジションについて黒三角と点線と数値 (Mbp) で示した.



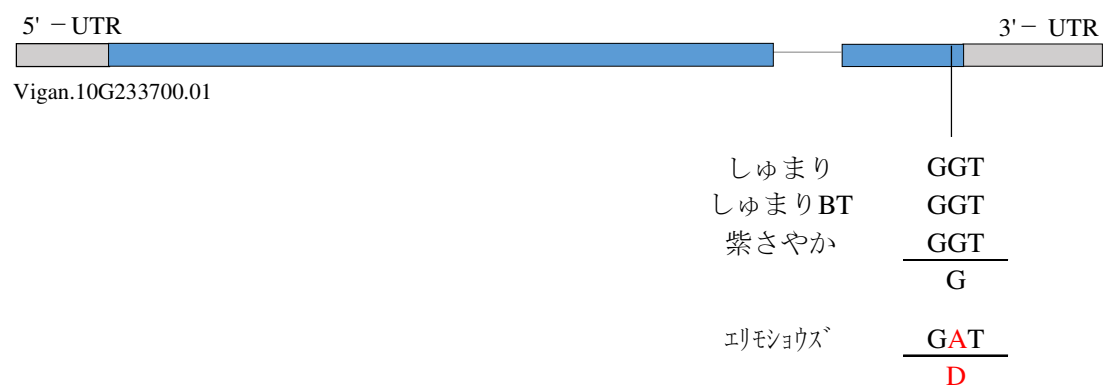


図 2 - 20. Vigan. 10G233700. 01 の遺伝子構造と「しゅまり」, 「しゅまり BT」, 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の SNP とアミノ酸変異.

## 第3章 アン色に関与する量的形質遺伝子座の検出

### 3-1 緒言

アズキのアン色は、加工適性に関わる最も重要な形質の一つである。アズキの種皮色の赤味には、アントシアニンとフラボノイドが関与し（村上ら 1994, Sasanuma *et al.*, 1966, Yoshida *et al.* 1996）、種皮、浸漬液、煮汁、生アンには、ロイコアントシアニンが含まれている（畑井 1987）。また、プロアントシアニジンとアントシアニジンの組成が、種皮色の赤、黒、白、緑、斑など色相に影響する（Zhao *et al.* 2022）。さらに、アン色の紫色には、非アントシアニン色素のカテキノピラノシアニジンAとカテキノピラノシアニジンBが関わっている（Yoshida *et al.* 2019）

アン色には品種間差異が知られており、鮮やかな「紫色」として高く評価されている品種には、「しゅまり」（藤田ら 2002）がある（畑井 1987）。この「しゅまり」似のアン色を特徴とする「紫さやか」は、「しゅまり」と「エリモショウズ」との交雑後代から育成された（長岡ら 2020）。

アズキの種皮色は、検査等級を決定する重要な形質の一つで、明度 23～28、彩度 21～27、色相角 27～36 の範囲内で規格内とされる。一方で、各値が小さいと濃赤色、大きいと淡赤色を呈し、両者は流通規格外となる。また、規格内の煮豆色の色相角は、20～32 の範囲にあるが（長岡ら 未発表）、実需者からの要望により煮豆色の色相角は、23～26 の範囲内を育種目標としている（長岡ら 未発表）。

アン色の明度と赤味度は、種皮色と強い正の相関関係にある（加藤ら 1992）。開花後 10 日間の日射量が種皮色の明度に強い影響を与え、この間の日射量が多いと明度は低下する（浅間・北村 1984）。また、登熟期間が

高温になると種皮色の色相は赤味を増し、明度と彩度が低下することで濃赤色となる（長岡ら 2004）。このように、アン色と関わる種皮色が、環境の影響を受けるために、アン色の選抜は、複数環境の評価が必要とされてきた。そのために、アン色の初期世代での選抜が不可能なため、遺伝的に固定した後期世代で選抜されてきた。また、アン色の評価には、収穫、乾燥、脱穀、選別、煮熟、製餡までに多くの時間と労力を要することが育種上の問題となっている。「紫さやか」は、F<sub>8</sub>世代で、製アン前の煮豆色について、官能試験と色彩色差計による測定結果の評価により「しゅまり」に似る系統として選抜された（長岡ら 2020）。

アン色の初期世代からの選抜が可能な MAS 法の開発が求められている。アズキの遺伝解析に利用できる DNA マーカーとして、SSR マーカーが開発され（Han *et al.* 2005）、当該マーカーを用いて、開花期のほか収量関連形質、あるいは品質と関わる種皮色の QTL が特定されてきた（Horiuchi *et al.* 2015, Isemura *et al.* 2007, Kaga *et al.* 2008, Yamamoto *et al.* 2016）。最近になって、北海道の品種「しゅまり」について、ゲノム全体 95.1%に相当する 522.8Mbp が解読された（Sakai *et al.* 2015）。また、Restriction site associated DNA(RAD)シーケンシングと Specific locus amplified fragment (SLAF) シーケンシングによる高密度連鎖地図の構築と収量関連形質の QTL が特定されている（Li *et al.* 2017, Liu *et al.* 2016）。

これまでアズキの種皮色に関わる遺伝子として、祖先野生種 *V. angularis* var. *nipponensis* のアイボリー色と栽培品種の赤色に関わる主働遺伝子 *SDC* と QTL である *sdc3.1.1*、ブータンの在来種のオリーブ色と栽培品種の赤色に関わる連鎖する QTL, *OLB1* と *OLB2* が、第 1 染色体上

に特定されている (Horiuchi *et al.* 2015, Isemura *et al.* 2007, Kaga *et al.* 2008). さらに, 赤色の栽培品種から見出された 2 種の種皮色の突然変異体のうちアイボリー色には第 8 染色体の主働遺伝子 *IVY*, 淡いオリーブ色には第 10 染色体の主働遺伝子 *POB* が報告されている (Horiuchi *et al.* 2015). しかし, アン色の遺伝的制御機構は未解明である.

本章では, 「紫さやか」と「エリモショウズ」の交雑に由来する組換え自殖系統 (Recombinant inbred lines: RILs) をマッピング集団として, 種皮色と煮豆色に関する遺伝的制御機構の解明と環境との交互作用の解明を目的とした.

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 植物材料

アズキ品種「エリモショウズ」と「紫さやか」を親品種として用いた. 両品種間の交雑  $F_2$  から単粒系統法による世代促進で得られた組換え自殖系統 150 系統の  $F_6$  (2020 年) と  $F_7$  (2021 年) を供試した.

### 3-2-2 栽培方法

供試材料を 2020 年と 2021 年に, 北海道芽室町 (北緯  $42^{\circ} 92'$ , 東経  $143^{\circ} 01'$ ) と北海道幕別町 (北緯  $42^{\circ} 67'$ , 東経  $143^{\circ} 31'$ ) で栽培した. 両地点の土壌は, いずれも褐色火山性土である.

2 地点における 7 月 21 日から 9 月 30 日までの登熟期間における平年の積算温度と積算日射量は, 前者で  $1,312^{\circ}\text{C}$  と  $970\text{ MJ}$  (農研機構メッシュ

農業気象データ(大野ら 2016), <https://amu.rd.naro.go.jp/>) に対して, 後者では 1, 227°C で 986 MJ とアズキの寒冷限界地帯とされている.

親品種と RILs の各系統を畝幅 66 cm で株間 10 cm の単粒で 1 反復につき 10 株ずつ, 3 反復を両年の 5 月下旬に播種した. 系統・反復毎に熟莢率が, 95% 以上に達した日に収穫し, 屋外の網室で 30 日間乾燥した後, 脱穀と唐箕選別した.

### 3-2-3 種皮色と煮豆色の評価

各品種系統の反復ごとに, ランダムに選別した子実 15 g をガラスセルに入れて, 色彩色差計 CR-5 (コニカミノルタ社) を用いて, C 光源 2° 視野の測定条件で, 明度 (seed coat  $L^*$ , SCL), 彩度 (seed coat  $C^*$ , SCC), 色相角 (seed coat  $h$ , SCH) を 2 試料ずつ計測した. 長岡ら (2020) に従って, 子実 30 g を 150 ml の水で 70 分間煮熟して調整した煮豆 15 g を, ガラスセルに入れて, 明度 (boiled bean  $L^*$ , BBL), 彩度 (boiled bean  $C^*$ , BBC), 色相角 (boiled bean  $h$ , BBH) を 2 試料ずつ計測した.  $L^*C^*h$  表色系を用いた評価方法では, 明度 ( $L^*$ ) は明るさの度合いを示し, 数値が高いと明るく, 低いと暗く, 彩度 ( $C^*$ ) は鮮やかさの度合いを示し, 数値が高いと鮮やか, 低いとくすんでいる, 色相角 ( $h$ ) は色彩を示し, 種皮色では数値が高いと赤みが弱く, 低いと赤みが強く, 煮豆色では数値が高いと赤みが弱く, 低くなるにつれて色味が赤色からうすい紫色を呈する.

### 3-2-4 連鎖地図の構築と QTL 解析

DNA マーカーの連鎖解析には, InDel マーカー 34 個 (第 2 章・表 2-4), CAPS マーカー 1 個と dCAPS マーカー 1 個を用い, 解析ソフトウェアには

JoinMap® 4 (van Ooijen 2006) を用いて、LOD 値 2.2 を閾値とした連鎖地図を構築した。地図関数は、Kosambi 関数を用いた (Kosambi 1943)。QTL 解析には、MapQTL® 6 (van Ooijen 2002) を用いて、interval マッピング法および Multiple-QTL models (MQM) マッピング法を行った。LOD 値の閾値は、形質ごとに Permutation test により算出した (Churchill and Doerge 1994)。

### 3-2-5 PCR 反応と制限酵素処理および電気泳動

RILs の PCR 反応と制限酵素処理は、第 2 章の 2-2-5-4、電気泳動は 2-2-5-5 に従い実施した。

## 3-3 結 果

### 3-3-1 登熟期間の気温と日射量

各栽培地区における 7 月 21 日から 9 月 30 日までの登熟期間の積算温度と積算日射量を図 3-1 に示した。積算温度は、芽室では 2020 年で 1,385℃、2021 年で 1,340℃と、両年とも平年 (1,312℃) より高く、幕別でも 2020 年で 1,295℃、2021 年で 1,246℃と、平年 (1,227℃) より高かった。日射量は、芽室では平年 (970 MJ) と比較して 2020 年で 933 MJ と少なく、2021 年で 1,044 MJ と多く、幕別でも平年 (986 MJ) と比較して、2020 年で 935 MJ と少なく、2021 年で 1,034 MJ と多かった。また、積算温度は、2 カ年とも芽室で幕別よりも高く、積算日射量は、両年次とも地点間に差異はなかった。

### 3-3-2 親品種の特性

4 環境下における「紫さやか」と「エリモショウズ」の表現型を表 3-1 に示した。種皮の明度ならびに煮豆の明度と煮豆の彩度については、4 環境で品種間に差異は無かった。種皮の彩度については、2020 年の芽室のみで「紫さやか」が高くなった ( $p < 0.05$ )。種皮の色相角と煮豆の色相角は、4 環境ともに「紫さやか」が「エリモショウズ」より低かった ( $p < 0.05$ )。さらに、両品種の種皮の色相角と煮豆の色相角は、幕別が芽室より高く、赤味が弱くなった。このうち、煮豆の色相角の 4 環境下における変動係数は、「紫さやか」で 0.007~0.009 となり、「エリモショウズ」(0.024~0.061) より小さかった。

### 3-3-3 DNA マーカーの分離比の検定

38 マーカーの遺伝子型の分離について、「しゅまり」型ホモ接合体：ヘテロ接合体：「エリモショウズ」型ホモ接合が 31 : 2 : 31 に適合するかを  $\chi^2$  乗検定で求めた。その結果、 $P$  値が有意水準の 5% を下回る DNA マーカーが確認されなかったため、マーカーの分離比に歪みは無かった (表 3-2)。

### 3-3-4 連鎖地図の構築

InDel マーカー 34 個 (第 2 章・表 2-4)、CAPS マーカー 1 個と dCAPS マーカー 1 個 (表 2-5) について、RILs の遺伝子型を判定し、7 連鎖群、全長 363.6 cM の連鎖地図を構築した (図 3-4)。

### 3-3-5 形質間の相関関係

各環境下における RILs の形質値間の相関係数を表 3-3 に示した。「紫

「さやか」の煮豆色の特徴とされる煮豆の色相角は、4環境を通して種皮の色相角あるいは煮豆の明度との間にそれぞれ正の相関関係を示した。また、同じ形質間で年次と地域の総当たりによる相関について、種皮の色相角と煮豆の色相角は、それぞれ全ての組み合わせで正の相関関係を示した。RILs の種皮と煮豆の各計測値の頻度分布をそれぞれ図3-2と図3-3に示した。6形質ともに2020年が2021年よりも幅広く分離し(図3-2と図3-3)、超越分離系統が観察された。

### 3-3-6 QTL 解析

QTL 解析の結果を表3-4、および図3-4と図3-5に示した。種皮の明度については、第10染色体上のDNAマーカーAZ10\_23.8M\_IDとAZ10\_28.5M\_ID間に「紫さやか」型対立遺伝子が明度を下げる *qSCL1* を検出した。また、第11染色体上のDNAマーカーAZ11\_0.3M\_IDとAZ11\_4.5M\_ID間に「紫さやか」型対立遺伝子が明度を上げる *qSCL2* を検出した。各QTLの寄与率は、*qSCL1* で7.5% (2021年芽室)、*qSCL2* で6.5% (2021年幕別) となった。

種皮の彩度については、第4染色体上のDNAマーカーAZ04\_6.9M\_IDとAZ04\_22.7M\_ID間に *qSCC1*、ならびに第11染色体上のDNAマーカーAZ11\_0.3M\_IDとAZ11\_35.4M\_ID間に *qSCC4* を検出した。これらのQTLでは「紫さやか」型対立遺伝子が、彩度を上げた。*qSCC1* の寄与率は5.7% (2021年幕別)、*qSCC2* の寄与率は6.8% (2021年幕別) となり、同一環境で検出された。さらに、第7染色体上のDNAマーカーAZ07\_0.4M\_IDとAZ07\_33.1M\_ID間に *qSCC2*、ならびに第8染色体上のDNAマーカーAZ08\_6.0M\_IDとAZ08\_17.2M\_ID間に *qSCC3* を検出した。これらのQTLで



は「紫さやか」型対立遺伝子が、彩度を下げた。*qSCC2* の寄与率は 7.6% (2021 年芽室), *qSCC3* の寄与率は 12.5% (2020 年幕別) と単一環境で検出された.

種皮の色相角については, 第 3 染色体上の DNA マーカー AZ03\_1.1M\_ID と AZ03\_6.1M\_ID 間に *qSCH1*, 第 10 染色体上の DNA マーカー AZ10\_23.8M\_ID と AZ10\_28.5M\_ID 間に *qSCH2*, 第 11 染色体上の DNA マーカー AZ11\_35.4M\_ID と AZ11\_36.5M\_ID 間に *qSCH3* を検出した. いずれの QTL においても, 「紫さやか」型対立遺伝子が, 色相角を下げた. *qSCH1* の寄与率は, 7.7% (2021 年芽室), *qSCH2* の寄与率は, 4.7% (2021 年幕別) と 13.8% (2021 年芽室), *qSCH3* の寄与率は, 8.1% (2021 年芽室), 9.2% (2020 年芽室), 15.1% (2021 年幕別) となった.

煮豆の明度については, 「紫さやか」型対立遺伝子が明度を下げる *qBBL1* を第 11 染色体上の DNA マーカー AZ11\_35.4M\_ID と AZ11\_36.5M\_ID 間に検出した. *qBBL1* の寄与率は, 6.2% (2021 年幕別), 8.7% (2020 年幕別), 9.0% (2021 年芽室) となった.

煮豆の彩度については, 「紫さやか」型対立遺伝子が彩度を上げる *qBBC1* を第 1 染色体上の DNA マーカー AZ01\_9.6M\_ID と AZ01\_14.7M\_ID 間, ならびに *qBBC2* を第 10 染色体上の DNA マーカー AZ10\_23.8M\_ID と AZ10\_28.5M\_ID 間に検出した. また, 「紫さやか」型対立遺伝子が彩度を下げる *qBBC3* を 11 染色体上の DNA マーカー AZ11\_35.4M\_ID と AZ11\_36.5M\_ID 間に検出した. 各 QTL の寄与率は, *qBBC1* で 5.8% (2021 年芽室), *qBBC2* で 12.1% (2021 年幕別), *qBBC3* で 9.2% (2021 年芽室) と単一環境で検出された.

煮豆の色相角については, 「紫さやか」型対立遺伝子が色相角を下げる

*qBBH1* を第 3 染色体上の DNA マーカー AZ03\_1.1M\_ID と AZ03\_6.1M\_ID 間, *qBBH3* を第 10 染色体上の DNA マーカー AZ10\_23.8M\_ID と AZ10\_28.5M\_ID, および *qBBH4* を第 11 染色体上の DNA マーカー AZ11\_35.4M\_ID と AZ11\_36.5M\_ID 間に検出した. また, 「紫さやか」型対立遺伝子が色相角を上げる *qBBH2* を第 10 染色体上の DNA マーカー AZ10\_0.8M\_CA と AZ10\_4.6M\_ID 間に検出した. 各 QTL の寄与率は, *qBBH1* で 4.4% (2021 年幕別), *qBBH2* で 6.7% (2020 年芽室), *qBBH3* で 8.1% (2021 年芽室), *qBBH4* で 5.5% (2021 年幕別), 6.9% (2020 年幕別), 9.4% (2021 年芽室) となった.

### 3-3-7 *qBBH1*, *qBBH3*, *qBBH4* の遺伝子型ごとの煮豆の色相角の比較

「紫さやか」型対立遺伝子が, 煮豆の色相角を小さくする作用を示した *qBBH1*, *qBBH3*, *qBBH4* の集積効果を検証するために, 各 QTL の近傍の DNA マーカーのホモ接合体となった 8 遺伝子型の 4 環境における煮豆の色相角を図 3-6 に示した. 全て「紫さやか」型にもつ MMM 系統群の煮豆の色相角は, 2020 年芽室で 24.8, 2021 年芽室で 25.0, 2020 年幕別で 26.6, 2021 年幕別 27.7 と 8 遺伝子型のうち最も小さい値となった ( $p < 0.05$ ).

### 3-4 考 察

#### 3-4-1 「紫さやか」の煮豆色は環境の影響を受けにくい

RILs の種皮の色相角と煮豆の色相角は、どちらも登熟期間の温度が高かった芽室が幕別より値が低くなることで赤味が強くなり、さらに種皮の色相角と連動して煮豆の色相角も高くなった(加藤ら 1992)。この結果は、登熟期間の高温が種皮色の赤味を増すこととよく一致した(長岡ら 2004)。

本研究によって、登熟期間の積算温度と日射量の異なる4環境下でも、「紫さやか」のアン色の特徴とされる煮豆の色相角(長岡ら 2020)が「エリモショウズ」より小さいことで、アン色はうすい紫色となり、かつ「エリモショウズ」では煮豆の色相角の変動幅が大きいのに対し、「紫さやか」では小さいことが確認できた。「エリモショウズ」の煮豆の色相角が、高くなったのは2年とも幕別となったことから、幕別では、登熟期間の積算温度が芽室より低いことが、「エリモショウズ」の高い煮豆の色相角に関わるものと考察された。これまでに、「エリモショウズ」では、登熟期間が低温で推移する栽培地帯では検査等級の下がることが指摘されている(青山ら 2009)。従って、「紫さやか」では、煮豆の色相角の登熟期間の積算温度への反応性の小さいことが、流通規格内歩留の確保を安定化できる品種と期待できた。

#### 3-4-2 種皮色と煮豆色に関わる QTL 領域は一部で異なる

本研究によって、種皮色に関わる QTL として、明度には *qSCL1* と *qSCL2*, 彩度には *qSCC1*, *qSCC2*, *qSCC3*, *qSCC4*, 色相角には *qSCH1*, *qSCH2*, *qSCH3* の計9個の QTL が特定された。本研究で特定した種皮色に関わる QTL のう

ち、4個が2領域にクラスターを形成したことから、種皮色には7領域が関わる結果となった。このうち、*qSCH2*近傍には種皮色の突然変異遺伝子 *POB* が報告されており (Horiuchi *et al.* 2015)、同じ遺伝子座か否かの検証が必要である。既報の遺伝子座とは一致しなかった他の QTL は、新規の遺伝子座と考察された。

煮豆色に関わる QTL として、明度には *qBBL1*、彩度には *qBBC1*, *qBBC2*, *qBBC3*, 色相角には *qBBH1*, *qBBH2*, *qBBH3*, *qBBH4* の計 8 個が特定された。このうち、5個が2領域にクラスターを形成したことから、5領域が煮豆色に関わることが示された。さらに、種皮色の QTL と煮豆色の QTL のクラスターが、3領域で確認できた。種皮色のみに関わる領域は、*qSCC1*, *qSCC2*, *qSCC3*, [*qSCC4*, *qSCL2*] の 4 領域となった。一方、煮豆色のみに関わる QTL は、*qBBC1* と *qBBH2* の 2 領域となった。残り 3 領域には、種皮色と煮豆色の双方に関わる QTL がクラスターを形成していることから、両者に関わる QTL の可能性が高い。今後、QTL クラスターについて、遺伝子地図を詳細化し、原因遺伝子の異同を検証する必要がある。

### 3-4-3 QTL と環境との交互作用

種皮色に関わる 9 個の QTL のうち、7 個が単一環境、1 個が 2 環境、1 個が 3 環境で検出された。また、煮豆色に関わる 8 個の QTL のうち、6 個が単一環境、2 個が 3 環境で検出された。従って、種皮色と煮豆色に関わる QTL の作用が、環境に影響されることが示された。

単一環境で検出された QTL のうち、*qSCL1*, *qSCC2*, *qSCH1* ならびに *qBBC1*, *qBBC3*, *qBBH3* は、2021 年芽室で検出された。2021 年芽室については、4 環境のうち、積算温度が高くかつ日射量が多かったことから、これらの QTL

が、当該環境下で作用するものと考察された。また、*qSCL2*, *qSCC1*, *qSCC4* ならびに *qBBC2*, *qBBH1* は、2021 年幕別のみで検出された。2021 年幕別については、4 環境のうち、積算温度が低くかつ日射量が多かったことから、これらの QTL が、当該環境下で作用するものと考察された。*qBBH2* は、2020 年芽室で検出された。2020 年芽室は、高温かつ日射量が少なかったことから、当該環境下で作用するものと考察された。

*qSCH2* は、2021 年の 2 地点で検出された。2021 年は、2020 年と比較して 2 地点とも積算日射量が多かったことから、*qSCH2* が、温度の影響を受けないが、日射量の多い環境下で作用するものと考察された。*qSCH3* は、2020 年幕別以外の 3 環境で検出されたことから、2020 年幕別のような低温と少ない日射量では作用しないものと考察された。一方で、*qBBL1* と *qBBH4* は、2020 年芽室以外の 3 環境で検出された。2020 年芽室のような高温で日射量が少ない環境では作用しないものと考察された。アズキの種皮色と環境との交互作用については、収穫を早めると種皮色が明るくなる（由田ら 1991）、播種日が遅くなるに従って種皮色は明るくなる（佐藤ら 1993）、開花日が遅くなるに従って種皮色が明るくなる傾向がある（加藤・目黒 1994）などの間接的な登熟期間の温度との交互作用について報告されている。さらに、直接的に登熟期間の温度との交互作用については、開花 15 日以降の 2 週間に 28℃以上の日が多くなると種皮色が濃赤色となり（長濱 2003）、登熟期間が高温になるほど色相は赤味を増し、明度と彩度は低下し濃赤色となる（長岡ら 2004）と報告されている。今後、本研究で特定した各 QTL と環境の相互作用を解明するために、環境制御下での検証を実施する必要がある。

#### 3-4-4 種皮と煮豆の色相角に関わる *qSCH2* と *qBBH3* の候補遺伝子

第 10 染色体の DNA マーカー AZ10\_23.8M\_ID (23.8Mb) と AZ10\_28.5M\_ID (28.5Mb) 間に特定された種皮の色相角に関与する *qSCH2* と煮豆の色相角に関与する *qBBH3* が特定された。本ゲノム領域には、フラボノイド色素の生合成酵素に関わる Chalcone synthase (CHS) 遺伝子と推定された「Vigan.10G233700.01」がコードされている。また、当該遺伝子には、フラボノイドの基本骨格の合成となる最初の段階を触媒し、1 分子の p-クマロイル CoA (*p*-coumaroyl-CoA) に 3 分子のマロニル (CoAmalonyl-CoA) を逐次的に縮合させ、カルコンを生成する。(Hahlbrock and Scheel 1989, Nakayama *et al.* 2019)。今後、本研究で確認された当該遺伝子のアミノ酸置換が、CHS の活性に影響して、種皮と煮豆の色相角に関わるかの検証が必要である。

#### 3-4-5 アン色の DNA マーカー選抜育種の可能性

本研究によって、アン色と関連する煮豆色、ならびに種皮色に関わる新たな 17 個の QTL をマッピングした。このうち、「紫さやか」の優れたアン色に影響する煮豆の色相角に関わる *qBBH1*, *qBBH3*, *qBBH4* の最近傍の DNA マーカーの AZ03\_1.1M\_ID, AZ10\_28.5M\_ID, AZ11\_35.4M\_ID を全て「紫さやか」型にもつ系統群は、他の遺伝子型の系統群と比較して、4 環境ともに最小の色相角となった。従って、当該マーカーが選抜マーカーとしての有効であることが示された。今後の育種において、「紫さやか」の色相角に関わる *qBBH1*, *qBBH3*, *qBBH4* を識別する DNA マーカーを活用することで、「紫さやか」の紫色のアン色を維持しながら、他の有用形質を導入や改良の迅速化が期待できる。さらに、今後、「紫さやか」の特徴である色相角に

関わる QTL の責任遺伝子を同定することで、アン色の制御機構の分子機構を解明するとともに、遺伝子型の高精度な選抜技術の確立も期待される。

表 3-1. 「紫さやか」と「エリモショウズ」における調査形質の平均値と標準偏差

形 質	年次	芽室				幕別			
		紫さやか		エリモショウズ		紫さやか		エリモショウズ	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
種皮色 明度	2020	23.9	0.5	25.2	1.1	25.8	0.6	27.2	0.5
SCL (L*)	2021	27.0	0.3	27.1	0.6	27.1	0.2	27.2	0.1
種皮色 彩度	2020	21.0	1.6	22.2	1.8	27.5	0.6	25.4	0.5 *
SCC (C*)	2021	27.5	0.4	27.1	0.4	26.4	0.3	26.6	0.3
種皮色 色相角	2020	29.1	0.6	31.2	1.1 *	33.0	1.7	36.8	2.1 *
SCH (h)	2021	32.7	0.6	35.2	0.4 **	33.2	0.4	36.9	0.9 **
煮豆色 明度	2020	23.8	0.4	24.0	1.8	28.0	0.4	29.2	0.9
BBL (L*)	2021	26.2	0.2	27.2	0.5	26.2	0.2	26.6	0.2
煮豆色 彩度	2020	13.6	0.5	14.2	1.2	14.4	0.6	15.1	0.6
BBC (C*)	2021	12.6	0.1	13.4	0.5	13.1	0.1	13.7	0.2
煮豆色 色相角	2020	24.2	0.2	29.2	0.8 **	24.9	1.1	30.5	1.9 **
BBH (h)	2021	24.4	0.2	28.9	1.0 **	25.2	0.8	31.6	1.3 **

\*, \*\*は t 検定でそれぞれ5%, 1%水準で「紫さやか」と有意差があることを示す.



表 3 - 2 . DNA マーカーの分離比

染色体	マーカー名	マーカー 種類	ポジション (Mbp)	マーカー分離比			$\chi^2$ (31:2:31)	P 値
				紫さやか	ヘテロ接合	エリモショウス <sup>*</sup>		
1	AZ01_9.6M_ID	InDel	9.6	76	4	70	0.35	0.84
1	AZ01_14.7M_ID	InDel	14.8	77	4	69	0.54	0.76
1	AZ01_31.6M_ID	InDel	31.7	75	2	73	1.62	0.45
1	AZ01_36.9M_ID	InDel	37.0	79	5	66	1.18	0.55
1	AZ01_41.0M_ID	InDel	41.1	70	2	78	2.03	0.36
1	AZ01_47.4M_ID	InDel	47.4	65	4	81	1.87	0.39
1	AZ01_51.0M_ID	InDel	51.0	73	3	74	0.63	0.73
2	AZ02_40.2M_DC	dCAPS	40.2	74	6	70	0.49	0.78
3	AZ03_1.1M_ID	InDel	1.1	78	6	66	1.37	0.50
3	AZ03_6.1M_ID	InDel	6.2	75	2	73	1.62	0.45
3	AZ03_13.2M_ID	InDel	13.2	77	4	69	0.54	0.76
3	AZ03_18.7M_ID	InDel	18.7	79	5	66	1.18	0.55
3	AZ03_24.4M_ID	InDel	24.4	65	8	77	3.41	0.18
3	AZ03_29.9M_ID	InDel	30.0	68	9	73	4.27	0.12
3	AZ03_34.8M_ID	InDel	34.8	70	6	74	0.49	0.78
3	AZ03_38.0M_ID	InDel	38.0	66	5	79	1.18	0.55
3	AZ03_42.0M_ID	InDel	42.1	68	6	76	0.82	0.66
4	AZ04_1.8M_ID	InDel	1.8	74	6	70	0.49	0.78
4	AZ04_6.9M_ID	InDel	7.0	86	4	60	4.76	0.09
4	AZ04_10.2M_ID	InDel	10.3	85	3	62	4.27	0.12
4	AZ04_22.7M_DC	dCAPS	22.8	77	6	67	1.07	0.59
4	AZ04_34.5M_ID	InDel	34.6	84	4	62	3.43	0.18
5	AZ05_2.5M_ID	InDel	2.6	70	4	76	0.35	0.84
7	AZ07_0.4M_ID	InDel	0.4	87	4	59	5.50	0.06
7	AZ07_31.7M_ID	InDel	31.8	80	5	65	1.57	0.46
7	AZ07_33.1M_ID	InDel	33.2	79	1	70	3.55	0.17
8	AZ08_6.0M_ID	InDel	6.1	81	6	63	2.61	0.27
8	AZ08_11.1M_ID	InDel	11.1	84	5	61	3.66	0.16
8	AZ08_17.2M_ID	InDel	17.2	65	7	78	2.34	0.31
10	AZ10_0.8M_CA	CAPS	0.9	63	8	79	4.18	0.12
10	AZ10_4.6M_ID	InDel	4.7	63	3	84	3.66	0.16
10	AZ10_23.8M_ID	InDel	23.8	65	4	81	1.87	0.39
10	AZ10_28.5M_ID	InDel	28.6	82	3	65	2.62	0.27
11	AZ11_0.2M_ID	InDel	0.3	70	4	76	0.35	0.84
11	AZ11_0.3M_ID	InDel	0.4	68	2	80	2.58	0.28
11	AZ11_4.5M_ID	InDel	4.5	75	2	73	1.62	0.45
11	AZ11_35.4M_ID	InDel	35.4	83	3	64	3.11	0.21
11	AZ11_36.5M_ID	InDel	36.6	83	6	61	3.71	0.16

表 3－3. 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の交雑に由来する組換え自殖系統 F<sub>6</sub> (2020) と F<sub>7</sub> (2021) における種皮色と煮豆色の相関関係

形質	栽培地	年次	SL21芽	SL20幕	SL21幕	SC20芽	SC21芽	SC20幕	SC21幕	SH20芽	SH21芽	SH20幕	SH21幕
SCL	芽室	2020 (SL20芽)	-0.045	-0.308 ***	0.112	0.598 ***	0.120	0.064	0.096	0.777 ***	0.116	-0.017	0.161 *
		2021 (SL21芽)		0.097	0.330 ***	-0.250 **	0.068	-0.218 **	0.093	-0.048	0.515 ***	0.141	0.293 ***
	幕別	2020 (SL20幕)			0.058	-0.062	-0.026	-0.028	0.091	-0.166 *	-0.058	0.544 ***	0.001
		2021 (SL21幕)				-0.188 *	0.196 *	0.059	0.638 ***	-0.092	0.213 **	0.171 *	0.614 ***
SCC	芽室	2020 (SC20芽)					0.168 *	0.230 **	0.157	0.667 ***	-0.009	-0.001	-0.030
		2021 (SC21芽)						0.278 ***	0.323 ***	0.096	0.080	0.146	0.046
	幕別	2020 (SC20幕)							0.206 *	0.066	0.030	0.411 ***	0.125
		2021 (SC21幕)								-0.007	0.083	0.108	0.435 ***
SCH	芽室	2020 (SH20芽)									0.247 **	0.213 **	0.215 **
		2021 (SH21芽)										0.274 ***	0.597 ***
	幕別	2020 (SH20幕)											0.306 ***

\*, \*\*, \*\*\* はそれぞれ 5 %, 1 %, 0.1% で有意相関があることを示す.

表 3－3．続き

形質	栽培地	年次		BL20芽	BL21芽	BL20幕	BL21幕	BC20芽	BC21芽	BC20幕	BC21幕	BH20芽	BH21芽	BH20幕	BH21幕
SCL	芽室	2020	(SL20芽)	0.656 ***	-0.042	0.020	0.163 *	-0.217 **	0.210 **	-0.044	0.048	-0.239 **	0.049	-0.027	0.167 *
		2021	(SL21芽)	-0.130	0.168 *	0.084	0.194 *	-0.112	-0.057	-0.205 *	0.014	0.259 **	0.137	0.072	0.181 *
	幕別	2020	(SL20幕)	-0.105	0.141	0.238 **	-0.019	0.160	-0.208 *	-0.062	0.101	0.061	0.031	0.192 *	0.017
		2021	(SL21幕)	0.088	0.120	0.051	0.574 ***	-0.156	-0.153	-0.018	0.241 **	0.066	0.079	0.079	0.222
SCC	芽室	2020	(SC20芽)	0.518 ***	-0.004	0.100	-0.044	0.028	0.128	0.123	-0.036	-0.279 ***	0.029	0.040	0.102
		2021	(SC21芽)	0.061	0.246 **	0.078	0.181 *	0.069	0.002	0.129	-0.064	-0.062	-0.024	0.077	-0.070
	幕別	2020	(SC20幕)	0.164 *	0.106	0.417 ***	0.277 ***	0.050	-0.001	0.067	-0.126	-0.012	0.059	0.206 *	0.123
		2021	(SC21幕)	0.104	0.265 **	0.104	0.562 ***	-0.030	-0.086	0.017	0.386 ***	-0.035	0.006	0.114	0.173
SCH	芽室	2020	(SH20芽)	0.531 ***	0.103	0.068	-0.005	-0.037	0.245 **	0.014	-0.022	0.210 **	0.257 **	0.293 ***	0.210 **
		2021	(SH21芽)	0.089	0.288 ***	0.241 **	0.250 **	-0.089	0.215 **	-0.151	-0.069	0.344 ***	0.627 ***	0.272 ***	0.497 ***
	幕別	2020	(SH20幕)	0.075	0.200 *	0.344 ***	0.262 **	0.070	-0.046	-0.053	-0.078	0.355 ***	0.225 **	0.466 ***	0.241 **
		2021	(SH21幕)	0.244 **	0.308 ***	0.210 **	0.538 ***	-0.030	0.178 *	-0.041	0.140	0.241 **	0.477 ***	0.269 ***	0.646 ***
BBL	芽室	2020	(BL20芽)		0.137	0.161 *	0.137	-0.007	0.166 *	0.120	0.135	0.246 **	0.060	0.014	0.249 **
		2021	(BL21芽)			0.099	0.289 ***	0.052	-0.193 *	-0.002	-0.021	0.096	0.355 ***	0.191 *	0.213 **
	幕別	2020	(BL20幕)				0.137	-0.007	0.166 *	-0.239 **	0.135	-0.010	0.060	0.306 ***	0.249 **
		2021	(BL21幕)					-0.097	0.025	0.001	0.055	0.062	0.123	0.155	0.448 ***
BBC	芽室	2020	(BC20芽)						0.026	0.386 ***	0.102	-0.015	0.041	-0.153	0.018
		2021	(BC21芽)							0.045	0.028	0.004	0.330 ***	0.066	0.296 ***
	幕別	2020	(BC20幕)								0.204 *	0.019	0.091	-0.087	0.026
		2021	(BC21幕)									0.117	-0.057	-0.146	0.206 *
BBH	芽室	2020	(BH20芽)										0.249 **	0.288 ***	0.210 **
		2021	(BH21芽)											0.281 ***	0.429 ***
	幕別	2020	(BH20幕)												0.213 **

\*, \*\*, \*\*\* はそれぞれ 5 %, 1 %, 0.1% で有意相関があることを示す。

表 3-4. 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の交雑に由来する組換え自殖系統 F<sub>6</sub> (2020) と F<sub>7</sub> (2021) における種皮色と煮豆色に関する QTL のリスト

形質	QTL	染色体	年次	芽室					幕別					Multi-QTL 寄与率 (%)	
				ピーク位置 (cM)	近接マーカー	LOD 値	相加 効果 <sup>a</sup>	寄与率 (%)	ピーク位置 (cM)	近接マーカー	LOD 値	相加 効果 <sup>a</sup>	寄与率 (%)		
種皮	明度	<i>qSCL1</i>	10	2021	76.0	AZ10_28.5M_ID	2.6	-0.1	7.5					10.4	
		<i>qSCL2</i>	11	2021						4.7	AZ11_4.5M_ID	2.2	0.2		6.5
	彩度	<i>qSCC1</i>	4	2021						29.3	AZ04_10.2M_ID	2.5	0.2	5.7	17.6
		<i>qSCC2</i>	7	2021	38.6	AZ07_33.1M_ID	3.0	-0.1	7.6						
		<i>qSCC3</i>	8	2020						8.0	AZ08_11.1M_ID	4.4	-0.6	12.5	
		<i>qSCC4</i>	11	2021						5.4	AZ11_4.5M_ID	3.0	0.2	6.8	
	色相角	<i>qSCH1</i>	3	2021	7.0	AZ03_6.1M_ID	5.5	-0.3	7.7					23.1	
		<i>qSCH2</i>	10	2021	65.0	AZ10_23.8M_ID	9.3	-0.5	13.8	62.0	AZ10_23.8M_ID	2.8	-0.3		4.7
		<i>qSCH3</i>	11	2020	27.1	AZ11_36.5M_ID	4.4	-0.4	9.2						
			2021	28.1	AZ11_36.5M_ID	5.8	-0.4	8.1	31.1	AZ11_36.5M_ID	7.6	-0.5	15.1		
煮豆	明度	<i>qBBL1</i>	11	2020						27.1	AZ11_36.5M_ID	3.0	-0.5	8.7	—
				2021	29.1	AZ11_36.5M_ID	3.1	-0.2	9.0	28.1	AZ11_36.5M_ID	2.6	-0.2	6.2	
	彩度	<i>qBBC1</i>	1	2021	0.2	AZ01_9.6M_ID	2.4	0.1	5.8					22.3	
		<i>qBBC2</i>	10	2021						62.0	AZ10_23.8M_ID	4.2	0.2		12.1
		<i>qBBC3</i>	11	2021	31.1	AZ11_36.5M_ID	3.4	-0.1	9.2						
	色相角	<i>qBBH1</i>	3	2021						1.0	AZ03_1.1M_ID	2.9	-0.5	4.4	25.3
		<i>qBBH2</i>	10	2020	3.0	AZ10_0.8M_CA	2.3	0.6	6.7						
		<i>qBBH3</i>	10	2021	74.0	AZ10_28.5M_ID	4.2	-0.5	8.1						
		<i>qBBH4</i>	11	2020						21.1	AZ11_35.4M_ID	2.3	-0.7	6.9	
	2021		26.1	AZ11_35.4M_ID	4.8	-0.6	9.4	25.1	AZ11_35.4M_ID	3.6	-0.5	5.5			

<sup>a</sup> 「紫さやか」型対立遺伝子の相加効果.

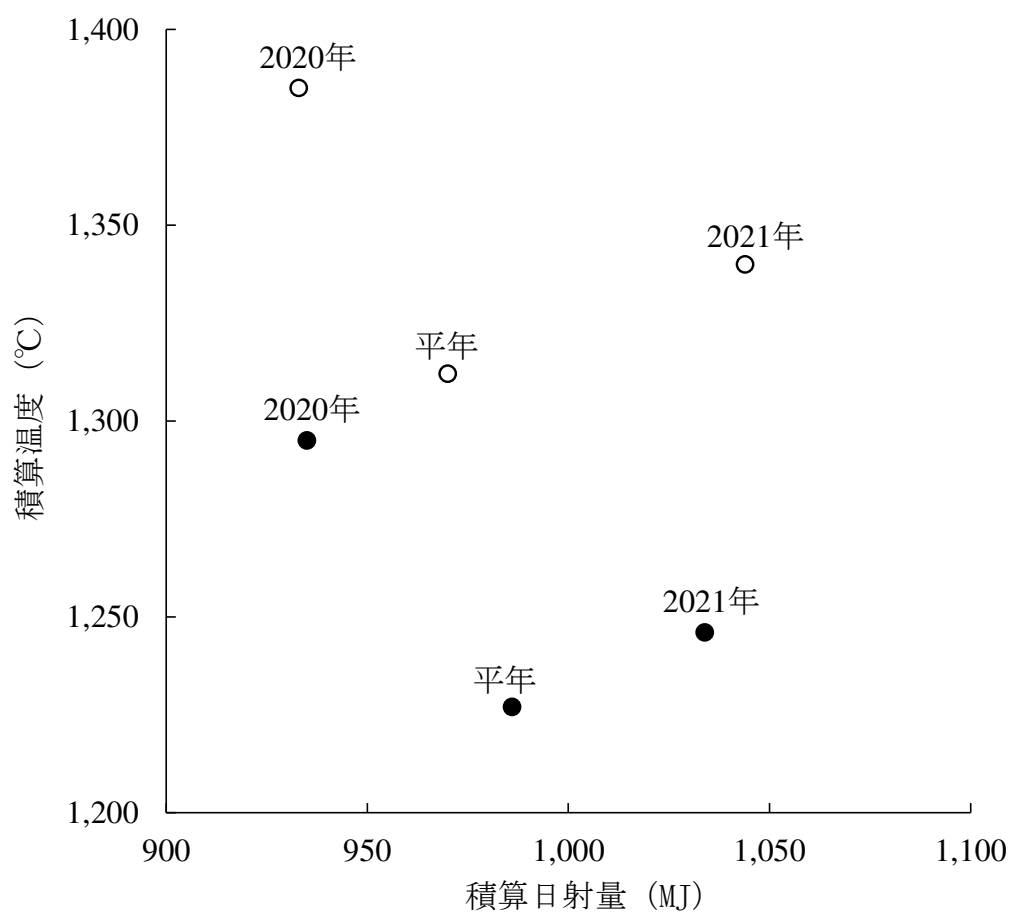


図 3 - 1 . 本研究で試験栽培した 4 環境と平年の登熟期間（7 月 21 日から 9 月 30 日）における積算温度と積算日射量.  
○と●は、それぞれ芽室町と幕別町を示す.

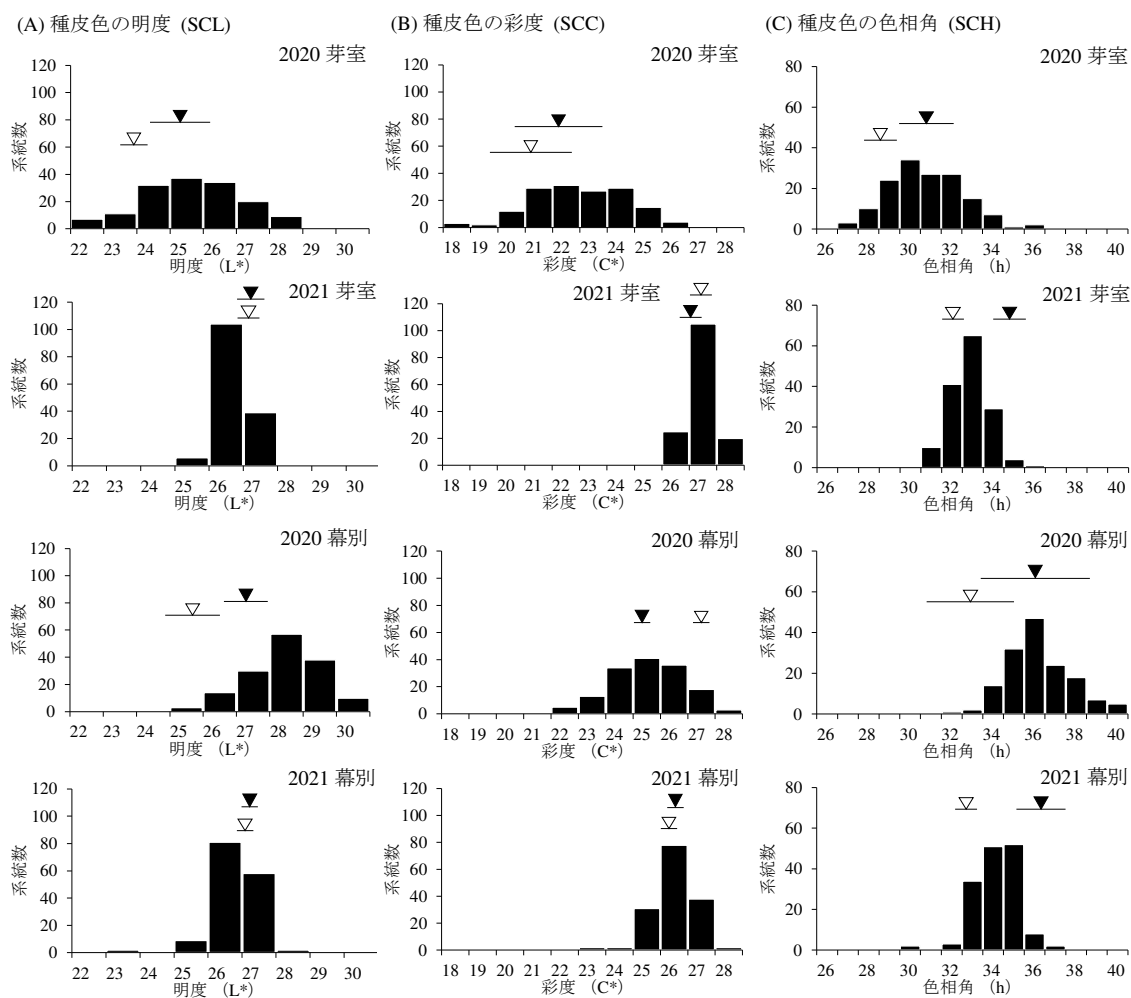


図 3-2. 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の交雑に由来する組換え自殖系統における種皮色の明度，彩度，色相角の頻度分布。

「紫さやか」および「エリモショウズ」の平均値をそれぞれ▽および▼で示し，下線は標準偏差の範囲を示す。

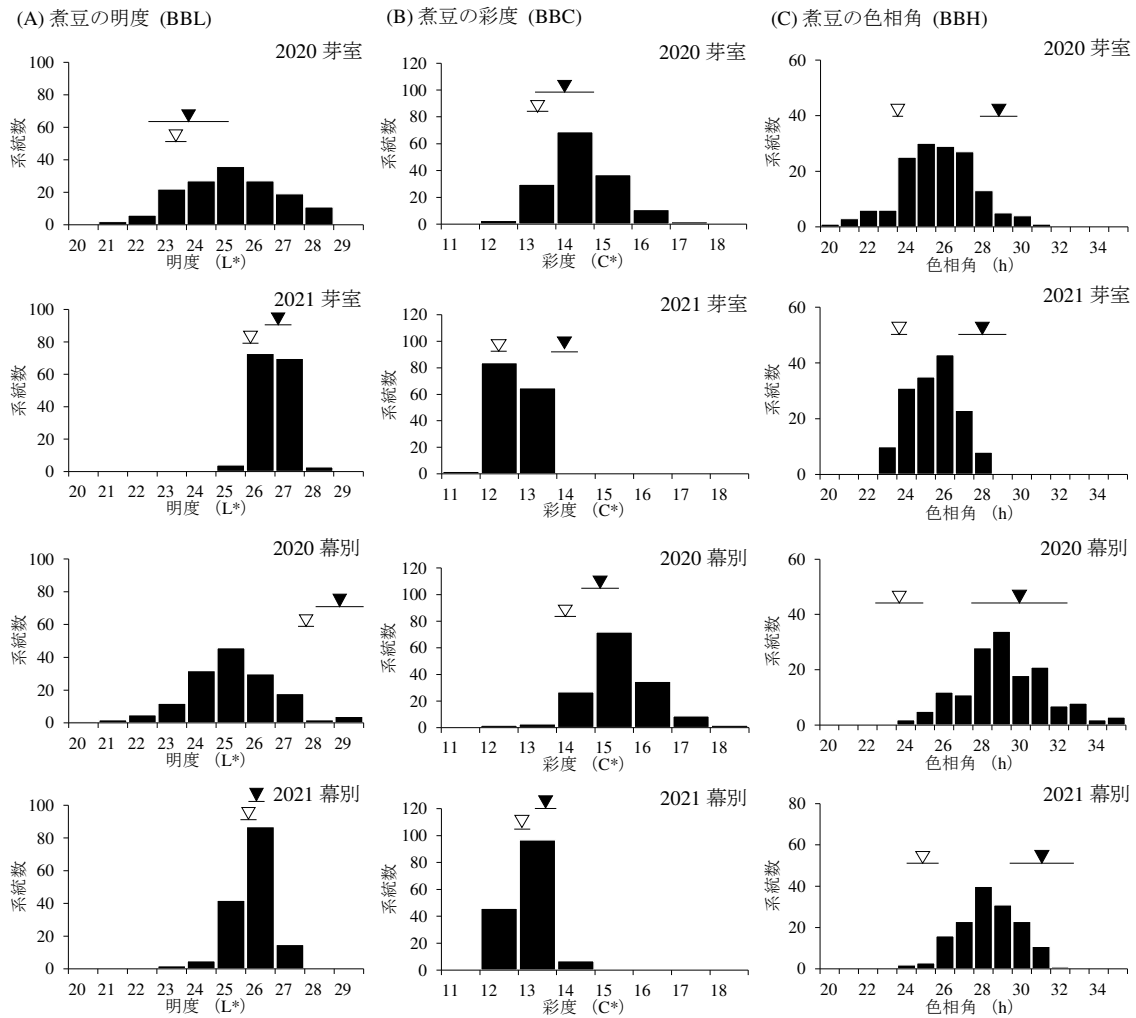


図 3-3. 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の交雑に由来する組換え自殖系統における煮豆の明度，彩度，色相角の頻度分布．

「紫さやか」および「エリモショウズ」の平均値をそれぞれ▽および▼で示し，下線は標準偏差の範囲を表す．

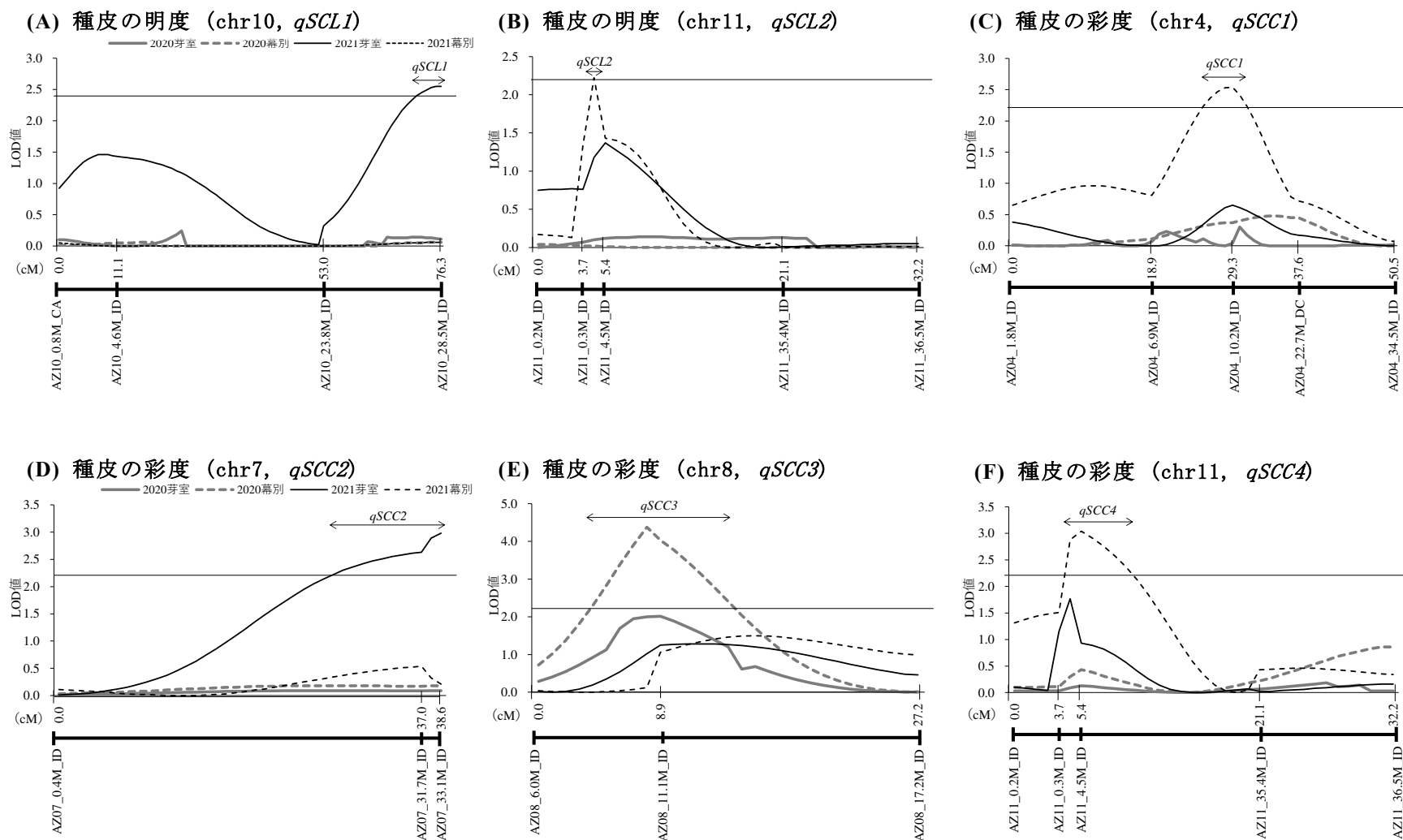


図3-4. 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の交雑に由来する組換え自殖系統  $F_6$  (2020) と  $F_7$  (2021) を用いた種皮色と煮豆色に関する LOD 曲線および連鎖地図と連鎖する DNA マーカー. LOD 値の閾値は 1,000 回の permutation test により決定した ( $p < 0.05$ ).



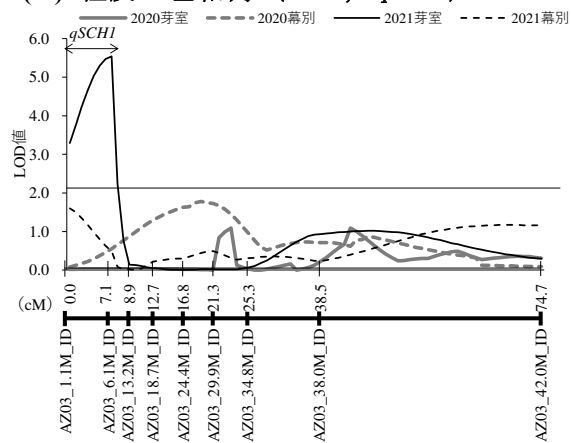
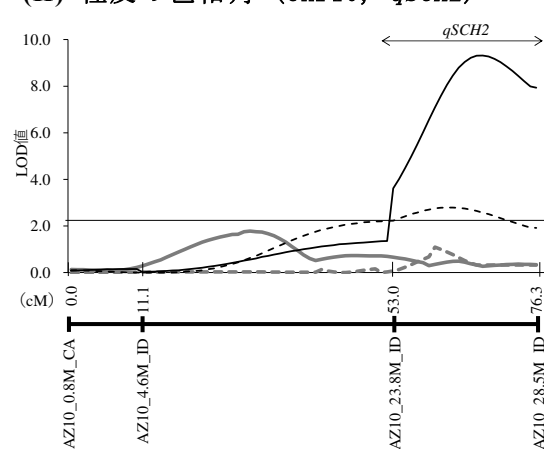
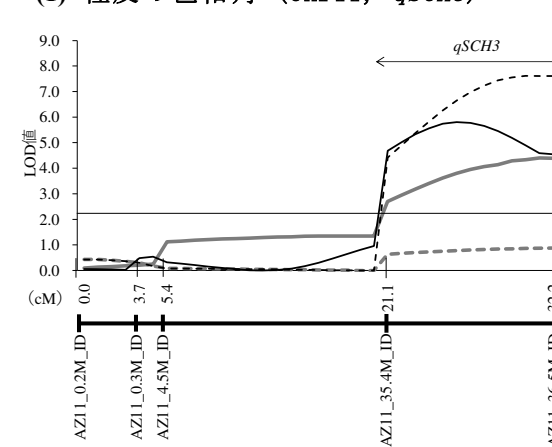
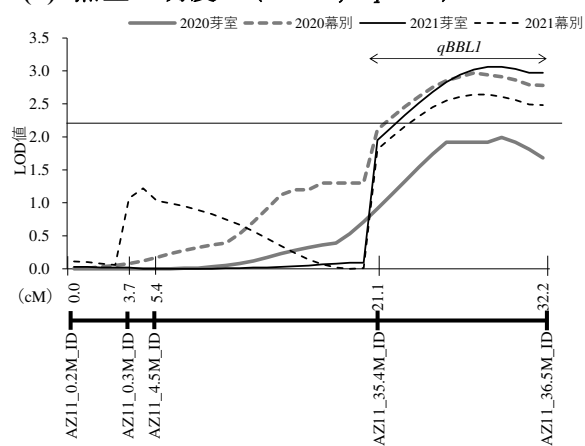
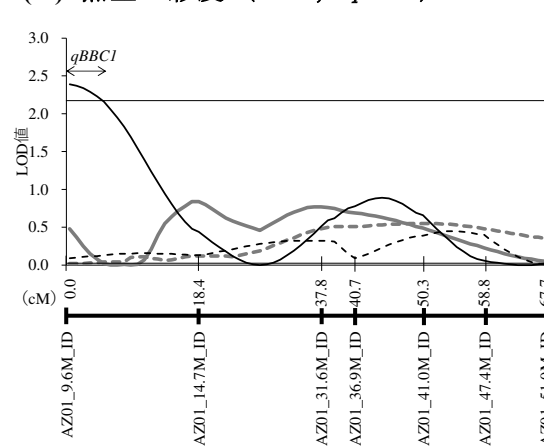
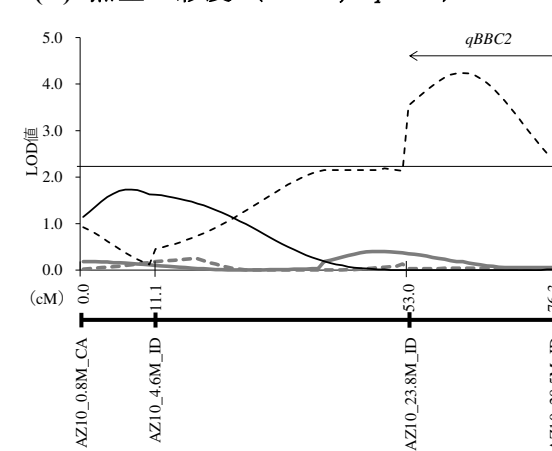
(G) 種皮の色相角 (chr3, *qSCH1*)(H) 種皮の色相角 (chr10, *qSCH2*)(I) 種皮の色相角 (chr11, *qSCH3*)(J) 煮豆の明度 (chr11, *qBBL1*)(K) 煮豆の彩度 (chr1, *qBBC1*)(L) 煮豆の彩度 (chr10, *qBBC2*)

図3-4. 続き1.

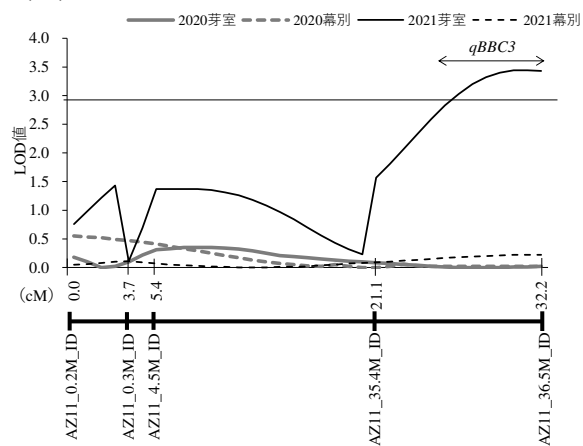
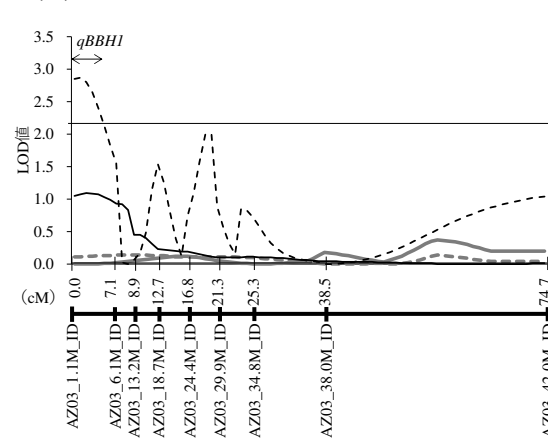
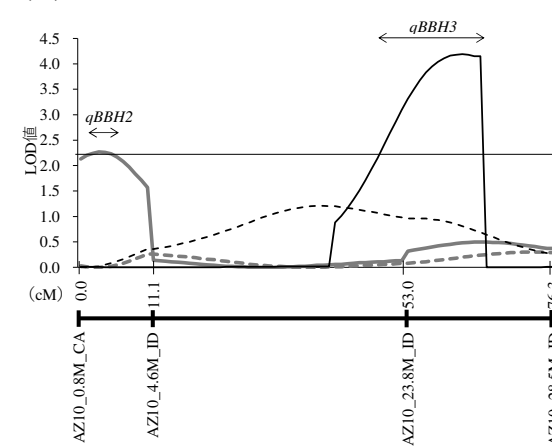
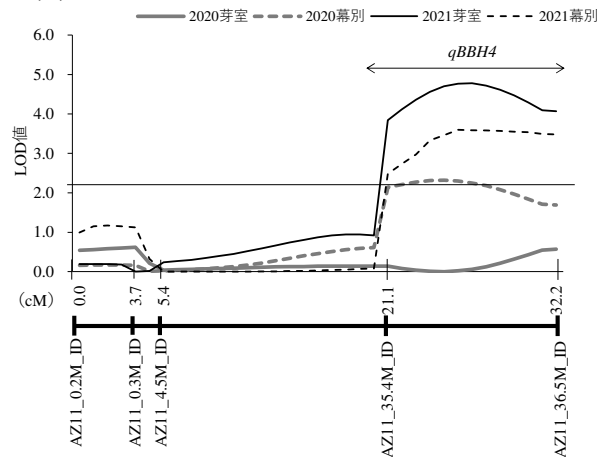
(M) 煮豆の彩度 (chr11, *qBBC3*)(N) 煮豆の色相角 (chr3, *qBBH1*)(O) 煮豆の色相角 (chr10, *qBBH2*, *qBBH3*)(P) 煮豆の色相角 chr11, *qBBH4*)

図 3 - 4. 続き 2.

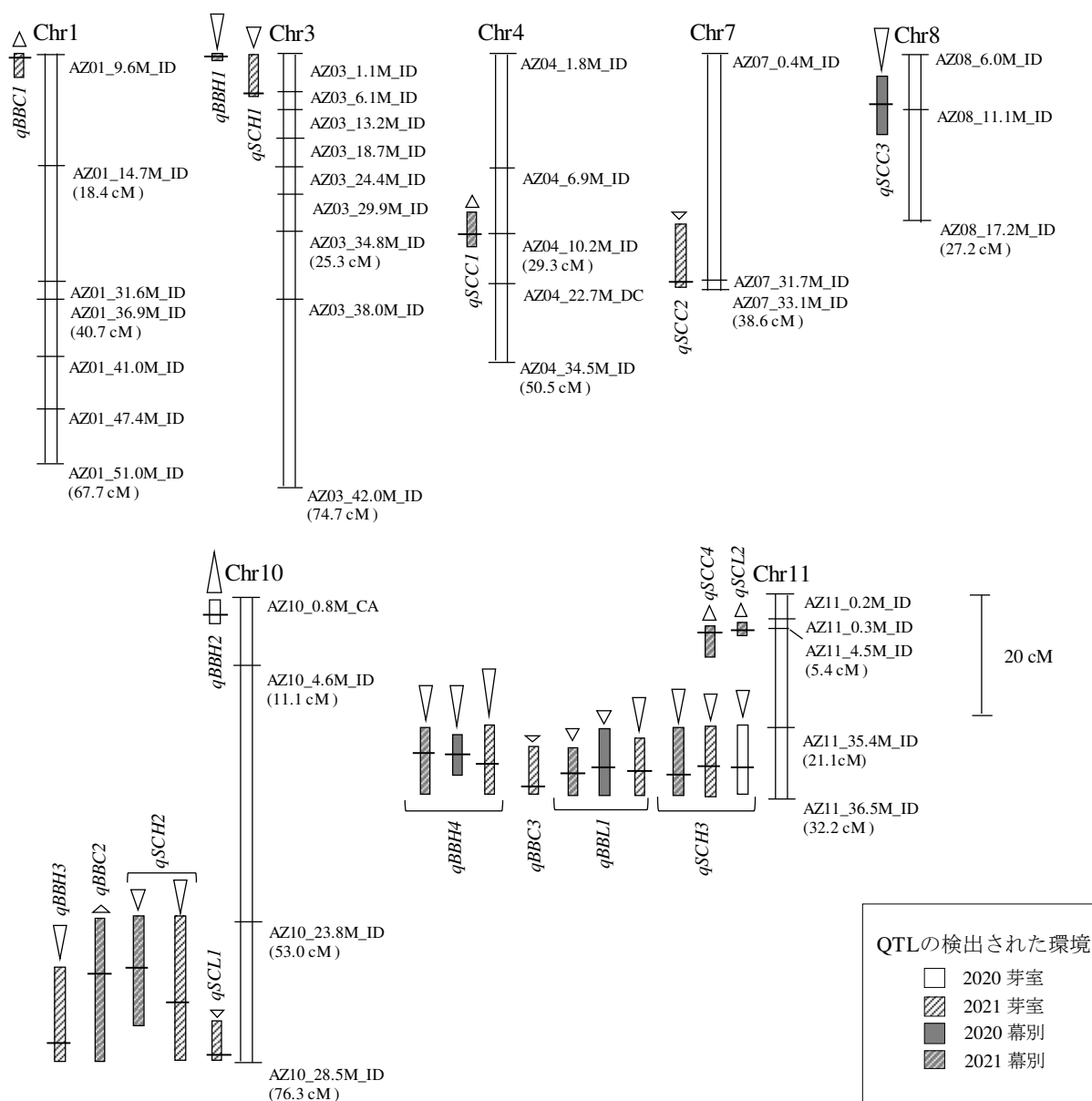


図 3-5. 種皮色と煮豆色に関する QTL のゲノム位置.

△は「紫さやか」型対立遺伝子が形質値を上げ、▽は形質値を下げることを示す. 三角形の高さは相加効果の大きさを表す.

QTL 領域の横線は LOD のピークを示す.

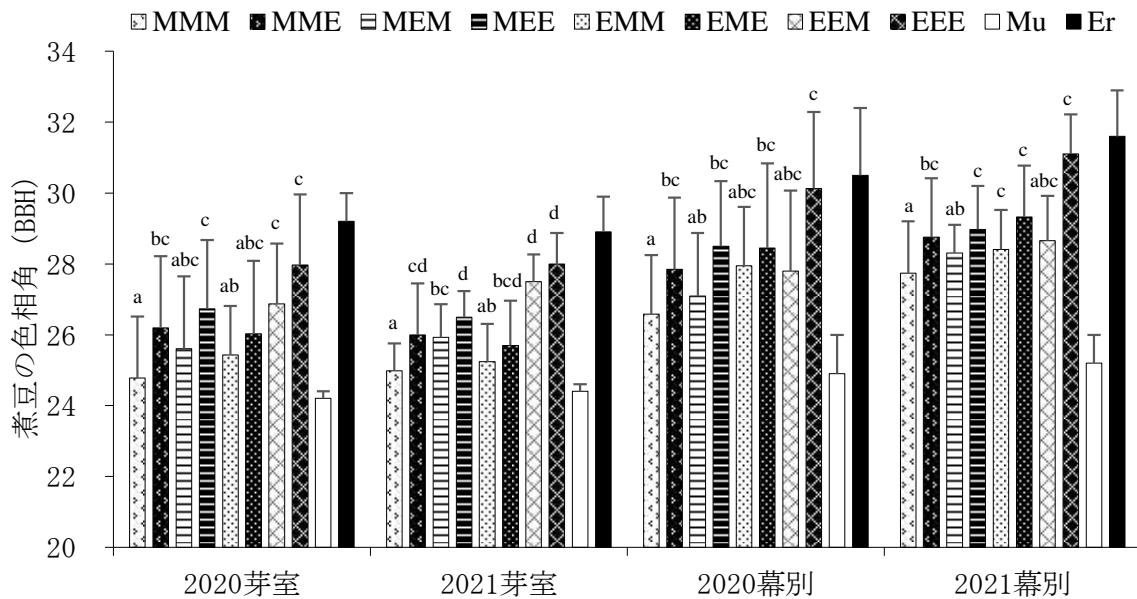


図3-6. 組換え自殖系統について  $qBBH1$ ,  $qBBH3$ ,  $qBBH4$  の近傍マーカーの遺伝子型系統ごとの4環境における煮豆の色相角の平均値+標準偏差. 遺伝子型は, 左から順に AZ03\_1.1M\_ID( $qBBH1$ ), AZ10\_28.5M\_ID( $qBBH3$ ), AZ11\_35.4M\_ID( $qBBH4$ ) を示した.

遺伝子型の M は「紫さやか」, E は「エリモショウズ」を示す. Mu は「紫さやか」, Er は「エリモショウズ」を示す.

各栽培環境における8遺伝子型の煮豆の色相角について, アルファベットの異文字間に5%水準で差異のあることを示す (Tukey-Kramer 法).

## 第4章 収量関連形質と機械化栽培適性に 関与する胚軸長の量的形質遺伝子座の解析

### 4-1 緒言

アズキの収量には、着莢数、一莢内粒数、百粒重が関与し、他に開花期、主茎長、主茎節数、分枝数などの草型形質が間接的に関与している。これまでに、在来種と近縁種間、栽培種と祖先野生種間の交雑に由来する組換え自殖系統 ( $F_2 \sim F_4$ ) と残余ヘテロ接合系統 ( $F_{2:3}$ ,  $BC_1F_{1:2}$ ) を用いて、主茎長に関わる 10 個の QTL (Isemura *et al.* 2007, Kaga *et al.* 2008), 主茎節数に関わる 3 個の QTL (Isemura *et al.* 2007, Li *et al.* 2017), 子実重に関わる 2 個の QTL (Kaga *et al.* 2008), 着莢数に関わる 2 個の QTL (Kaga *et al.* 2008), 一莢内粒数に関わる 7 個の QTL (Kaga *et al.* 2008, Li *et al.* 2017), 百粒重に関わる 17 個の QTL が報告されている (Isemura *et al.* 2007, Kaga *et al.* 2008, Li *et al.* 2017)。また、アズキの開花始までの日数に関わる、16 個の QTL が同定され (Isemura *et al.* 2007, Kaga *et al.* 2008, Li *et al.* 2017, Liu *et al.* 2016), さらに開花の日長感受性遺伝子 *FDI* が報告されている (Yamamoto *et al.* 2016)。これら既報の QTL は、第 6 と 8 染色体を除く 9 本の染色体に特定されている (Isemura *et al.* 2007, Kaga *et al.* 2008, Li *et al.* 2017)。今後、品種間の多様性に関わる新たな収量関連形質の QTL の特定と環境との交互作用の解明が課題である。

現在、国内では農業就業人口の減少による労働力不足から、初期生育から機械除草と立毛のままダイレクトに機械収穫が可能な省労力栽培が可

能な品種が望まれている。地際から初生葉節までの胚軸長の短い品種では、初期生育の機械除草により幼植物体が埋没し消失するリスクが高まる。さらに、胚軸長の短い品種では最下着莢位置が低くなることから、機械収穫時には莢が切断される、あるいは刈り残される莢が多くなって、収穫損失が多くなる（島田 2009）。このため、ダイズ並の 10 cm 以上の胚軸長の品種が必要とされている。これまでに、在来種と近縁種間の交雑に由来する組換え自殖系統（ $F_2$ ）と残余ヘテロ接合系統（ $F_{2:3}$ ,  $BC_1F_{1:2}$ ）を用いた胚軸長に関する QTL 解析によって、*Ec12.1.1*, *Ec12.1.2*, *Ec11.2.1* が特定されている（Isemura *et al.* 2007）。いずれも、栽培種の対立遺伝子が胚軸長を長くした。また、栽培品種「京都大納言」と祖先野生種間の交雑に由来する組換え自殖系統（ $F_2$ ）と残余ヘテロ接合系統（ $F_{2:3}$ ）を用いて栽培品種の対立遺伝子が胚軸長を長くする 2 個の QTL *Ec13.1.1*, *Ec13.9.1* が報告されている（Kaga *et al.* 2008）。これら、栽培品種の有する胚軸長を長くする QTL のうち、*Ec12.1.1* と *Ec13.1.1* は（Isemura *et al.* 2007, Kaga *et al.* 2008）、それぞれ同じ第 1 染色体の共通の DNA マーカーに連鎖することから、同じ遺伝子座の可能性もある。さらに、普通胚軸長の品種「エリモ 167」と十勝農業試験場の育成系統の長胚軸系統「十系 1121」間の交雑に由来する  $F_2$  集団を用いた QTL 解析によって、胚軸長に関わる *qECL2*, *qECL4*, *qECL7*, *qECL10* が同定された（Mori *et al.* 2021）。このうち、*Ec11.2.1*（Isemura *et al.* 2007）と *qECL2*（Mori *et al.* 2021）は、第 2 染色体の SSR マーカー CEDG009 と連鎖することから、同じ遺伝子座の可能性もある（Mori *et al.* 2021）。

「紫さやか」は、開花始、主茎長、主茎節数、分枝数、着莢数、一莢内粒数、子実重は両親の「エリモショウズ」と「しゅまり」とほぼ同等であ

るが、その遺伝的制御機構の異同は不明である。また、「紫さやか」の粒大は、両親の「エリモショウズ」より 14%、「しゅまり」より 7%、それぞれ大粒である（長岡ら 2020）。さらに、胚軸長は、「エリモショウズ」の約 2 倍で「しゅまり」とほぼ同等である（長岡ら 2020）。「紫さやか」の農業特性が、どのように遺伝的に制御されているかは不明である。

本章では、「紫さやか」と「エリモショウズ」間の交雑に由来する組換え自殖系統を用いて、着莢数、一莢内粒数、百粒重、開花始、主茎長、主茎節数、分枝数、胚軸長に関する QTL の特定と QTL 間の相互作用ならびに QTL と環境との交互作用の解明を目的とした。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 植物材料

第 3 章の 3-2-1 で記した植物材料を用いた。

### 4-2-3 形質評価

各系統の反復毎に、始めて開花した株を観察した日を開花始（flower - days to first flower, FLD）として記録し、播種から開花始までの日数で表した。収穫時には、各反復 2 株から 9 株をランダムに選定して、以下の形質を調査した。地際から主茎頂部の生長点までの長さを主茎長（stem length, STL）とし、反復あたり各系統 5 株を調査して平均値を求めた。また、開花期の 7 月下旬には、地際から初生葉節までの長さを計測し、胚軸長（epicotyl length, ECL）として記録した。初葉節から主茎頂部の節までの節数を主茎節数（branch number, BRN）とした。2 節以上を発達させ

て、かつ着莢した分枝を分枝数 (lateral branch number, LBN) とした。

収穫後、十分に乾燥させて、各反復 2 株から 9 株をランダムに選定して、以下の収量関連形質を調査した。1 株当りの着莢数 (pod - total number, PDTN)、および各反復 3 株以上の 100 莢以上の粒数を数え、一莢内の平均粒数を求めて、一莢内粒数 (seed - number of seeds per pod, SDNPPD) とした。各反復 5 株について、脱粒と唐箕選した後に、一株当りの子実重を 1 株分測定して、子実重 (seed - total weight, SDTWT) とした。各系統について、10 株から調整した子実を用いて、任意に 100 粒を抽出し、2 回分の独立の計測の平均値を百粒重 (seed - 100 seeds weight, SD100WT) とした。

#### 4-2-4 QTL 解析

第 3 章の 3-3-4 で作成した連鎖地図を用いて、3-2-4 に従って QTL 解析を行った。

### 4-3 結 果

#### 4-3-1 初期生育と登熟期間の気温

各栽培地区における 6 月 1 日から 7 月 20 日までの開花始までの初期生育の積算温度と 7 月 21 日から 9 月 30 日までの登熟期間の積算温度を図 4-1 に示した。初期生育の積算温度は、芽室では 2020 年で 864℃、2021 年で 902℃と、両年とも平年 (789℃) より高く、幕別でも 2020 年で 757℃、2021 年で 821℃と、平年 (713℃) より高かった。登熟期間の積算温度も、芽室では 2020 年で 1,385℃、2021 年で 1,340℃と、両年とも平年 (1,312℃)



より高く、幕別でも2020年で1,295℃、2021年で1,246℃と、平年(1,227℃)より高かった。また、初期生育期間と登熟期間の気温のどちらも、2カ年とも芽室で幕別よりも高かった。

#### 4-3-2 親品種の特性

「紫さやか」と「エリモショウズ」の表現型を表4-1に示した。胚軸長については、4環境で「紫さやか」が「エリモショウズ」より2.1 cm～2.3 cm長かった ( $p < 0.01$ )。また、両品種の胚軸長は、芽室が幕別より長くなった。主茎節数については、2021年の幕別で「紫さやか」が少なくなった ( $p < 0.05$ )。開花始、主茎長、分枝については、いずれの環境においても、品種間差異は無かった。

百粒重については、4環境ともに「紫さやか」が「エリモショウズ」と比較して、9%～15%と重かった ( $p < 0.01$ )。また、両品種の百粒重は、幕別が芽室より20%～28%と重くなった。残りの着莢数、一莢内粒数、子実重では、4環境で品種間に差異は無かった。

#### 4-3-3 形質間の相関関係

RILsの各形質の計測値の頻度分布をそれぞれ図4-2に示した。各形質ともに幅広く分離し、超越分離系統が観察された。各環境下におけるRILsの形質値間の相関係数を表4-2に示した。胚軸長は、4環境を通して主茎節数との間に正の相関関係を示し、百粒重は、4環境を通して着莢数と一莢内粒数との間にそれぞれ負の相関関係を示した。また、同じ形質間で年次と地域の総当たりによる相関について、百粒重の年次間の相関は、それぞれ全ての組み合わせで正の相関関係を示した。

#### 4-3-4 QTL の検出

QTL 解析の結果を表 4-3, および図 4-3 と図 4-4 に示した.

##### 4-3-4-1 開花始 (FLD)

開花始については, 第 11 染色体上の DNA マーカー AZ11\_35.4M\_ID と AZ10\_36.5M\_ID 間に「紫さやか」型対立遺伝子が, 晩生化する *qFLD1* を 2021 年の両試験地で検出した. *qFLD1* の寄与率は, 12.8% (2021 年芽室) および 10.8% (2021 年幕別) となった.

##### 4-3-4-2 主茎長 (STL)

「紫さやか」型対立遺伝子が主茎長を長くする *qSTL1* を第 4 染色体上の DNA マーカー AZ04\_6.9M\_ID と AZ04\_10.2M\_ID 間, *qSTL2* を第 7 染色体上の DNA マーカー AZ07\_31.7M\_ID と AZ07\_33.1M\_ID 間に検出した. *qSTL1* の寄与率は 4.5% (2021 年芽室), 6.6% (2020 年幕別), *qSTL2* の寄与率は 8.6% (2021 年幕別) となった.

##### 4-3-4-3 胚軸長 (ECL)

4 環境で「紫さやか」型対立遺伝子が胚軸長を長くする *qECL1* を第 10 染色体上の DNA マーカー AZ10\_23.8M\_ID と AZ10\_28.5M\_ID 間, *qECL2* を第 11 染色体上の DNA マーカー AZ11\_0.3M\_ID と AZ11\_35.4M\_ID 間に検出した. *qECL1* の寄与率は, 27.1% (2021 年芽室), 13.0% (2021 年幕別), 20.2% (2020 年芽室), 16.1% (2020 年幕別), *qECL2* の寄与率は 6.6% (2021 年芽室), 16.8% (2021 年幕別), 4.2% (2020 年芽室), 5.3% (2020 年幕別) となった.

続いて、*qECL1* と *qECL2* の相互作用を解析するために、各 QTL の近傍の DNA マーカー AZ10\_28.5M\_ID (*qECL1*) および AZ11\_4.5M\_ID (*qECL2*) について、4 遺伝子型のホモ接合系統を選定した。これら 4 遺伝子型の 4 環境における胚軸長を図 4-5 に示した。2 遺伝子座とも「紫さやか」型の胚軸長は、3.2~3.7 cm となり、いずれの環境でも他の遺伝子型より長かった ( $p < 0.05$ )。

#### 4-3-4-4 主茎節数 (BRN)

主茎節数については、第 3 染色体上の DNA マーカー AZ03\_18.7M\_ID と AZ03\_24.4M\_ID 間に *qBRN1*, 第 8 染色体上の DNA マーカー AZ08\_11.1M\_ID と AZ08\_17.2M\_ID 間に *qBRN2*, 第 10 染色体上の DNA マーカー AZ10\_4.6M\_ID と AZ10\_28.5M\_ID 間に *qBRN3* を検出した。いずれの QTL においても、「紫さやか」型対立遺伝子が、主茎節数を少なくした。*qBRN1* の寄与率は、5.8% (2020 年芽室), *qBRN2* の寄与率は、7.0% (2021 年幕別), *qBRN3* の寄与率は、16.2% (2021 年芽室), 11.4% (2021 年幕別), 12.6% (2020 年幕別) となった。

#### 4-3-4-5 分枝数 (LBN)

「紫さやか」型対立遺伝子が分枝数を多くする *qLBN1* を第 11 染色体上の DNA マーカー AZ11\_35.4M\_ID と AZ11\_36.5M\_ID 間に検出した。*qLBN1* の寄与率は、7.1% (2021 年幕別) となった。

#### 4-3-4-6 一莢内粒数 (SDNPPD)

「紫さやか」型対立遺伝子が粒数を多くする *qSDNPPD1* を第 4 染色体上

の DNA マーカー AZ04\_6.9M\_ID と AZ04\_10.2M\_ID 間に検出した．*qSDNPPD1* の寄与率は，6.0%（2020 年芽室）となった．

#### 4-3-4-7 百粒重（SD100WT）

4 環境で「紫さやか」型対立遺伝子が百粒重を大きくする *qSD100WT3* が，第 3 染色体上の DNA マーカー AZ03\_1.1M\_ID と AZ03\_6.1M\_ID 間に検出された．当該 QTL の寄与率は，6.4%（2021 年芽室），15.2%（2021 年幕別），7.2%（2020 年芽室），5.6%（2020 年幕別）となった．他に 3 環境で「紫さやか」型対立遺伝子が百粒重を大きくする *qSD100WT1* を第 1 染色体上の DNA マーカー AZ01\_36.9M\_ID と AZ01\_47.4M\_ID 間に検出した．当該 QTL の寄与率は，5.2%（2021 年芽室），7.3%（2021 年幕別），5.8%（2020 年幕別）となった．さらに，単一環境で「紫さやか」型対立遺伝子が百粒重を大きくする *qSD100WT5* を第 11 染色体上の DNA マーカー AZ11\_4.5M\_ID と AZ11\_35.4M\_ID 間に検出した．当該 QTL の寄与率は，3.9%（2021 年幕別）となった．

逆に，4 環境で「紫さやか」型対立遺伝子が百粒重を小さくする *qSD100WT3* が，第 10 染色体上の DNA マーカー AZ10\_23.8M\_ID と AZ10\_28.5M\_ID 間に検出された．当該 QTL の寄与率は，6.5%（2021 年芽室），4.2%（2021 年幕別），6.2%（2020 年芽室），3.9%（2020 年幕別）となり，2 カ年とも芽室で寄与率が大きい傾向となった．他に，*qSD100WT4* を第 11 染色体上の DNA マーカー AZ11\_35.4M\_ID と AZ11\_36.5M\_ID 間に単一環境で検出した．当該 QTL の寄与率は，9.7%（2020 年芽室）となった．

次に，3 環境以上で検出された *qSD100WT1*，*qSD100WT2*，*qSD100WT3* の 3 個の QTL の相互作用を解析した．各 QTL の近傍の DNA マーカー

AZ01\_41.0M\_ID (*qSD100WT1*), AZ03\_1.1M\_ID (*qSD100WT2*), AZ10\_28.5M\_ID (*qSD100WT3*) について 8 遺伝子型のアレル系統を選定して、4 環境における百粒重を図 4-6 に示した。その結果、*qSD100WT1* と *qSD100WT2* が「紫さやか」型、*qSD100WT3* が「エリモショウズ」型にもつ MME 系統群の百粒重は、14.3~18.2g となり、2020 年幕別では、他の 7 遺伝子型より大きくなった ( $p < 0.05$ )。

#### 4-4 考 察

##### 4-4-1 長胚軸性の遺伝的制御機構

本研究により、「紫さやか」型対立遺伝子が胚軸長を長くする *qECL1* と *qECL2* に特定した。両 QTL は、相加的に作用することが示された。*qECL1* は、第 10 染色体上の DNA マーカー AZ10\_23.8M\_ID (23.8 Mb) と AZ10\_28.5M\_ID (28.5 Mb) 間に特定された。当該ゲノム領域の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) は、「しゅまり BT」に由来する SNP と InDel のクラスター領域と一致した。さらに、*qECL2* は、第 11 染色体上の DNA マーカー AZ11\_0.3M\_ID (0.3 Mb) と AZ11\_35.4M\_ID (35.4 Mb) 間に特定された。当該ゲノム領域の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) は、近接マーカー (AZ11\_4.5M\_ID) の周辺領域が「しゅまり BT」に由来する InDel と SNP のクラスター領域となった (第 5 章・図 5-1)。従って、QTL 解析と QTL 領域のハプロタイプ解析の結果から、「紫さやか」の長胚軸性には、「しゅまり BT」に由来する *qECL1* と *qECL2* が関わるものと結論した。

これまでに、第 10 染色体上の 28.6Mb 付近の DNA マーカー AZ10\_28.6M\_InDel と連鎖する胚軸長に関わる *qECL10* が報告されている

(Mori *et al.* 2021). 本研究で特定した *qECL1* が、同染色体上の DNA マーカー AZ10\_26.7M\_ID (26.7Mb) と AZ10\_28.5M\_ID (28.5Mb) 間に座乗することから両 QTL のゲノム上の位置が近接している. 今後、両 QTL が、同座かあるいは連鎖する別の遺伝子座かを検証する必要がある.

本研究によって、*qECL1* (紫さやか型) と *qECL2* (紫さやか型) を集積した組換え自殖系統群が、他の 3 遺伝子型の組換え自殖系統群よりも、初期生育期間 (50 日間) の積算温度が 757°C から 902°C までの変動する環境下で一貫して、長胚軸となった. 両 QTL の作用については、「紫さやか」が「エリモショウズ」に対して、同環境下で一貫して胚軸長が長かったこととよく一致した. アズキの胚軸長は、初期生育期間の積算温度の上昇にともない、胚軸長は長くなるが (沢田ら 2000), *qECL1* (紫さやか型) と *qECL2* (紫さやか型) の遺伝子型の効果は、温度に影響されることなく胚軸長に作用した.

#### 4-4-2 百粒重の遺伝的制御機構

本研究により、「紫さやか」型対立遺伝子が百粒重を大きくする *qSD100WT1*, *qSD100WT2*, *qSD100WT5* を特定した. また、「エリモショウズ」型対立遺伝子が百粒重を大きくする *qSD100WT3* と *qSD100WT4* を特定した. *qSD100WT1* は、第 1 染色体上の DNA マーカー AZ01\_36.9M\_ID (36.9 Mb) と AZ01\_47.4M\_ID (47.4 Mb) 間に特定された. 当該ゲノム領域の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) は、「しゅまり BT」に由来する SNP と InDel のクラスター領域と重なった. また、*qSD100WT2* の座乗する第 3 染色体上の DNA マーカー AZ03\_1.1M\_ID (1.1Mb) と AZ03\_6.1M\_ID (6.1Mb) 間のゲノム領域の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) は、「しゅまり BT」に由来する

SNP と InDel のクラスター領域と重なった．さらに，*qSD100WT5* の座乗する第 11 染色体上の DNA マーカー AZ11\_4.5M\_ID (4.5Mb) と AZ11\_35.4M\_ID (35.4Mb) 間のゲノム領域の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) については，DNA マーカー AZ11\_35.4M\_ID の近傍が，「しゅまり BT」に由来する SNP と InDel のクラスター領域と重なった．

*qSD100WT3* の座乗する第 10 染色体上の DNA マーカー AZ10\_23.8M\_ID (23.8Mb) と AZ10\_28.5M\_ID (28.5Mb) 間のゲノム領域の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) は，「エリモショウズ」に由来する SNP と InDel のクラスター領域と重なった．また，*qSD100WT4* の座乗する第 11 染色体上の DNA マーカー AZ11\_35.4M\_ID (35.4Mb) と AZ11\_36.5M\_ID (36.5Mb) 間のゲノム領域の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) も，「エリモショウズ」に由来する SNP と InDel のクラスター領域と重なった．以上の QTL 解析とハプロタイプの結果から，「紫さやか」の百粒重には，「しゅまり BT」に由来する *qSD100WT1* と *qSD100WT2* が寄与するものと結論できた．

これら 5 個の QTL のうち，3 環境以上で検出された *qSD100WT1*，*qSD100WT2*，*qSD100WT3* について，ホモ接合型の組換え自殖系統群 8 群について，登熟期間の積算温度が 1,246℃～1,385℃と変動した環境下でも，一貫して *qSD100WT1* (紫さやか型) / *qSD100WT2* (紫さやか型) / *qSD100WT3* (エリモショウズ型) の組換え自殖系統群が，他の 7 遺伝子型の組換え自殖系統群よりも大粒となった．今後，「紫さやか」の百粒重を，さらに大きくできるかについて，「エリモショウズ」型の *qSD100WT3* の導入の可能性の検討が必要である．そのためには，*qSD100WT3* と「エリモショウズ」型で胚軸長を短くする *qECL1* の詳細な地図の作成が必要である．

第 1 染色体には，7.4Mb 付近の DNA マーカー CEDG141 と連鎖する百粒重

に関わる *Sd100wt2.1.1*, 32.2Mb 付近の DNA マーカー s244-1339845 と連鎖する *VaSd100wt1.1*, 30.1Mb 付近の DNA マーカー s168-1117751 と連鎖する *VaSd100wt1.2*, 36.7Mb 付近の DNA マーカー s244-641945 と連鎖する *VaSd100wt1.3*, 57.5Mb 付近の DNA マーカー CEDG090 と連鎖する *Sd100wt1.1.2* と *Sd100wt3.1.1* が, それぞれ報告されている (Isemura *et al.* 2007, Kaga *et al.* 2008, Li *et al.* 2017). 従って, 同染色体の DNA マーカー AZ01\_36.9M\_ID (36.9Mb) と AZ10\_47.4M\_ID (47.4Mb) 間に座乗する *qSD100WT1* と *VaSd100wt1.3* は近傍に座乗することから, 同座かあるいは連鎖する別の遺伝子座かを検証する必要がある.

第 10 染色体には, 22.3Mb 付近の DNA マーカー CEDG106 と連鎖する百粒重に関わる *Sd100wt3.10.1* が報告されている (Kaga *et al.* 2008). 従って, 同染色体の DNA マーカー AZ10\_23.8M\_ID (23.8Mb) と AZ10\_28.5M\_ID (28.5Mb) 間に座乗する *qSD100WT3* と近傍に座乗することから, 両 QTL が同座かあるいは連鎖する別の遺伝子座かを検証する必要がある.

第 11 染色体には, 29.6Mb 付近の DNA マーカー CEDG044 と連鎖する百粒重に関わる *Sd100wt3.11.1* と 31.8Mb 付近の DNA マーカー s268-1701932 と連鎖する *VaSd100wt11.1* が報告されている (Kaga *et al.* 2008, Li *et al.* 2017). 従って, 同染色体の DNA マーカー AZ11\_35.4M\_ID (35.4Mb) と AZ11\_36.5M\_ID (36.5Mb) 間に座乗する *qSD100WT4* と *VaSd100wt11.1* とは異なる遺伝子座と推定された.

#### 4-4-3 開花始の遺伝的制御機構

本研究により, 「紫さやか」と「エリモショウズ」間に開花始に差異はなかったが, 「紫さやか」型対立遺伝子で早生化する *qFLD1* が, 第 11 染色



体上の DNA マーカー AZ11\_35.4M\_ID (35.4Mb) と AZ11\_36.5M\_ID (36.5Mb) 間に特定された。当該ゲノム領域の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) は、「しゅまり BT」に由来する SNP と InDel のクラスター領域と重なった。*qFLD1* の相加効果は、0.4 日 (2021 年芽室) と 0.8 日 (2021 年幕別) と 1 日未満と効果の小さな QTL であったことが、両親間の差異が検出されなかった理由と推定された。今後、*qFLD1* が「紫さやか」の開花始に影響する環境要因を明らかにし、当該 QTL の収量性への影響を精査する必要がある。

これまでに、第 11 染色体の 29.6Mb 付近の DNA マーカー CEDG044 と連鎖する開花始に関わる QTL *Fld3.11.1* が報告されている (Kaga *et al.* 2008)。そのため、AZ11\_35.4M\_ID (35.4Mb) と AZ10\_36.5M\_ID (36.5Mb) 間に特定した *qFLD1* は、*Fld3.11.1* とは異なる遺伝子座と推定された。

#### 4-4-4 主茎長の遺伝的制御機構

本研究により、「紫さやか」型対立遺伝子が主茎長を長くする *qSTL1* と *qSTL2* に特定した。*qSTL1* は、第 4 染色体上の DNA マーカー AZ04\_6.9M\_ID (6.9Mb) と AZ04\_10.2M\_ID (10.2Mb) 間に特定された。当該ゲノム領域の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) は、「しゅまり BT」に由来する SNP と InDel のクラスター領域と重なった。また、*qSTL2* の座乗する第 7 染色体上の DNA マーカー AZ07\_31.7M\_ID (31.7Mb) と AZ07\_33.1M\_ID (33.1 Mb) 間の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) は、「しゅまり BT」に由来する SNP と InDel のクラスター領域と重なった。従って、「紫さやか」の主茎長は、「しゅまり BT」に由来する *qSTL1* と *qSTL2* が関わることとよく一致した。ただし、*qSTL1* は 2 環境で *qSTL2* は 1 環境で検出されていること、両 QTL の相加効果は 1.0cm~1.4cm の範囲内で、主茎長の制御への寄与は小

さいものと結論した.

これまでに, 第4染色体の 53.7Mb 付近の DNA マーカーCEDG197 と連鎖する主茎長に関わる *St12.4.1* が報告されている (Isemura *et al.* 2007). 従って, 同染色体上の AZ04\_6.9M\_ID (6.9Mb) と AZ04\_10.2M\_ID (10.2Mb) 間に特定した *qSTL1* は, *St12.4.1* と重ならなかった. また, 第7染色体の 2.4 Mb 付近の DNA マーカーCEDG064 と連鎖する *St11.7.1* と 15.9 Mb 付近の DNA マーカーCEDG131 と連鎖する *St11.7.2* が報告されている (Isemura *et al.* 2007). 従って, 同染色体上の DNA マーカーAZ07\_31.7M\_ID (31.7 Mb) と AZ07\_33.1M\_ID (33.1 Mb) 間に特定した *qSTL2* は, *St11.7.1* と *St11.7.2* とは異なる遺伝子座と推定された.

#### 4-4-5 主茎節数の遺伝的制御機構

本研究により, 「しゅまり BT」型対立遺伝子が主茎節数を少なくする *qBRN1*, *qBRN2*, *qBRN3* を特定した. *qBRN1* の座乗する第3染色体の DNA マーカーAZ03\_18.7M\_ID (18.7 Mb) と AZ03\_24.4M\_ID (24.4 Mb) 間の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) は, 「しゅまり BT」に由来する SNP と InDel のクラスター領域と重なった. また, *qBRN2* の座乗する第8染色体の DNA マーカーAZ08\_11.1M\_ID (11.1Mb) と AZ08\_17.2M\_ID (17.2Mb) 間の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) も, 「しゅまり BT」に由来する SNP と InDel のクラスター領域と重なった. さらに, *qBRN3* の座乗する第10染色体上の DNA マーカーAZ10\_4.6M\_ID (4.6Mb) と AZ10\_28.5M\_ID (28.5Mb) 間の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) は, 「しゅまり BT」に由来する SNP と InDel のクラスター領域と重なった. 従って, 「紫さやか」の主茎節数は, 「しゅまり BT」に由来する *qBRN1*, *qBRN2*, *qBRN3* が関わることとよく一致

した.

なお, *qBRN1* と *qBRN2* は 1 環境で検出されていること, 両 QTL の相加効果は 0.2 節~0.4 節の範囲内で, 主茎節数の制御への寄与は小さいものと結論した.

これまでに, 第 10 染色体の 21.8Mb 付近の DNA マーカー CEDG081 と連鎖する主茎節数に関わる *Brn1.10.1* が報告されている (Isemura *et al.* 2007). 従って, 同染色体の DNA マーカー AZ10\_4.6M\_ID (4.6Mb) と AZ10\_28.5M\_ID (28.5Mb) 間に座乗する *qBRN3* は, *Brn1.10.1* と重なった. 今後, 両 QTL が, 同座かあるいは連鎖する別の遺伝子座かを検証する必要がある.

#### 4-4-6 分枝数の遺伝的制御機構

本研究により, 「紫さやか」型対立遺伝子が分枝数を多くする *qLBN1* を第 11 染色体上の DNA マーカー AZ11\_35.4M\_ID (35.4 Mb) と AZ11\_36.5M\_ID (36.5 Mb) 間に特定した. 当該ゲノム領域の「紫さやか」の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) が, 「しゅまり BT」に由来する SNP と InDel のクラスター領域と重なった. 従って, 「紫さやか」の分枝数には, 「しゅまり BT」に由来する *qLBN1* が関わるものと結論できた. ただし, 4 環境ともに両親間に分枝数の差異がなかったこと, *qLBN1* が単一環境のみで検出されたこと, 相加効果が 0.1 と非常に小さいことから, 当該 QTL の分枝数の制御への寄与については, 検証を重ねる必要がある.

#### 4-4-7 一莢内粒数の遺伝的制御機構

本研究により, 「紫さやか」型対立遺伝子が一莢内粒数を多くする

*qSDNPPD1* を第 4 染色体上の DNA マーカー AZ04\_6.9M\_ID (6.9 Mb) と AZ04\_10.2M\_ID (10.2 Mb) 間に特定した. 当該ゲノム領域の「紫さやか」の SNP (図 2-9) と InDel (図 2-10) は, 「しゅまり BT」に由来する SNP と InDel のクラスター領域と重なった. 従って, 「紫さやか」の一莢内粒数は, 「しゅまり BT」に由来する *qSDNPPD1* が関わるものと結論した.

これまでに, 第 4 染色体の 5.3Mb 付近の DNA マーカー s801776704 と連鎖する一莢内粒数に関わる *VaSnp4.1* が報告されている (Li *et al.* 2017). 従って, 同染色体の DNA マーカー AZ04\_6.9M\_ID (6.9Mb) と AZ04\_10.2M\_ID (10.2Mb) 間に座乗する *qSDNPPD1* と *VaSnp4.1* が近傍に座乗する. 今後, 両 QTL が, 同座かあるいは連鎖する別の QTL かを検証する必要がある. ただし, 4 環境ともに両親間に一莢内粒数の差異がなかったこと, *qSDNPPD1* が単一環境のみで検出されたこと, 相加効果が 0.2 となったことから, 当該 QTL の一莢内粒数の制御における寄与については, 検証を重ねる必要がある.

#### 4-4-8 収量性と胚軸長に関わる QTL は 2 領域でクラスターを形成

本研究で特定した *qECL1*, *qBRN3*, *qSD100WT3* は, 第 10 染色体の 23.8Mb ~28.5Mb に座乗し, クラスター 1 (仮称) を形成した. また, *qFLD1*, *qLBN1*, *qSD100WT4* が, 第 11 染色体の 35.4Mb ~36.5Mb に座乗し, クラスター 2 (仮称) を形成した. クラスター 1 では, 「紫さやか」型対立遺伝子が, *qECL1* によって胚軸を長くし, *qBRN3* によって主茎節を減らし, *qSD100WT3* によって百粒重を小さくする. 今後, クラスター 1 を対象として, 長胚軸性と節数ならびに粒重を制御するためには, 各 QTL の異同を解明する必要がある. クラスター 2 では, 「紫さやか」型対立遺伝子が, 開花始を早期化し,

分枝数を多くし、百粒重を小さくした。同様に今後、クラスター 2 を対象として、開花期、分枝数、粒重を制御するためには、各 QTL の異同を解明する必要がある。

#### 4-4-9 DNA マーカー選抜育種への可能性

本研究によって、草型と収量に関わる 15 個の QTL と連鎖する DNA マーカーを特定した。このうち、胚軸長に関わる *qECL1* と *qECL2* と百粒重に関わる *qSD100WT1*, *qSD100WT2*, *qSD100WT3* は、ホモ接合型の組換え自殖系統群が 4 環境で安定して、長胚軸あるいは大粒化に作用した。従って、これら 5 個の QTL は、MAS の対象候補と期待された。すなわち、*qECL1* には AZ10\_28.5M\_ID, *qECL2* には AZ11\_4.5M\_ID *SD100WT1* には AZ01\_47.4M\_ID, *qSD100WT2* には AZ03\_1.1M\_ID *qSD100WT3* には AZ10\_28.5M\_ID がそれぞれ DNA マーカーとして選定できた。いずれも、アガロースゲル電気泳動で遺伝子型が判別できる 10bp 以上の InDel マーカーとなった。以上より、これら 5 マーカーは、育種事業での活用が期待できる。なお、*qECL1* と *qSD100WT3* については、胚軸長を長くする作用と粒大を小さくする作用が連鎖することに配慮した育種計画が必要である。

表 4－1. 「紫さやか」と「エリモショウズ」における調査形質の平均値と標準偏差

形 質		年次	芽室				幕別			
			紫さやか		エリモショウズ		紫さやか		エリモショウズ	
			平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
開花始	FLD	2020	65.5	2.4	65.0	1.9	74.5	1.2	74.5	1.2
	(日)	2021	59.0	0.5	58.3	0.4	65.7	0.9	64.0	0.8
主茎長	STL	2020	62.3	2.8	60.5	2.5	53.3	1.0	50.1	2.0
	(cm)	2021	61.7	1.4	63.1	3.1	55.9	3.5	56.1	1.0
胚軸長	ECL	2020	5.2	0.1	2.9	0.1 **	4.5	0.5	2.4	0.3 **
	(cm)	2021	5.4	0.2	3.2	0.3 **	4.8	0.2	2.7	0.2 **
主茎節数	BRN	2020	12.8	0.9	12.9	0.5	12.3	0.1	12.3	0.2
	(節)	2021	14.3	0.4	15.2	0.2	13.7	0.3	14.7	0.2 *
分枝数	LBN	2020	3.1	0.2	2.9	0.4	2.1	0.4	2.4	0.3
	(本)	2021	2.9	0.3	2.9	0.1	2.7	0.2	2.3	0.3
着莢数	PDTN	2020	43.2	1.8	44.8	2.1	41.5	2.3	40.1	3.1
	(莢)	2021	44.7	1.9	45.4	1.4	42.2	6.7	41.3	3.4
一莢内粒数	SDNPPD	2020	5.32	0.5	5.34	0.4	5.43	0.2	5.53	0.2
	(粒)	2021	7.26	0.3	7.23	0.3	6.80	0.4	6.73	0.8
子実重	SDTWT	2020	345	34.4	338	53.5	276	19.5	280	34.0
	(g)	2021	367	36.3	363	44.5	354	32.9	358	39.1
百粒重	SD100WT	2020	14.0	0.1	12.1	0.1 ***	16.8	0.5	15.5	0.5 **
	(g)	2021	14.6	0.3	12.9	0.3 ***	18.3	0.5	16.1	0.4 ***

\*, \*\*, \*\*\* は t 検定でそれぞれ 5 %, 1 %, 0.1%水準で「紫さやか」と有意差があることを示す.

表 4－2. 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の交雑に由来する組換え自殖系統 F<sub>6</sub> (2020) と F<sub>7</sub> (2021) における形質間の相関関係

形質	栽培地	年次		FLD21芽	FLD20幕	FLD21幕	STL20芽	STL21芽	STL20幕	STL21幕	ECL20芽	ECL21芽	ECL20幕	ECL21幕	BRN20芽
FLD	芽室	2020	(FLD20芽)	0.158 *	-0.231 **	0.203 **	-0.128	-0.019	0.130	0.063	0.186 *	0.209 **	0.047	0.182 *	-0.145
		2021	(FLD21芽)		-0.106	0.345 ***	-0.035	0.040	0.138	-0.024	0.132	0.179 *	0.061	0.201 **	0.059
	幕別	2020	(FLD20幕)			-0.068	-0.061	0.064	-0.331 ***	-0.014	-0.234 ***	0.010	0.280 ***	-0.106	0.032
		2021	(FLD21幕)				-0.291 ***	-0.063	0.219 **	0.029	0.093	-0.027	0.047	0.124	0.007
STL	芽室	2020	(STL20芽)					0.269 ***	-0.086	0.164 *	0.105	0.033	-0.075	0.033	0.337 ***
		2021	(STL21芽)						0.177 *	0.294 ***	-0.198 *	-0.159 *	-0.001	-0.067	0.183 *
	幕別	2020	(STL20幕)							0.333 ***	0.023	0.090	-0.069	0.047	0.101
		2021	(STL21幕)								-0.142	-0.280 ***	-0.070	-0.083	0.129
ECL	芽室	2020	(ECL20芽)									0.562 ***	0.143	0.519 ***	0.208 **
		2021	(ECL21芽)										0.350 ***	0.768 ***	-0.135
	幕別	2020	(ECL20幕)											0.312 ***	-0.048
		2021	(ECL21幕)												-0.120

\*, \*\*, \*\*\* はそれぞれ 5 %, 1 %, 0.1% で有意相関があることを示す.

表 4－2． 続き 1

形質	栽培地	年次		BRN21芽	BRN20幕	BRN21幕	LBN20芽	LBN21芽	LBN20幕	LBN21幕	PDT20芽	PDT21芽	PDT20幕	PDT21幕	SDN20芽
FLD	芽室	2020	(FLD20芽)	-0.083	-0.006	0.017	-0.219 **	0.184 *	0.170 *	0.086	-0.230 **	0.082	0.022	0.051	-0.065
		2021	(FLD21芽)	-0.105	0.017	0.047	-0.022	0.393 ***	0.105	0.259 ***	0.079	0.048	0.017	-0.017	-0.061
	幕別	2020	(FLD20幕)	0.019	0.018	-0.074	0.240 ***	0.159 *	-0.179 *	-0.114	0.123	0.045	-0.051	-0.045	-0.003
		2021	(FLD21幕)	0.041	-0.083	0.086	-0.044	0.159 *	0.168 *	0.162 *	0.043	0.084	-0.061	0.093	0.002
STL	芽室	2020	(STL20芽)	0.165 *	0.095	0.127	0.347 ***	0.122	-0.001	-0.111	0.203 *	0.124	-0.134	-0.001	-0.032
		2021	(STL21芽)	0.376 ***	0.283 ***	0.215 **	-0.006	-0.027	0.072	-0.136	-0.075	-0.036	-0.157	0.021	0.137
	幕別	2020	(STL20幕)	0.226 **	0.182 *	0.294 ***	-0.229 **	0.092	0.140	0.274 ***	-0.042	-0.121	-0.045	0.138	-0.096
		2021	(STL21幕)	0.354 ***	0.113	0.431 ***	-0.154	-0.098	0.116	0.392 ***	-0.098	0.005	-0.071	-0.071	0.022
ECL	芽室	2020	(ECL20芽)	-0.440 ***	-0.173 *	-0.247 **	0.139	0.227 **	0.081	0.087	0.184 *	0.038	0.034	0.216 **	-0.047
		2021	(ECL21芽)	0.490 ***	-0.221 **	-0.341 ***	0.133	0.342 ***	-0.094	0.027	0.166 *	0.092	0.020	0.186 *	-0.205 *
	幕別	2020	(ECL20幕)	-0.235 **	0.364 ***	-0.208 **	0.157 *	0.032	-0.072	0.136	0.155	0.001	-0.069	0.178 *	-0.068
		2021	(ECL21幕)	-0.344 ***	-0.266 ***	0.268 **	0.023	0.225 **	-0.052	0.150	0.075	0.154	-0.073	0.201 *	-0.147
BRN	芽室	2020	(BRN20芽)	0.227 **	0.154	0.278 ***	0.294 ***	0.115	-0.061	-0.017	0.454 ***	0.097	-0.155	0.044	0.050
		2021	(BRN21芽)		0.275 ***	0.560 ***	-0.097	0.224 **	0.058	0.020	-0.117	0.177 *	-0.049	-0.109	0.053
	幕別	2020	(BRN20幕)			0.321 ***	-0.057	0.012	0.168 *	-0.184 *	-0.010	0.038	0.222 **	-0.004	0.087
		2021	(BRN21幕)				-0.055	-0.097	0.111	0.187 *	0.005	0.076	0.076	0.166 *	-0.027
LBN	芽室	2020	(LBN20芽)					0.125	-0.054	-0.143	0.521 ***	0.264 ***	0.074	0.138	0.152
		2021	(LBN21芽)						0.086	0.230 **	0.122	0.179 *	-0.034	0.001	-0.214 **
	幕別	2020	(LBN20幕)							-0.002	-0.062	0.019	0.175 *	-0.056	-0.006
		2021	(LBN21幕)								-0.055	0.094	-0.134	0.094	-0.190 *
PDTN	芽室	2020	(PDT20芽)									0.158	0.029	0.103	0.055
		2021	(PDT21芽)										-0.440	0.026	-0.045
	幕別	2020	(PDT20幕)											0.002	0.092
		2021	(PDT21幕)												0.070

\*, \*\*, \*\*\* はそれぞれ 5 %, 1 %, 0.1% で有意相関があることを示す。



表 4－2．続き 2

形質	栽培地	年次		SDN21芽	SDN20幕	SDN21幕	SDT20芽	SDT21芽	SDT20幕	SDT21幕	SDH20芽	SDH21芽	SDH20幕	SDH21幕
FLD	芽室	2020	(FLD20芽)	-0.108	-0.022	0.001	-0.236 **	-0.080	-0.004	0.085	0.165 *	-0.102	-0.257 ***	-0.293 ***
		2021	(FLD21芽)	0.034	-0.195 *	-0.047	0.043	0.034	-0.129	-0.003	-0.023	0.100	-0.062	-0.015
	幕別	2020	(FLD20幕)	0.038	-0.039	-0.112	0.065	0.047	0.049	-0.124	-0.331 ***	0.082	0.370	0.045
		2021	(FLD21幕)	0.054	-0.114	-0.038	0.068	0.055	-0.082	-0.099	-0.047	0.020	-0.057	-0.043
STL	芽室	2020	(STL20芽)	-0.062	0.153	0.069	0.303 ***	0.214 **	0.007	0.110	0.287 ***	0.174 *	0.185 *	0.195 *
		2021	(STL21芽)	0.197	0.059	0.120	0.012	0.105	-0.069	-0.034	0.156	0.055	0.198 *	0.179 *
	幕別	2020	(STL20幕)	-0.134	0.111	0.078	-0.066	-0.078	0.106	-0.076	0.252 **	0.030	-0.226 **	-0.142
		2021	(STL21幕)	-0.057	0.034	0.067	-0.070	0.160 *	0.032	-0.084	0.284 ***	0.381 ***	0.147	0.178 *
ECL	芽室	2020	(ECL20芽)	-0.136	0.137	-0.039	0.195 *	-0.042	0.157	0.106	0.037	-0.038	-0.235 **	-0.191 *
		2021	(ECL21芽)	-0.128	-0.035	-0.089	0.102	-0.046	0.041	0.039	-0.053	-0.140	-0.157	-0.267 ***
	幕別	2020	(ECL20幕)	-0.029	-0.120	-0.051	0.076	0.002	0.190 *	-0.035	-0.112	0.078	0.054	-0.077
		2021	(ECL21幕)	-0.034	-0.055	-0.062	0.042	0.064	-0.030	-0.029	0.044	-0.099	-0.224 **	-0.256 **
BRN	芽室	2020	(BRN20芽)	0.024	-0.067	-0.044	0.416 ***	0.173 *	-0.157	0.029	0.149	0.149	0.233 **	0.222 **
		2021	(BRN21芽)	0.139	0.042	0.092	-0.053	0.267 ***	-0.106	-0.085	0.134	0.049	0.123	0.179 *
	幕別	2020	(BRN20幕)	0.077	-0.041	0.082	0.041	0.037	0.012	-0.075	0.114	-0.083	0.132	0.099
		2021	(BRN21幕)	-0.022	0.065	-0.069	-0.005	0.101	0.085	-0.049	0.164	0.096	0.050	0.107
LBN	芽室	2020	(LBN20芽)	0.005	0.085	-0.131	0.505 ***	0.207 **	0.097	0.052	-0.165 *	0.142	0.228 **	0.133
		2021	(LBN21芽)	-0.162 *	0.096	-0.071	0.104	-0.020	-0.114	0.165 *	0.227 **	0.163 *	0.016	0.163 *
	幕別	2020	(LBN20幕)	-0.134	-0.077	0.044	-0.015	0.070	-0.029	0.113	0.225 **	0.167 *	0.096	0.144
		2021	(LBN21幕)	-0.242 **	-0.121	-0.148	-0.100	0.095	-0.016	0.060	0.190 *	0.297 ***	-0.109	-0.016
PDTN	芽室	2020	(PDT20芽)	-0.150	-0.003	-0.165 *	0.837 ***	0.114	0.066	0.019	-0.198 *	0.039	0.072	0.113
		2021	(PDT21芽)	-0.077	-0.110	-0.187 *	0.049	0.553 ***	-0.029	0.168 *	-0.036	-0.166 *	-0.066	-0.239 **
	幕別	2020	(PDT20幕)	0.043	-0.018	0.013	0.021	-0.068	0.281 ***	-0.056	-0.085	-0.057	-0.163 *	0.020
		2021	(PDT21幕)	0.136	0.067	0.122	0.099	0.119	0.079	0.177 *	-0.003	-0.111	-0.090	-0.171 *

\*, \*\*, \*\*\* はそれぞれ 5 %, 1 %, 0.1% で有意相関があることを示す.

表 4－2． 続き 3

形質	栽培地	年次		SDN21芽	SDN20幕	SDN21幕	SDT20芽	SDT21芽	SDT20幕	SDT21幕	SDH20芽	SDH21芽	SDH20幕	SDH21幕
SDNPPD	芽室	2020	(SDN20芽)	0.305 ***	0.018	0.168 *	0.215 **	0.182 *	0.104	-0.074	-0.166 *	-0.022	0.186 *	0.183 *
		2021	(SDN21芽)		0.002	0.475 ***	-0.006	0.191 *	-0.038	-0.153	-0.118	-0.306 ***	0.046	0.128
	幕別	2020	(SDN20幕)			0.125	0.057	-0.202 *	0.181 *	0.148	-0.079	-0.157	-0.969 ***	-0.028
		2021	(SDN21幕)				-0.009	0.071	0.041	0.166 *	0.074	-0.194 *	-0.001	-0.257 **
SDTWT	芽室	2020	(SDT20芽)					0.183 *	0.015	0.020	-0.079	0.096	0.215 **	0.254 **
		2021	(SDT21芽)						-0.043	0.077	0.120	0.160 *	0.247 **	0.160 *
	幕別	2020	(SDT20幕)						0.022		0.002	0.027	-0.209 *	-0.121
		2021	(SDT21幕)								0.140	0.115	0.059	0.004
SD100WT	芽室	2020	(SDH20芽)									0.351 ***	0.255 **	0.265 **
		2021	(SDH21芽)										0.490 ***	0.481 ***
	幕別	2020	(SDH20幕)											0.568 ***

\*, \*\*, \*\*\* はそれぞれ 5 %, 1 %, 0.1% で有意相関があることを示す.

表 4-3. 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の交雑に由来する組換え自殖系統 F<sub>6</sub> (2020) と F<sub>7</sub> (2021) における各形質に関する QTL のリスト

形質	QTL	染色体	年次	芽室					幕別					Multi-QTL 寄与率 (%)
				ピーク位置 (cM)	近接マーカー	LOD 値	相加 効果 <sup>a</sup>	寄与率 (%)	ピーク位置 (cM)	近接マーカー	LOD 値	相加 効果 <sup>a</sup>	寄与率 (%)	
開花始	<i>qFLD1</i>	11	2021	27.1	AZ11_36.5M_ID	5.1	0.8	12.8	31.1	AZ11_36.5M_ID	4.4	0.4	10.8	—
主茎長	<i>qSTL1</i>	4	2020						32.3	AZ04_10.2M_ID	2.3	1.4	6.6	5.5
			2021	27.9	AZ04_10.2M_ID	2.5	1.2	4.5						
	<i>qSTL2</i>	7	2021						37.0	AZ07_31.7M_ID	3.8	1.0	8.6	
胚軸長	<i>qECL1</i>	10	2020	76.3	AZ10_28.5M_ID	9.7	0.4	20.2	67.0	AZ10_28.5M_ID	5.7	0.3	16.1	34.6
			2021	71.0	AZ10_28.5M_ID	12.9	0.3	27.1	74.0	AZ10_28.5M_ID	7.1	0.1	13.0	
	<i>qECL2</i>	11	2020	7.4	AZ11_4.5M_ID	2.3	0.4	4.2	5.4	AZ11_4.5M_ID	2.2	0.1	5.3	
			2021	4.7	AZ11_4.5M_ID	3.5	0.1	6.6	5.4	AZ11_4.5M_ID	8.8	0.3	16.8	
	<i>qBRN1</i>	3	2020	16.7	AZ03_24.4M_ID	2.5	-0.4	5.8						
主茎節数	<i>qBRN2</i>	8	2021						20.9	AZ08_17.2M_ID	3.4	-0.2	7.0	25.1
	<i>qBRN3</i>	10	2020						76.3	AZ10_28.5M_ID	4.4	-0.2	12.6	
			2021	66.0	AZ10_28.5M_ID	10.1	-0.3	16.2	74.0	AZ10_28.5M_ID	5.4	-0.2	11.4	
分枝数	<i>qLBN1</i>	11	2021	32.1	AZ11_36.5M_ID	2.4	0.1	7.1						—
一莢内粒数	<i>qSDNPPD1</i>	4	2020	20.9	AZ04_6.9M_ID	2.2	0.2	6.0						—
百粒重	<i>qSD100WT1</i>	1	2020						53.3	AZ01_41.0M_ID	3.6	0.6	5.8	40.3
			2021	50.3	AZ01_41.0M_ID	4.0	0.4	5.2	50.3	AZ01_41.0M_ID	4.8	0.5	7.3	
	<i>qSD100WT2</i>	3	2020	2.0	AZ03_1.1M_ID	2.9	0.3	6.2	1.0	AZ03_1.1M_ID	2.5	0.3	3.9	
			2021	1.0	AZ03_1.1M_ID	4.9	0.3	6.5	1.0	AZ03_1.1M_ID	2.9	0.3	4.2	
	<i>qSD100WT3</i>	10	2020	70.0	AZ10_28.5M_ID	3.4	-0.3	7.2	76.3	AZ10_28.5M_ID	3.5	-0.4	5.6	
			2021	72.0	AZ10_28.5M_ID	4.8	-0.3	6.4	71.0	AZ10_28.5M_ID	9.3	-0.6	15.2	
	<i>qSD100WT4</i>	11	2020	21.1	AZ11_35.4M_ID	4.4	-0.4	9.7						
	<i>qSD100WT5</i>	11	2021						16.4	AZ11_35.4M_ID	2.9	0.4	3.9	

<sup>a</sup> 「紫さやか」型対立遺伝子の相加効果.

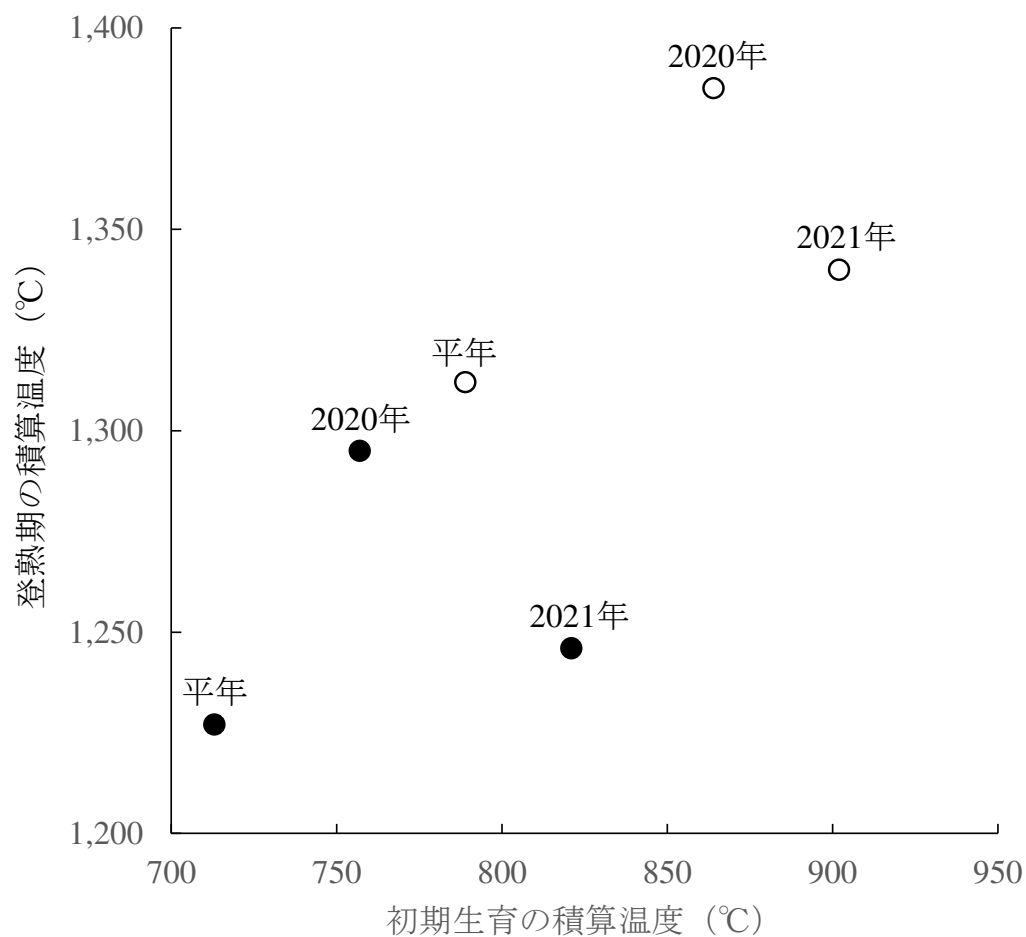


図 4－1．本研究で試験栽培した 4 環境と平年の開花始までの期間（6 月 1 日から 7 月 20 日）と登熟期間（7 月 21 日から 9 月 30 日）における積算温度．

○と●は、それぞれ芽室町と幕別町を示す．

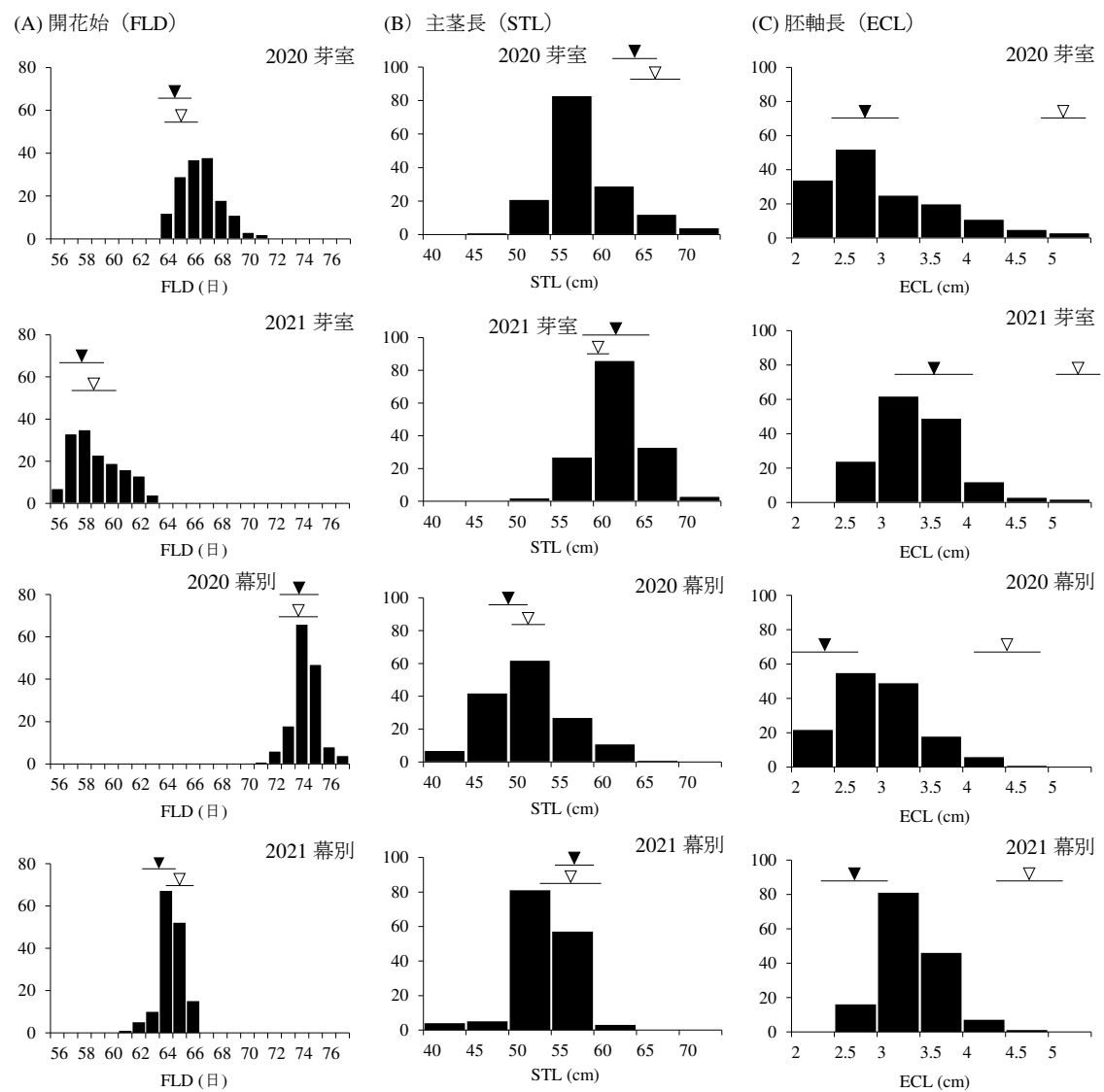


図4-2.「紫さやか」と「エリモショウズ」間の交雑に由来する組換え自殖系統 F<sub>6</sub> (2020) と F<sub>7</sub> (2021) における各形質の頻度分布。

「紫さやか」および「エリモショウズ」の平均値をそれぞれ▽および▼で示し、下線は標準偏差の範囲を示す。

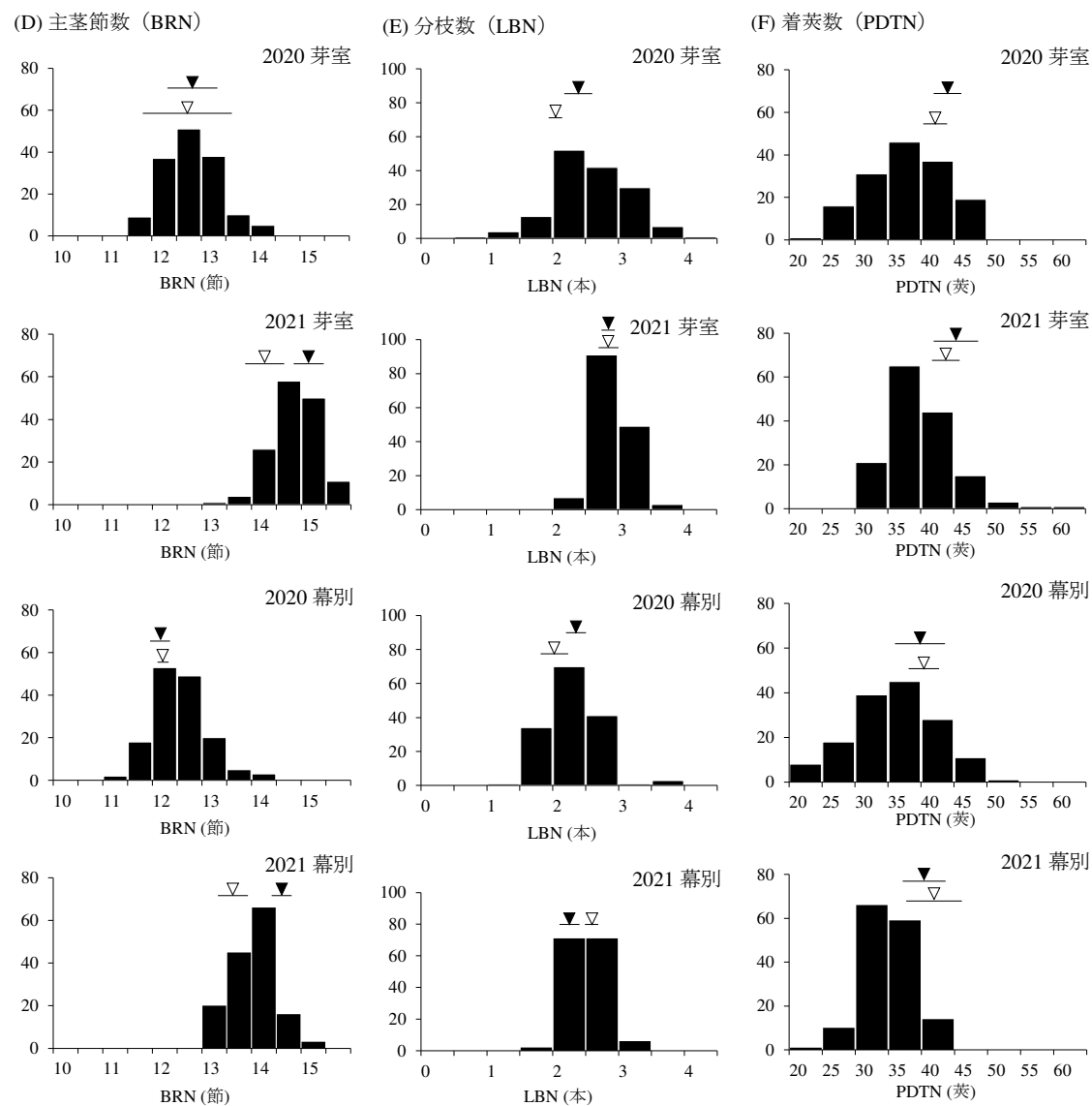


図 4－2． 続き 1．

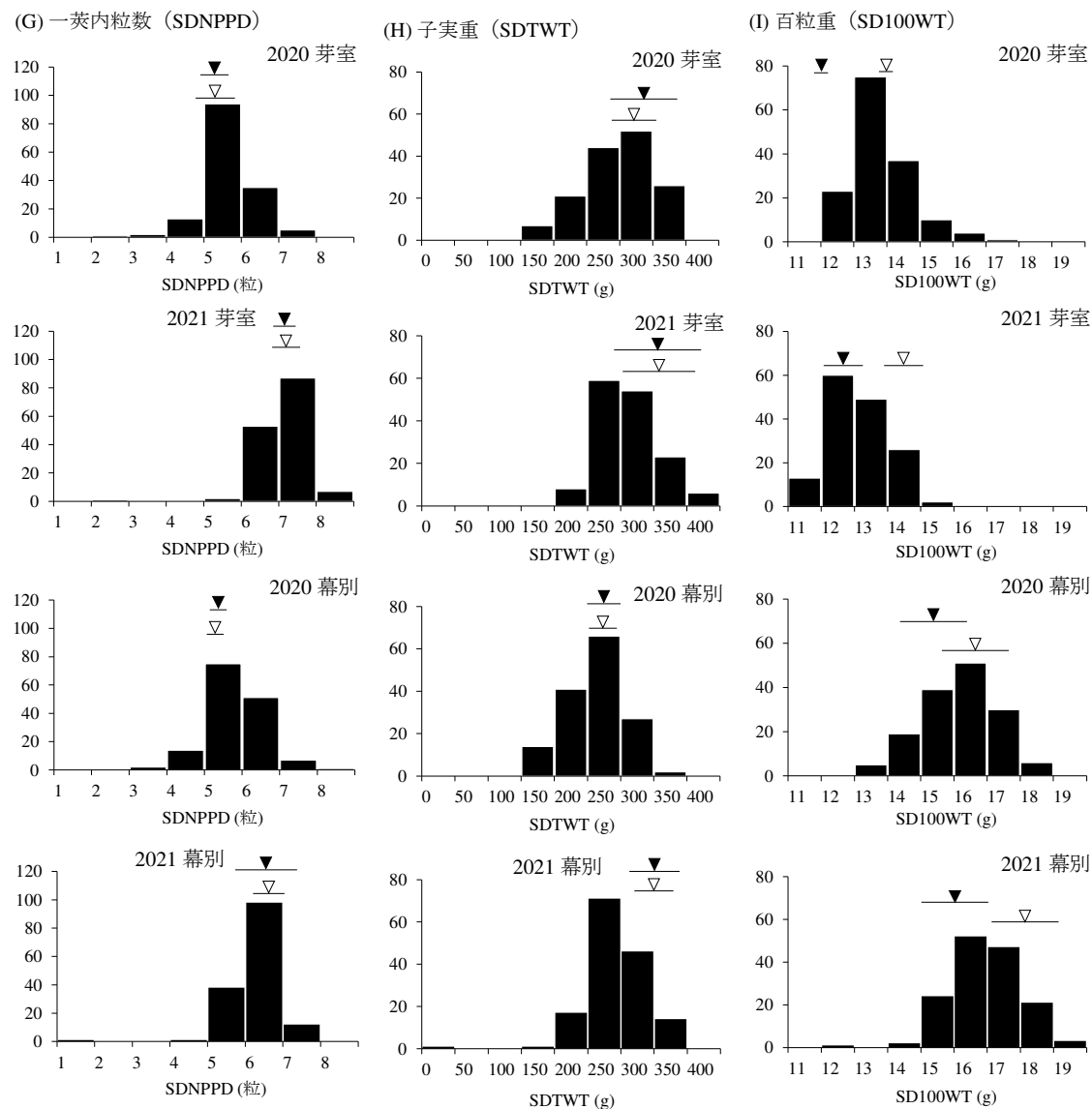


図 4－2． 続き 2．

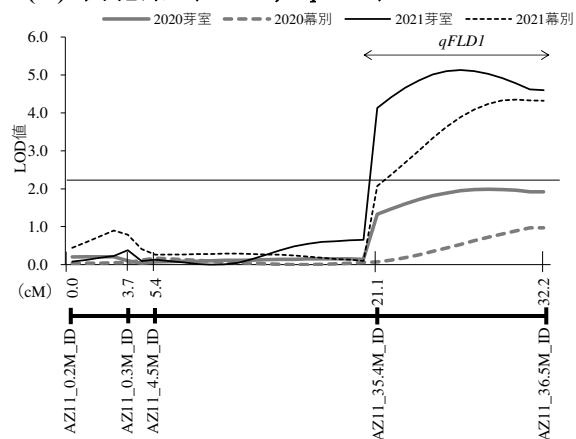
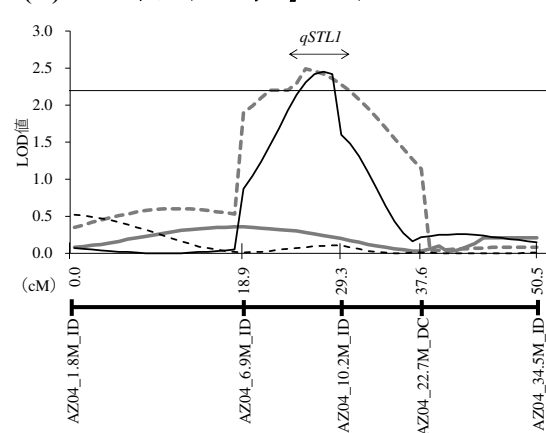
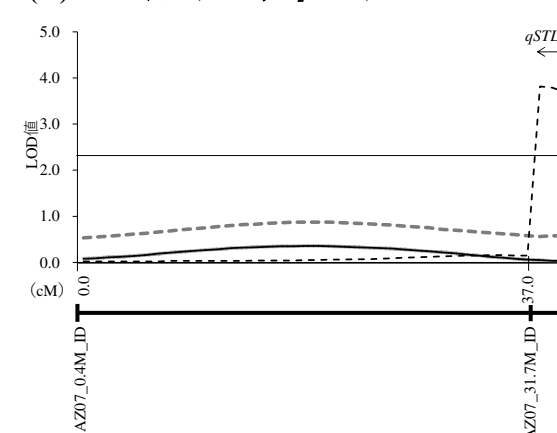
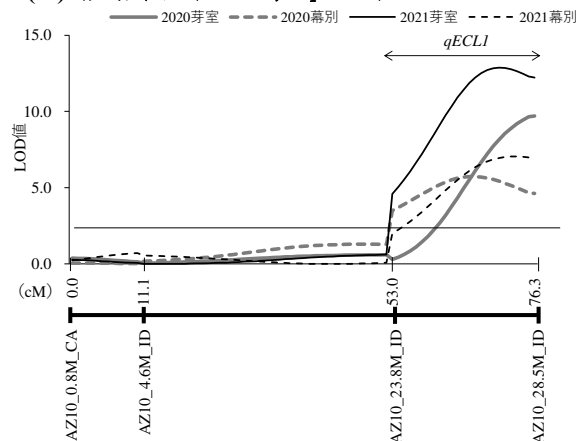
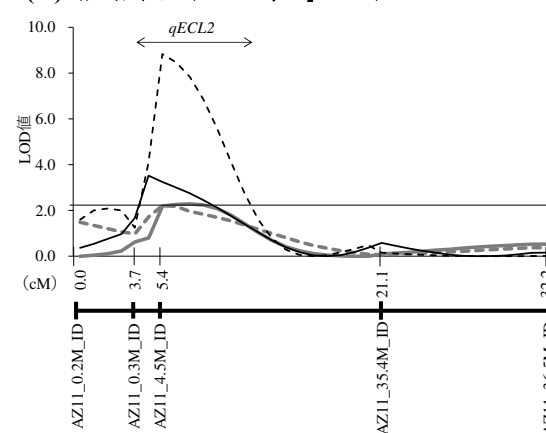
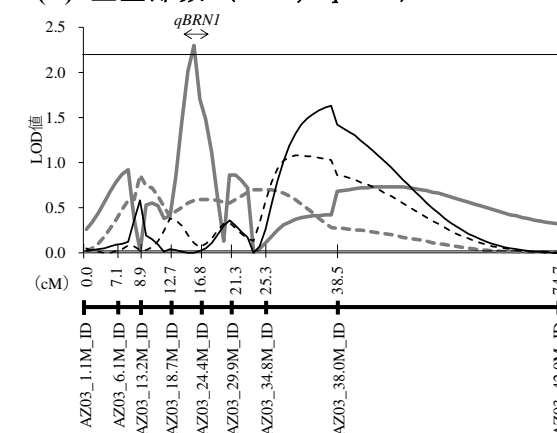
(A) 開花始 (chr11, *qFLD1*)(B) 主茎長 (chr4, *qSTL1*)(C) 主茎長 (chr7, *qSTL2*)(D) 胚軸長 (chr10, *qECL1*)(E) 胚軸長 (chr11, *qECL2*)(F) 主茎節数 (chr3, *qBRN1*)

図4-3. 「紫さやか」と「エリモショウズ」間の交雑に由来する組換え自殖系統F<sub>6</sub> (2020) とF<sub>7</sub> (2021) を用いた調査形質に関する LOD 曲線および連鎖地図と連鎖する DNA マーカー. LOD 値の閾値は 2.2 とした ( $p < 0.05$ ).



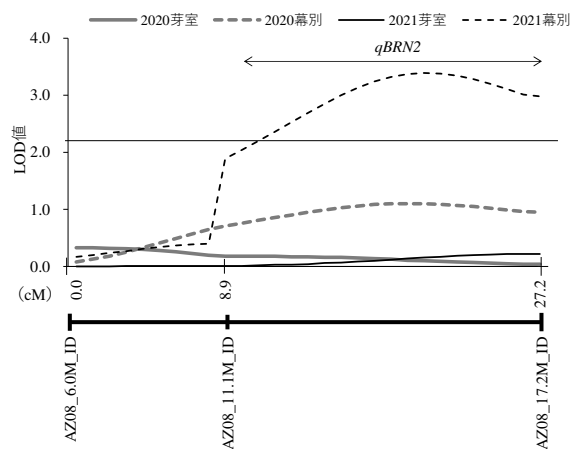
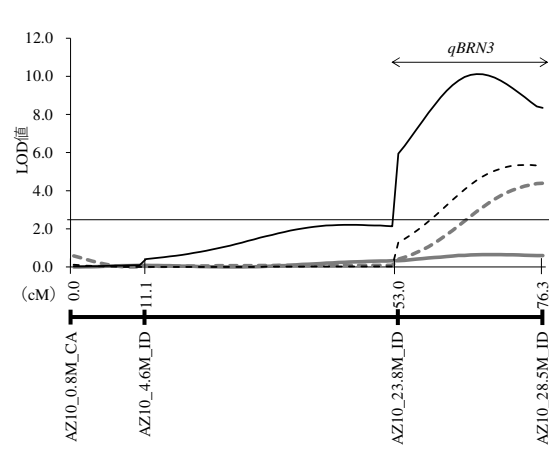
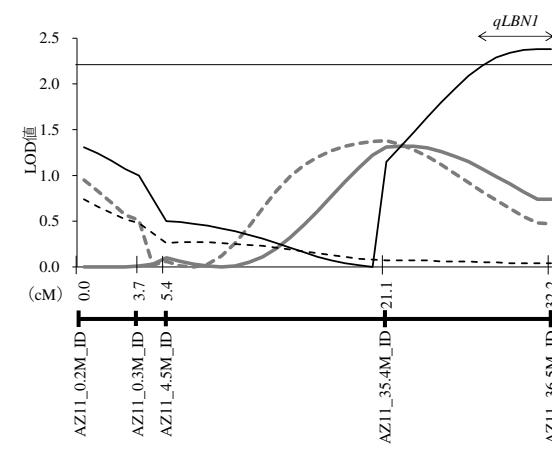
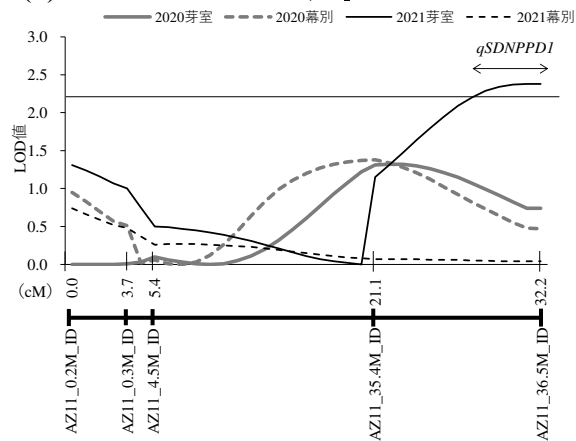
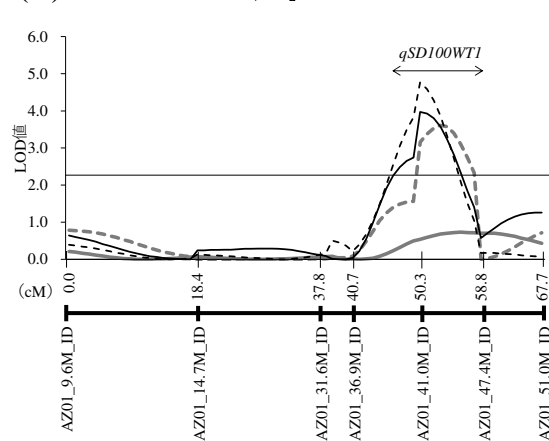
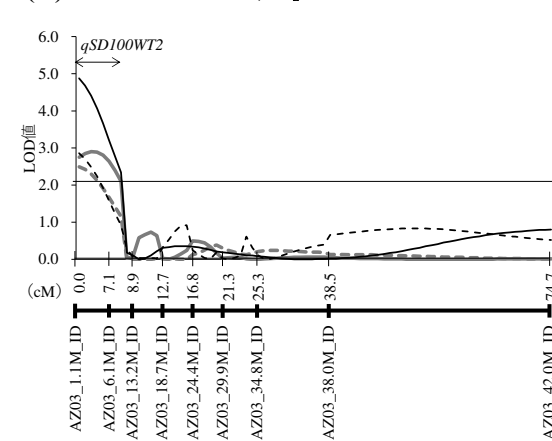
(G) 主茎節数 (chr8, *qBRN2*)(H) 主茎節数 (chr10, *qBRN3*)(I) 分枝数 (chr11, *qLBN1*)(J) 一莢内粒数 (chr4, *qSDNPPD1*)(K) 百粒重 (chr1, *qSD100WT1*)(L) 百粒重 (chr3, *qSD100WT2*)

図4-3. 続き1.

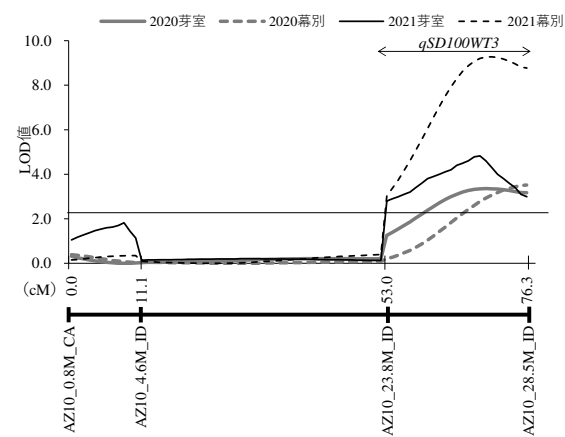
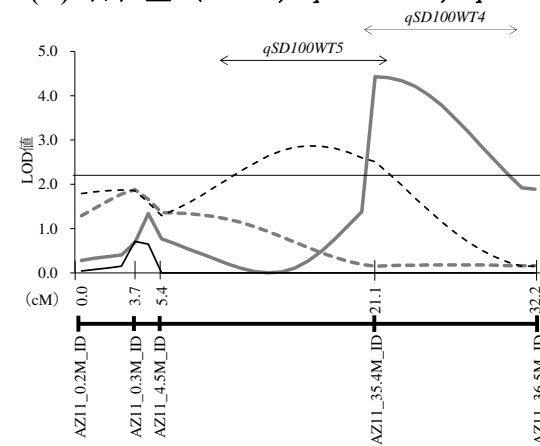
(M) 百粒重 (chr10,  $qSD100WT3$ )(N) 百粒重 (chr11,  $qSD100WT4$ ,  $qSD100WT5$ )

図 4 - 3. 続き 2.

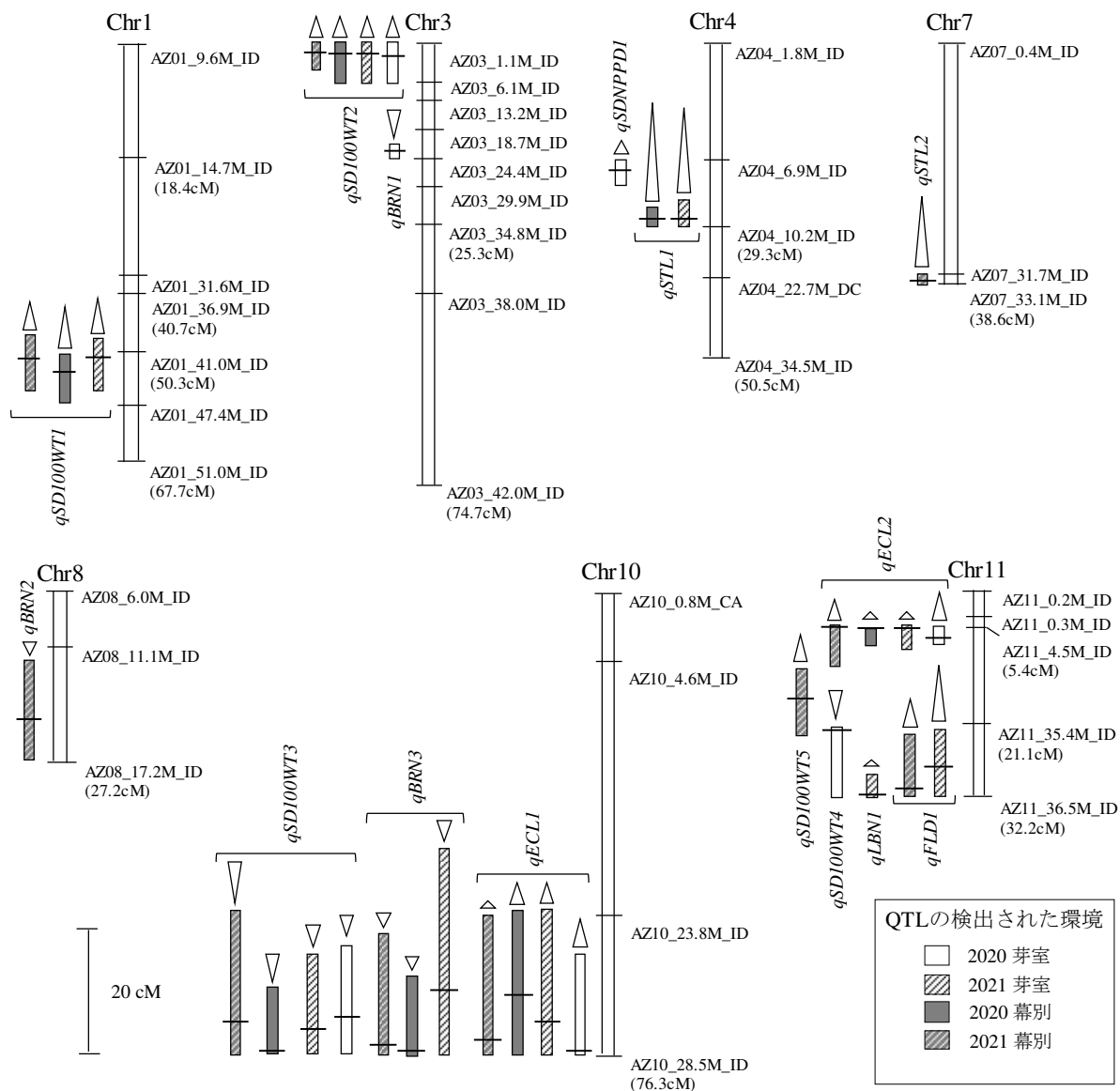


図 4-4. 収量関連形質に関する QTL のゲノム位置.

△は「紫さやか」型対立遺伝子が形質値を上げ、▽は形質値を下げることを示す. 三角形の高さは相加効果の大きさを表す.

QTL 領域の横線は LOD のピークを示す.

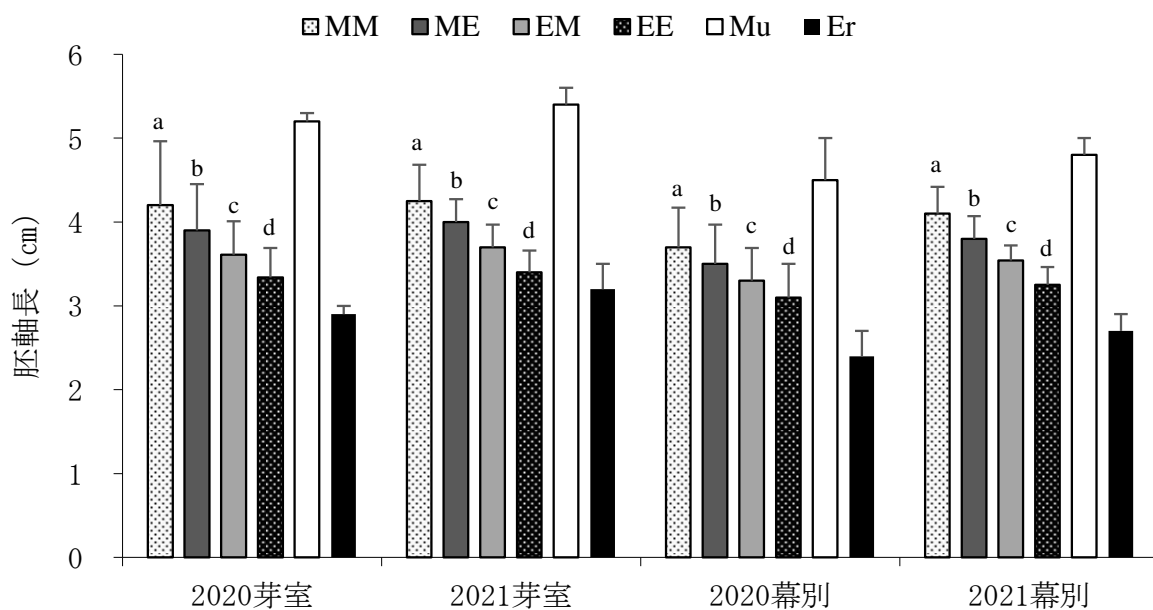


図4-5. 組換え自殖系統について *qECL1*, *qECL2* の近傍マーカーの遺伝子型系統ごとの4環境における胚軸長の平均値+標準偏差.

遺伝子型は, 左から順に AZ10\_28.5M\_ID (*qECL1*), AZ11\_4.5M\_ID (*qECL2*) を示した.

遺伝子型の M は「紫さやか」, E は「エリモショウズ」を示す. Mu は「紫さやか」, Er は「エリモショウズ」を示す.

各栽培環境における4遺伝子型の胚軸長について, アルファベットの異文字間に5%水準で差異のあることを示す (Tukey-Kramer 法).

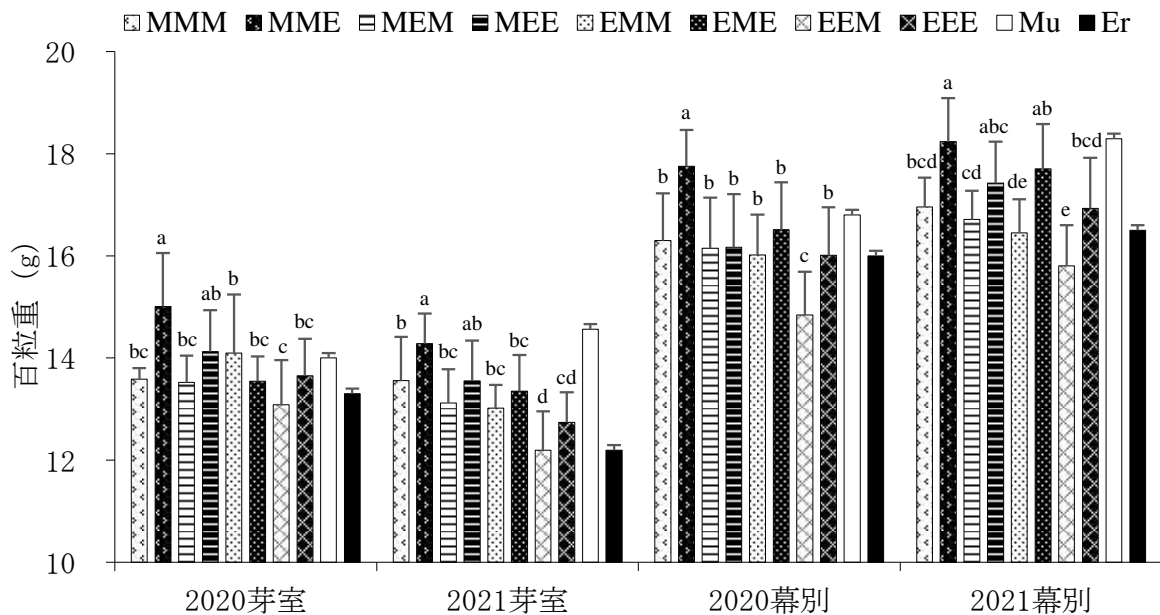


図4-6. 組換え自殖系統について  $qSD100WT1$ ,  $qSD100WT2$ ,  $qSD100WT3$  の近傍マーカーの遺伝子型系統ごとの4環境における百粒重の平均値+標準偏差.

遺伝子型は、左から順に AZ01\_41.0M\_ID ( $qSD100WT1$ ), AZ03\_1.1M\_ID ( $qSD100WT2$ ), AZ10\_28.5M\_ID ( $qSD100WT3$ ), を示した.

遺伝子型の M は「紫さやか」、E は「エリモショウズ」を示す. Mu は「紫さやか」、Er は「エリモショウズ」を示す.

各栽培環境における8遺伝子型の百粒重について、アルファベットの異文字間に5%水準で差異のあることを示す (Tukey-Kramer 法).

## 第5章 総合考察

### 5-1 本研究で特定した QTL のゲノムポジション

本研究では、アズキ品種「しゅまり BT」と「エリモショウズ」間の交雑から育成された「紫さやか」（長岡ら 2020）に「エリモショウズ」を戻し交雑して育成した組換え自殖系統 150 系統を供試して、15 種の形質を 2 地点 2 ヶ年の 4 環境下で評価した（第 3 章と第 4 章）。また、「紫さやか」と「しゅまり BT」と「エリモショウズ」の全ゲノムリシーケンス解析によって、「紫さやか」のゲノム構造を由来親別の SNP と InDel を用いて、特徴付けた（第 2 章）。DNA マーカーの遺伝子型データと形質データを用いて、本研究で特定した 32 個の QTL のゲノムポジションと「紫さやか」のゲノム構造を図 5-1 に示した。

第 1 染色体の 9.6 Mb～14.7 Mb に「紫さやか」型で煮豆の彩度を上げる *qBBC1*, 36.9 Mb～47.4 Mb に「紫さやか」型で百粒重を大きくする *qSD100WT1* をそれぞれ特定した。第 3 染色体の 1.1 Mb～6.1 Mb に「紫さやか」型で種皮色と煮豆の色相角を下げる *qSCH1* と *qBBH1*, 百粒重を大きくする *qSD100WT2* を特定した。また、18.7 Mb～24.4 Mb に「紫さやか」型で主茎節数を少なくする *qBRN1* を特定した。第 4 染色体の 6.9 Mb～10.2 Mb に「紫さやか」型で主茎長を長くする *qSTL1*, 一莢内粒数を多くする *qSDNPPD1* に特定した。また、6.9 Mb～22.7 Mb に「紫さやか」型で種皮色の彩度を上げる *qSCC1* を特定した。第 7 染色体の 0.4 Mb～33.1 Mb に「紫さやか」型で種皮の彩度を下げる *qSCC2* を特定した。また、31.7 Mb～33.1 Mb に「紫さやか」型で主茎長を高くする *qSTL2* を特定した。第 8 染色体の 6.0 Mb～17.2 Mb に「紫さやか」型で種皮色の彩度を下げる *qSCC3* を特定

した．また，当該領域と一部重なる 11.1 Mb～17.2Mb に「紫さやか」型で主茎節数を少なくする *qBRN2* を特定した．第 10 染色体の 0.8 Mb～4.6 Mb に「紫さやか」型で煮豆の色相角を上げる *qBBH2* を特定した．また，23.8 Mb～28.5 Mb には，QTL クラスター 1 が見出され，「紫さやか」型で種皮色の明度を下げる *qSCL1*，種皮色の色相角を下げる *qSCH2*，煮豆の彩度を上げる *qBBC2*，煮豆の色相角を下げる *qBBH3*，胚軸長を高くする *qECL1*，主茎節数を少なくする *qBRN3*，百粒重を小さくする *qSD100WT3* を特定した．第 11 染色体の 0.3 Mb～35.4 Mb に「紫さやか」型で種皮色の明度を上げる *qSCL2*，種皮色の彩度を上げる *qSCC4*，胚軸長を高くする *qECL2* を特定した．また，当該ゲノム領域と一部重なる 4.5 Mb～35.4 Mb には，「紫さやか」型で百粒重を大きくする *qSD100WT5* を特定した．さらに，35.4 Mb～36.5 Mb には，QTL クラスター 2 が見出され，「紫さやか」型で種皮色の色相角を下げる *qSCH3*，煮豆の明度を下げる *qBBL1*，煮豆の彩度を下げる *qBBC3*，煮豆の色相角を下げる *qBBH4*，開花始までの日数を早生化する *qFLD1*，分枝数を多くする *qLBN1*，百粒重を大きくする *qSD100WT4* を特定した．

本研究で解析したアズキの各形質には，1～5 個の QTL によって制御されていた．これらの QTL は、特定の染色体に偏ることなく，第 1，3，4，7，8，10，11 染色体の 7 本の染色体に座乗した．このうち，27 個の QTL のポジションが，既報の QTL のポジション (Isemura *et al.* 2007, Kaga *et al.* 2008, Li *et al.* 2017, Mori *et al.* 2021) と重ならないことから，新規の QTL と推定された．

## 5-2 MAS 法に利用できる DNA マーカーの開発

本研究によって、アズキの育種事業に活用できる可能性が示された形質ならびに関わる QTL とその選抜に利用できる DNA マーカーを表 5-1 にまとめた。

DNA マーカーAZ01\_41.0M\_ID は、百粒重に関わる *qSD100WT1* の選抜マーカーとして選定された。当該マーカーについて、「紫さやか」型を選抜することで、百粒重が 0.4g~0.6g 大きい個体の選抜が期待できる。次に、DNA マーカーAZ03\_1.1M\_ID は、煮豆の色相角に関わる *qBBH1* と百粒重に関わる *qSD100WT2* の選抜マーカーとして選定された。当該マーカーについて、「紫さやか」型を選抜することで、色相角が 0.5 小さく、百粒重が 0.27g~0.34g 大きい個体の選抜が期待できる。さらに、DNA マーカーAZ10\_28.5M\_ID は、煮豆の色相角に関わる *qBBH3* と胚軸長に関わる *qECL1* と百粒重に関わる *qSD100WT3* の選抜マーカーとして選定された。当該マーカーについて、「紫さやか」型を選抜することで、色相角が 0.5 小さく、胚軸長が 0.1~0.4 cm 長い個体の選抜が期待できる。ただし、当該選抜によって、百粒重が 0.3g~0.6g 小さい個体が選抜されることを考慮する必要がある。また、DNA マーカーAZ11\_4.5M\_ID は、胚軸長に関わる *qECL2* を選抜できるマーカーとして選定できた。当該マーカーについて、「紫さやか」型を選抜することで、胚軸長が 0.1~0.4 cm 長い個体の選抜が期待できる。最後に、DNA マーカーAZ11\_35.4M\_ID は、煮豆の色相角に関わる *qBBH4* の選抜マーカーとして選定された。当該マーカーについて、「紫さやか」型を選抜することで、色相角が 0.5~0.7 小さい個体の選抜が期待できる。



### 5-3 今後への展開

本研究で特定した QTL のゲノムポジションデータは，将来，原因遺伝子の単離の基礎となる．そして，QTL の原因遺伝子が単離できれば，より高精度な遺伝子型判定を可能にする DNA マーカーの作出が可能になる．さらに，形質発現に至る遺伝子のネットワークの解明や分子機構の解明への展開に期待できる．

表 5－1．本研究で開発した MAS 法に利用できる可能性のある DNA マーカーのリスト

染色体	マーカー名	マーカー の種類	PCR法による 増副産物サイズ (bp)			形質	寄与率 (%)		相加効果 <sup>c</sup>	
			紫さやか <sup>a</sup>	エリモショウズ <sup>a</sup>	差 <sup>b</sup>		最小	最大	最小	最大
1	AZ01_41.0M_ID	InDel	257	231	26	百粒重	5.2	7.3	0.4	0.6
3	AZ03_1.1M_ID	InDel	184	217	-33	煮豆色相角	4.4	—	-0.5	—
						百粒重	3.9	6.5	0.27	0.34
10	AZ10_28.5M_ID	InDel	225	197	28	煮豆色相角	4.2	—	-0.5	—
						胚軸長	13.0	27.1	0.1	0.4
						百粒重	5.6	15.2	-0.6	-0.3
11	AZ11_4.5M_ID	InDel	344	322	22	胚軸長	4.2	16.8	0.1	0.4
	AZ11_35.4M_ID	InDel	262	240	22	煮豆色相角	5.5	9.4	-0.7	-0.5

<sup>a</sup> 「しゅまり」と「しゅまり BT」は「紫さやか」と同一サイズ.

<sup>b</sup> 「紫さやか」と「エリモショウズ」との差.

<sup>c</sup> 「紫さやか」型対立遺伝子の相加効果.

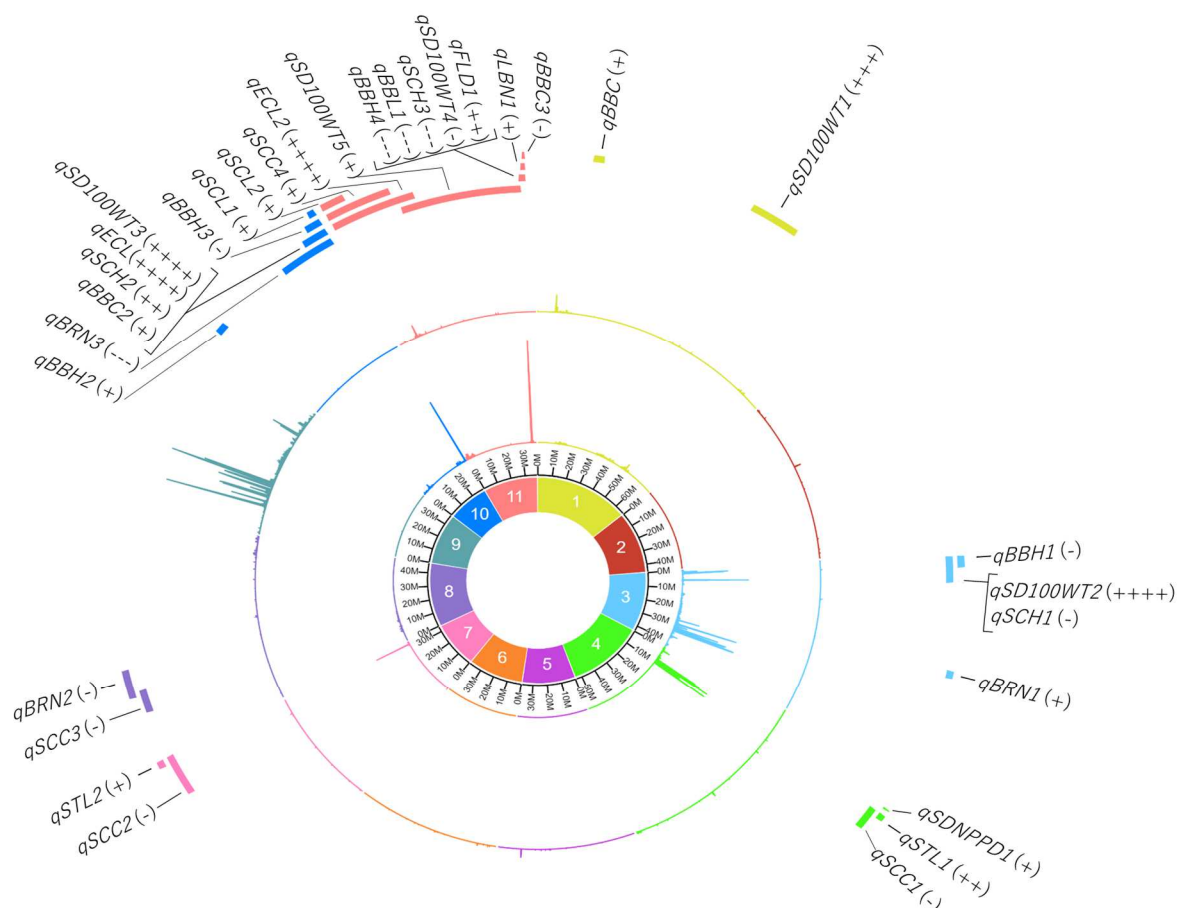


図 5-1. アズキ品種「紫さやか」について、100kb のスライディングウインドウ毎の「しゅまり BT」型 SNP/InDel (内側) と「エリモショウズ」型 SNP/InDel (中央) の頻度分布、ならびに本研究で検出した QTL のポジション (外側)。

QTL の名称に続くカッコ内の「+」は、「紫さやか」型対立遺伝子が値を大きくし、「-」は、小さくすることを示す。また、QTL の検出された環境の数を+と-の数でそれぞれ示した。 *qSCL1*, *qSCL2* は種皮色の明度に関わる QTL, *qSCC1*, *qSCC2*, *qSCC3*, *qSCC4* は種皮色の彩度に関わる QTL, *qSCH1*, *qSCH2*, *qSCH3* は種皮色の色相角に関わる QTL, *qBBL1* は煮豆の明度に関わる QTL, *qBBC1*, *qBBC2*, *qBBC3* は煮豆の彩度に関わる QTL, *qBBH1*, *qBBH2*, *qBBH3*, *qBBH4* は煮豆の色相角に関わる QTL, *qFLD1* は開花始の日数に関わる QTL, *qSTL1*, *qSTL2* は主茎長に関わる QTL, *qECL1*, *qECL2* は胚軸長に関わる QTL, *qBRN1*, *qBRN2*, *qBRN3* は主茎節数に関わる QTL, *qLBN1* は分枝数に関わる QTL, *qSDNPPD1* は一莢内粒数に関わる QTL, *qSD100WT1*, *qSD100WT2*, *qSD100WT3*, *qSD100WT4*, *qSD100WT5* は百粒重に関わる QTL。

## Summary

Adzuki beans (*Vigna angularis* [Willd.] Ohwi & Ohashi) are grown worldwide, including in Africa, Europe, and the Americas, with Asia having the largest area of adzuki beans. About 24 countries in the world plant adzuki beans. In addition to China, which has the largest production area, Japan, North Korea, South Korea, Australia, Thailand, India, Myanmar, the United States, Canada, Brazil, Colombia, New Zealand, Zaire, Angola, and the former Soviet Union in the Far East all have certain production areas (Zhang *et al.* 2007). The annual production of adzuki beans in Japan and China is estimated to be 800,000 metric tons (Vaughan *et al.* 2005). Purplish-red or dark-purple paste prepared from boiled red adzuki beans is called “an” (bean paste) and is an important ingredient in Japanese and Chinese sweets. In Japan, red adzuki beans are used to prepare the sweet “wagashi” and the sugar-glazed boiled bean dish “amanatto.” Together, these three uses account for more than 80% of adzuki bean consumption in Japan.

In Chapter 1, I introduced the current status of adzuki beans production in Japan and the challenges of phenotypic selection in adzuki breeding. In addition, I mentioned the potential of genomic research platforms that can be used to solve these issues.

Chapter 2 was conducted to clarify the genomic structure of the adzuki bean cultivar “Murasakisayaka” and to develop DNA markers between “Murasakisayaka” and cv. “Erimoshozu.” A total of 40,629 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 9,996 insertions and deletions (InDels) were identified between “Murasakisayaka” and “Erimoshozu.” Based on these

polymorphisms, 38 DNA markers that covered 33% of the whole genome sequence were developed.

Chapter 3 was conducted to clarify the genetic basis of boiled bean color and seed coat color in adzuki bean. Eight QTLs for boiled beans color and nine for seed coat color were identified. Among these, three QTLs (*qBBH1*, *qBBH3*, and *qBBH4*) contributed to the hue angle of boiled beans. Seven QTLs related to seed coat color were detected in a single environment, one in two environments, and one in three environments. Among QTLs related to boiled beans, six were detected in a single environment and two in three environments, indicating that the effects of QTLs related to seed coat color and boiled beans were influenced by the environment. In addition, the genotypes with all three QTLs had the smallest hue angles in all four environments compared to the other genotypes. This genotype had DNA markers in the vicinity of the three QTLs (*qBBH1*, *qBBH3*, and *qBBH4*) related to the hue angle of boiled beans, indicating the effectiveness of the markers as selection markers.

Chapter 4 was conducted to clarify the genetic basis of yield-related traits and epicotyl length in adzuki beans. A total of 13 QTLs were identified for yield-related traits such as flowering time, stem length, branch number, lateral branch number, and the number of seeds per pod; 100-seed weight and 2 QTLs were identified for epicotyl length as the QTLs related to the suitability for mechanized cultivation. Of these 13 QTLs, seven were detected in a single environment, two in two environments, two in three environments, and four in four environments. Thus, the environment influenced the effect of QTLs on yield and mechanization suitability. Compared to the lines with other genotypes in the four environments,

the lines with two QTLs (*ECL1* and *ECL2*) for epicotyl length in the “Murasakisayaka” genotype had the longest epicotyl length. Of the three QTLs detected in three or more environments, two “Murasakisayaka” types (*qSD100WT1* and *qSD100WT2*) and one “Erimoshozu” type (*qSD100WT3*) had the largest weight of 100 seeds. Therefore, epicotyl length and 100-seed weight were highly effective for marker-assisted selection in the breeding program.

In Chapter 5, the potential of marker assisted selection (MAS) in “an-paste” color, yield-related traits, and epicotyl length was discussed based on the present study. For MAS of the hue angle, the most important character of boiled bean color, three potential markers—*qBBH1* (chromosome 3), *qBBH3* (chromosome 10), and *qBBH4* (chromosome 11)—were identified. For MAS of 100-seed weight, three potential markers—*qSD100WT1* (chromosome 1), *qSD100WT2* (chromosome 3), and *qSD100WT3* (chromosome 10)—were identified. For MAS of epicotyl length, two potential markers—*ECL1* (chromosome 10) and *ECL2* (chromosome 11)—were identified. We are expected to clarify the improvement by applying these markers in breeding programs.

In conclusion, the present study developed new DNA markers for MAS in breeding program. Furthermore, the present study explained the genetic basis of the number of QTLs involved in controlling the practical traits of breeding targets, locus positions on chromosomes, contribution rates to trait variations, and allelic effects. The new DNA markers developed in this study can add other useful traits to “Murasakisayaka” while maintaining its seed size, epicotyl length, and bean paste color. In addition, they will be useful for developing DNA marker-assisted selection methods and QTL analysis in adzuki beans as well as for identifying

new genes that play important functions in the superior cultivars. It is expected that in the future of adzuki bean breeding, the new DNA markers will be an important tool for studying genetic diversity and molecular breeding.

## 謝 辞

大学院博士後期課程在学期間中の 2020 年 1 月から新型コロナウイルスの感染拡大による未曾有の事態の只中にあり、私たちの日常は様々な制約に晒され、我が国の経済も苦境に喘ぎ、緊急事態宣言で大学生活にもかつてない支障が生じました。

こうした中、本論文をまとめるにあたり、終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻をいただきました帯広畜産大学環境農学研究部門・加藤清明教授に心より感謝申し上げます。副指導教員や論文審査委員としてご助言とご協力をいただいた同・森正彦准教授、同・大西一光准教授、同・實友玲奈准教授、ならびに弘前大学農学生命科学部食料資源学科・千田峰生教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、「紫さやか」の育成において主動的立場で多くのご助言と本研究の供試材料の組換え自殖系統の交配および世代促進をしていただきました株式会社バイオテック・長岡泰良博士に心より感謝いたします。

株式会社御座候・山田宗平氏と同・小河俊郁氏には、「紫さやか」の加工適性と製餡評価で多くのご助言とご協力をいただきました。ここに記すとともに心より感謝申し上げます。

本研究の実験の実施において、株式会社バイオテック・入来院美奈氏(当時)、帯広畜産大学大学院植物生産科学コース・吉田透氏、同・吉川晶子氏にご協力をいただきましたことを記すとともに心より感謝申し上げます。

本研究を実施するために植物材料の栽培管理をしていただきました沖



縄県宮古島市・川満定秀氏，北海道幕別町・長崎重喜氏，株式会社バイオファーム・長岡優典氏に，それぞれ多大なご協力をいただきました．皆さまに心より感謝申し上げます．

本研究では，多くの生産者様，農業協同組合様，豆類集荷業者様などの関係機関の数多くの皆様にご協力をいただきました．現地栽培試験の圃場選定や試験圃場の管理にご協力をいただければ，こうした試験研究を続けることはかないませんでした．深く感謝いたします．

大学院に在籍することで，2018～2022 年度には加藤教授の研究室を中心とする学生たちのゼミや交流会にも，参加させていただくことができました．学生たちが興味と関心を持つ点や研究を進める場に接することができ，大変有益な経験となりました．当該年度に在籍していた学生の皆様にも感謝申し上げます．また，大学が本来の姿を取り戻す日が一日も早く訪れることを願っております．

最後に，博士後期課程に社会人入学することを快く受け入れ，在学期間中の5年間，激励とサポートをしてくれるとともに，播種と圃場管理作業，さらに圃場調査と品質調査にご協力してくれた，妻・ひろみと娘・星来に感謝いたします．

本研究の知見は，北海道アズキの生産者と実需者の双方の需要を反映した形質を効果的に選抜できる技術開発の基礎として，今後のアズキの育種に大きく貢献し，祝辞や祭事でアズキを食す日本独自の食文化を後代まで継承できるよう，本研究で微力ながら貢献が出来たら幸甚に存じる．

2022（令和4）年12月

## 引用文献

- 青山聡・島田尚典・長谷川尚輝・村田吉平・藤田正平・松川勲（2009）アズキ新品種「きたろまん」の育成．北海道立農試集報 94： 1-16.
- Aoyama, S., Onishi, K. and Kato, K. (2011) The genetically unstable dwarf locus in azuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi). J. Hered. 102: 604-609.
- 浅間和夫・北村亨（1984）小豆の登熟期における気象条件が種子色に与える影響．日本育種学会・日本作物学会北海道談話会会報 24： 29.
- Breton, G., Danyluk, J., Charron, JB. and Sarhan, F. (2003) Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispanning transmembrane protein family from cereals and Arabidopsis. Plant Physiol. 132: 64-74.
- Chu, L., Zhao, P., Wang, K., Zhao, B., Li, Y., Yang, K. and Wan, P. (2021) *VaSDC1* is involved in modulation of flavonoid metabolic pathways in black and red seed coats in adzuki bean (*Vigna angularis* L.). Front. Plant Sci. 12: 1464.
- Churchill, G.A. and R.W. Doerge. (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics 138: 963-971.
- Dogimont, C., Bendahmane, A., Chovelon, V. and Boissot, N. (2010) Host plant resistance to aphids in cultivated crops: Genetic and molecular bases, and interactions with aphid populations. C. R. Biol. 333: 566-573.
- 藤田正平・島田尚典（1991）小豆における開花時期と種皮色との関係およ

びその品種間の差異. 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会報  
31: 46.

藤田正平・村田吉平・島田尚典・青山聡・千葉一美・松川勲・白井滋久・  
三浦豊雄・越智弘明・近藤則夫 (2002) アズキ新品種 「しゅまり」  
の育成. 北海道立農試集報 82: 31-40.

藤田正平 (2007) アズキ落葉病およびアズキ茎疫病の抵抗性系統作出に関  
わる育種学的研究. 北海道立農試報告 115: 1-55.

Galeano, C.H., Ferná'ndez, A.C., Go'mez, M. and Blair, M.W. (2009) Single  
strand conformation polymorphism based SNP and Indel markers for genetic  
mapping and syntenic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).  
BMC Genomics. 10: 629.

Han, O.K., Kaga, A., Isemura, T., Wang, X. W., Tomooka, N. and Vaughan, D.A.  
(2005) A genetic linkage map for azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi  
& Ohashi]. Theor. Appl. Genet. 111: 1278-1287.

畑井朝子 (1987) あんに関する最近の研究動向. 調理科学 20. 4: 294-301.

北海道農政部 (2022) 北海道オープンデータ CC-BY4.0. [[https://  
creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ja](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ja)].

Hahlbrook K. and Scheel D. (1989) Physiology and molecular biology of  
phenylpropanoid metabolism. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 40:  
347-369.

Hillier, L.W., Marth, G.T, Quinlan, A.R., Dooling, D., Fewell, G., Barnett. D.,  
Fox, P., Glasscock, J.I., Hickenbotham, M., Huang, W., Magrini, V.J.,  
Richt ,R.J., Sander, S.N., Stewart, D.A., Stromberg, M., Tsung, E.F., Wylie,  
T., Schedl, T., Wilson, R.K. and Mardis, E.R. (2008) Whole-genome

- sequencing and variant discovery in *C. elegans*. *Nat Methods*. 5: 183-188.
- 日向康吉 (1984) 植物の種間交雑による育種. *化学と生物* 22: 833-840.
- Horiuchi, Y., Yamamoto, H., Ogura, R., Shimoda, N., Sato, H. and Kato, K. (2015) Genetic analysis and molecular mapping of genes controlling seed coat colour in adzuki bean (*Vigna angularis*). *Euphytica*. 206: 609-617.
- Hunter, R.S. (1942) Photoelectric tristimulus colorimetry with three filters. *JOSA*. 32: 509-538.
- Hyten, D.L., Cannon, S.B., Song, Q., Weeks, N., Fickus, E.W., Shoemaker, R.C., Specht, J.E., Farmer, A.D., May G.D. and Cregan, P.B. (2010a) High-throughput SNP discovery through deep resequencing of a reduced representation library to anchor and orient scaffolds in the soybean whole genome sequence. *BMC Genomics*. 11: 38.
- Hyten, D.L., Song, Q., Fickus, E.W., Quigley, C.V., Lim, J.S., Choi, I.Y., Hwang, E.Y., Pastor-Corrales, M. and Cregan, P.B. (2010b) High-throughput SNP discovery and assay development in common bean. *BMC Genomics* 11:475 sequence. *BMC Genomics*. 11: 38.
- Isemura, T., Kaga, A., Konishi, S., Ando, T., Tomooka, N., Han, O.K. and Vaughan, D.A. (2007) Genome dissection of traits related to domestication in azuki bean (*Vigna angularis*) and comparison with other warm-season legumes. *Ann. Bot.* 100: 1053-1071.
- Kaga, A., Isemura, T., Tomooka, N. and Vaughan, D. A. (2008). The genetics of domestication of the azuki bean (*Vigna angularis*). *Genetics*. 178: 1013-1036.
- Kang, Y., Satyawati, D., Shim, S., Lee, T., Lee, J., Hwang, W., Kim, S., Lestari,

- P., Laosatit, K., Kim, K., Ha, T., Chitikineni, A., Kim, M., Ko, J., Gwang, J., Monn, J., Lee, Y., Park, B., Varshney, R. and Lee, S.H. (2015) Draft genome sequence of adzuki bean, *Vigna angularis*. Sci. rep. 5: 1-8.
- Kang, Y.J., Kim, K.H., Shim, S., Yoon, M.Y., Sun, S., Kim, M.Y., Van, K. and Lee, S.H. (2012). Genome-wide mapping of NBS-LRR genes and their association with disease resistance in soybean. BMC Plant Biol. 12: 139.
- 加藤淳・細谷恵理・市川信雄（1992）北海道産小豆の品質関連形質の変異および種皮色とアン色の関係．北海道立農試集報 64： 25-34.
- 加藤淳・目黒孝司（1994）小豆種皮色に及ぼす着莢部位および開花時期の影響．北農 61： 43-49.
- 川合のどか・森正彦・長澤秀高・加藤清明（2018）長胚軸性アズキの選抜マーカーの開発．育種・作物学会北海道談話会会報 59： 54-55.
- Koes, R.E., Spelt, C.E., Reif, H.J., van den Elzen, P.J.M., Veltkamp, E. and Mol, J.N. (1986). Floral tissue of *Brunia hybrida* (V30) expresses only one member of the chalcone synthase multigene family. Nucleic Acids Res. 14: 5229-5239.
- Kosambi, D.D. (1943) The estimation of map distances from the recombination values. Ann. Eugen. 12: 172-175.
- Lai, J., Li, R., Xu, X., Jin, W., Xu, M., Zhao, H., Xiang, Z., Song, W., Ying, K., Zhang, M., Jiao, Y., Ni, P., Zhang, J., Li, D., Guo, X., Ye, K., Jian, M., Wang, B., Zheng, H., Liang, H., Zhang, X., Wang, S., Chen, S., Li, J., Fu, Y., Springer, N.M., Yang, H., Wang, J., Dai, J., Schnable, P.S. and Wang, J. (2010) Genome-wide patterns of genetic variation among elite maize inbred lines. Nat Genet. 42: 1027-1030.

- Li, F., Cao, D., Liu, Y., Yang, T. and Wang, G. (2015). Transcriptome sequencing of lima bean (*Phaseolus lunatus*) to identify putative positive selection in legumes. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 15172-15187.
- Li, H. and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *bioinformatics* 25(14): 1754-1760.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G. and Durbin, R. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078-2079.
- Little, A. C., (1975) Off on a tangent. *J. Food Sci.* 40: 410-411.
- Li, Y., Yang, K., Yang, W., Chu, L., Chen, C., Zhao, B., Li, Y., Jian, J., Yin, Z., Wang T. and Wan, P. (2017) Identification of QTL and qualitative trait loci for agronomic traits using SNP markers in the adzuki bean. *Fron. Plant Sci.* 8: 840.
- Liu, C., Fan, B., Cao, Z., Su, Q., Wang, Y., Zhang, Z. and Tian, J. (2016) Development of a high-density genetic linkage map and identification of flowering time QTLs in adzuki bean (*Vigna angularis*). *Sci rep.* 6: 1-10.
- Lumpkin T.A. and McClary D.C. (1994) Azuki bean: botany, production and uses. Wallingford (UK): CAB International.
- Lyu, J.I., Ramekar, R., Kim, J.M., Hung, N.N., Seo, J.S., Kim, J.B., Choi, I.Y., Park, K.C. and Kwon, S.J. (2021). Unraveling the complexity of faba bean (*Vicia faba* L.) transcriptome to reveal coldstress-responsive genes using long-read isoform sequencing technology. *Sci. Rep.* 11: 21094.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernysky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M. and DePristo, M.

- A. (2010). The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20, 1297-1303.
- Mori, M., Maki, K., Kawahata, T., Kawahara, D., Kato, Y., Yoshida, T., Nagasawa, H., Sato, H., Nagano, A., Bethke, P. and Kato, K. (2021) Mapping of QTLs controlling epicotyl length in adzuki bean (*Vigna angularis*). *Breed. Sci.* 71: 208-216.
- 村上知子・平山雄二・栗島こずえ・伊藤裕三・山田弘子（1994）小豆の加熱に関する研究（第7報）：フラボノイドの推定構造．北海道教育大学紀要．第二部．A，数学・物理学・化学・工学編 45：47-55.
- Murray, M. and W. Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- 村田吉平・成河智明・千葉一美・佐藤久泰・足立大山・松川勲（1985）あずき新品種「エリモショウズ」の育成について．北海道立農試集報 53: 103-113.
- 村田吉平（2010）生育速度（DVR, DVI）によるアズキの生育と開花のモデル化．日本育種学会・日本作物学会北海道談話会会報．51: 89-90.
- 長岡寛知・長岡泰良・山田宗平・小河俊郁（2018）落葉病抵抗性で機械化収穫適性が高く，餡色が紫色のアズキ新品種「紫さやか」の育成．日本育種学会・日本作物学会北海道談話会会報 59: 50-51.
- 長岡寛知・山田宗平・小河俊郁・長岡泰良（2020）落葉病抵抗性であん色が紫色のアズキ新品種「紫さやか」の育成．育種学研究 22: 28-32.
- 長岡泰良・沢田壮兵・加藤清明（2004）アズキ種皮色に対する登熟期温度の影響．日本作物学会紀事 73: 330-335.

- 長濱修 (2003) 大納言小豆の濃赤粒対策. 豆類時報 30: 15-22.
- Nakayama, T., Takahashi, S. and Waki, T. (2019) Formation of flavonoid metabolons: functional significance of protein-protein interactions and impact on flavonoid chemodiversity. *Front. Plant Sci.* 10: 821.
- 農林水産省 (2022) 令和 3 年産大豆, 小豆, いんげん及びらっかせい (乾燥子実) の作付面積 .  
[[https://www.maff.go.jp/j/tokei/kekka\\_gaiyou/sakumotu/mens eki/r3/sakutuke\\_mame/index.html](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kekka_gaiyou/sakumotu/mens eki/r3/sakutuke_mame/index.html)].
- Okawa, K., Nakayama, K., Kakizaki, T., Yamashita, T. and Inaba, T. (2008) Identification and characterization of Cor413im proteins as novel components of the chloroplast inner envelope. *Plant Cell Environ.* 31: 1470-1483.
- 大野宏之・佐々木華織・大原源二・中園江 (2016) 実況値と数値予報, 平年値を組み合わせたメッシュ気温・降水量データの作成. *生物と気象* 16: 71-79.
- Rafalski A. (2002) Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol.* 5: 94-100.
- Riahi, L., Zoghalmi, N., Fournier-Level, A., Dereeper, A., Le Cunff, L., Laucou, V., Mliki, A. and This, P. (2013) Characterization of single nucleotide polymorphism in Tunisian grapevine genome and their potential for population genetics and evolutionary studies. *Genet Resour Crop Evol.* 60: 1139-1151.
- Ryder, T.B., Hedrick, S.A., Bell, J.N., Liang, X., Clouse, S.D. and Lamb, C.J. (1987) Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Gen.*



Genet. 210: 219-233.

Sakai, H, Naito, K., Ogiso-Tanaka, E., Takahashi, Y., Iseki, K., Muto, C., Satou, K., Teruya, K., Shiroma, A., Shimoji, M., Hirano, T., Itoh, T., Kaga, A. and Tomooka, N. (2015) The power of single molecule real-time sequencing technology in the de novo assembly of a eukaryotic genome. Sci Rep. 5: 16780.

Sakai, H., Naito, K., Takahashi, Y., Sato, T., Yamamoto, T., Muto, I., Itoh, T. and Tomooka, N. (2016) The Vigna Genome Server, 'Vig GS': A genomic knowledge base of the genus Vigna based on high-quality, annotated genome sequence of the Azuki Bean, *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi. Plant Cell Physiol. 57: e2.

Salathia, N., Lee, H.N., Sangster, T.A., Morneau, K., Landry, C.R., Schellenberg, K., Behere, A.S., Gunderson, K.L., Cavalieri, D., Jander, G. and Queitsch, C. (2007) Indel arrays: an affordable alternative for genotyping. Plant J. 51: 727-737.

Sasanuma, S., Takeda, K. and Hayashi K. (1966) Black red pigment of “adzuki bean” studies on anthocyanins LV. Botanical Magazine Tokyo, 79: 807-810.

佐藤仁 (2010). 地球温暖化と生産構造の変化に対応できる北海道農林業の構築－気象変動が道内主要作物に及ぼす影響の予測－. 北海道立農業試験場資料 39: 55-63.

佐藤仁・堀内優貴 (2017). 新たに開発された北海道の小豆品種「ちはやひめ」と「十育 167 号」. 豆類時報 87: 20-26.

佐藤導謙・伊藤光彦・宮野邦夫・足立大山 (1993) アズキ品種

「カムイダナゴン」の種皮色に対する播種日及び収穫時期の影響. 日

- 本育種学会・日本作物学会北海道談話会報 34: 30-31.
- 沢田壮兵・長岡優典・青山聡・村田吉平 (2000). アズキおよび近縁種の上胚軸長の変異. 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会会報 41: 103-104.
- 島田尚典 (2009) 長胚軸・長花柄小豆系統の機械除草, コンバイン収穫適性評価. 北海道立農試集報 94: 55-64.
- Subbaiyan, G.K., Waters, D.L.E., Katiyar, S.K., Sadananda, A.R., Vaddadi, S. and Henry, R.J. (2012) Genome-wide DNA polymorphisms in elite indica rice inbreds discovered by whole-genome sequencing. *Plant Biotechnol. J* 10: 623-634.
- Suzuki, T., Yoshii, T., Fujita, S., Shimada, H., Takeuchi, T. and Kondo, N. (2013) DNA markers linked to *Pga1*, an adzuki bean gene that confers resistance to *Cadophora gregata* race 1. *Breed. Sci.* 63: 353-357.
- van Ooijen, J.W. (2002) MapQTL® 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Kyazma B.V., Wageningen, The Netherlands.
- van Ooijen, J.W. (2006) JoinMap® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, The Netherlands.
- Vaughan, D.A., Tomooka, N. and Kaga A. (2005) Azuki bean [*Vigna angularis* (L.) Ohwi and Ohashi]. In: Singh RJ, Jauhar PP (eds) Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. Grain legumes, vol 1. CRC Press. Boca Roca. Pp: 341-353
- Vasemagi, A., Gross, R., Palm, D., Paaver, T. and Primmer, C.R. (2010)

- Discovery and application of insertion–deletion (INDEL) polymorphisms for QTL mapping of early life-history traits in Atlantic salmon. *BMC Genomics*. 11: 156.
- Wang, D.G., Fan, J.B., Siao, C.J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M.S., Shen N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T.J., Lipshutz, R., Chee, M. and Lander, E.S. (1998) Large-scale identification, mapping, and genotyping of single- nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*. 280: 1077-1082.
- Wang, K., Li, M. and Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic acids research*. 38: e164.
- Yamamoto, H., Horiuchi, Y., Ogura, R., Sakai, H., Sato, H. and Kato, K. (2016) Identification and molecular mapping of *Flowering Date1 (FD 1)*, a major photoperiod insensitivity gene in the adzuki bean (*Vigna angularis*). *Plant Breed*. 135: 714-720.
- 由田宏一・佐藤久泰・上嶋尚・石井伸朗・佐藤導謙（1991）アズキにおける品質関連形質の変異とその成因．第2報北海道産にみられる種皮色の変異．日作紀 60： 234-240.
- Yoshida, K., Sato, Y., Okuno, R., Kameda, K., Isobe, M. and Kondo, T. (1996) Structural analysis and measurement of anthocyanin from colored seed coats of *Vigna*, *Phaseolus*, and *Glycine* legumes. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 60: 589-593.
- Yoshida, K., Nagai, N., Ichikawa, Y., Goto, M., Kazuma, K., Oyama, K., Koga, K., Hashimoto, M., Iuchi, Y., Takaya, Y., and Kondo, T. (2019) Structure of

two purple pigments, catechinopyranocyanidins A and B from the seed-coat of the small red bean, *Vigna angularis*. Sci Rep. 9: 1-12.

Zhang, H., Yao, Y., Tan, L., Wang, Q., Xu, Y., Liu, H. and Liu, J. (2007) Application of HACCP system in standardization production of adzuki bean. J. Anhui Agric. Sci. 23: 7039-7041.

Zhao, P., Chu, L., Wang, K., Zhao, B., Li, Y., Yang, K. and Wan, P. (2022) Analyses on the pigment composition of different seed coat colors in adzuki bean. Food Sci. Nutr. 10: 1-9.