



# アズキにおける分子マーカーを利用した遺伝子的変異の解析

伊勢村, 武久

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Date of Publication)

2013-07-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2526

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002526>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

アズキにおける分子マーカーを利用した遺伝的変異の解析

平成 14 年 1 月

神戸大学大学院自然科学研究科

伊勢村 武久

## 目次

第1章 緒言	1
--------	---

第2章 種子貯蔵タンパク質の電気泳動像に基づいた在来アズキ系統の 遺伝的変異と地理的分布	
---	--

緒論	4
----	---

### 材料および方法

供試材料	5
------	---

電気泳動	5
------	---

### 結果

多型バンドの同定	8
----------	---

各多型バンドポジションにおけるバンドパターンの地理的分布	8
------------------------------	---

タンパク質タイプの同定	13
-------------	----

タンパク質タイプの地理的分布	13
----------------	----

考察	15
----	----

摘要	17
----	----

第3章 農業形質から評価した在来アズキ系統の遺伝的多様性	
------------------------------	--

緒論	19
----	----

### 材料および方法

供試材料	20
------	----

形質調査	20
------	----

データ解析	20
-------	----

### 結果



材料および方法	
供試材料	68
DNA の抽出および PCR 分析	69
RAPD マーカーの連鎖解析	69
結果	
マーカーの分離	69
連鎖解析	84
UA 地図と AN 地図の比較	102
組換え近交系世代における地図と分離世代におけるそれ との比較	102
考察	112
摘要	119
第6章 総合考察	121
謝辞	125
引用文献	126

## 第1章 緒言

アズキ (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi) は東アジアを起源とし、アズキ亜属 (*Ceratotropis*) の中の重要なマメ類の一つとなっている (Siriwandhane et al. 1991)。アズキの主たる栽培地域は中国、韓国、日本などの北東アジアであり、これらの地域では、ダイズに次いで重要なマメとして古くからその栽培が行われてきた (Lumpkin and McClary 1994)。

北東アジアの人々にとって、赤色は祝い事と最も深い関係がある特別な色であることから、美しい赤色をしたアズキはこの地域の食文化においても独特の地位を占めてきた。とくに、我が国では、アズキは和菓子 (餡)、ぜんざい、赤飯の材料としてなど特殊な用途を持っており、この国の食文化において欠かすことのできない重要な食材の一つとなっている。しかしながら、アズキの生産は冷害や病虫害の影響を受けやすいため、その収穫量は年次によって大きく変動する。したがって、このような様々なストレスに対する抵抗性品種や多収性品種を育成することが重要な課題となっている (村田 1999)。

作物の遺伝的改良には、一般的に幅広い遺伝資源とそれらの遺伝的変異に関する情報が不可欠である。中国をはじめとする北東アジアの各国には、今なお数多くの在来アズキが存在している (Lumpkin and McClary 1994)。古くから特定の地域において栽培され続けてきた在来品種は、その地域の環境によく適応した優良な遺伝子を数多く集積し、多様な遺伝的変異性を有していることから、これらは貴重な遺伝資源の一つであるといえる。我が国においても、北海道立十勝農業試験場 (十勝農試) や農林水産省農業生物資源研究所 (生物研) などの研究機関において、日本および海外の幅広い地域から収集された多数の在来品種が維持・保存されている。したがって、上記のような品種を育成するために、このような在来品種を利用することは意義あることと考えられる。

アズキにおける遺伝的変異の解析は、従来から、日本の品種を中心に種子重、開花期および草型のような農業形質の調査 (Kawahara 1959, Tasaki 1963, 池主ら 1991) が行われてきた。また、近年、RAPD および AFLP 分析により、

DNA レベルでの遺伝的多様性の解析が、いくつかの品種・系統を用いて行われている（加賀ら 1993、Yee et al. 1999）。しかしながら、幅広い様々な地域から収集された数多くの在来アズキにおける変異を解析した知見は今だみられず、在来品種を有効利用するための遺伝情報は不足している。

このような観点から、本研究では、まず、日本、韓国、中国、台湾、ブータンおよびネパールにおいて収集された数多くの在来品種を用いて、種子貯蔵タンパク質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 分析、農業形質の調査および RAPD 分析によりそれらの遺伝的変異を分析するとともに、各形質における変異と系統の地理的分布の関係を解析した。

近年、幅広い遺伝資源を活用するという観点から、多くの作物において、野生種や近縁種を利用して画期的な新品種を育成するための基礎研究が進められている。このような野生種や近縁種には、その作物には無い病虫害抵抗性などの有用な遺伝子を保持しているものがあり、それらを栽培作物に導入することは意義あることと考えられる。アズキの近縁野生種として、アズキと交雑が可能なヤブツルアズキ (*V. angularis* var. *nipponensis* (Ohwi) Ohwi and Ohashi)、ヒメツルアズキ (*V. nakashimae* (Ohwi) Ohwi and Ohashi)、ヒナアズキ (*V. riukiensis* (Ohwi) Ohwi and Ohashi) などが存在しており、これらはいずれもアズキ育種における遺伝子給源として期待されている (Siriwandhane et al. 1991)。また、近縁栽培種のタケアズキ (*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi) には、栽培アズキやその野生種には存在しないアズキゾウムシ抵抗性遺伝子を有するものが発見されており、これらはアズキゾウムシ抵抗性品種の有用な育種素材であると考えられている (沢および Tan 1976、Tomooka et al. 2000)。

このような野生種や近縁種を有効に利用するためには、それらが持つ有用形質を支配する遺伝子の解析が重要である。有用形質の中には、これまでの遺伝学的手法では解析が困難な開花期や収量などのように複数の遺伝子が関与しているものも多い。近年、このような量的形質に関与する遺伝子を解析するために、分子マーカーを利用して作成された精密な連鎖地図を用いた QTL 解析が盛んに行われている。アズキにおいても、タケアズキとアズキおよびアズキと

ヒメツルアズキとの種間交雑に由来する雑種集団を用いて、分子マーカーによる連鎖地図が作成されている (Kaga et al. 1996a, 2000)。しかし、これらの地図にはまだ不完全な面があり、QTL 解析を行うためにはより詳細な地図が必要であると考えられる。

本研究では、開花期、草丈、粒重などの量的形質を支配する遺伝子の QTL 解析を行うための基礎として、タケアズキとアズキおよびアズキとヒメツルアズキとの種間交雑に由来する 2 つの組換え近交系集団を用いて、RAPD マーカーによる高密度で精密な連鎖地図を作成した。

## 第2章 種子貯蔵タンパク質の電気泳動像に基づいた在来アズキ系統の遺伝的変異と地理的分布

### 緒論

世界中で広く栽培されている作物種の中で、マメ類は最も重要な植物性タンパク質の供給源となっている。マメ類の可食部位である種子には、消化のよい良質な貯蔵タンパク質が豊富に含まれていることから、マメ類を研究対象とする育種家および遺伝学者にとって、種子貯蔵タンパク質における変異の解析は大きな関心事の一つとなっている。

電気泳動法による種子貯蔵タンパク質における変異の解析は簡便で、短期間に多数のサンプルを分析できることから、この手法により多くの作物でその遺伝的変異が解析されている。種子貯蔵タンパク質の遺伝的変異に関する情報は、その遺伝的改良（成分育種）のための基礎的知見となるのはもちろん、品種・系統の分類、属内の種における遺伝的関係の解明、遺伝的多様性の中心や伝播経路の推定などにも利用されている。例えば、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) やベニバナインゲン (*P. coccineus*) では、それぞれ、vicilin および lectin (Brown et al. 1981, 1982) と legmin、vicilin および phytohaemagglutinin (Durante et al. 1989) における変異性をもとにして品種分類が行われている。また、ヒヨコマメ属 (*Cicer*) では、栽培種と8つの野生種との種間関係が明らかにされ、栽培種の祖先型野生種が推定されている (Ahmad and Slinkard 1992)。インゲンマメ (Gepts et al. 1986, 1988, Gepts and Bliss 1988) およびリョクトウ (*V. radiata*) (Tomooka et al. 1992) では、遺伝的多様性の中心および伝播経路を推定するために、種子貯蔵タンパク質における変異が解析されている。

アズキに関しても、山口と小菅 (1991) および森ら (1992) により、いくつかの品種を用いて種子貯蔵タンパク質の泳動像変異が報告されている。しかし、様々な地域から収集された数多くの在来系統を用いた解析は、これまで行われていない。そこで、本研究では、東アジアの各地域において収集された数

多くの在来アズキ系統を用いて、SDS-PAGE分析によりそれらの種内変異を解析し、各タンパク質タイプの地理的分布を調査した。

## 材料および方法

### 供試材料

日本、韓国、中国、台湾、ブータンおよびネパールのアジア各国において収集された434系統を供試した。これらのほとんどは、古くから各地域において栽培され続けてきた在来系統であると考えられる。収集地域ごとの系統数はTable 1 のとおりである。日本国内のものは、38道府県の311系統を7地域に大別して示した。なお、道府県別の供試系統数をFig. 1 に示した。

### 電気泳動

細かく砕いた種子10 mg に 0.2 % SDS、5 M 尿素 および 1 % 2-メルカプトエタノールを含む 0.05 M トリス-塩酸 (pH 8.0) 緩衝液を 1 ml 加えて攪拌することにより全種子貯蔵タンパク質を抽出した。各系統とも 7  $\mu$ l のそれを 11.55 % (W/V) の均一ゲルを用いてSDS-PAGEにより分析した。電気泳動は最初の20分は100 Vの、続く90分は150 Vの定電圧条件で行った。各タンパク質のサブユニットの分子量の推定は、分子量既知のマーカータンパク質 (Pharmacia) の移動度と比較することにより行った。マーカータンパク質の組成はphosphorylase b (94 kDa)、bovine serum albumin (67 kDa)、ovalbumin (43 kDa)、carbonicanhydrase (30 kDa)、soybean trypsin inhibitor (20 kDa) および  $\alpha$ -lactalbumin (14 kDa) である。ゲルは0.225 % コマジーブリリアントブルー G-250 溶液で30分間染色し、その後、5 % 酢酸-20 % メタノール溶液に一昼夜浸して脱色した。各系統のバンドパターンは、少なくとも2枚の泳動像を用いて同定した。バンドパターンが曖昧であった場合には、ゲル濃度や泳動時間を変えて泳動を行い、それを同定した。

Table 1. Azuki bean strains used in this study

Origin	No. of strains
Bhutan	43
Nepal	3
South Korea	70
China (mainland)	2 <sup>1)</sup>
Taiwan	5
Japan	311
Hokkaido	10
North Honshu	41
East Honshu	29
Central Honshu	75
West Honshu	70
Shikoku	31
Kyushu	55
<b>Total</b>	<b>434</b>

1) Two strains from China (mainland) were collected in Dongbei (Northeastern) ditrict and Turpan, respectively.

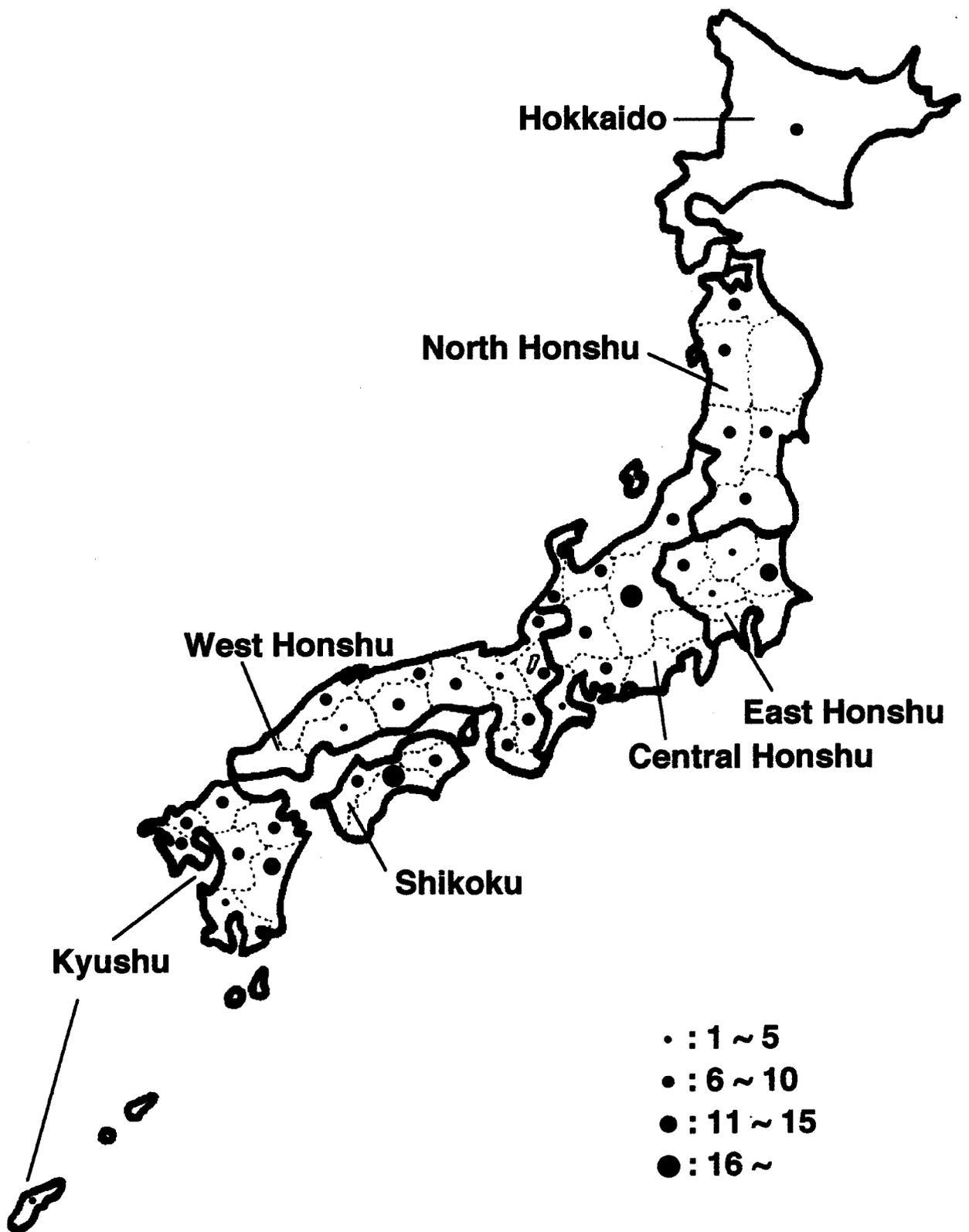


Fig. 1. Seven geographical regions (Hokkaido, North-, East-, Central-, West-Honshu, Shikoku and Kyushu) in Japan. In each prefecture, number of the strains analyzed is indicated by the circle.

## 結果

### 多型バンドの同定

SDS-PAGEによる泳動像において、20から100 kDaの範囲に、系統あたり全部で21から24本のバンドが検出された。これらのうち、それぞれ A (約 67 kDa)、B (63 kDa)、C (36 kDa)、D (32 kDa)、E (31 kDa)、F (28 kDa) および G (27 kDa) として識別した7箇所のバンドで多型が検出された (Figs.2 and 3)。ポジション 'A' のバンドでは、ある系統は1本のバンドとして、また、あるものは2本のバンドとして発現しており、さらに、それぞれについて3種類の移動度が認められた。結果として、この位置において6種類のバンドタイプが確認でき、それらをそれぞれ、A1、A2、A3、A4、A5 および A6として識別した (Fig.4)。ポジション 'C' のバンドは、移動度の違いにより2タイプ(C1 および C2)に分けることができ、C1 の移動度は C2 よりも遅かった。ポジション 'B' および 'D' のバンドは、欠損型の多型を示した。ポジション 'E'、'F' および 'G' のバンドは、系統間でその発現量に差異が認められた。

### 各多型バンドポジションにおけるバンドパターンの地理的分布

各ポジションにおいて観察された多型パターンおよびそれらを示す系統数を Table 2 に示した。'A' のバンドで最も高い変異性がみられ、各タイプの出現頻度は地域間で差異が認められた。ブータン、ネパールおよび中国の系統はすべて A3 タイプを示したのに対し、韓国の系統のほとんどが A2 または A3 タイプのいずれかであり、両タイプの出現頻度はほぼ同じであった。日本では、A2 タイプの出現頻度が最も高く、次いで A3 タイプが多く検出された。さらに、本州中部、西部および四国の系統においては、A4、A5 および A6 の3種類のマイナータイプも観察された。

ポジション 'B' および高濃度の 'G' のバンドは、ブータンおよびネパールのほとんどの系統において特異的に発現していた。C2 タイプはブータンの3系統においてのみ検出された。ポジション 'D' におけるバンドの欠損がブータンおよびネパールのほとんどの系統ならびに本州西部および九州の数系統において

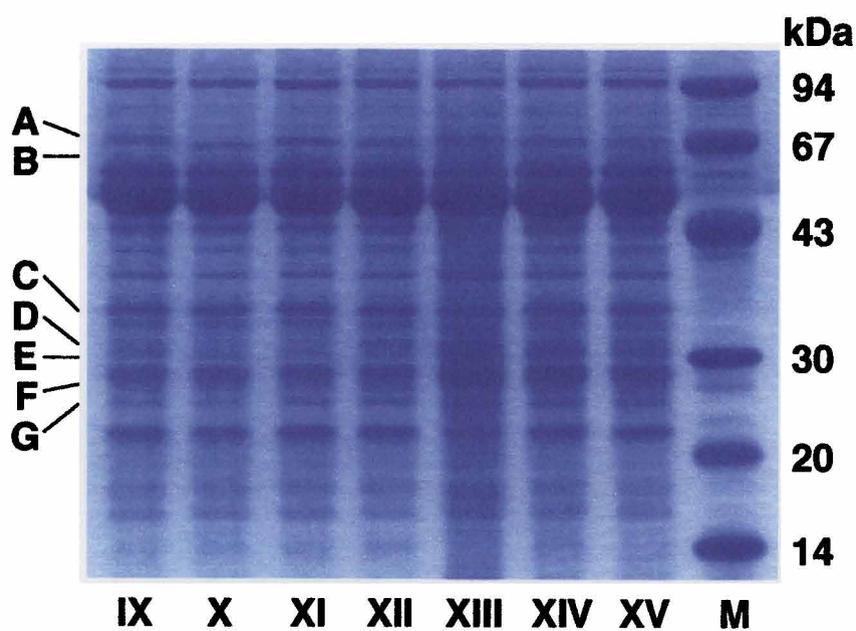
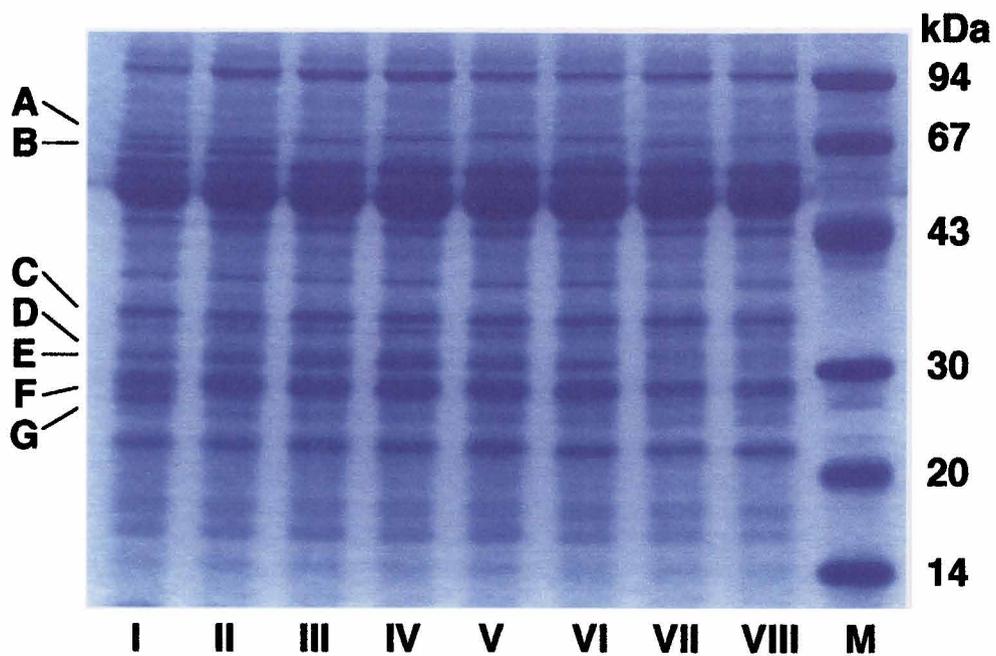


Fig. 2. Electrophoregram types identified by SDS-PAGE of total seed storage proteins in azuki bean.  
 M: Molecular weight marker proteins.

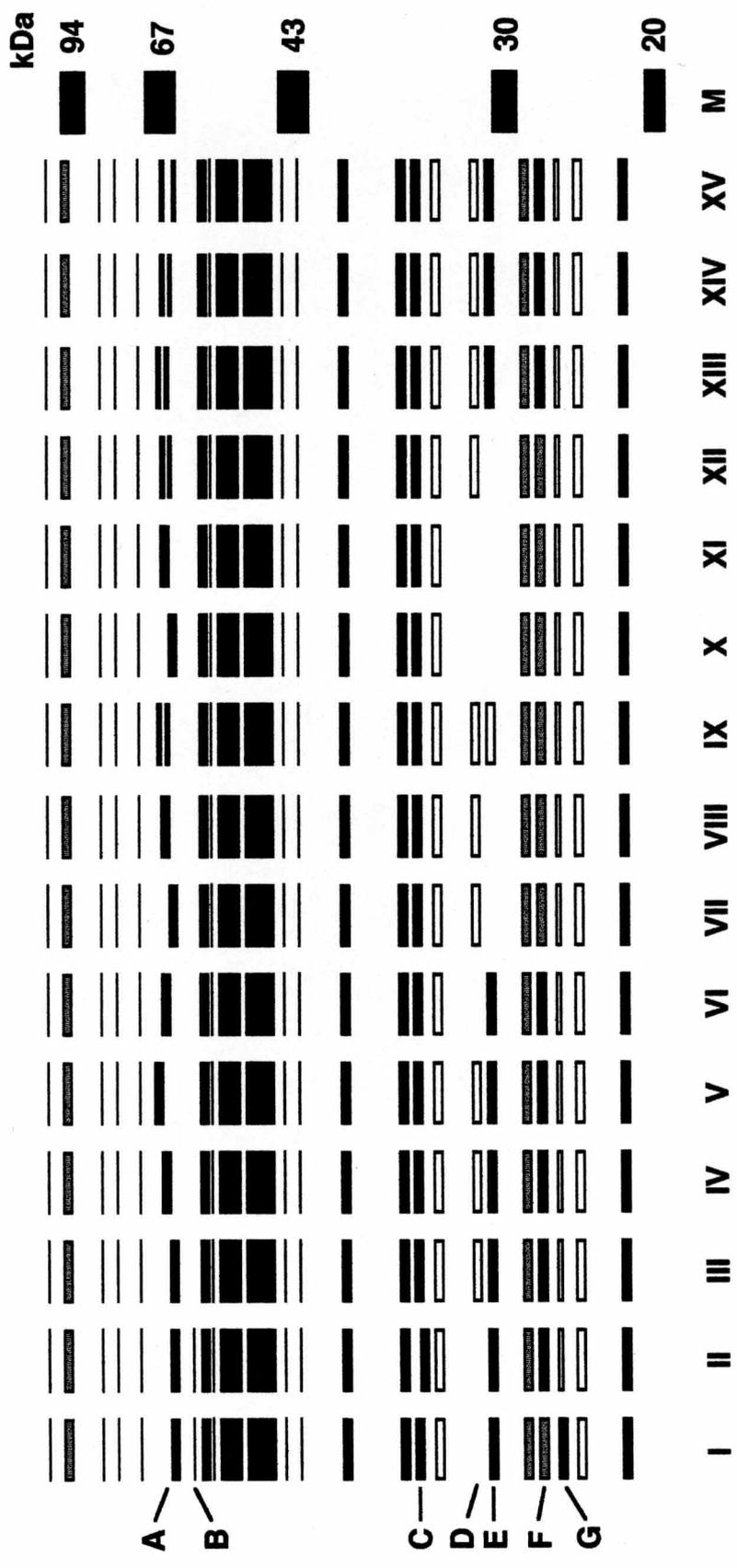
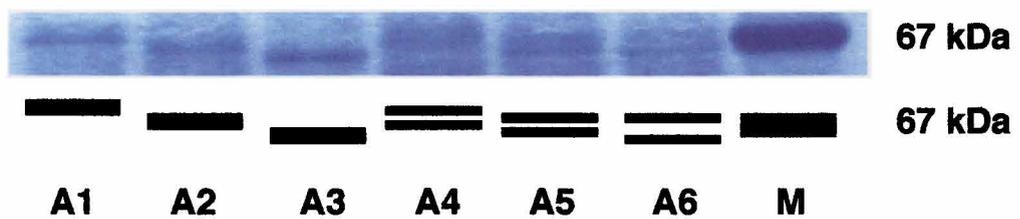


Fig. 3. Schematic illustration of 15 electrophoregram types corresponding to those in Fig. 2.



**Fig. 4.** Polymorphic band patterns observed by SDS-PAGE in the position 'A'. Six polymorphic patterns observed were designated as A1, A2, A3, A4, A5 and A6. Electrophoresis was carried out using 6.93% gel. M: bovine serum albumin (67kDa).



認められた。ポジション ‘E’ のバンドの欠損が、韓国および南西日本（本州西部、四国および九州）の少数の系統において観察された。ポジション ‘F’ の低濃度のバンドは、ブータンおよびネパールのほとんどの系統ならびに韓国および南西日本の少数の系統において認められた。北東および中部日本（北海道、本州北部、東部および中部）の155系統では、多型はポジション ‘A’ のバンドにおいてのみ検出された。

### タンパク質タイプの同定

タンパク質の泳動像における多型バンドの組み合わせに基づいて、15種類のタンパク質タイプを識別することができた (Figs. 2 and 3)。これらタイプ I から XV とした。タイプ I および II は、ポジション ‘B’、‘C’ や ‘G’ に特異的なバンドを有していた。タイプ III から V および XIII から XV は、ポジション ‘A’ のバンドタイプの違いによって識別できた。タイプ VI から XII は、ポジション ‘A’、‘D’、‘E’ および ‘F’ におけるバンドパターンによって他のものとは区別できた。タンパク質タイプに基づいて供試した434系統を分類したところ、275系統 (63%) がタイプ IV に、82系統 (19%) がタイプ III に、39系統 (9%) がタイプ I に属していた (Table 3)。他の12種のタイプはいずれも8系統以下しか所属しないマイナータイプであった。

### タンパク質タイプの地理的分布

各国におけるタンパク質タイプの分布および遺伝的変異性の程度を Table 3 に示した。遺伝的変異性の程度は、Shannon and Weaver の指標 ( $H'$  ; Tozuka et al. 1998)

$$H' = -\sum P_i \ln P_i \quad (P_i \text{ は各タンパク質タイプの頻度})$$

により推定した。

タンパク質タイプの分布の様相および遺伝的変異性の程度には、地域間で差異が認められた。ブータン-ネパール地域には、タイプ I、II および III の系統が検出され、特にタイプ I および II はこの地域の系統だけに特異的に認められ

Table 3. The number of strains belonging to the respective protein types and magnitude of the index (H') of Shannon-Weaver

Origin	Total no. of strains	Protein type														H <sup>(1)</sup>			
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV		XV		
Bhutan	43	37	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.502
Nepal	3	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.636
South Korea	70	0	0	37	30	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.863
China (mainland)	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000
Taiwan	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000
Japan																			
Hokkaido	10	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.694
North Honshu	41	0	0	6	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.416
East Honshu	29	0	0	6	22	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.650
Central Honshu	75	0	0	5	65	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0.546
West Honshu	70	0	0	2	47	1	6	0	6	1	0	3	1	1	1	1	1	1	1.286
Shikoku	31	0	0	6	22	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0.891
Kyushu	55	0	0	9	44	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.619
<b>Total</b>	<b>434</b>	<b>39</b>	<b>3</b>	<b>82</b>	<b>275</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1.229</b>

1) H' =  $-\sum P_i \ln P_i$  (P<sub>i</sub>:Frequency of ith protein type)

るものであった。ブータンの系統は、そのほとんどがタイプ I に属していたことから、やや低い遺伝的変異性 (0.502) を示した。また、ネパールの系統の遺伝的変異性は0.636であった。韓国の系統では、4種のタイプ (III、IV、VおよびVII) が検出され、これらのうち、タイプ III および IV が主要タイプであった。この地域の系統の遺伝的変異性は0.854と比較的高かった。中国の系統はすべてタイプ III を、一方、台湾のものはすべてタイプ IV を示した。日本国内でも、タンパク質タイプの地理的分布は地域間で差異が認められた。北海道では、タイプ III と IV のみが同数検出されたが、他の6地域では、タイプ IV の系統が多数を占めていた。タイプ V の系統は本州東部、中部および西部ならびに四国地域に低頻度で分布していた。他の9タイプ (VI、VIII~XV) を示す系統は、本州中部、西部、四国および九州において特異的に観察され、これらの特異的なタイプのほとんどが、日本海沿岸地域に存在した。これらのことを反映して、南西日本地域の系統の遺伝的変異性は、北東および中部日本地域のそれら (0.416-0.694) よりも高い値 (0.619-1.286) を示し、特に、11種類のタンパク質タイプが検出された本州西部地域において、最も高い変異性 (1.286) が認められた。

## 考察

本研究では、在来アズキ品種の種子貯蔵タンパク質における遺伝的変異およびそれらの地理的分布を解析した。検出された泳動像パターンは、Chen et al. (1984)、山口と小菅 (1991) および森ら (1992) が報告したものとよく類似していた。これまでに森ら (1992) により報告されたポジション 'A'、'D'、'E' および 'F' のバンドに加え、本研究によって、ブータンおよびネパールの系統において、ポジション 'B'、'C' および 'G' の新たな多型バンドを同定することができた。さらに、南西日本の系統には、多くの特異的なタンパク質タイプを有するものの存在することが明らかとなった。ただし、これらの系統でも、種皮色、種子の大きさ、草型などのような農業形質によって、他のタンパク質

タイプを示す系統と区別することはできなかった。

タンパク質タイプの分布および変異性の程度には、系統の収集地域間で差異が認められた。このような知見はアズキの起源地を同定するうえでも有用であると思われる。Tasaki (1963) は形態学および生態学的特性における変異に基づいて、アズキは中国の中部および南部で起源したとしている。Yee et al.

(1999) は、AFLP分析に基づいて、中国の系統が他の地域のものよりも変異に富んでいることを示した。さらに、星川 (1980) もアズキは中国で栽培化され、古代に韓国を経て日本に導入されたとしている。本研究では、中国の系統は2系統を供試したのみであり、そのため、中国のアズキにおける遺伝的変異の程度を評価することはできなかった。本研究における供試系統の範囲では、本州西部地域の系統において、最も大きな遺伝的多様性が観察された。この地域に特異的なタンパク質タイプが分布していたことに関しては、次のことが考えられる。(i) 特異的なタイプが元来、中国にも存在し、それらが古代に日本に導入された。(ii) 中国から導入された後、特異的なタイプが日本で分化した。(iii) 特異的なタイプを有する野生アズキが日本で独立的に栽培化された。(iv) 特異的なタイプは各地域において、野生アズキからの遺伝子移入により生じた。ほとんどの系統が中国から韓国を経て日本に導入されたと仮定した場合、韓国の系統の中には、タイプ VI および VIII から XV のような特異的なタンパク質タイプを示すものが存在していると期待される。しかしながら、分析した韓国の系統の中では、これらのタイプは全く検出されなかった。したがって、最初の仮説は除外されるものと思われる。2番目の仮説は、本州西部やその周辺地域が遺伝的多様性の二次中心であることを示唆している。3番目と4番目の仮説に関連して、すでに次のような研究がなされている。すなわち、野生型アズキ (ヤブツルアズキ) が韓国、台湾、中国南部およびネパールとともに、北海道と沖縄県を除く日本各地にも分布していることが明らかにされている (Tateishi 1984, Yamaguchi 1992, Yasuda and Yamaguchi 1996)。また、Yasuda and Yamaguchi (1996) は日本、韓国および中国の栽培型、野生型および雑草型アズキ (形態的に栽培型と野生型の間中間的な特徴

を示す)の phosphogulcomutase アイソザイムにおける変異に基づいて、日本の野生型あるいは雑草型アズキが栽培型アズキの祖先種の一つであることを示唆している。さらに、Xu et al. (2000a, b) もRAPDおよびAFLP分析により、日本の野生型、雑草型および栽培型アズキの遺伝的関係を調査した。氏らは栽培型アズキが野生型アズキに由来し、雑草型アズキは野生型からの栽培化の過程において起源したものである可能性を示している。これらの知見を考慮すると、いくつかの特異的なタンパク質タイプを示した系統は、その栽培化(あるいは遺伝子移入)が南西日本で起きた可能性がある。

ブータンおよびネパールの多くの系統が、この地域に特異的なタンパク質タイプ I および II を示した。さらに、タイプ III の系統も含め、この地域のすべての系統が、他の地域のものと比較して、草型、開花期、種子の大きさなどの農業形質において、著しい差異を示した。これらの地域特異的な系統も、野生種系統から独立的に起源した可能性がある。栽培型アズキの起源地および伝播経路を明らかにするためには、今後、特に中国の在来品種および様々な地域から収集した野生種の遺伝的変異に関して、より多くの知見を得る必要がある。

## 摘要

本研究では、韓国、ブータン、ネパール、中国、台湾および日本で収集された在来アズキ434系統を用いて、それらの遺伝的変異を種子貯蔵タンパク質の SDS-PAGE 分析により解析した。その結果、多型バンドの組み合わせに基づき、供試系統を15種類のタンパク質タイプ(タイプ I ~ XV) に分類することができた。これらのタンパク質タイプの分布には収集地域間で著しい差異が認められた。ブータンおよびネパールでは、ほとんどの系統がこの地域に特異的であったタイプ I および II を示し、少数の系統がタイプ III を示した。Shannon-Weaver の指標により推定した遺伝的変異性は、ブータンおよびネパールでそれぞれ 0.502 および 0.636 であった。韓国では、4種のタイプ (III, IV, V および VII) が検出された。これらのうちのタイプ III と IV が主要タイプであ

り、遺伝的変異性は 0.854 であった。中国および台湾のすべての系統が、それぞれタイプ III および IV を示した。日本の系統については、311系統を7地域（北海道、本州北部、本州東部、本州中部、本州西部、四国および九州）に大別して解析した。北海道ではタイプIIIとIVが同数認められたが、他の6地域では、タイプIVが多数を占めていた。タイプ V の系統は少数ながら本州東部、中部、西部および四国に分布していた。さらに、9つのタイプ（VI、VIII - XV）が本州中部、本州西部、四国および九州でごく少数ずつ検出され、これらの特異的なタイプを示す系統のほとんどは、日本海沿岸の地区に分布していた。上記の結果を反映して、日本では、南西日本地域の系統の遺伝的変異性（0.619 - 1.286）は、北東および中部日本地域のそれら（0.416 - 0.694）よりも大きかった。本州西部の系統では11種類もの泳動像タイプが観察され、最も高い遺伝的変異性（1.286）が認められた。

### 第3章 農業形質から評価した在来アズキ系統の遺伝的多様性

#### 緒論

我が国では、十勝農試や生物研などの研究機関において、日本はもとより海外の様々な地域において収集された数多くの在来アズキ品種が、アズキ育種のための重要な遺伝資源として維持されている。このような在来品種を育種に有効利用するためには、これらの遺伝的変異に関する情報が不可欠であり、とくに、育種目標や交雑親の決定と密接に関係する農業形質の遺伝的特性についての情報が重要となる。

在来アズキ品種の農業形質における遺伝的変異の解析に関しては、Kawahara (1959) および Tasaki (1963) はそれぞれ、開花まで日数と結実日数の組み合わせおよび草型に基づいて生態型を分類し、それらの地理的分布を明らかにしている。また、池主 (1991) および Wang et al. (2001) は粒重、開花期、収量などの諸形質を調査し、在来品種には大きな変異の存在することを報告している。しかし、これらの研究を除くと、在来品種の農業形質における遺伝的変異に関する有用な情報はほとんど無いため、それらを育種に有効に利用することが困難な状況にある。

したがって、育種における在来品種の利用を促進するためには、広範囲な地域から収集されたより多くの品種を用いて、遺伝的変異に関する情報を得る必要がある。そして、それらにはどの程度の変異が存在し、各地域にどのような変異を有する系統が分布しているのかを明瞭にすることが重要であると考えられる。さらに、このような特性調査により得られた情報をもとに各品種を分類することで、目的とする変異をより効果的に選抜できるなど遺伝資源の利用効率を高めることができるとともに、遺伝資源の維持効率を高めるコアコレクション (core collection) の開発にも役立つものと思われる。

このような観点から、本研究では、東アジア地域の各国から収集された189系統を用いて、5つの農業形質における遺伝的特性を調査し、各地域における

遺伝的変異の程度およびその特徴、さらには、変異と系統の地理的分布との関係を解析するとともに、多変量解析の手法を用いて系統分類を行った。

## 材料および方法

### 供試材料

供試材料には、日本、韓国、中国、台湾、ネパールおよびブータンで収集された在来品種189系統を用いた (Table 1)。これらの系統は種子貯蔵タンパク質のSDS-PAGE分析により検出された全15種類の泳動像タイプを含み、各収集地域に分布する泳動像タイプとその頻度を考慮しながら、各地域の系統数がSDS-PAGE分析での供試数に比例するように選んだものである。なお本研究では、各系統の収集地を、日本については、北海道、本州北東部、本州中部、本州西部および四国-九州の5地域に、また、海外については、韓国-中国-台湾およびブータン-ネパールの2地域に大別した (Table 1)。

### 形質調査

各系統とも催芽処理をした種子7粒を1998年7月10日に播種し、健全な幼植物3個体を7月23日に神戸大学農学部附属農場の圃場に定植した。以降、慣行法で植物体を栽培し、各個体について播種日から第一花が開花した日までの日数 (以下、開花まで日数という) を調べるとともに、成熟後の植物体における主茎長、分枝数、主茎節数および20粒重を調査した。

### データ解析

各形質について、各系統の平均値を求め、そのデータマトリクスを作成した。このマトリクスを基に、各形質間の相関係数を求めた。また、収集地域ごとに各形質の平均値、標準偏差および分布幅 (レンジ) を算出するとともに、収集地域間における平均値の差異をダンカンの多重検定により解析した。さらに、各系統間の遺伝的関係を解析するために、統計ソフトウェアの SPSS 6.1J Professional Statistics Power Mac 版 (エス・ピー・エス・エス株式会社)

Table 1. Origin and the numbers of azuki bean strains used in this study

Region	No. of strains	Origin (No. of strains)
Hokkaido	5	Hokkaido (5)
Northeastern Honshu	31	Aomori (4), Iwate (4), Akita (4), Yamagata (4), Fukushima (4), Tochigi (2), Gunma (3), Saitama (2), Ibaragi (4)
Central Honshu	26	Nagano (4), Niigata (4), Toyama (4), Ishikawa (4), Gifu (4), Aichi (3), Mie (3)
West Honshu	38	Fukui (4), Shiga (5), Hyogo (4), Nara (4), Wakayama (4), Kyoto (3), Tottori (4), Shimane (4), Okayama (4), Hiroshima (2)
Shikoku-Kyushu	37	Tokushima (4), Ehime (4), Kochi (4), Fukuoka (3), Saga (3), Nagasaki (4), Kumamoto (3), Ooita (4), Miyazaki (4), Kagoshima (3), Okinawa (1)
Korea-China-Taiwan	32	Korea (27), China (2), Taiwan (3)
Bhutan-Nepal	20	Bhutan (18), Nepal (2)
Total	189	

を用いて、各系統の形質の平均値を標準化（平均値 = 0, 分散 = 1）した後、UPGMA法によりクラスター分析を行った。また、Excel 多変量解析 ver. 3（株式会社エスミ）を用いて、相関行列法により主成分分析を行った。

## 結果

### 各形質における変異

189系統の平均値を基に算出した5つの形質間の相関係数を Table 2 に示した。これによると、分枝数と20粒重との間を除く全ての形質間において1%水準で有意な相関関係があり、とりわけ、主茎長と主茎節数 ( $r = 0.717$ )、開花まで日数と主茎長 ( $r = 0.645$ )、分枝数と主茎節数 ( $r = 0.625$ ) および主茎長と分枝数 ( $r = 0.538$ ) との間で高い正の相関が認められた。また、20粒重と他の4形質間との相関係数はいずれも負の値を示した。

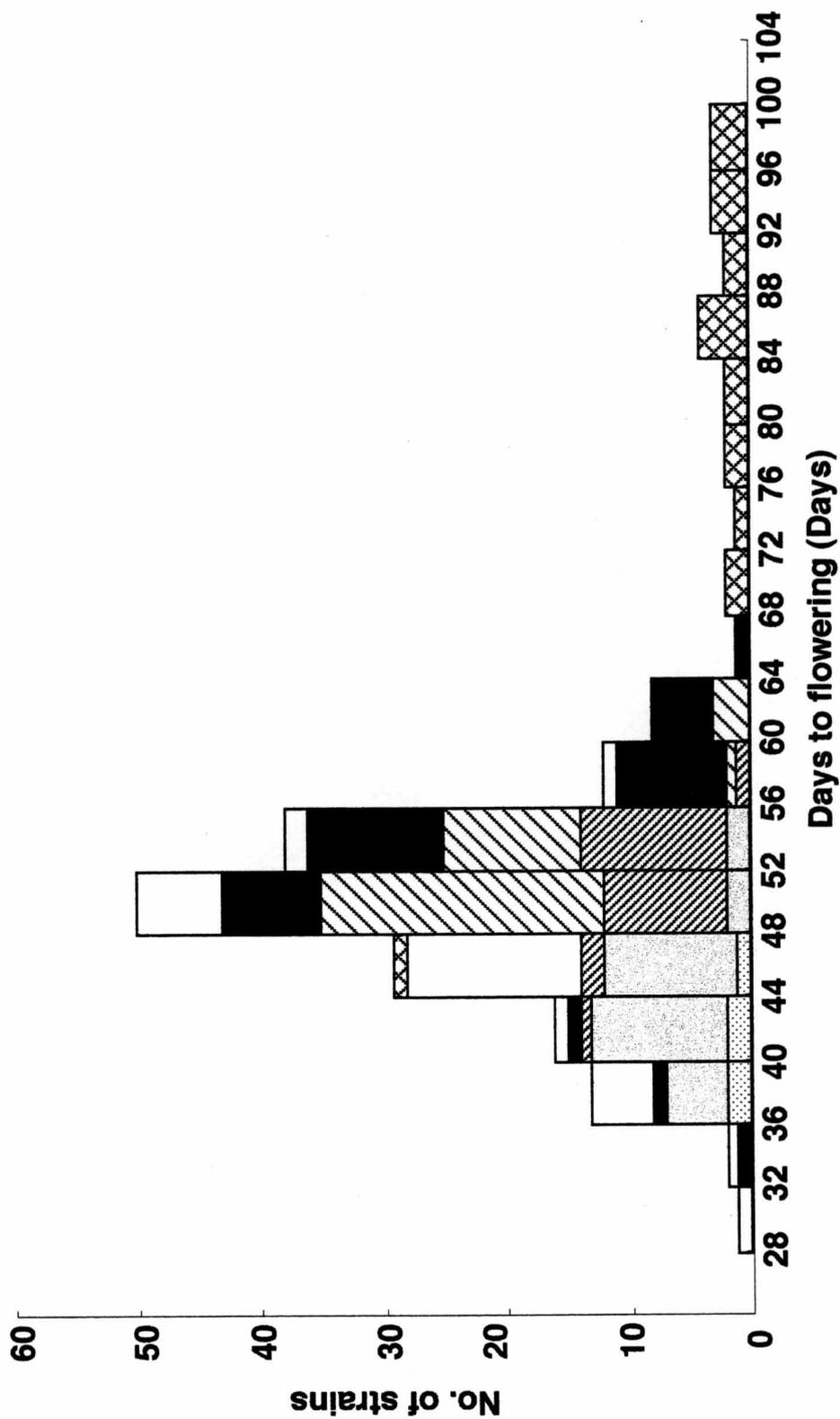
Fig. 1 (A) ~ (E) に、開花まで日数、主茎長、分枝数、主茎節数および20粒重に関する度数分布図を、また、Table 3 および Table 4 には、各形質における収集地域ごとの平均値、標準偏差および分布幅を示した。これらの図表より、いずれの形質においても、収集地域間および地域内で下記のように大きな変異の存在することが明らかであった。

まず、開花まで日数についてみると、全系統の平均値は53.1日であり、分布幅は31.3~98.0日の範囲にあった。収集地域ごとの平均値では、北海道、本州北東部および韓国-中国-台湾地域において41.5~45.5日と短いのに対し、日本の中部、西部および四国-九州地域は50.8~54.2日とやや長くなっていた。また、ブータン-ネパール地域の系統は、1系統を除けばいずれも開花が非常に遅く、平均は84.1日であった。そして、これらの地域間で平均値には有意な差があり、とくに日本の系統では、北海道から四国-九州地域への地理的分布に沿って形質傾斜の傾向が認められた。この形質の地域内の分布幅については、北海道、本州北東部、中部および西部地域の系統群はいずれも20日以内でやや小さいのに対し、四国-九州、韓国-中国-台湾地域およびブータン-ネパール地域の系統群はいずれも25日以上であった。

Table 2. Correlation coefficient between five morphological traits based on the means for 189 azuki bean strains

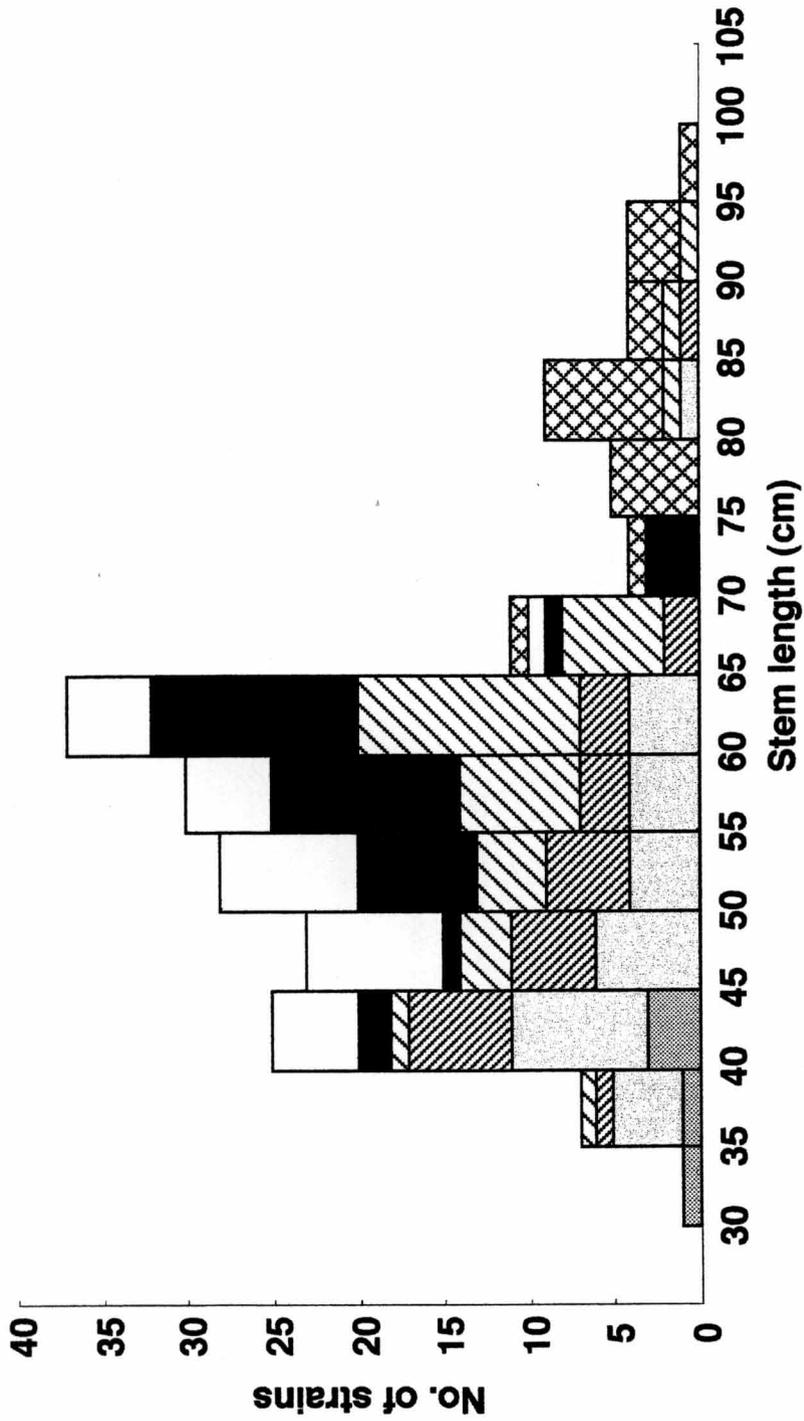
	Days to flowering	Stem length	No. of branches	No. of nodes	20-grain weight
Days to flowering	1.000				
Stem length	0.645**	1.000			
No. of branches	0.425**	0.538**	1.000		
No. of nodes	0.437**	0.717**	0.625**	1.000	
20-grain weight	-0.528**	-0.428**	-0.077	-0.214**	1.000

\*\* Significant at 1% level.



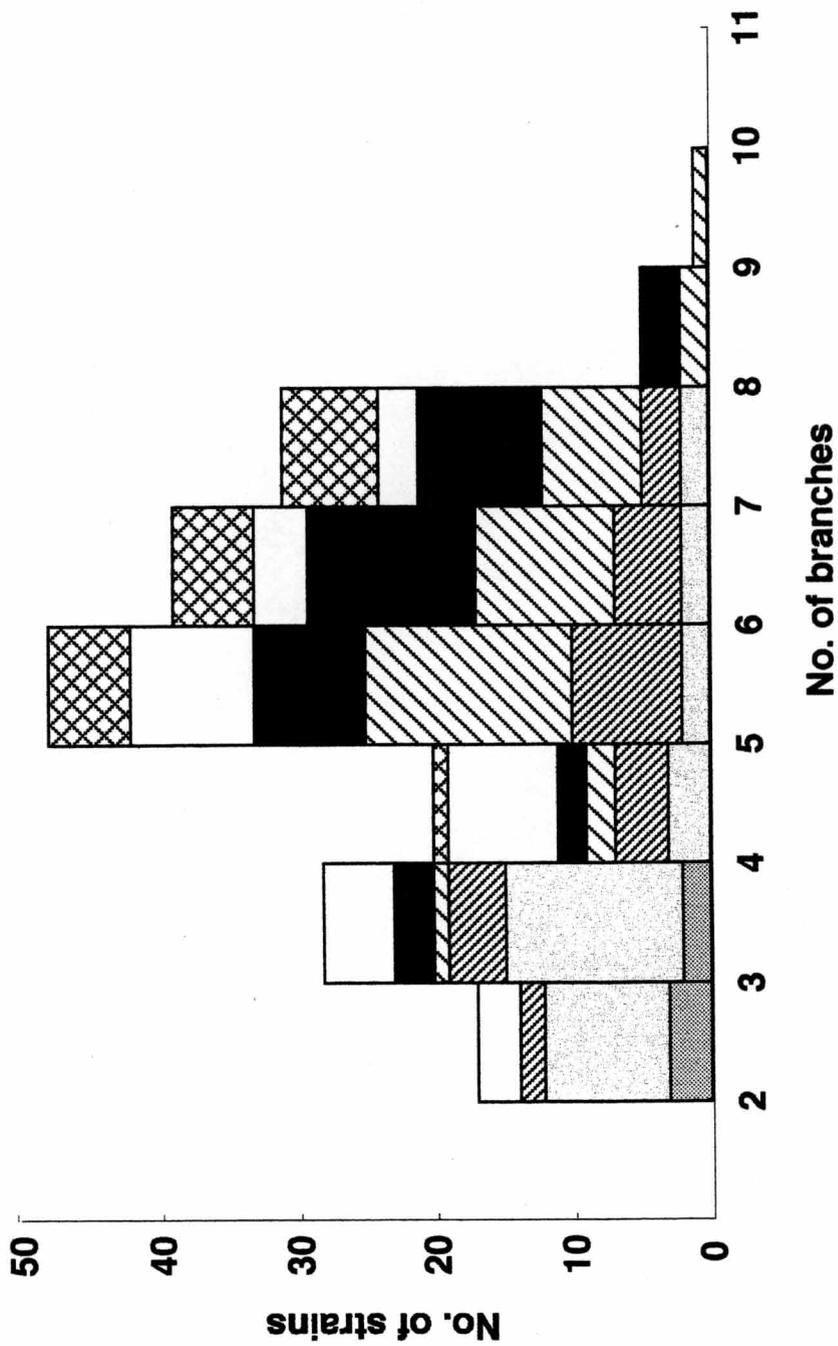
**Fig. 1 (A). Frequency distribution of days to flowering.**

Hokkaido
  Northeastern Honshu
  Central Honshu
  West Honshu
  Shikoku - Kyushu
  Korea - China - Taiwan
  Bhutan - Nepal



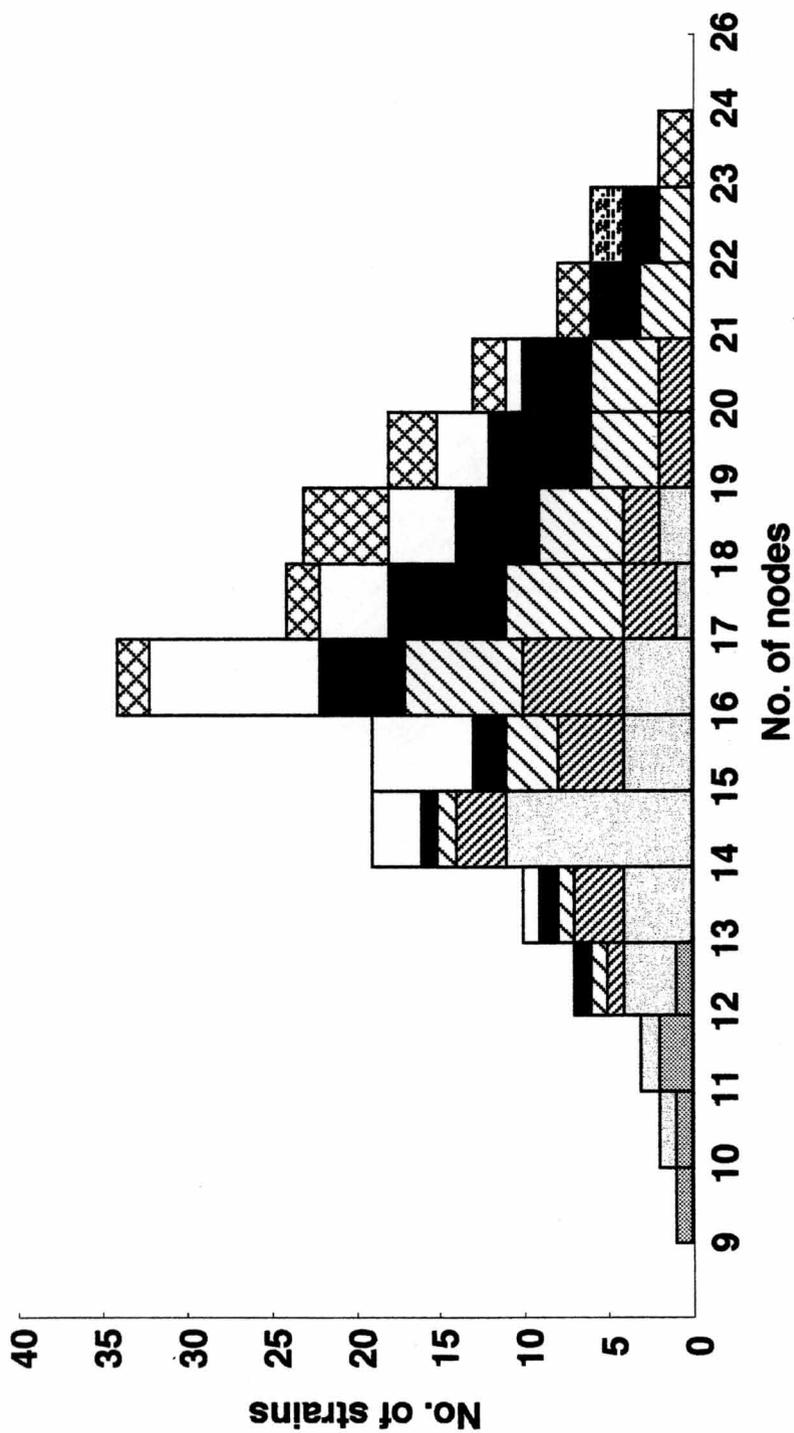
**Fig. 1 (B). Frequency distribution of stem length.**

- Hokkaido
- ▨ Northeastern Honshu
- ▧ Central Honshu
- ▩ West Honshu
- Shikoku - Kyushu
- Korea - China - Taiwan
- ▩ Bhutan - Nepal



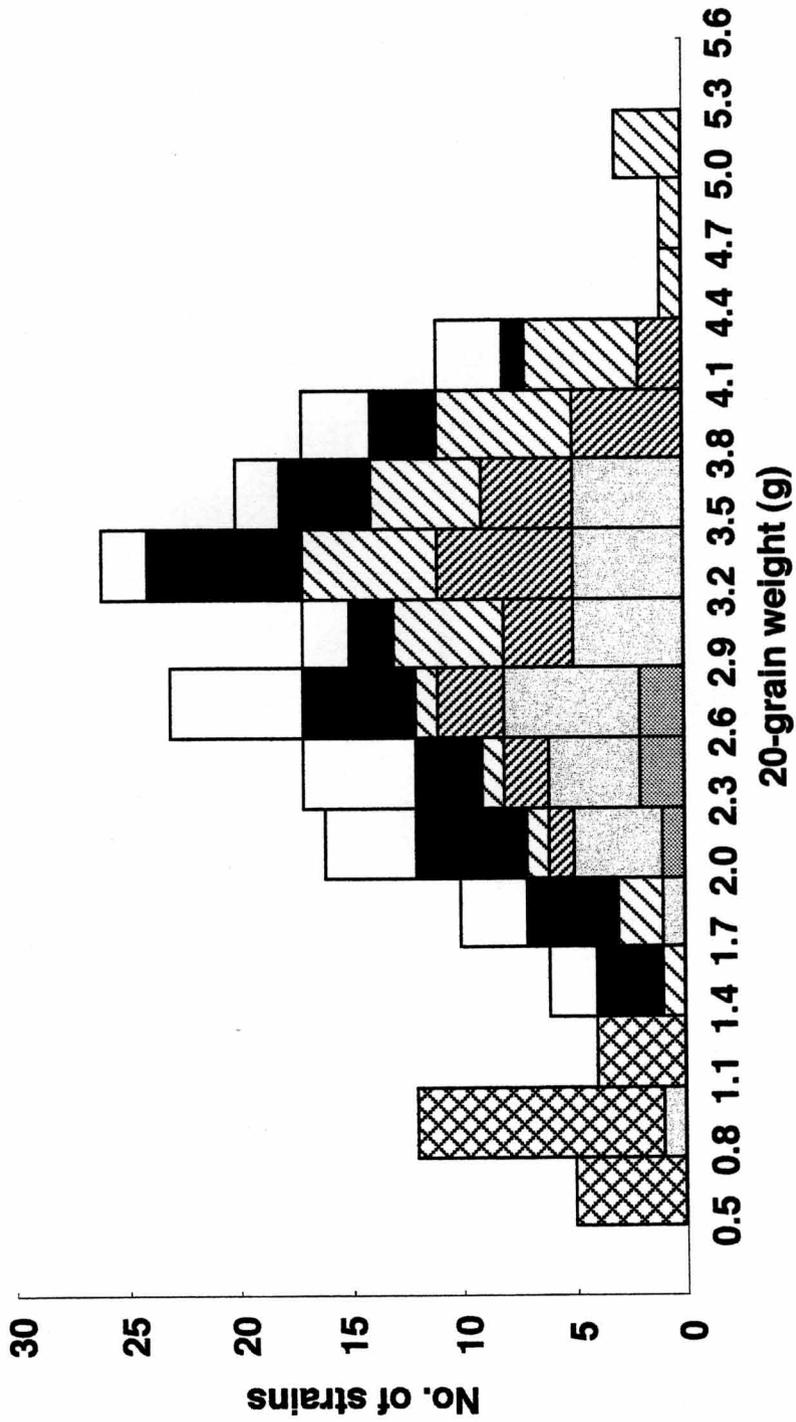
**Fig. 1 (C). Frequency distribution of No. of branches.**

- Hokkaido
- ▨ Northeastern Honshu
- ▧ Central Honshu
- ▩ West Honshu
- Shikoku - Kyushu
- Korea - China - Taiwan
- ▨ Bhutan - Nepal



**Fig. 1 (D). Frequency distribution of No. of nodes.**

- Hokkaido
- ▨ Northeastern Honshu
- ▩ Central Honshu
- ▧ West Honshu
- ▦ Shikoku - Kyushu
- Korea - China - Taiwan
- ▤ Bhutan - Nepal



**Fig. 1 (E). Frequency distribution of 20-grain weight.**

- Hokkaido
- ▨ Northeastern Honshu
- ▧ Central Honshu
- ▩ West Honshu
- Shikoku - Kyushu
- Korea - China - Taiwan
- ▨ Bhutan - Nepal

Table 3. Means for five traits among azuki bean strains in each region

Region	Days to flowering (days)	Stem length (cm)	No. of branches (No.)	No. of nodes (No.)	20-grain weight (g)
Hokkaido	41.5 ± 3.37 a	39.1 ± 5.71 a	2.8 ± 0.69 a	11.0 ± 1.26 a	2.53 ± 0.27 a
Northeastern Honshu	44.0 ± 4.18 a	50.0 ± 9.55 b	3.6 ± 1.48 a	14.5 ± 1.86 b	2.83 ± 0.64 a
Central Honshu	50.8 ± 3.23 b	53.4 ± 11.14 b	5.1 ± 1.48 b	16.3 ± 2.24 c	3.39 ± 0.55 b
West Honshu	52.3 ± 3.28 bc	61.1 ± 10.81 c	6.1 ± 1.10 c	17.8 ± 2.42 d	3.57 ± 0.85 b
Shikoku-Kyushu	54.2 ± 6.15 c	58.5 ± 7.24 c	6.1 ± 1.25 c	18.2 ± 2.33 d	2.81 ± 0.78 a
Korea-China-Taiwan	45.5 ± 5.52 a	52.1 ± 6.52 b	4.7 ± 1.39 b	16.7 ± 1.75 c	2.85 ± 0.80 a
Bhutan-Nepal	84.1 ± 12.28 d	82.2 ± 6.88 d	6.3 ± 1.00 c	19.6 ± 2.18 e	0.92 ± 0.21 c
Total	53.1 ± 12.82	57.8 ± 13.03	5.2 ± 1.64	16.9 ± 2.75	2.85 ± 1.01

Values represent the means ± standard deviation.

Values with different small letters in the column are significantly different by Duncan's multiple range test at 5% level.

Table 4. Range of means for five traits among azuki bean strains in each region

Regions	Days to flowering	Stem length	No. of branches	No. of nodes	20-grain weight
	(days)	(cm)	(No.)	(No.)	(g)
Hokkaido	38.3~46.3	30.5~44.2	2.0~3.7	9.3~12.7	2.09~2.82
Northeastern Honshu	37.7~54.0	35.8~82.0	2.0~7.0	10.3~18.7	0.93~3.81
Central Honshu	42.0~57.0	36.5~88.2	2.7~7.7	12.3~20.7	2.28~4.37
West Honshu	48.0~63.0	36.9~93.1	3.7~9.0	12.7~22.7	1.69~5.29
Shikoku-Kyushu	35.5~66.0	41.0~73.5	3.0~8.0	12.7~22.7	1.53~4.38
Korea-China-Taiwan	31.3~57.0	42.6~67.2	2.0~7.5	13.7~20.7	1.67~4.42
Bhutan-Nepal	47.5~98.0	69.8~96.6	4.3~7.7	16.3~23.3	0.54~1.38
Total	31.3~98.0	30.5~96.6	2.0~9.0	9.3~23.3	0.54~5.29

次に、草型に関係する主茎長、分枝数および主茎節数についてみると、全系統の平均はそれぞれ57.8 cm、5.2本および16.9節であり、分布幅はそれぞれ30.5～96.6 cm、2.0～9.0本および9.3～23.3節の範囲にあった。これらの形質に関しても地域間で大きな差異が認められた。日本の系統では、開花まで日数の場合と同様に、いずれの形質においても形質傾斜の傾向が認められ、北海道および本州北東部から中部、さらには、西部および四国-九州地域へと移るにしたがい、平均値は大きくなった。韓国-中国-台湾地域の系統群は、本州北東部や中部地域の系統群と同程度の値を示した。全系統が蔓性を示したブータン-ネパール地域では、主茎長の平均は82.2 cm と他の地域に比べて著しく大きくなっており、分枝数および主茎節数においても7地域間で最も大きな値を示した。これらの形質に関する収集地域内での分布幅をみると、主茎長では一部の系統が蔓性を示した本州北東部、中部および西部地域、ならびに四国-九州地域の系統群では30 cm 以上であったが、すべてが有限伸育型を示した北海道および韓国-中国-台湾の系統群と、すべてが蔓性を示したブータン-ネパール地域の系統群ではいずれも30 cm 未満であった。分枝数では、北海道およびブータン-ネパール地域の系統群の分布幅は4本以下でやや少なかったが、他の地域の系統でも約5本程度の範囲であり、地域間に分布幅の大きな差異は認められなかった。主茎節数の分布幅では、北海道は3.4節で一番小さく、本州西部および四国-九州地域の系統の分布幅は10節で他の地域の系統のそれよりも広がっていた。

20粒重では、全系統の平均は2.85 g であり、その分布幅は0.54～5.29 g の範囲にあった。平均値を地域間で比較してみると、北海道、本州北東部、四国-九州および韓国-中国-台湾地域の系統群は2.53～2.85 g であり、これら間に有意差は認められなかった。本州中部および西部の系統群はそれぞれ3.39および3.57 g で、いずれも他の地域の系統群よりも有意に大きな値を示したが、ブータン-ネパール地域の系統群は0.92 g で、他の地域の系統群よりも有意に小さかった。各地域内の20粒重の分布幅をみると、北海道およびブータン-ネパール地域の系統は1 g 以下で小さく、本州中部地域のそれは2 g 程度であった。一方、本州西部地域の系統のそれは3.60 g で最も大きな値を示し、四国-

九州地域および韓国-中国-台湾地域の系統の分布幅も3 g 近くの値を示した。

### クラスター分析

5形質のデータを基にUPGMA法によって作成した在来アズキ189系統のデンドログラムを Fig. 2 に示した。分析した189系統は大きくAおよびBの2つのクラスターに分類することができ、両クラスターにはそれぞれ167および22系統が含まれていた。Aクラスターはさらに結合距離 2.3 で6つの小クラスター (A1~A6) に分割することができた。A1からA6までの各小クラスターにはそれぞれ72、8、52、30、3および2系統が属していた。

各地域の系統の分布の様相についてみると、北海道の系統はすべてA4クラスターに属していた。本州北東地域の系統では、32系統のうち27系統がA3またはA4クラスターに分布しており、とくにA4クラスターには18系統が属していた。本州中部地域の系統では、A1およびA3クラスターに11系統ずつが属しており、両クラスターの系統がこの地域の85 % を占めていた。本州西部地域の系統では、この地域の89 % に当たる34系統がA1またはA3クラスターに属しており、とくにA1クラスターに23系統が含まれていた。また、蔓性を示した残りの4系統はA5またはA6クラスターに属していた。四国-九州地域の系統の分布の様相は本州西部地域のそれと似ており、32系統 (86 %) がA1またはA3のいずれかのクラスターに属しており、そのうち28系統がA1クラスターに含まれていた。また、この地域の系統のうちいくつかはA2、A4またはA6クラスターにも分布していた。韓国-中国-台湾地域の系統はA1、A2またはA3クラスターに30系統が属しており、とくにA3クラスターには18系統が含まれていた。このA3クラスターには上記のように、本州北東部、中部、西部および四国-九州地域の系統も多く含まれていたことから、韓国-中国-台湾地域の多くの系統は日本の幅広い地域の系統とクラスターを組んでいたといえる。

ブータン-ネパール地域の系統はすべてBクラスターに属していた。また、このクラスターには蔓性で、20粒重も小さな日本の2系統も含まれていた。このクラスターはAクラスターと 4.6 の距離で結合しており、このクラスターを中心に構成していたブータン-ネパール地域の系統は、他の地域の系統と著し



Fig. 2. Dendrogram of 189 azuki bean landraces based on the UPGMA method using five agronomic traits. Letters in the parentheses after accession number indicate the regions originated; H:Hokkaido, N:Northeastern Honshu, C:Central Honshu, W:West Honshu, S:Shikoku-Kyushu, K:Korea-China-Taiwan, B:Bhutan-Nepal. See the text for the explanations of A1 ~ A6 and B.

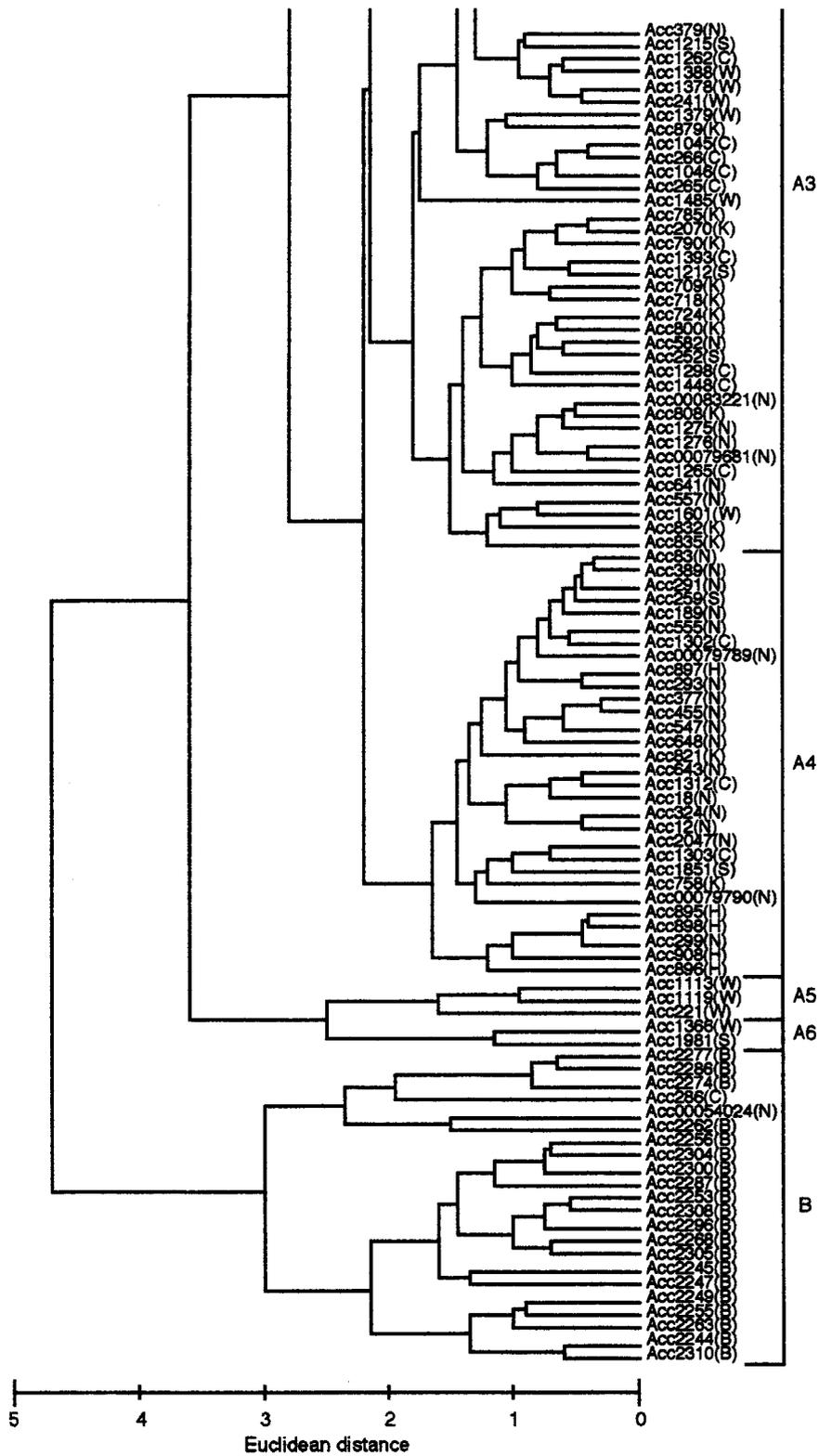


Fig. 2. Continued.

く異なった特徴を有することが明らかになった。

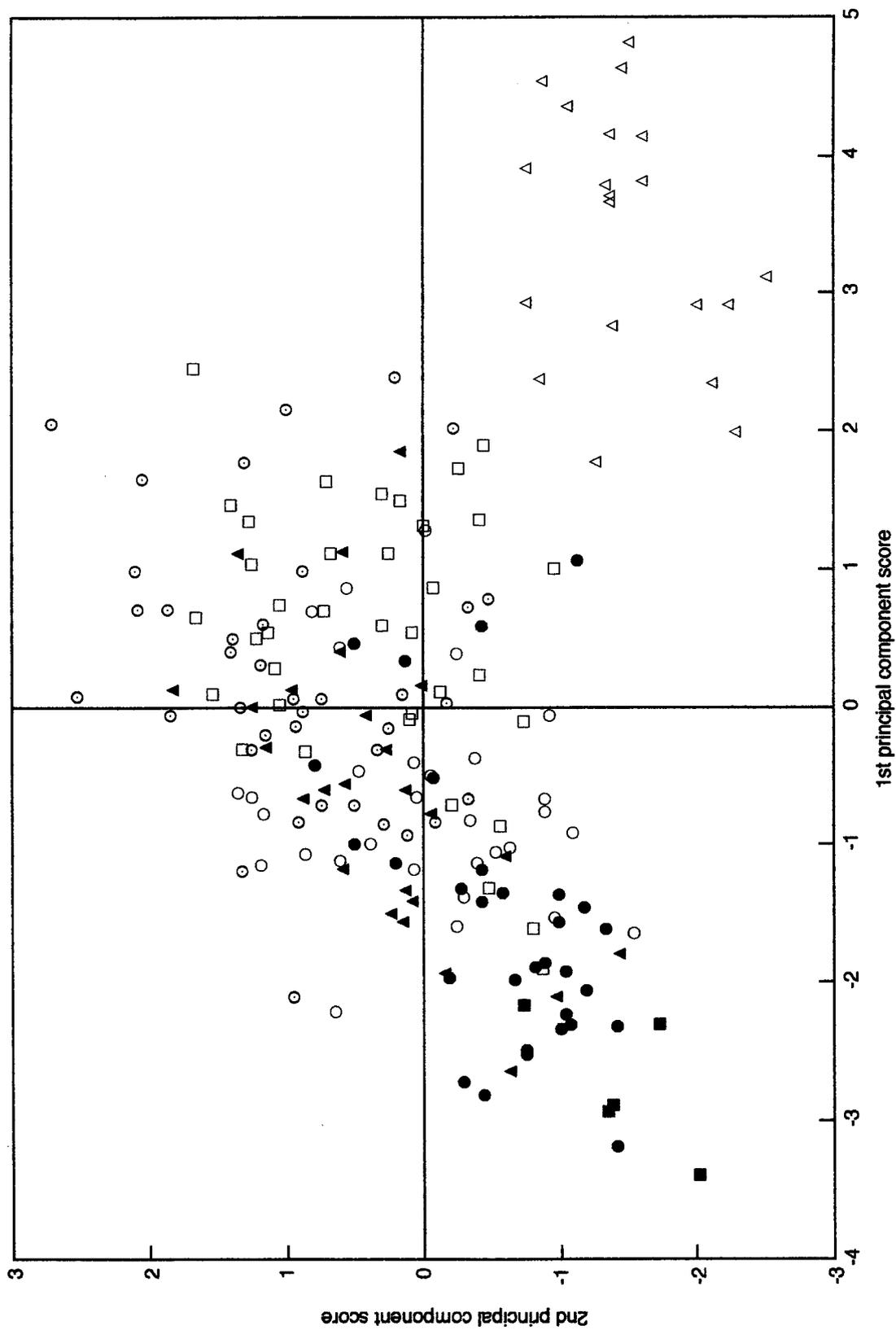
## 主成分分析

189系統の平均値を基に算出した各形質間の相関係数 (Table 2) を用いて主成分分析を行った。各形質における第3主成分までの固有ベクトル、各主成分の固有値ならびに累積寄与率を Table 5 に示した。第1主成分だけで全変異の 58.2 % を、また、第3主成分までで 88.5 % を説明することができた。第1主成分には5つの形質が同程度に関与しており、この主成分は、開花まで日数、主茎長、分枝数および主茎節数の値が大きく、20粒重が小さい系統ほど、そのスコアが大きな値をとる傾向があることを意味していた。一方、第2主成分には20粒重の関与が大きく、この主成分は、20粒重の大きな系統ほどそのスコアが大きな値をとる傾向のあることを意味していた。

X軸に第1主成分スコアを、Y軸に第2主成分スコアをとり、各系統のスコアをプロットした結果を Fig. 3 に示した。プータン-ネパール地域の系統はすべて第4象限にまとまって分布しており、他の地域の系統の分布領域とは明らかに異なっていた。一方、日本および韓国-中国-台湾地域の系統は第1象限から第3象限へと楕円状に分布していた。日本の系統に注目してみると、北海道、本州北東部、中部、西部および四国-九州の順に第3象限から第1象限に向かって分布する傾向が認められた。とくに、北海道の全系統および本州北東地域の系統のほとんどが第3象限に分布していた。また、本州中部の系統はそのほとんどが第1象限と第2象限の原点に近い位置に分布していた。本州西部および四国-九州の系統も第1または第2象限に分布していたるものが多かったが、比較的まとまって分布していた北海道、本州北東部および中部の系統と比べて、かなり広範囲に分布する傾向が認められた。さらに、韓国-中国-台湾地域の系統はそのほとんどが第2および第3象限に分布していたが、その分布域はやはり比較的広がった。

**Table 5. Eigen vectors of five traits obtained by principal component analysis**

Traits	1st principal component	2nd principal component	3rd principal component
Days to flowering	0.468	-0.310	-0.594
Stem length	0.526	0.008	0.294
No. of branches	0.420	0.496	-0.473
No. of nodes	0.477	0.346	0.548
20-grain weight	-0.317	0.734	-0.192
Eigen value	2.912	1.065	0.446
Cumulative contribution rate	0.582	0.795	0.885



**Fig. 3. Distribution of 189 azuki bean landraces on the basis of the 1st and 2nd principal component score.**

## 考察

本研究では、日本および海外で収集された在来アズキ189系統について、それらの特性および遺伝的変異を農業形質の面から解析した。今回調査した開花まで日数、主茎長、分枝数などはいずれも量的形質であり、これらは環境要因や栽培条件の影響を受けやすい。そのため、様々な地域から収集された系統を特定の場所で栽培することによって得られた情報から、それらの遺伝的特性を正確に評価することは困難な面がある。しかしながら、これらの系統を同じ条件下で栽培することにより、各地域の系統の変異の程度や特徴を相対的に比較することができ、また、このような研究はどの系統がその地域の栽培環境に最も適しているかを知るうえでも意義あることと考えられる。

本研究では、供試した系統は各形質において収集地域内および地域間で大きな遺伝的変異を示した。日本の系統に注目してみると、北海道や本州北東地域の系統よりも本州中部や四国-九州地域の系統において大きな変異性が認められ、このような傾向は第2章に記した種子貯蔵タンパク質のSDS-PAGE分析における結果と一致していた。また、韓国-中国-台湾地域の系統においても、比較的大きな変異がみられた。特に、韓国の系統に関しては、日本の系統と同様に、国内のほぼ全地域から収集されており、このことが変異の大きさに反映したものである。

本研究では、系統ごとにみた場合、各形質において観察された変異のパターンと種子貯蔵タンパク質におけるそれとの間に、明確な関連性を見い出すには至らなかった。しかし、系統群としてみれば、種子貯蔵タンパク質の分析結果と同様に、その形態学的変異と地理的分布との間に明確な関連性があることが明らかとなった。とりわけ、日本の系統に関しては開花まで日数、主茎長、分枝数および主茎節数において形質傾斜の傾向が認められ、北東地区では早生で草丈が低く分枝数の少ない直立型の系統が多く、逆に西南地区では晩生で草丈が高く分枝数の多い分枝型の系統が多く見られた。このような傾向は草型に基づいて生態型を分類したTasaki (1963) の報告とよく一致している。さらに、ブータン-ネパール地域の系統群は他の地域のものと著しく異なった特性を示すことも明らかにすることができた。

我が国には数多くの在来品種が存在しているにもかかわらず、これまでのアズキ育種に用いられた在来品種の数は少ない。加賀ら（1993）のRAPD分析の結果によると、エリモショウズや京都大納言などの主要12品種の遺伝的多様性はかなり小さいことが明らかにされている。この一因として、近年のブランド化に伴う品種統一が挙げられる。そして、このような主要品種における遺伝的基盤の脆弱さが我が国におけるアズキ生産の不安定さにもつながっているものと推測される。したがって、アズキの生産性を高め、安定した生産量を確保できるようにするためには、本研究で供試したような遺伝的変異に富む在来品種を育種素材として利用し、主要品種の遺伝的基盤を拡大することが有効な手段の一つであると考えられる。本研究によって、収集地域ごとに系統の特徴を明確にすることができたことは、目的とする変異を有する系統を収集する際や、収集した系統の中から目的に適った交雑親を選定する際に、それらがどの地域の系統に存在し、またどの地域の系統を利用すればよいかを知るうえで有用な情報を提供することができるものと思われる。例えば、早生系統や耐倒伏性系統の育成には、早生で草丈が低い系統が多く分布していた北海道や本州北東地域のものが、また大粒系統や多収性系統の育成には、大粒で多分枝性の系統が多く分布していた本州西部や中部地域のものが有用な育種素材になるであろう。

本研究では、アズキの起源および栽培化の中心であると考えられている中国（Tasaki 1963, Yee et al. 1999）の系統はわずか2系統しか分析することができず、その遺伝的多様性や遺伝資源としての評価を十分に行うことはできなかった。一般に多様性の中心地には、他の地域には無い病虫害抵抗性などの有用な遺伝子をもつ系統が多く存在するといわれている。実際、Wang et al. (2001) は、中国の在来系統にはオーストラリアにおいて栽培されている日本の主要品種よりも収量性の高いものが存在しており、これらの系統はオーストラリアにおける収量に関する育種の貴重な材料になることを指摘している。したがって、中国の系統については、より多くの材料を用いて詳細な調査を行う必要がある。

ブータン-ネパール地域の系統に関しては、村田ら（1995）および Takeya and

Tomooka (1997) がこの地域の系統を日本で栽培した場合、現地で認められたのとは全く違った特性を示すことを報告している。本研究においても、それらは温度や日長などの影響を受けたことによって、蔓性になり、開花までの日数も極めて長く、日本や韓国の系統とは著しく異なった特徴を示したものと思われる。また、第2章に記したように、種子貯蔵タンパク質のSDS-PAGE分析によって、この地域の系統は日本や韓国の系統とは異なった特異的なバンドパターンを示すことを確認している。したがって、この地域の系統に関しても、その特性をより正確に評価するために、今後、様々な側面から詳細な分析を行う必要があるものと思われる。

本研究に供試した在来系統をより有効に利用するためには、今後、耐冷性、病虫害抵抗性、収量性、さらには、餡への加工適性など、様々な形質調査を行う必要がある。また、DNAレベルでの遺伝的変異の解析やDNAマーカーを用いた連鎖地図の作成、農業上有用な諸形質を支配する遺伝子に関する連鎖マーカーの検索やそれらのマッピングおよびQTL解析など、分子レベルでの解析も重要であろう。

## 摘要

本研究では、日本、韓国、中国、台湾、ブータンおよびネパールにおいて収集された在来アズキ189系統について、5つの農業形質（開花まで日数、主茎長、分枝数、主茎節数および20粒重）を調査した。供試した189系統の集収地を北海道（5系統）、本州北東部（31）、中部（26）、西部（38）、四国-九州（37）、韓国-中国-台湾（32）およびブータン-ネパール（20）の7つの地域に大別し、クラスターおよび主成分分析によりそれらの遺伝的変異を解析した。地域内では、本州西部、四国-九州および韓国-中国-台湾地域の系統において、他の4地域のものよりもやや大きな変異性が認められた。韓国-中国-台湾地域の系統は、日本の系統と比較的よく似た特徴を示したが、ブータン-ネパール地域のものは他の地域のものとは著しく異なった特徴をもっていた。日本の系統では、20粒重を除く他の4形質において形質傾斜が認められた。すなわち、北東

日本には、草丈が低く、直立した少数の分枝をもつ早生の系統が多くみられたのに対し、南西日本には、草丈が高く、多数の分枝を生ずる晩生の系統が多くみられた。本研究の遺伝的変異に関する知見は、アズキ育種のために有用な遺伝子を持った交雑親を選定する上でも役立つものと思われる。

## 第4章 RAPD分析により評価した在来アズキ系統の遺伝的多様性

### 緒論

近年、RFLP、RAPD、AFLP、マイクロサテライト分析法など様々な DNA レベルでの多型を検出するための技術が開発されてきている。これらの技術は、多くの作物種において、その遺伝資源における多様性の解析、品種・系統の分類や同定などに有効であることが示されている。アズキにおいても、このような技術を用いて、DNA レベルでの品種・系統間の遺伝的多様性の解析が行われている。例えば、加賀ら (1993) は日本の主要 12 品種を用いて RAPD 分析を行い、これらの品種における遺伝的変異は小さいことを認めた。Yee et al.

(1999) は日本、韓国および中国などの 58 品種・系統の遺伝的多様性を RAPD および AFLP 分析により解析し、中国の系統は他の地域のものより変異に富むことを明らかにしている。また、アズキ亜属における遺伝的関係を調査するために、他の種の系統とともに 2~3 のアズキ系統の遺伝的変異が解析されている (Fatokun et al. 1993, Kaga et al. 1996b)。しかし、これまでのところ、日本国内および世界各国の幅広い地域から収集された多数の在来系統を用いて DNA レベルでの遺伝的変異を解析した研究はみられない。

Williams et al. (1990) により開発された RAPD 分析法は再現性の面で他の手法よりも若干劣るとされるものの、鋳型 DNA の塩基配列に関する情報を必要とせず、少量の DNA を用いて極めて簡便に分析を行うことができるため、多数の系統を短期間に解析できるという長所がある。そのためマメ類に限っても、この手法を用いて、ダイズ (Doldi et al. 1997, Thompson et al. 1998)、インゲンマメ (Metais et al. 2000, Maciel et al. 2001)、ラッカセイ (Subramanian et al. 2000, Raina et al. 2001)、エンドウ (Samec and Nasinec 1996)、ソラマメ (Link et al. 1995)、リョクトウ (Santalla et al. 1998, Lakhanpaul et al. 2000)、レンズマメ (Abo-elwafa et al. 1995, Ford et al. 1997) など数多くの種類において、その遺伝的多様性の解析や品種の同定が行われている。

そこで本研究では、日本、韓国、中国、台湾、ブータンおよびネパールにおいて収集された 203 系統の在来アズキについて、RAPD 分析法によりそれらの遺伝的変異を解析し、収集地域によって多様性の程度に違いがみられるか否かを分析するとともに、アズキにおいても RAPD 分析法が系統群の分類や品種識別に有用であるか否かを明らかにすることを目的として行った。

## 材料および方法

### 供試材料

供試材料には、38 道府県から収集された日本の在来アズキ 140 系統ならびに韓国、中国、台湾、ブータンおよびネパールから収集された 63 系統の、合わせて 203 系統を用いた (Table 1)。これらの系統は種子貯蔵タンパク質の電気泳動像タイプおよび収集地を考慮して選んだものである。なお、供試系統を収集地域ごとに区別して解析を行う場合には、日本、韓国-中国-台湾およびブータン-ネパールの 3 地域に大別し、さらに日本の系統については北東日本と南西日本に区分した。

### DNA の抽出

各系統とも 3~5 個体の初生葉および本葉をバルクして約 3 g にし、それから Draper and Scott (1988) の方法にしたがって全 DNA を抽出した。その手順を以下に示す。細かく粉碎した葉に抽出バッファー [0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0)、0.05 M EDTA、0.5 M 塩化ナトリウム および 10 mM 2-メルカプトエタノール] 15 ml および 10% SDS 溶液 2 ml を加え、震盪させながら 65°C で 20 分間インキュベートした。その後、5 M 酢酸カリウム溶液 5 ml を加え、震盪させながら水中で 30 分間インキュベートした。12,000 rpm で 30 分間 (4°C) 遠心分離して上清を回収し、そこに等量の冷イソプロパノールを加えて DNA を析出させた。12,000 rpm で 10 分間 (4°C) 遠心分離して DNA ペレットを回収し、70% エタノールでそれを洗浄した。DNA ペレットを乾かした後、

Table 1. Origin of the plant materials and the number of strains analyzed

Region	No. of strains	Country or Prefecture in Japan (No. of strains)
Japan	140	
Northeast Japan (69)		Hokkaido (10), Aomori (4), Iwate (4), Akita (4), Yamagata (4), Fukushima (4), Tochigi (1), Gunma (4), Saitama (2), Ibaragi (3), Nagano (4), Niigata (3), Toyama (4), Ishikawa (4), Gifu (3), Aichi (4), Mie (3)
Southwest Japan (71)		Fukui (4), Shiga (5), Hyogo (4), Nara (4), Wakayama (4), Kyoto (2), Tottori (5), Shimane (4), Okayama (4), Hiroshima (1), Tokushima (4), Ehime (4), Kochi (4), Fukuoka (2), Saga (3), Nagasaki (4), Kumamoto (3), Oita (3), Miyazaki (3), Kagoshima (3), Okinawa (1)
South Korea-China-Taiwan	40	South Korea (36), China (2), Taiwan (4)
Bhutan-Nepal	23	Bhutan (21), Nepal (2)
Total	203	

1  $\mu$ g の RNase を含む TE バッファー [10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0)、1 mM EDTA] 10 ml を加えて、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、5M 塩化ナトリウム溶液 500  $\mu$ l および 99% エタノール 3.7 ml を加えて攪拌し、氷中に 25 分間静置した。12,000 rpm で 5 分間 (4°C) 遠心分離して上清を回収し、そこに等量の冷イソプロパノールを加えて DNA を析出させた。8,000 rpm で 5 分間 (4°C) 遠心分離して DNA ペレットを回収し、70% エタノールでそれを洗浄した。DNA ペレットを乾かした後、TE バッファー (10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0)、1 mM EDTA) 1 ml に溶解させた。

この DNA を濃度既知の  $\lambda$  DNA と比較することにより、2 ng/ $\mu$ l の濃度に調整し、それをさらに 10 倍希釈したサンプルを PCR の鋳型 DNA として用いた。

## PCR 分析

PCR およびその産物の電気泳動は Kaga et al. (1996a) の方法を若干修正して行った。本研究における PCR 反応液の組成は、0.4 ng 鋳型 DNA、0.2  $\mu$ M 10 塩基プライマー (Operon Technologies, USA)、0.2 mM dNTPs (TOYOBO, Japan)、0.2 ユニット *Taq* DNA ポリメラーゼ (TOYOBO, Japan)、10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3)、50 mM 塩化カリウムおよび 2 mM 塩化マグネシウムであり、反応液量は 10  $\mu$ l とした。PCR 増幅は Bio Oven III (Bio Therm, USA) を用いて、93°C-2 分で始まり、93°C-1 分、34°C-2 分、72°C-2 分の一連の行程を 40 サイクル行った後、72°C-5 分で終了するように設定して行った。PCR 産物は 1.6% アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド溶液で染色することにより検出した。

明瞭な多型バンドを生じさせるプライマーを検索するために、あらかじめ、上記の 4 つの収集地域を代表する 5 系統、すなわち Acc 896 (北東日本)、Acc 1363 (南西日本)、Acc 1083 (南西日本)、Acc 841 (韓国-中国-台湾) および Acc 2305 (ブータン-ネパール) を用いて、620 種類のプライマーについてスクリーニングを行った。その結果に基づいて、特に明瞭な多型バンドを生じさせた 48 プライマーを本試験に用いた。それらの塩基配列を Table 2 に示した。

Table 2. Nucleotide sequence of the primers used in this study

Primers	sequence 5' - 3'	Primers	sequence 5' - 3'
OPA01	AGAGCCTTGG	OPAD04	GTAGGCCTCA
OPA08	GTGACGTAGG	OPAD14	GAACGAGGGT
OPC04	CCGCATCTAC	OPAD16	AACGGGCGTC
OPC08	TGGACCGGTG	OPAE12	CCGAGCAATC
OPC09	CTCACCGTCC	OPAE14	GAGAGGCTCC
OPD03	GTCGCCGTCA	OPAE15	TGCCTGGACC
OPD08	GTGTGCCCCA	OPAF10	GGTTGGAGAC
OPE02	GGTGCGGGAA	OPAF17	TGAACCGAGG
OPE04	GTGACATGCC	OPAG07	CACAGACCTG
OPE06	AAGACCCCTC	OPAG14	CTCTCGGCGA
OPE15	ACGCACAACC	OPAG17	AGCGGAAGTG
OPG06	GTGCCTAACC	OPAG19	AGCCTCGGTT
OPG11	TGCCCGTCGT	OPAH06	GTAAGCCCCT
OPH05	AGTCGTCCCC	OPAH09	AGAACCGAGG
OPH07	CTGCATCGTG	OPAH15	CTACAGCGAG
OPI07	CAGCGACAAG	OPAI10	TCGGGGCATC
OPI10	ACAACGCGAG	OPAI20	CCTGTTCCCT
OPI12	AGAGGGCACA	OPAJ12	CAGTTCCCGT
OPAA14	AACGGGCCAA	OPAJ13	CAGCCGTTCC
OPAA15	ACGGAAGCCC	OPAJ18	GGCTAGGTGG
OPAB04	GGCACGCGTT	OPAL04	ACAACGGTCC
OPAB11	GTGCGCAATG	OPAN10	CTGTGTGCTC
OPAB14	AAGTGCGACC	OPAP06	GTCACGTCTC
OPAB19	ACACCGATGG	OPAR15	ACACTCTGCC

## データ解析

本研究では、明瞭な多型バンドについてのみ系統ごとにその有無を調査し、バンドが有る場合を1、無い場合を0として、0-1 データマトリクスを作成した。この0-1 データマトリクスをもとに、統計ソフトウェア Excel 多変量解析 ver.3 (株式会社エスミ) を用いて相関行列法により主成分分析を行った。また、このマトリクスから、各2系統間の類似度  $S_{ij}$  (Simple Matching Coefficient, Sokal and Michener 1958) を、

$$S_{ij} = (a + d) / (a + b + c + d)$$

(a: 2系統*i*および*j*ともに存在するバンド数、b: 系統*i*にのみ存在するバンド数、c: 系統*j*にのみ存在するバンド数、d: 2系統*i*および*j*ともに存在しないバンド数)

により算出した。この類似度の値を、

$$D_{ij} = 1 - S_{ij}$$

により非類似度 ( $D_{ij}$ ) に変換し、SPSS 6.1J Professional Statistics Power Mac 版 (エス・ピー・エス・エス株式会社) を用いて、UPGMA 法によりクラスター分析を行った。

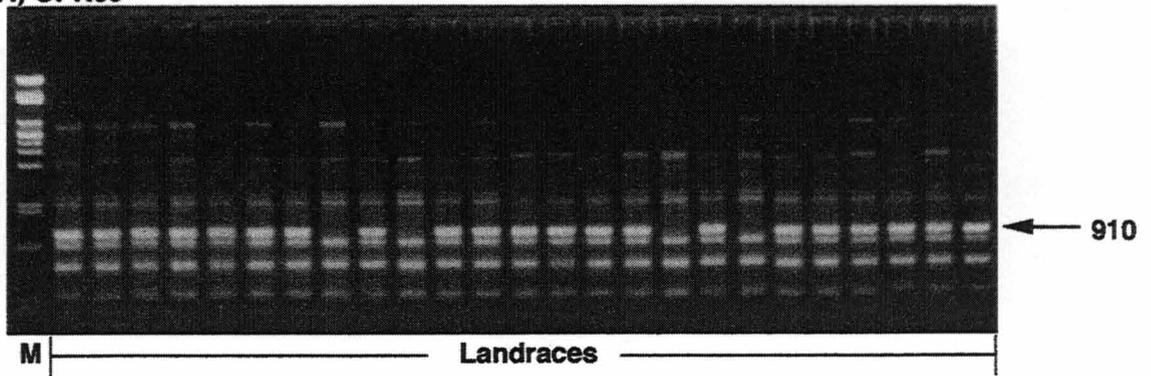
## 結果

RAPD マーカーの同定と各マーカーにおけるバンド出現割合の地域間差異

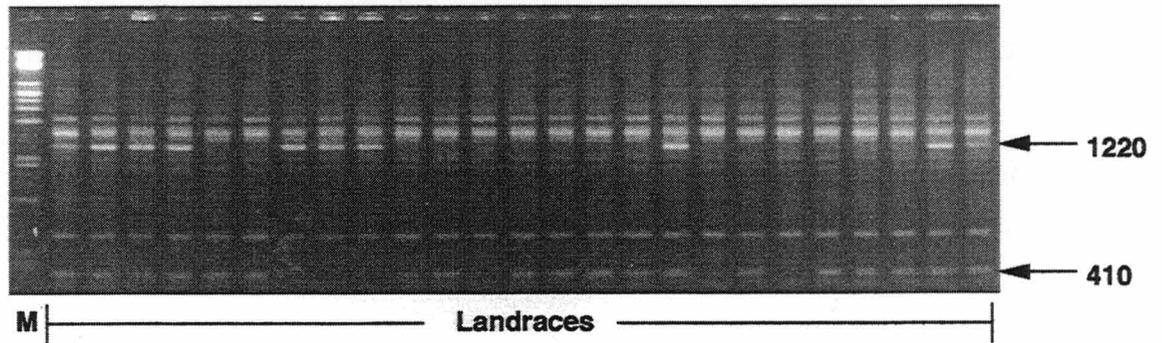
Fig. 1. に、プライマーとして OPH05, OPAD16, OPAF10 および OPAJ12 を用いた時に得られた PCR 増幅産物の電気泳動像を示した。この図では、各泳動像とも矢印で示した位置に 1~4 本の多型バンドが観察されたことを示している。

各プライマーにおいて検出された総バンド数および多型バンド数を Table 3 に示した。プライマーごとの総バンド数は 6~12 本 (平均 8.6 本) であり、全体で 413 本のバンドを検出することができた。これらのうち 97 本 (23.5%) の

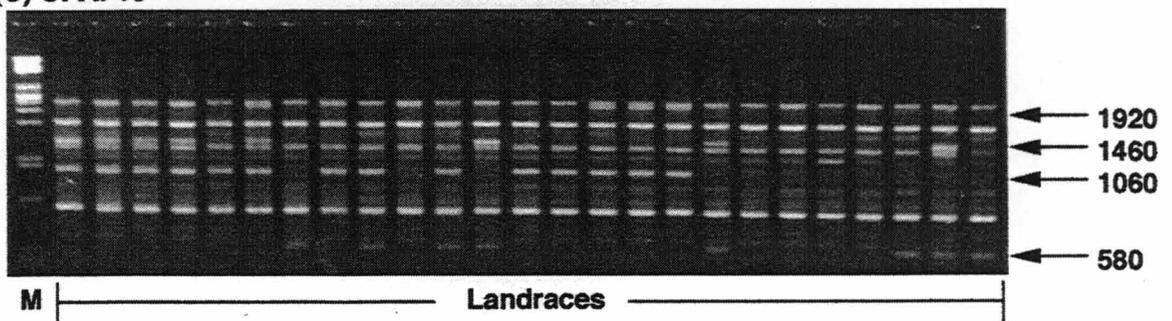
(A) OPH05



(B) OPAD16



(C) OPAF10



(D) OPAJ12

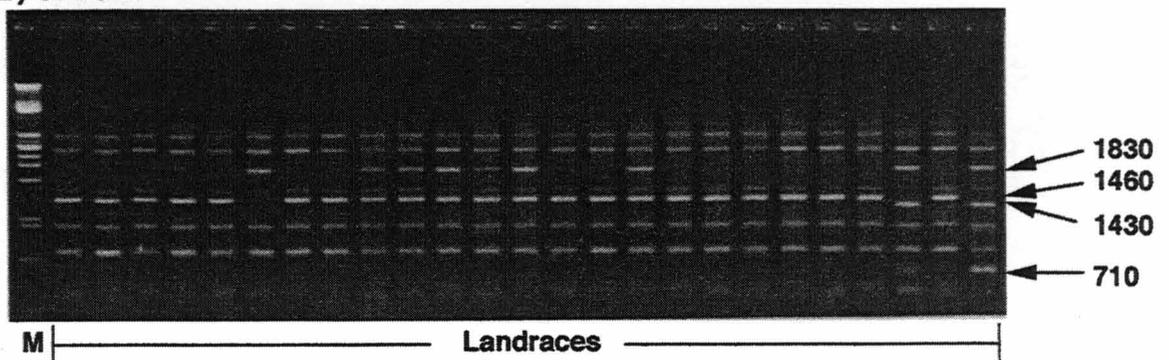


Fig. 1. RAPD banding patterns of 25 azuki bean landraces using four primers OPH05 (A), OPAD16 (B), OPAF10 (C) and OPAJ12 (D). M: Molecular weight marker ( $\lambda$  DNA digested with *Pst* I).

Table 3. The numbers of total and polymorphic bands detected in each primer

Primers	No. of total bands	No. of polymorphic bands	Primers	No. of total bands	No. of polymorphic bands
OPA-01	12	1	OPAD-04	10	2
OPA-08	8	2	OPAD-14	10	2
OPC-04	9	2	OPAD-16	7	2
OPC-08	8	1	OPAE-12	6	1
OPC-09	9	1	OPAE-14	6	3
OPD-03	8	2	OPAE-15	8	2
OPD-08	7	1	OPAF-10	8	4
OPE-02	8	1	OPAF-17	10	2
OPE-04	11	2	OPAG-07	9	1
OPE-06	10	2	OPAG-14	10	4
OPE-15	9	2	OPAG-17	7	1
OPG-06	6	1	OPAG-19	11	4
OPG-11	7	2	OPAH-06	8	2
OPH-05	7	1	OPAH-09	8	1
OPH-07	10	3	OPAH-15	9	4
OPI-07	10	2	OPAI-10	10	1
OPI-10	9	2	OPAI-20	10	2
OPI-12	10	1	OPAJ-12	9	4
OPAA-14	7	2	OPAJ-13	10	4
OPAA-15	7	2	OPAJ-18	7	2
OPAB-04	9	1	OPAL-04	10	2
OPAB-11	7	1	OPAN-10	9	4
OPAB-14	10	2	OPAP-06	9	3
OPAB-19	6	1	OPAR-15	8	2
Total bands per 48 primers		: 413	Total bands per primer		: 8.6
Polymorphic bands per 48 primers		: 97	Polymorphic bands per primer		: 2.0

バンドにおいて多型が認められ、プライマーごとの多型バンド数は1~4本(平均2.0本)であった。以後、これらの多型バンドをRAPD マーカーといい、そのバンドを生じさせた RAPD プライマーの名称と増幅された DNA の塩基数 (bp) によって表示することとする。

Table 4 に、97 の RAPD マーカーのそれぞれについて、そのバンドを有する系統の数を収集地域別に示した。これから、RAPD マーカーの種類によってバンドを生ずる系統数は大きく異なっており、わずか 9 系統だけでバンドが出現するもの (OPAJ13-840) から、197 系統で出現するもの (OPI10-1480) まで存在することが分かった。

さらにこの表には、「日本、韓国-中国-台湾およびブータン-ネパールの 3 地域ともに、各 RAPD マーカーにおいてバンドを有する系統数の全系統数に対する割合 (以下、バンド出現割合という) は等しい」ということを帰無仮説として、カイ二乗検定を行った結果を示した。これによると、81 の RAPD マーカーにおいて、少なくともいずれかの 2 地域間で有意差が認められ、とくに、OPC09-630 など 9 つの RAPD マーカーは 3 つの地域のいずれの間でもバンド出現割合が有意に異なっていた。これら 9 つを除くと、ブータン-ネパール地域と日本および韓国-中国-台湾地域のいずれとの間でも有意に異なる RAPD マーカーが 54 存在し、これらの中には、ブータン-ネパール地域の全系統でバンドを生ずるが他の 2 地域の系統ではこれが全く認められないもの (OPAE15-650 など) や、その逆のもの (OPE04-950 など) もあった。また、日本と他の 2 地域との間でバンド出現割合が有意に異なる RAPD マーカー (OPI07-1160、OPI10-1250 など) が 8 つ、韓国-中国-台湾地域と他の 2 地域との間で有意となるもの (OPAB11-1220、OPAF10-1460 など) が 6 つ認められ、その他に、特定の 2 地域間のみで有意に異なる RAPD マーカーが 4 つ存在した。これらを一括すると、ブータン-ネパール地域と日本および韓国-中国-台湾地域との間では、それぞれ 72 および 70 の RAPD マーカーで、また、日本と韓国-中国-台湾地域との間では、25 の RAPD マーカーにおいて、バンドの出現割合に有意差があった。

Table 4. The number of strains showing RAPD markers in each region

RAPD marker	No. of strains				Significant difference			
	J (NJ, SJ) <sup>1)</sup>	SCT	BN	Total	J vs SCT	J vs BN	SCT vs BN	NJ vs SJ
OPA01-770	13 ( 4, 9)	6	10	29		*** <sup>2)</sup>	*	
OPA08-1110	140 (69, 71)	40	5	185		***	***	
OPA08-1180	107 (54, 53)	27	23	157				
OPC04-1350	120 (58, 62)	37	16	173				
OPC04-1450	20 (11, 9)	3	4	27				
OPC08-1000	71 (40, 31)	33	20	124	*	*		
OPC09-630	68 (40, 28)	10	0	78	*	***	*	
OPD03-530	140 (69, 71)	40	2	182		***	***	
OPD03-1230	0 ( 0, 0)	0	21	21		***	***	
OPD08-1270	140 (69, 71)	40	2	182		***	***	
OPE02-1030	0 ( 0, 0)	0	20	20		***	***	
OPE04-700	30 ( 9, 21)	11	6	47				*
OPE04-950	140 (69, 71)	40	0	180		***	***	
OPE06-1190	79 (36, 43)	20	12	111				
OPE06-1660	140 (69, 71)	40	4	184		***	***	
OPE15-1010	140 (69, 71)	40	2	182		***	***	
OPE15-1320	10 ( 5, 5)	4	23	37		***	***	
OPG06-680	105 (55, 50)	33	23	161				
OPG11-750	16 ( 7, 9)	7	0	23			*	
OPG112140	0 ( 0, 0)	0	21	21		***	***	
OPH05-910	111 (57, 54)	33	23	167				
OPH07-360	121 (58, 63)	32	23	176				
OPH07-500	0 ( 0, 0)	0	21	21		***	***	
OPH07-540	140 (69, 71)	40	2	182		***	***	
OPI07-1160	63 (31, 32)	6	0	69	**	**		
OPI07-1370	49 (15, 34)	28	0	77	**	**	***	**
OPI10-1250	5 ( 3, 2)	7	4	16	**	**		
OPI10-1480	140 (69, 71)	34	23	197				
OPI12-880	102 (44, 58)	19	3	124		***	*	
OPAA14-530	0 ( 0, 0)	0	21	21		***	***	
OPAA14-1000	140 (69, 71)	40	2	182		***	***	
OPAA15-1010	37 (13, 24)	4	21	62		***	***	
OPAA15-1160	140 (69, 71)	40	14	194				
OPAB04-1410	30 ( 6, 24)	4	0	34		*		**
OPAB11-1220	14 ( 5, 9)	13	0	27	**		**	
OPAB14-750	9 ( 2, 7)	0	23	32		***	***	
OPAB14-780	131 (67, 64)	40	0	171		***	***	
OPAB19-1690	78 (34, 44)	26	20	124				
OPAD04-940	0 ( 0, 0)	0	17	17		***	***	
OPAD04-2200	0 ( 0, 0)	0	21	21		***	***	
OPAD14-630	24 ( 7, 17)	0	0	24	**	*		*
OPAD14-1220	74 (37, 37)	7	0	81	**	***	*	
OPAD16-410	118 (59, 59)	35	0	153		***	***	
OPAD16-1220	25 (13, 12)	16	0	41	**	*	**	
OPAE12-2010	94 (39, 55)	14	23	131	*		**	
OPAE14-530	127 (63, 64)	37	9	173		*	*	
OPAE14-720	20 (10, 10)	16	0	36	**		**	
OPAE14-1430	29 (14, 15)	12	15	56		***	*	
OPAE15-650	0 ( 0, 0)	0	23	23		***	***	
OPAE15-1030	102 (54, 48)	11	0	113	**	***	*	
OPAF10-580	31 (11, 20)	3	17	51		***	***	
OPAF10-1060	91 (53, 38)	18	0	109		***	**	
OPAF10-1460	18 ( 9, 9)	16	2	36	***		*	
OPAF10-1920	19 ( 9, 10)	0	0	20				
OPAF17-720	140 (69, 71)	40	2	182		***	***	
OPAF17-1250	40 (18, 22)	15	23	78		***	**	
OPAG07-1190	61 (23, 38)	29	23	113	*	***		
OPAG14-480	18 (10, 8)	3	0	21				
OPAG14-550	81 (41, 40)	21	15	117				
OPAG14-1250	44 (26, 18)	27	0	71	**	**	***	
OPAG14-1340	0 ( 0, 0)	0	21	21		***	***	

Table 4. Continued

RAPD marker	No. of strains				Significant difference			
	J (NJ, SJ) <sup>1)</sup>	SCT	BN	Total	J vs SCT	J vs BN	SCT vs BN	NJ vs SJ
OPAG17-1660	63 (33, 30)	14	14	91				
OPAG19-1050	42 (24, 18)	22	2	66	*		**	
OPAG19-1160	0 ( 0, 0)	0	21	21		***	***	
OPAG19-1680	0 ( 0, 0)	0	21	21		***	***	
OPAG19-2600	140 (69, 71)	40	2	182		***	***	
OPAH06-440	9 ( 5, 4)	3	23	35		***	***	
OPAH06-620	140 (69, 71)	40	2	182		***	***	
OPAH09-1480	20 (12, 8)	24	22	66	***	***		
OPAH15-820	140 (69, 71)	40	2	182		***	***	
OPAH15-900	140 (69, 71)	40	2	182		***	***	
OPAH15-1170	0 ( 0, 0)	0	13	13		***	***	
OPAH15-1200	58 (29, 29)	23	2	83		*	**	
OPAI10-920	71 (41, 30)	8	0	79	**	***	*	
OPAI20-1190	138 (68, 70)	40	3	181		***	***	
OPAI20-1320	0 ( 0, 0)	0	21	21		***	***	
OPAJ12-710	5 ( 1, 4)	3	9	17		***	**	
OPAJ12-1430	0 ( 0, 0)	0	21	21		***	***	
OPAJ12-1460	130 (63, 67)	39	3	172		***	***	
OPAJ12-1830	65 (24, 41)	6	23	94	**	**	***	*
OPAJ13-630	0 ( 0, 0)	0	21	21		***	***	
OPAJ13-780	140 (69, 71)	40	5	185		***	***	
OPAJ13-840	4 ( 1, 3)	5	0	9	*			
OPAJ13-1610	115 (48, 67)	37	23	175				
OPAJ18-1000	140 (69, 71)	40	0	180		***	***	
OPAJ18-960	30 (15, 15)	8	0	38		*	*	
OPAL04-1110	77 (36, 41)	7	7	91	**			
OPAL04-1190	140 (69, 71)	40	5	185		***	***	
OPAN10-790	140 (69, 71)	37	2	179		***	***	
OPAN10-990	72 (25, 47)	7	3	82	**	*		*
OPAN10-1450	6 ( 2, 4)	3	23	32		***	***	
OPAN10-1580	0 ( 0, 0)	0	21	21		***	***	
OPAP06-1760	54 (31, 23)	5	9	68	*		*	
OPAP06-1280	10 ( 3, 7)	0	20	30		***	***	
OPAP06-770	10 ( 3, 7)	1	20	31		***	***	
OPAR15-1970	113 (57, 56)	11	0	124	***	***	*	
OPAR15-2080	33 (15, 18)	29	23	85	***	***		

<sup>1)</sup>: J=Japan, NJ=Northeast Japan, SJ=Southwest Japan, SCT=South Korea-China-Taiwan, BN=Bhutan-Nepal

<sup>2)</sup>: \*, \*\* and \*\*\* indicate significance at 5%, 1% and 0.1% level, respectively

なお、日本の系統を、北東日本地域と南西日本地域に分けてみると、OPE04-700、OPAD14-630など、6つのRAPDマーカーにおいて、バンドの出現割合に有意な地域間差が認められた。

### 収集地域内および地域間にみられる遺伝的多様性

各収集地域内および地域間における遺伝的多様性の程度を評価するために、検出された97の本多型バンドを対象にして、各収集地域内および地域間における非類似度を算出し、その結果をそれぞれTable 5および6に示した。

203系統全体における非類似度の平均値は0.291であり、各2系統間の非類似度は0.000から0.773の範囲にあった。収集地域ごとにみると、ブータン-ネパール地域の系統群では、その平均非類似度は0.162(レンジ0.000~0.526)で、分析した地域の中では多様性の程度が最も小さかった。韓国-中国-台湾地域の系統群の平均非類似度は0.193(0.000~0.340)であった。日本の系統群は外国の各地域のものより高い値を示し、全体で0.203(0.000~0.381)、北東日本地域および南西日本地域では、それぞれ、0.193(0.000~0.361)および0.207(0.031~0.340)であり、分析した地域の中では、南西日本地域の系統群が最も高い多様性の程度を示した。

一方、収集地域間で算出した平均非類似度は、各収集地域内の値よりも概して大きな値を示した。特に、ブータン-ネパール地域と他の地域との間における平均非類似度は、0.598(韓国-中国-台湾地域)~0.621(北東日本地域)と非常に大きかった。また、日本の両地域と韓国-中国-台湾地域との間にも、0.222(北東日本地域)および0.230(南西日本地域)とやや大きな差異が認められた。北東日本地域と南西日本地域との間の値は0.206で、これは南西日本地域内の系統群で得られた値と同程度であった。

### 主成分分析による系統分類

203系統のRAPD分析で得られた0-1マトリクスを用いて、相関行列法により主成分分析を行った結果、第1主成分だけで変異全体の42.9%を、また、第

**Table 5. Average dissimilarity among azuki bean landraces in the each region**

<b>Regional groups compared</b>	<b>Average <math>\pm</math> standard deviation (Range)</b>
Within : Japan	0.203 $\pm$ 0.050 (0.000 ~ 0.381)
Northeastern Japan	0.193 $\pm$ 0.053 (0.000 ~ 0.361)
Southwestern Japan	0.207 $\pm$ 0.048 (0.031 ~ 0.340)
South Korea-China- Taiwan	0.193 $\pm$ 0.061 (0.000 ~ 0.340)
Bhutan-Nepal	0.162 $\pm$ 0.146 (0.000 ~ 0.526)
All strains	0.291 $\pm$ 0.175 (0.000 ~ 0.773)

Table 6. Average dissimilarity between regional groups of azuki bean landraces

Regional groups compared	Average $\pm$ standard deviation (Range)
Between : Japan vs South Korea-China-Taiwan	0.226 $\pm$ 0.053 (0.021 ~ 0.402)
Japan vs Bhutan-Nepal	0.615 $\pm$ 0.108 (0.175 ~ 0.773)
South Korea-China-Taiwan vs Bhutan-Nepal	0.598 $\pm$ 0.106 (0.206 ~ 0.753)
Northeastern Japan vs Southwestern Japan	0.206 $\pm$ 0.048 (0.062 ~ 0.381)
Northeastern Japan vs South Korea-China-Taiwan	0.222 $\pm$ 0.057 (0.021 ~ 0.371)
Northeastern Japan vs Bhutan-Nepal	0.621 $\pm$ 0.107 (0.196 ~ 0.773)
Southwestern Japan vs South Korea-China-Taiwan	0.230 $\pm$ 0.049 (0.062 ~ 0.402)
Southwestern Japan vs Bhutan-Nepal	0.610 $\pm$ 0.109 (0.175 ~ 0.763)

3 主成分までで 53.7% を説明することができた。

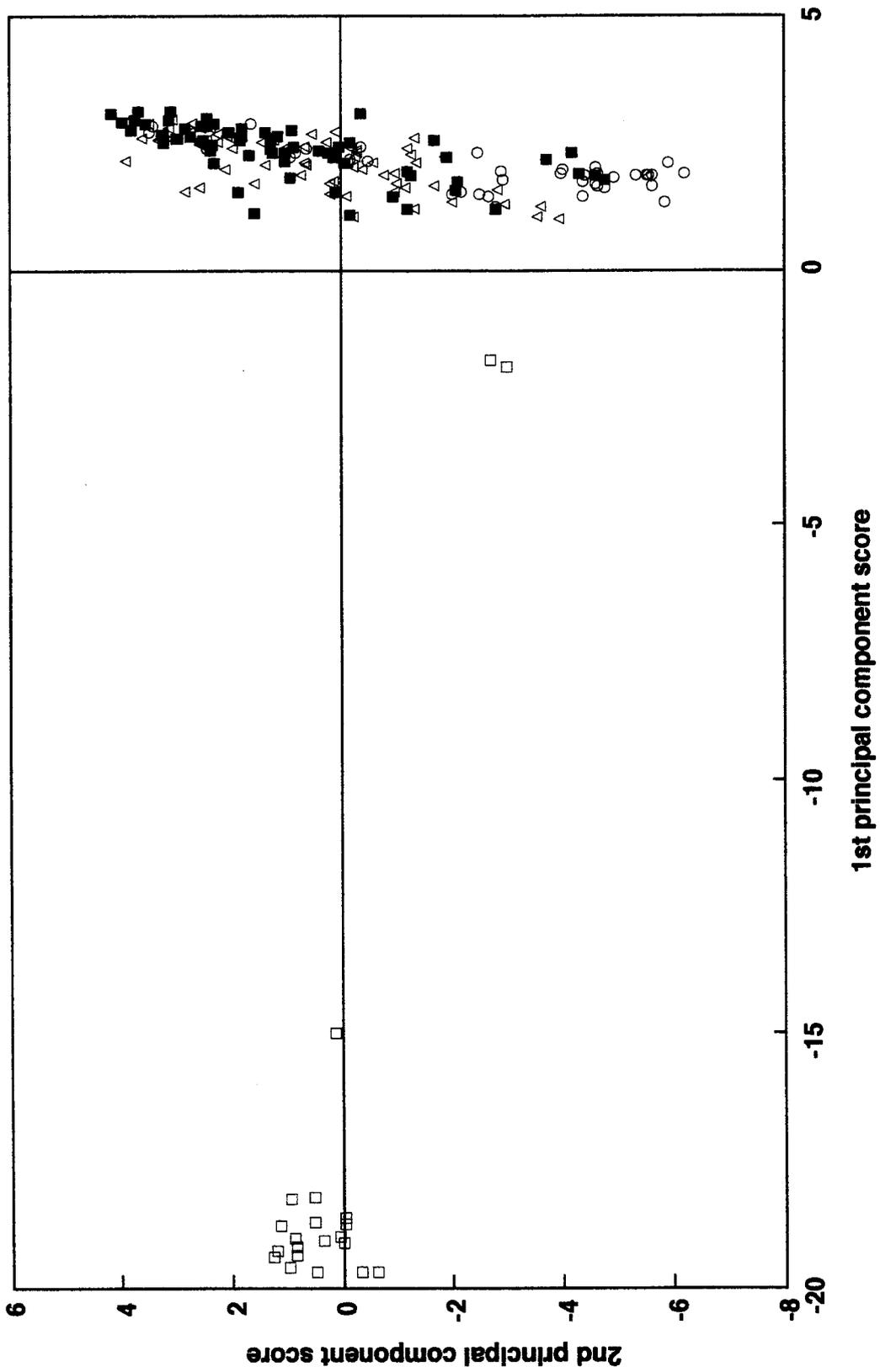
Fig. 2(A) は、各系統の第 1 および第 2 主成分スコアを散布図として表したものである。これによると、ブータン-ネパール地域の系統群は、そのほとんどが第 1 主成分スコアにおいて極めて大きな負の値を示し、他の地域の系統とは明確に区別できた。また、韓国-中国-台湾地域の系統のほとんどは第 4 象限に、日本の系統の多くは第 1 象限に分布していた。

Fig. 2(B) には、第 2 および第 3 主成分スコアの散布図を示した。これによると、韓国-中国-台湾地域の系統の大部分は第 2 主成分スコアの小さい領域に分布しており、その他の地域の系統と区別できた。日本の系統についても、北東地域の系統群と南西地域の系統群との間で、それらの分布がやや異なる傾向が認められた。すなわち、北東地域の系統は第 2 主成分スコアが正の値を示し、第 1 および第 4 象限に分布する系統が多いのに対し、南西地域の系統は第 3 主成分スコアが正の値を示し、第 1 および第 2 象限に多く分布していた。ブータン-ネパール地域の系統は、2 系統を除き、原点周辺の比較的狭い範囲に分布した。

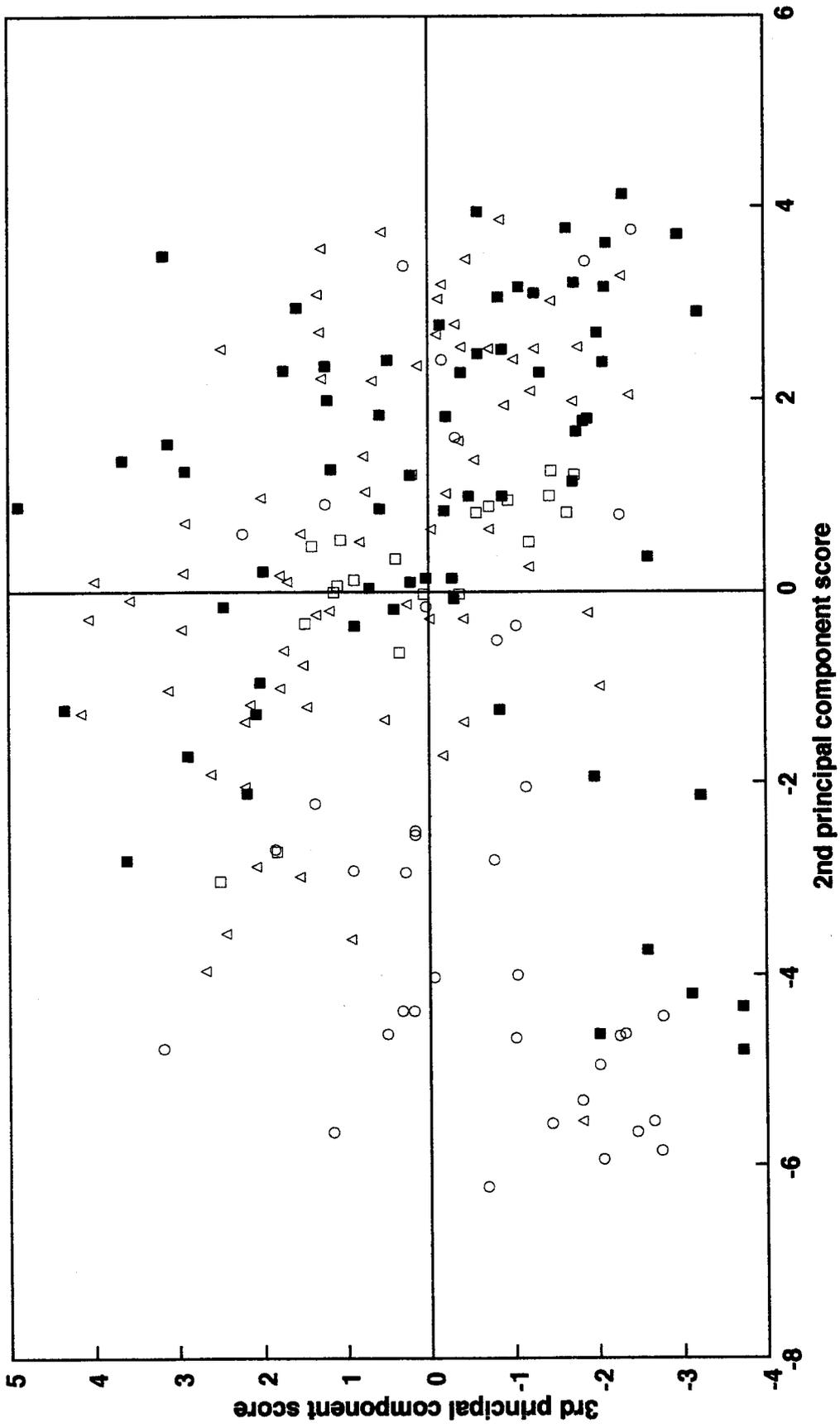
### クラスター分析による系統分類

Fig. 3. に、97 本の RAPD マーカーを用いて UPGMA 法により得られたアズキ 203 系統のデンドログラムを示した。この図中の系統番号は十勝農試および生物研で採用されているものであり、また、系統番号の後に各系統の収集地域の略号と 15 種類のタンパク質タイプ (第 2 章) も併記した。これによって、供試系統はほぼ収集地域に対応して、大きく 5 つのクラスター (A、B、C、D および E) に分類することができた。

A クラスターはブータン-ネパール地域の 21 系統のみから構成されていた。これらのうち 20 系統はタンパク質タイプ I を示し、それらは密接なクラスターを形成したが、タンパク質タイプ II を示した 1 系統 (Acc 2277) は、他の 20 系統で構成されたクラスターと 0.198 の非類似度で結合していた。この A クラスターの系統群は 0.640 の大きな非類似度で残りの 181 系統からなる一群のク



**Fig. 2(A). Distribution of 203 azuki bean landraces on the basis of the 1st and 2nd principal component score.**



**Fig. 2(B). Distribution of 203 azuki bean landraces on the basis of the 2nd and 3rd principal component score.**

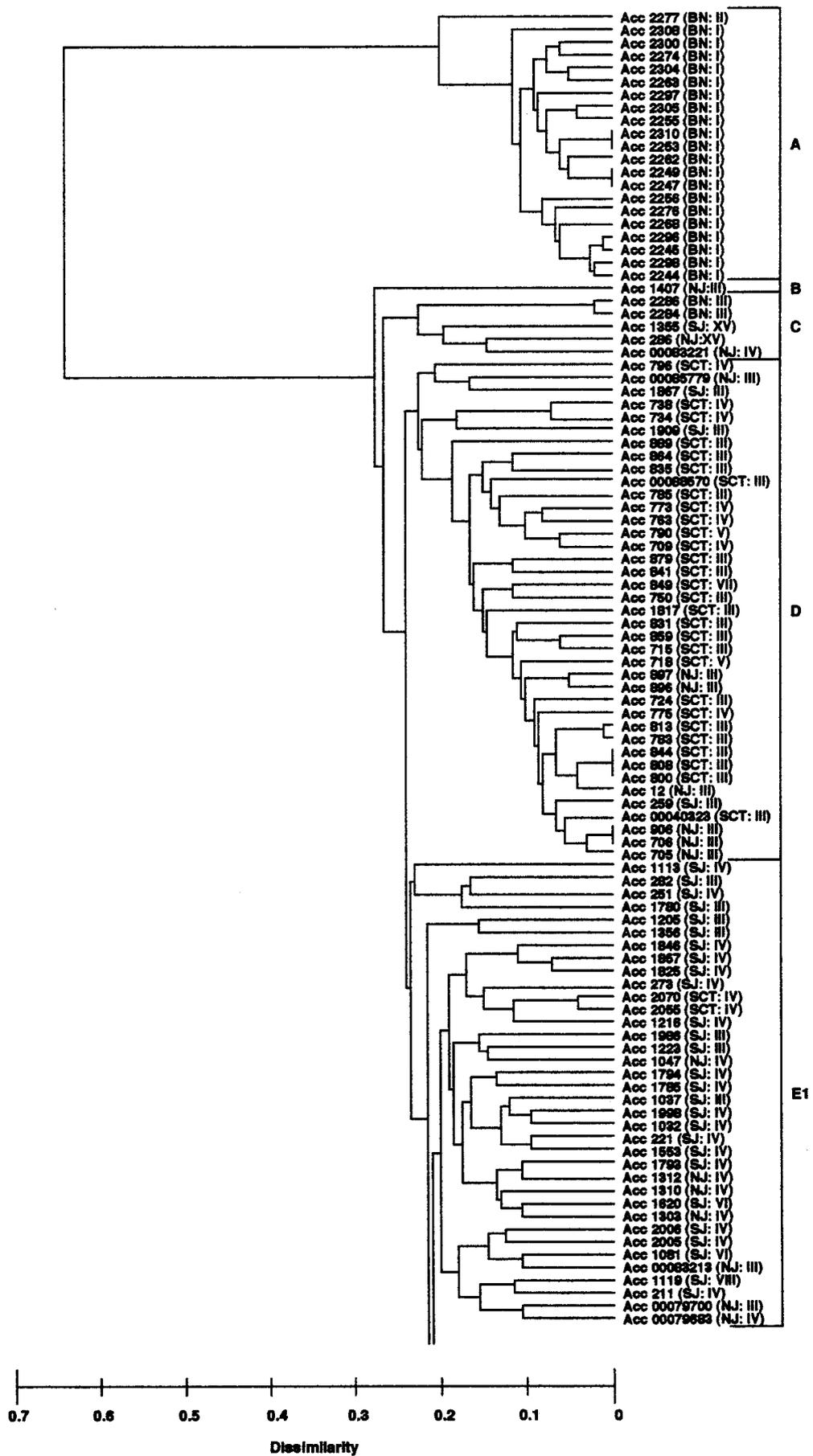


Fig. 3. Dendrogram of 203 azuki bean landraces based on the UPGMA clustering using 97 RAPD markers. Letters in the parentheses after accession numbers indicate the abbreviation of regional groups (See Table 4) and protein types (See Chapter 2) .

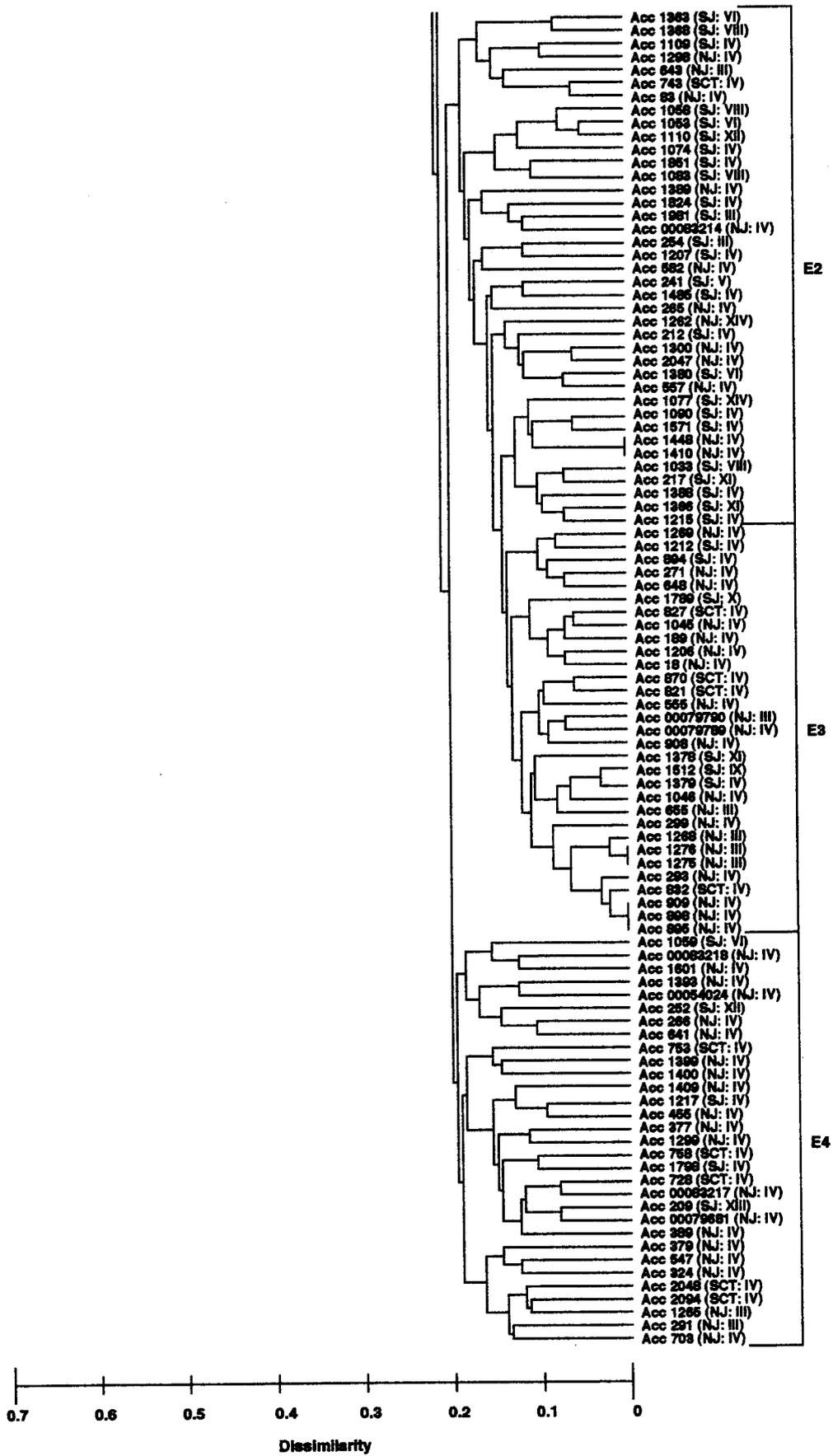


Fig. 3. Continued.

ラスターと結合していた。

B クラスターには北東日本地域の 1 系統 (Acc 1407) のみが所属し、これは C から E までのクラスターを構成した 180 系統と 0.273 の非類似度で結合していた。C クラスターは 5 系統で構成されており、ここには日本の系統に加え、ブータンのタンパク質タイプ III を示した 2 系統 (Acc 2284, Acc 2286) も含まれていた。

D クラスターは E クラスターと 0.242 の非類似度で結合しており、39 系統から構成されていた。このうち、26 系統が韓国のものであり、2 系統 (Acc 00040323, Acc 00088570) は中国のものであった。残りの 11 系統は日本のものであり、台湾のものは全く含まれていなかった。このクラスターには、タンパク質タイプ III を示す系統が多く存在し、韓国および中国の 28 系統中 18 系統が、また、日本の 11 系統すべてがこのタイプのものであった。とくに、北海道のタンパク質タイプ III を示す 5 系統 (Acc 705, Acc 706, Acc 896, Acc 897, Acc 906) はいずれもこのクラスターに含まれていた。

E クラスターには、137 系統が所属し、それらは非類似度が 0.234 以下の範囲で互いに結合していた。所属系統のうち 125 系統は日本のものであり、残りは韓国の 8 系統と台湾の 4 系統 (Acc 2048, Acc 2055, Acc 2070, Acc 2094) であった。このクラスターは、多数の小グループから成り、それらが互いに狭い非類似度の範囲で結合されているため、これをさらに分割することはやや困難であった。しかし、便宜的に Fig.3. に示すような 4 つのグループ (E1, E2, E3 および E4) に大別してみると、各グループには次のような特徴が認められた。すなわち、E1 および E2 グループには 75 系統が所属し、これらのグループに属した日本の 72 系統のうち 53 系統は南西日本地域のものであった。一方、E3 および E4 グループに含まれる日本の 53 系統のうち、北東日本地域のもものが 37 系統を占めており、その頻度は南西日本地域の系統より明らかに高かった。また、韓国の系統は 8 系統のうち、1 系統 (Acc 743) のみが E2 グループに含まれており、残りの 7 系統は E3 または E4 グループに属していた。台湾の 4 系統は E1 または E4 グループに属していた。このような E クラスターに含まれ

た韓国および台湾の系統は、いずれも種子貯蔵タンパク質の SDS-PAGE パターンが日本の系統において圧倒的多数を占めていたタイプ IV を示すものであった。E2 グループには、本州西部においてのみ特異的に観察されたタンパク質タイプ (VI、VIII、XI、XII および XIV) を持つものが 12 系統含まれており、この頻度は他の 3 つのグループより高かった。

このデンドログラムに示されたように、7 組 16 系統については、それぞれを識別することはできなかった。互いに識別できなかった系統は、いずれも同一の地域 (日本の系統の場合には、同一の道県) に由来するものであった。これら以外の系統については、97 本の RAPD バンドの有無の組み合わせにより、明確に識別することができた。

## 考察

本研究においては、1 プライマー当たりで検出された多型バンド数は 2.0 本であり、さらに、全系統間の非類似度の平均は 0.291 であった。これまでの DNA レベルでのアズキに関する遺伝的変異の解析において、加賀ら (1993) は、日本の 12 の主要品種に関する RAPD 分析では、37 プライマーを用いて検出した 184 本のバンドのうち、多型を示すものはわずか 10 本 (1 プライマー当たり 0.5 本) しか認められなかったことから、日本の品種における遺伝的多様性は小さいとしている。一方、Yee *et al.* (1999) は RAPD および AFLP 分析により、主として、東アジア地域の系統の遺伝的変異を解析し、それぞれ 57 本 (1 プライマー当たり 3.2 本) および 214 本 (1 プライマー組み当たり 11.3 本) の多型バンドを検出した。そして、Jaccard の係数による類似度は、RAPD マーカーを用いた場合は 0.52、AFLP マーカーを用いた場合は 0.71 であったと報告している。本研究の 0-1 マトリクスから Jaccard の係数による類似度を計算したところ、その値は 0.542 となった。この値は氏らの RAPD 分析で得た値とほぼ同じであり、AFLP 分析による値より小さかった。これらのことから、本研究に用いた在来系統の遺伝的多様性は、Yee *et al.* (1999) が分析した品種・系統と

ほぼ同程度であり、日本の主要品種よりはかなり大きいといえる。我が国のアズキ主要品種における遺伝的多様性は小さい（加賀ら 1993）ので、上記の結果から、本研究に供試したような在来系統を育種的に利用することは日本のアズキ品種の脆弱な遺伝的基盤を拡大するために有効であると思われる。

各収集地域における多様性の程度には若干の差異がみられ、ブータン-ネパール地域の系統で最も小さく、韓国-中国-台湾地域のものがこれに続き、日本のものが最も大きかった。また、日本の中では、南西地域のものが北東地域のものより大きな多様性を示した。これらの傾向は種子貯蔵タンパク質の SDS-PAGE 分析による変異解析の結果とほぼ一致していた。RAPD および AFLP 分析の結果に基づいて、Yee et al. (1999) はアズキの起源および栽培化の中心であると考えられている中国の系統において、最も大きな遺伝的多様性が認められたとしている。本研究では中国の在来アズキを 2 系統しか分析できず、その遺伝的多様性の程度を明らかにすることはできなかったが、上記の結果は中国とともに南西日本地域もアズキの多様性中心の 1 つである可能性を示唆する。

本研究では、出現頻度が他の 2 地域とは有意に異なる RAPD マーカーが数多く検出され、主成分分析やクラスター分析により日本、韓国およびブータンの系統群を識別することができた。近代の品種には、他地域の品種間交雑によって育成されたものが多く、これらの品種では、適応性に関係した形質以外では、遺伝的な地域特異性は減少していると考えられる。それに対して在来系統はほとんど人工的な交雑は行われておらず、地域間での種子の交換も稀であるため（Tasaki 1963）、本研究で供試した在来系統をその収集地域によって大別できたものと考えられる。本研究では、特にブータン-ネパール地域の系統群と東アジア地域（日本、韓国、中国および台湾）のそれらとの間では、多数の多型バンドが観察され、その結果、両地域の系統群を明確に区別することができた。このことに関しては、第 2 および 3 章において記した種子貯蔵タンパク質の SDS-PAGE 分析および農業形質の調査結果と一致している。

日本の系統についても、北東地域のものと南西地域のものとを大まかに区別することができた。本研究では、両地域間で出現頻度が有意に異なる RAPD マ

一カーは 6 本だけであったが、プライマーを増やして分析すれば、さらに多くの RAPD マーカーが検出され、両地域の系統群がより明確に区別できるようになる可能性も残されている。また、北海道の 10 系統に関しては、SDS-PAGE 分析の結果と同様に、日本の系統群とクラスターを組むもの (Acc 703, Acc 895, Acc 898, Acc 908, Acc 909) および韓国や中国の系統群とクラスターを組むもの (Acc 705, Acc 706, Acc 896, Acc 897, Acc 906) の 2 つのグループに明確に分かれることが明らかとなった。北海道で栽培されている大納言品種の母本は、日露戦争のころに中国東北部より持ち帰られたものであることが記されている (村田 1989)。したがって、RAPD および SDS-PAGE 分析の結果から、韓国や中国の系統群とクラスターを組んだ系統がそのようなものである可能性がある。

ブータン-ネパール地域および日本の系統群において、これらの地域においてのみ特異的に検出された RAPD マーカーも認められた。このような地域特異性を示すバンドを持った系統が存在している理由としては、第 2 章において記した南西日本地域に特異的なタンパク質タイプを示す系統が多く存在していた理由と同様のことが考えられる。本研究でも、上記のように中国の系統を 2 系統しか分析しておらず、また、ヤブツルアズキについても全く分析していないので、このような特異的な系統が各地域に存在している理由を明確にすることはできなかった。しかし、近年、野生型および雑草型アズキと栽培型アズキとの遺伝的関係が形態学的調査 (Yamaguchi 1992)、アイソザイム分析 (Yasuda and Yamaguchi 1996)、RAPD および AFLP 分析 (Xu et al. 2000a, b) により研究され、中国以外の地域でもアズキの栽培化が起きた可能性を示唆する知見も得られている。したがって、Takeya and Tomooka (1997) の指摘と同様に、本研究結果も、アズキの栽培化は中国以外の地域においても起きた可能性のあることを支持するものと思われる。

今回、全体で 97 の RAPD マーカーを見い出すことができ、とりわけブータン-ネパール地域の系統群と東アジア地域のそれらとの間では、数多くのマーカーが検出された。このことはブータン-ネパール地域の系統と東アジア地域のそ

れとの交配に由来する雑種集団を用いることによって、DNA マーカーによる種内レベルでの連鎖地図作成が可能であることを示唆する。このような連鎖地図が作成されれば、栽培種における有用形質を育種に利用する際に、それらを支配する遺伝子のマッピングや QTL 解析、さらにはそれらのマーカーに基づいた選抜が可能となり、アズキ育種の効率化に寄与できるものと思われる。

RAPD 分析法は品種識別の手段としても有用であることが、様々な作物において確認されている (Fukuoka et al. 1992, Samec and Nasinec 1996, Obara-Okeyo and Kako 1998)。本研究においては、97 本の RAPD バンドの組み合わせによりそのほとんどの系統を識別することができた。したがって、アズキにおいても、RAPD 分析は系統識別を行う上で有効であると考えられる。今回識別できなかった系統は、遺伝的に全く同一のものである可能性もあるが、それらを確認するためには、さらにプライマーを増やして分析することなどが必要である。

## 摘要

日本、韓国、中国、台湾、ブータンおよびネパールにおいて収集された在来アズキ 203 系統について、RAPD 分析法により DNA レベルでの遺伝的変異を解析した。48 プライマーを用いて分析した結果、全部で 413 本の明瞭なバンドが検出された。それらのうち 97 本のバンドで多型が認められ、それぞれにおいてバンドを生ずる系統と生じない系統とが区別された。97 本の多型バンドを対象にして、Simple matching coefficient をもとに非類似度を算出したところ、日本、韓国-中国-台湾およびブータン-ネパールの各地域内の系統平均値は、それぞれ 0.203、0.193 および 0.162 であり、全系統平均値は 0.291 であった。多くの RAPD マーカーにおいて、バンドを生ずる系統の割合は収集地域間で有意に異なっており、これを反映して、特に、ブータン-ネパール地域の系統群と日本および韓国-中国-台湾地域の系統群との間の非類似度は、それぞれ 0.615 および 0.598 と極めて大きな値を示した。また、日本と韓国-中国-台湾の系統

間でも 0.226 とやや大きな非類似度が認められた。そして、クラスター分析および主成分分析により、供試した系統は、ほぼ収集地域に対応したグループに分類することができた。また、検出された 97 の RAPD マーカーにおけるバンドの有無の組み合わせにより、供試した系統のほとんどを識別することができた。以上の結果から、アズキにおいても RAPD 分析が品種・系統の分類や識別に有効であることが明らかとなった。また、DNA レベルでも、本研究に供試した在来系統には大きな遺伝的変異があることから、これらは日本の既存品種の遺伝的基盤を拡大したり、種内レベルでの DNA マーカーによる連鎖地図を作成するための雑種集団を作出したりするのに利用できるものと思われた。

## 第 5 章 アズキとその近縁種との種間交雑に由来する 2 つの組換え近交系集団を用いた RAPD マーカーによる連鎖地図の作成

### 緒論

栽培植物の野生種やその近縁種の中には、栽培種には無い有用形質を保有しているものが多く存在しており、これらは遺伝資源として重要である。このような有用形質の中には、各種の病虫害抵抗性など単一の遺伝子に支配されていると考えられているものばかりではなく、開花期、草丈、収量などの複数の遺伝子が関与した量的形質に関するものも多い。

近年、多くの植物種において、栽培種と有用遺伝子を有する野生種や近縁種との交雑に由来する雑種集団を用いて、分子マーカーによる高密度で精密な連鎖地図が作成されている (Xiao et al. 1998, Fulton et al. 2000, Winter et al. 2000, Lambrides et al. 2000, Eujayl et al. 1998)。このような地図は野生種や近縁種が有する量的形質に関与する遺伝子の QTL 解析に利用され、それらに由来する遺伝子の同定やその効果が分析されている。例えば、トマトでは、RFLP マーカーにより作成した地図を用いて、収量、果実の形状、有機酸含量など 30 の農業形質に関して、野生種 (*Lycopersicon parviflorum*) 由来の遺伝子の効果が QTL 解析により分析され、それらのうちの 27 形質において 183 の野生種由来の有用遺伝子が同定されている (Fulton et al. 2000)。また、イネでも、RFLP およびマイクロサテライトマーカーにより作成した地図を用いて、収量や稈長など 12 形質において、68 個の野生種 (*Oryza rufipogon*) 由来の QTL が同定されている (Xiao et al. 1998)。

アズキの野生種や近縁種の中にも、栽培アズキには無い有用遺伝子を保持しているものが報告されている。とくに、タケアズキにはアズキゾウムシ (沢および Tan 1976, Tomooka et al. 2000) やアズキモザイクウイルス病 (沢ら 1984) などの抵抗性遺伝子が存在し、また、アズキ亜属の中で最も多収性である (Smartt 1990) ことが示されている。ヒメツルアズキは茎疫病抵抗性遺伝

子を有しているとされている (Kaga et al. 1996a)。これらの種における有用遺伝子を利用するために、アズキとこの両種との種間交雑に由来する雑種集団が育成され、これらの F<sub>2</sub> または F<sub>3</sub> 世代集団を用いて、このような有用遺伝子を解析するための基礎となる分子マーカーを用いた連鎖地図が報告されている (Kaga et al. 1996a, 2000)。しかし、これらの地図には、アズキの基本染色体数よりも多い連鎖群が存在していて、マーカーも密ではないなど、まだ不完全な面も残されている。

本研究では、QTL 解析を行うため基礎として、タケアズキとアズキおよびアズキとヒメツルアズキとの種間交雑に由来する 2 つの組換え近交系集団を用いて、RAPD マーカーによるより高密度で精密な連鎖地図を作成した。また、両集団に共通であるアズキのバンドの分布の様相に基づいて、両集団の連鎖地図を比較するとともに、本研究の組換え近交系世代における地図と Kaga et al. (1996a, 2000) が報告した分離世代 (F<sub>2</sub> または F<sub>3</sub>) におけるそれらとの間でも比較を行った。

## 材料および方法

### 供試材料

連鎖地図を作成する集団として、タケアズキ (品種: Kagoshima) とアズキ (品種: エリモショウズ) との種間交雑に由来し、70 系統からなる F<sub>7</sub> 世代集団 (以下、UA 集団と略する) およびアズキ (品種: エリモショウズ) とヒメツルアズキの交雑に由来し、53 系統からなる F<sub>6</sub> 世代集団 (以下、AN 集団と略する) を用いた。これらの集団は、Kaga et al. (1996a, 2000) により作出された分離世代集団を、各世代において任意に選んだ 1 個体の種子を播種して次代を育成し、維持してきたものである。

両集団とも催芽処理をした種子を 1999 年 7 月 14 日に播種し、健全な幼植物を 7 月 27 日に神戸大学農学部附属農場の圃場に定植した。両集団とも、各系統 5 個体、1 反復の試験区を設け、慣行法により植物体を栽培した。

## DNA の抽出および PCR 分析

DNA の抽出および PCR 分析は、いずれも第 4 章において記した方法で行った。なお、PCR プライマーには、両集団とも共通の 125 種類の 10 塩基プライマー (Operon Technologies, USA) を用いた (Table 1)。これらは Kaga et al. (1996a, 2000) が用いたもの (46 プライマー) および在来品種の解析 (第 4 章) に用いたもの (48 プライマー) に加え、3 系統間のスクリーニングにより、タケアズキとアズキおよびアズキとヒメツルアズキの両方で明瞭な多型が検出されたもの (31 プライマー) である。

## RAPD マーカーの連鎖解析

両集団とも、各 RAPD マーカーについて、両親のどちらのバンドパターンを示すかを調査した。その分離の様相をもとに、各マーカーの分離が期待値の 1 : 1 の比から外れているか否かをカイ二乗検定により分析した。

RAPD マーカーの連鎖解析には、連鎖解析ソフト Mapmaker ver. 2.0 (Lander et al. 1987) を用いた。各 RAPD マーカーの連鎖群への振り分けは、Two point 分析の “Group” コマンドにより、LOD スコア 5.0 以上の条件で行った。また、各連鎖群におけるマーカー順序の決定は、Multipoint 分析の “First Order” コマンドにより、LOD スコア 3.0 の条件で行った。地図距離 (cM) は Kosambi の地図関数 (Kosambi 1944) により算出した。

## 結果

### マーカーの分離

UA および AN 集団における RAPD パターンの一例を、それぞれ Fig. 1 および Fig. 2 に示した。これらの泳動像においては、矢印は両親間で多型が認められ、かつ組換え近交系集団においてそれが分離したバンドの位置を示す。UA 集団では、このような多型バンドが各プライマーで 1~8 本、全部で 451 本 (プライマーあたり 3.61 本) 検出された (Table 2)。一方、AN 集団では、各プライマーで 1~9 本、全部で 432 本 (プライマーあたり 3.46 本) の RAPD マー

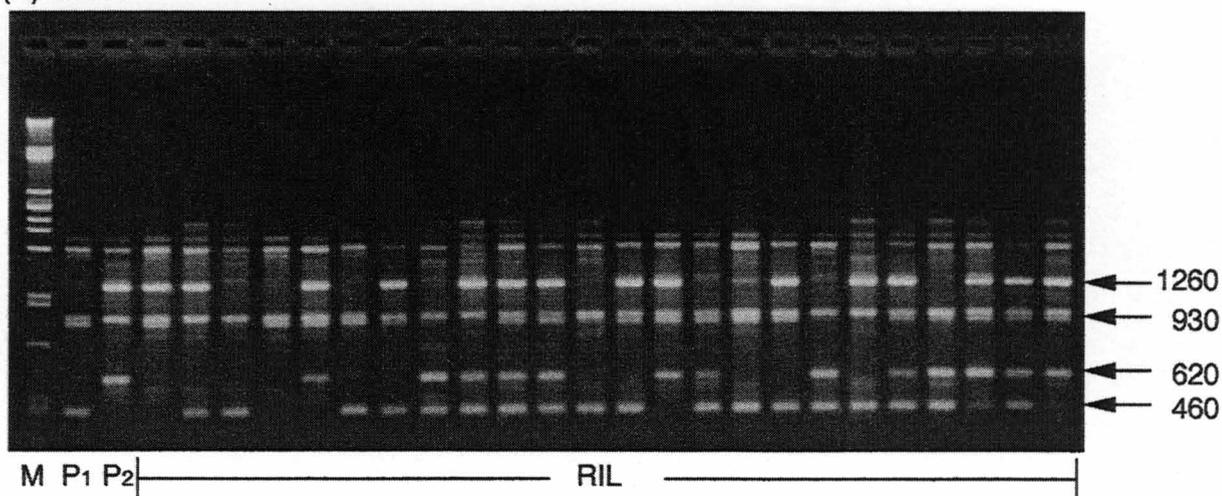
Table 1. Nucleotide sequences of the primers used in this study

Primer	sequence 5' - 3'	Primer	sequence 5' - 3'
OPA01	AGAGCCTTGG	OPE09	CTTCACCCGA
OPA07	GAAACGGGTG	OPE15	ACGCACAACC
OPA08	GTGACGTAGG	OPE17	CTACTGCCGT
OPA17	GACCGCTTGT	OPF03	CCTGATCACC
OPA18	AGGTGACCGT	OPF05	CCGAATTCCC
OPB01	GTTTCGCTCC	OPF07	CCGATATCCC
OPB07	GGTGACGCAG	OPF09	CCAAGCTTCC
OPB08	GTCCACACGG	OPF13	GGCTGCAGAA
OPC01	TTCGAGCCAG	OPG05	CTGAGACGGA
OPC02	GTGAGGCGTC	OPG06	GTGCCTAACC
OPC04	CCGCATCTAC	OPG10	AGGGCCGTCT
OPC05	GATGACCGCC	OPG11	TGCCCGTCGT
OPC06	GAACGGACTC	OPG12	CAGCTCACGA
OPC07	GTCCCGACGA	OPG13	CTCTCCGCCA
OPC08	TGGACCGGTG	OPG14	GGATGAGACC
OPC09	CTCACCGTCC	OPG18	GGCTCATGTG
OPC10	TGTCTGGGTG	OPH04	GGAAGTCGCC
OPC13	AAGCCTCGTC	OPH05	AGTCGTCCCC
OPC15	GACGGATCAG	OPH07	CTGCATCGTG
OPC19	GTTGCCAGCC	OPH17	CACTCTCCTC
OPD01	ACCGCGAAGG	OPI03	CAGAAGCCCA
OPD02	GGACCCAACC	OPI07	CAGCGACAAG
OPD03	GTCGCCGTCA	OPI10	ACAACGCGAG
OPD05	TGAGCGGACA	OPI12	AGAGGGCACA
OPD08	GTGTGCCCCA	OPI18	TGCCCAGCCT
OPD09	CTCTGGAGAC	OPI20	AAAGTGCGGG
OPD10	GGTCTACACC	OPJ13	CCACACTACC
OPD11	AGCGCCATTG	OPP03	CTGATACGCC
OPD13	GGGGTGACGA	OPP05	CCCCGGTAAC
OPD15	CATCCGTGCT	OPP14	CCAGCCGAAC
OPD16	AGGGCGTAAG	OPP16	CCAAGCTGCC
OPD18	GAGAGCCAAC	OPQ07	CCCCGATGGT
OPD20	ACCCGGTCAC	OPQ10	TGTGCCCGAA
OPE01	CCCAAGGTCC	OPQ14	GGACGCTTCA
OPE02	GGTGCGGGAA	OPQ19	CCCCCTATCA
OPE03	CCAGATGCAC	OPR13	GGACGACAAG
OPE04	GTGACATGCC	OPR14	CAGGATTCCC
OPE06	AAGACCCCTC	OPS07	TCCGATGCTG

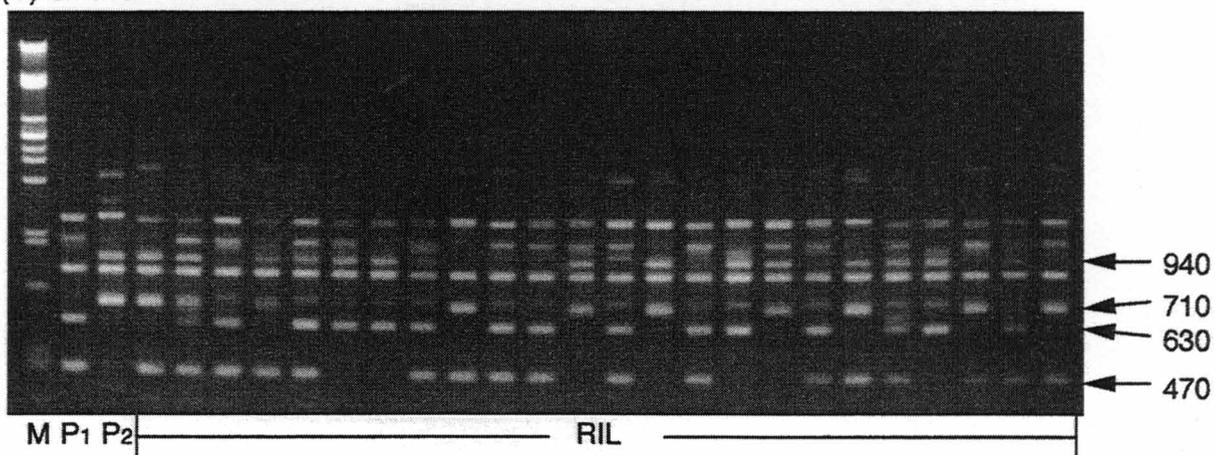
Table 1. Continued

Primer	sequence 5' - 3'	Primer	sequence 5' - 3'
OPS08	TTCAGGGTGG	OPAD14	GAACGAGGGT
OPS10	ACCGTTCCAG	OPAD16	AACGGGCGTC
OPS19	GAGTCAGCAG	OPAE12	CCGAGCAATC
OPT01	GGCCACTCA	OPAE14	GAGAGGCTCC
OPT03	TCCACTCCTG	OPAE15	TGCCTGGACC
OPV01	TGACGCATGG	OPAF10	GGTTGGAGAC
OPV07	GAAGCCAGCC	OPAF17	TGAACCGAGG
OPW07	CTGGACGTCA	OPAG07	CACAGACCTG
OPW10	TCGCATCCCT	OPAG14	CTCTCGGCGA
OPW16	CAGCCTACCA	OPAG17	AGCGGAAGTG
OPW17	GTCCTGGGTT	OPAG19	AGCCTCGGTT
OPX06	ACGCCAGAGG	OPAH06	GTAAGCCCCT
OPX07	GAGCGAGGCT	OPAH09	AGAACCGAGG
OPX12	TCGCCAGCCA	OPAH15	CTACAGCGAG
OPX15	CAGACAAGCC	OPAI10	TCGGGGCATC
OPY01	GTGGCATCTC	OPAI20	CCTGTTCCCT
OPY07	AGAGCCGTCA	OPAJ12	CAGTTCCCCT
OPY17	GACGTGGTGA	OPAJ13	CAGCCGTTCC
OPAA14	AACGGGCCAA	OPAJ18	GGCTAGGTGG
OPAA15	ACGGAAGCCC	OPAL04	ACAACGGTCC
OPAB04	GGCACGCGTT	OPAN10	CTGTGTGCTC
OPAB11	GTGCGCAATG	OPAP06	GTCACGTCTC
OPAB14	AAGTGCGACC	OPAR15	ACACTCTGCC
OPAB19	ACACCGATGG	OPAR19	CTGATCGCGC
OPAD04	GTAGGCCTCA		

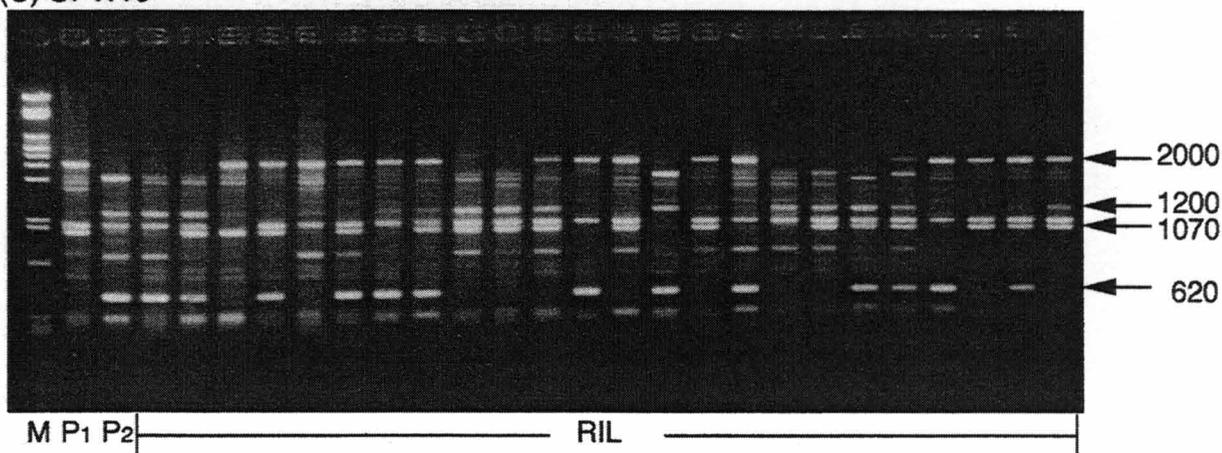
(A) OPI18



(B) OPJ13

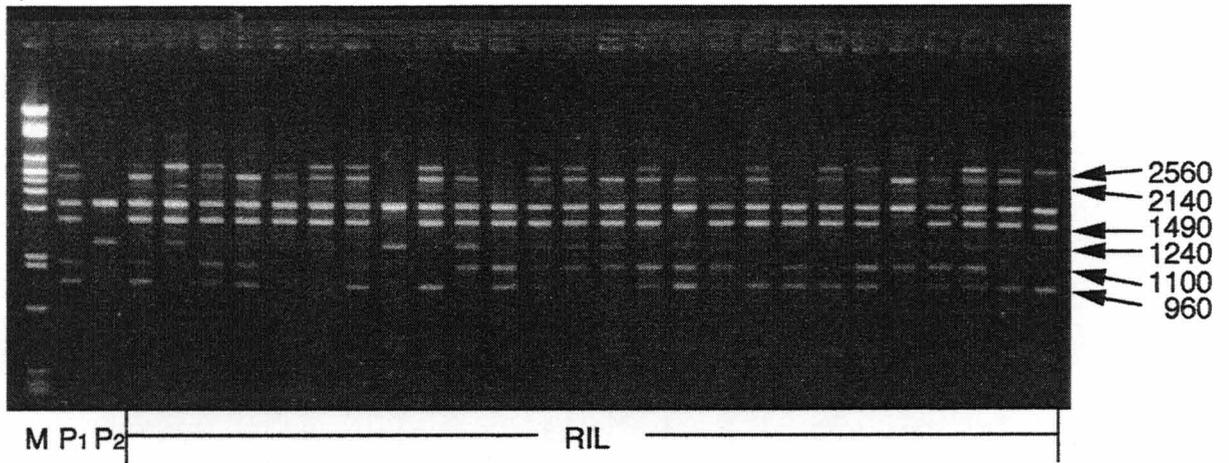


(C) OPW16

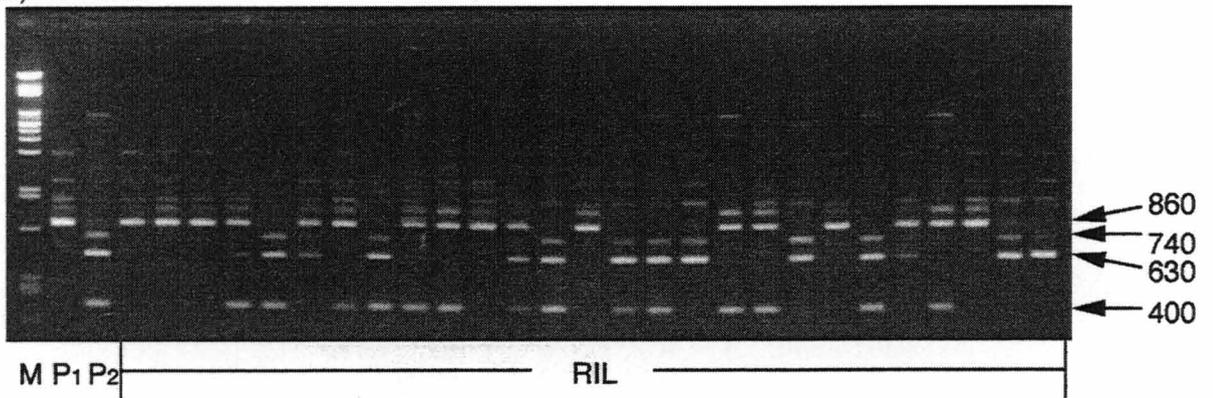


**Fig. 1. RAPD banding patterns of recombinant inbred line (F7) population derived from rice bean x azuki bean using three primers OPI18 (A), OPJ13 (B) and OPW16 (C). M: Molecular weight marker (lambda DNA digested with *Pst* I), P1: rice bean, P2: azuki bean, RIL: recombinant inbred line.**

(A) OPS08



(B) OPAH15



(C) OPAJ18

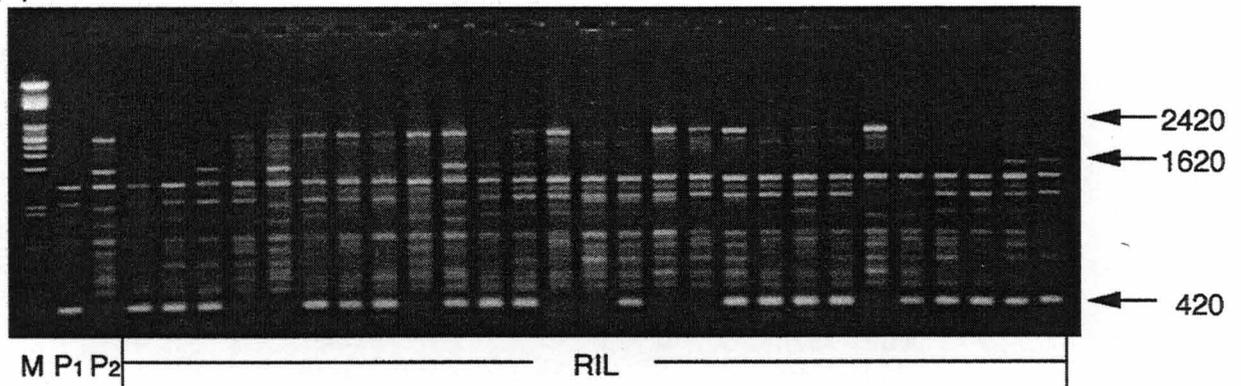


Fig. 2. RAPD banding patterns of recombinant inbred line ( $F_6$ ) population derived from azuki bean x *Vigna nakashimae* using three primers OPS08 (A), OPAH15 (B) and OPAJ18 (C). M: Molecular weight marker ( $\lambda$  DNA digested with *Pst*I), P1: azuki bean, P2: *V. nakashimae*, RIL: recombinant inbred line.

Table 2. Segregation of 451 RAPD markers in UA F<sub>7</sub> population

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	U type	A type		Group
OPA01-1990	A	44	26	4.629 *	-
OPA01-1370	U	47	23	8.229 **	1
OPA01-870	A	54	16	20.629 **	4
OPA01-730	U	49	21	11.200 **	10
OPA07-1700	A	52	18	16.514 **	6
OPA07-1390	A	42	28	2.800	-
OPA07-1030	U	39	31	0.914	9
OPA07-450	U	51	19	14.629 **	10
OPA08-2020	A	33	37	0.229	3
OPA08-1860	U	44	26	4.629 *	5
OPA17-1950	A	29	41	2.057	1
OPA17-1860	A	38	32	0.514	10
OPA17-1380	U	63	7	44.800 **	5
OPA17-1190	U	44	26	4.629 *	7
OPA18-1150	U	33	37	0.229	6
OPA18-1030	A	31	39	0.914	8
OPA18-940	U	54	16	20.629 **	9
OPA18-900	A	53	17	18.514 **	9
OPA18-680	U	51	19	14.629 **	11
OPA18-610	A	35	35	0.000	8
OPA18-550	U	47	23	8.229 **	7
OPA18-370	A	40	30	1.429	3
OPB01-2640	A	26	44	4.629 *	1
OPB01-850	U	29	41	2.057	-
OPB01-730	A	31	39	0.914	6
OPB01-510	A	28	42	2.800	6
OPB07-2270	U	40	30	1.429	3
OPB07-1090	A	51	19	14.629 **	2
OPB07-900	U	57	13	13.000 **	4
OPB07-760	A	35	35	0.000	9
OPB07-530	U	46	24	6.914 **	-
OPB07-500	A	58	12	30.229 **	2
OPB08-2420	U	62	8	41.657 **	2
OPB08-1800	A	21	49	11.200 **	1
OPB08-1720	U	37	33	0.229	3
OPB08-1070	A	34	36	0.057	-
OPB08-960	U	50	20	12.857 **	-
OPC01-1970	U	41	29	2.057	6
OPC01-1160	A	38	32	0.514	-
OPC01-680	A	34	36	0.057	10
OPC01-450	U	37	33	0.229	9
OPC02-2140	A	56	14	25.200 **	7
OPC02-1780	U	36	34	0.057	5
OPC02-1570	U	54	16	20.629 **	6
OPC02-1440	A	53	17	18.514 **	6
OPC02-950	U	55	15	22.857 **	7
OPC02-390	A	49	21	11.200 **	-
OPC02-300	A	42	28	2.800	5
OPC04-1340	A	36	34	0.057	-

Table 2. Continued

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	U type	A type		Group
OPC04-910	U	41	29	2.057	-
OPC04-560	U	57	13	27.657 **	-
OPC05-1470	A	37	33	0.229	11
OPC05-1050	A	28	42	2.800	1
OPC05-750	U	57	13	27.657 **	4
OPC05-640	A	37	33	0.229	-
OPC06-1550	U	54	16	20.629 **	11
OPC06-1190	A	45	25	5.714 *	-
OPC06-810	U	55	15	22.857 **	-
OPC06-590	U	50	20	12.857 **	2
OPC06-390	A	55	15	22.857 **	2
OPC07-1060	U	50	20	12.857 **	-
OPC07-570	U	58	12	30.229 **	5
OPC08-1020	A	31	39	0.914	1
OPC09-3880	A	14	56	25.200 **	-
OPC09-3690	A	38	32	0.514	9
OPC09-2000	U	53	17	18.514 **	4
OPC09-1740	A	45	25	5.714 *	7
OPC09-630	U	44	26	4.629 *	-
OPC10-1570	U	48	22	9.657 **	10
OPC10-1390	U	44	26	4.629 *	6
OPC10-1250	U	31	39	0.914	-
OPC10-730	A	25	45	5.714 **	1
OPC13-1450	A	13	57	27.657 **	-
OPC13-1270	U	59	11	32.914 **	2
OPC13-1160	A	34	36	0.057	-
OPC13-980	U	41	29	2.057	1
OPC13-660	A	55	15	22.857 **	2
OPC15-2670	A	52	18	16.514 **	2
OPC15-1140	U	56	14	25.200 **	-
OPC15-1010	U	44	26	4.629 **	-
OPC15-960	A	57	13	27.657 **	2
OPC15-770	A	36	34	0.057	7
OPC19-1500	U	30	40	1.429	-
OPC19-1070	A	33	37	0.229	3
OPD01-2140	A	36	34	0.057	9
OPD01-1830	U	49	21	11.200 **	9
OPD01-1570	U	33	37	0.229	6
OPD01-550	A	8	62	41.657 **	-
OPD02-460	U	51	19	14.629 **	5
OPD03-1920	A	41	29	2.057	7
OPD03-1200	A	42	28	2.800	-
OPD03-1050	A	40	30	1.429	3
OPD03-530	A	35	35	0.000	11
OPD03-280	U	44	26	4.629 **	-
OPD05-1510	A	20	50	12.857 **	-
OPD05-1090	A	30	40	1.429	-
OPD05-710	U	42	28	2.800	-
OPD08-1220	A	30	40	1.429	5

Table 2. Continued

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	U type	A type		Group
OPD08-1070	A	47	23	8.229 **	11
OPD08-850	A	32	38	0.514	5
OPD09-1350	A	46	24	6.914 **	4
OPD09-1280	U	45	25	5.714 *	-
OPD09-1020	U	54	16	20.629 **	10
OPD10-1160	A	34	36	0.057	-
OPD10-960	A	44	26	4.629 **	7
OPD10-330	A	26	44	4.629 *	-
OPD11-2140	U	47	23	8.229 **	-
OPD11-1160	U	52	18	16.514 **	-
OPD11-1020	A	36	34	0.057	8
OPD11-460	A	27	43	3.657	-
OPD13-1130	U	30	40	1.429	3
OPD13-810	A	36	34	0.057	3
OPD13-590	A	48	22	9.657 **	2
OPD13-410	A	37	33	0.229	3
OPD15-1750	A	40	30	1.429	-
OPD15-1430	A	35	35	0.000	10
OPD15-820	A	24	46	6.914 **	-
OPD15-690	U	32	38	0.514	-
OPD15-620	U	64	6	48.057 **	2
OPD16-1650	U	38	32	0.514	5
OPD16-1340	U	42	28	2.800	8
OPD16-1030	U	40	30	1.429	1
OPD16-980	A	42	28	2.800	1
OPD16-730	U	37	33	0.229	1
OPD16-510	A	29	41	2.057	-
OPD16-260	A	40	30	1.429	5
OPD18-1840	A	60	10	35.714 **	2
OPD18-1580	U	49	21	11.200 **	4
OPD18-1120	A	44	26	4.629 *	3
OPD18-770	A	51	19	14.629 **	5
OPD18-690	A	49	21	11.200 **	6
OPD18-660	U	50	20	12.857 **	7
OPD18-360	U	39	31	0.914	5
OPD20-2500	U	39	31	0.914	-
OPD20-1610	A	33	37	0.229	10
OPD20-1540	U	31	39	0.914	-
OPD20-1320	U	65	5	51.429 **	2
OPD20-1070	A	32	38	0.514	-
OPD20-1000	A	31	39	0.914	10
OPD20-760	U	37	33	0.229	3
OPD20-250	U	36	34	0.057	3
OPE01-2040	U	52	18	16.514 **	7
OPE01-1660	A	47	23	8.229 **	4
OPE01-1140	A	22	48	9.657 **	1
OPE01-980	A	51	19	14.629 **	4
OPE02-1590	A	38	32	0.514	10
OPE02-1380	A	34	36	0.057	-

Table 2. Continued

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	U type	A type		Group
OPE02-1050	A	40	30	1.429	6
OPE02-930	U	54	16	20.629 **	5
OPE02-820	A	57	13	27.657 **	2
OPE02-610	A	40	30	1.429	-
OPE02-550	U	58	12	30.229 **	4
OPE02-430	U	52	18	16.514 **	7
OPE03-950	A	44	26	4.629 *	-
OPE03-650	U	53	17	18.514 **	4
OPE03-440	A	34	36	0.057	6
OPE04-1470	A	42	28	2.800	-
OPE04-1140	U	46	24	6.914 **	-
OPE04-1020	A	50	20	12.857 **	6
OPE04-970	A	48	22	9.657 **	9
OPE04-750	A	38	32	0.514	-
OPE04-690	U	56	14	25.200 **	4
OPE06-1610	A	49	21	11.200 **	2
OPE06-1430	U	48	22	9.657 **	5
OPE06-1320	A	50	20	12.857 **	11
OPE06-1130	U	36	34	0.057	-
OPE06-1000	A	39	31	0.914	-
OPE09-1360	A	44	26	4.629 *	-
OPE15-1820	A	31	39	0.914	-
OPE17-1830	A	31	39	0.914	9
OPE17-1610	A	32	38	0.514	5
OPE17-370	U	43	27	3.657	3
OPF03-2140	A	29	41	2.057	5
OPF03-870	A	62	8	41.657 **	2
OPF03-700	A	53	17	18.514 **	-
OPF05-1630	U	36	34	0.057	-
OPF07-1510	U	35	35	0.000	-
OPF07-1440	A	38	32	0.514	-
OPF07-1240	U	48	22	9.657 **	-
OPF07-1080	A	36	34	0.057	-
OPF09-1870	A	28	42	2.800	-
OPF09-1430	U	40	30	1.429	-
OPF09-1050	A	42	28	2.800	5
OPF09-840	U	61	9	38.629 **	4
OPF09-820	A	54	16	20.629 **	4
OPF13-1450	A	32	38	0.514	8
OPF13-1190	A	27	43	3.657	1
OPG05-1620	U	40	30	1.429	1
OPG05-850	A	24	46	6.914 **	-
OPG05-740	U	37	33	0.229	-
OPG06-1420	A	29	41	2.057	5
OPG06-730	U	41	29	2.057	3
OPG06-610	U	63	7	44.800 **	2
OPG10-2400	U	42	28	2.800	8
OPG10-1030	A	32	38	0.514	10
OPG11-1030	A	29	41	2.057	5

Table 2. Continued

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	U type	A type		Group
OPG12-1090	A	43	27	3.657	1
OPG12-630	U	39	31	0.914	11
OPG12-510	U	29	41	2.057	1
OPG12-280	U	43	27	3.657	6
OPG13-2580	U	32	38	0.514	-
OPG13-690	U	56	14	25.200 **	7
OPG14-1640	U	34	36	0.057	1
OPG14-710	A	52	18	16.514 **	-
OPG18-1570	U	40	30	1.429	1
OPG18-740	U	41	29	2.057	1
OPG18-710	A	34	36	0.057	1
OPG18-540	U	54	16	20.629 **	4
OPG18-360	A	61	9	38.629 **	2
OPH04-1590	U	52	18	16.514 **	4
OPH04-1560	A	40	30	1.429	-
OPH04-1160	A	55	15	22.857 **	2
OPH04-750	U	62	8	41.657 **	2
OPH04-600	A	27	43	3.657	-
OPH05-800	A	22	48	9.657 **	-
OPH07-2400	U	48	22	9.657 **	9
OPH07-1660	A	55	15	22.857 **	-
OPH07-1180	U	58	12	30.229 **	-
OPH07-920	U	28	42	2.800	-
OPH07-290	A	25	45	5.714 *	1
OPH17-2460	U	42	28	2.800	3
OPH17-1930	U	44	26	4.629 *	6
OPH17-1760	A	25	45	5.714 *	-
OPH17-680	A	48	22	9.657 **	-
OPI03-2100	U	37	33	0.229	8
OPI03-1300	A	34	36	0.057	3
OPI03-1100	U	41	29	2.057	-
OPI03-990	A	46	24	6.914 **	-
OPI03-280	A	39	31	0.914	8
OPI07-1700	U	48	22	9.657 **	8
OPI07-1580	U	56	14	25.200 **	-
OPI07-530	A	51	19	14.629 **	2
OPI10-1560	A	41	29	2.057	-
OPI10-900	U	59	11	32.914 **	9
OPI10-400	A	30	40	1.429	8
OPI12-910	A	29	41	2.057	1
OPI12-830	U	44	26	4.629 *	1
OPI12-690	U	53	17	18.514 **	8
OPI12-590	A	39	31	0.914	3
OPI18-1260	A	25	45	5.714 *	1
OPI18-930	U	33	37	0.229	1
OPI18-620	A	46	24	6.914 **	7
OPI18-460	U	57	13	27.657 **	-
OPI20-1110	U	61	9	38.629 **	4
OPI20-1000	U	48	22	9.657 **	6

Table 2. Continued

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	U type	A type		Group
OPI20-600	U	56	14	25.200 **	4
OPI20-570	U	52	18	16.514 **	5
OPI20-280	U	35	35	0.000	3
OPJ13-940	A	38	32	0.514	8
OPJ13-710	A	53	17	18.514 **	-
OPJ13-630	U	51	19	14.629 **	-
OPJ13-470	U	29	41	2.057	3
OPP03-2520	A	41	29	2.057	-
OPP05-2940	U	51	19	14.629 **	10
OPP14-2440	A	46	24	6.914 **	7
OPP14-1260	A	24	46	6.914 **	-
OPP14-610	U	44	26	4.629 *	1
OPP14-520	A	41	29	2.057	5
OPP14-400	U	32	38	0.514	9
OPP16-2040	U	45	25	5.714 *	9
OPP16-1680	U	43	27	3.657	11
OPP16-1240	A	19	51	14.629 **	-
OPP16-1160	U	51	19	14.629 **	-
OPQ07-750	U	31	39	0.914	-
OPQ10-1960	U	57	13	27.657 **	-
OPQ10-920	U	47	23	8.229 **	-
OPQ14-1540	U	50	20	12.857 **	-
OPQ14-1160	U	50	20	12.857 **	1
OPQ14-830	A	36	34	0.057	-
OPQ19-3800	U	38	32	0.514	-
OPQ19-2760	A	36	34	0.057	4
OPQ19-2480	U	37	33	0.229	-
OPQ19-2170	A	23	47	8.229 **	-
OPQ19-990	A	26	44	4.629 *	-
OPQ19-830	A	25	45	5.714 *	6
OPR13-1650	A	33	37	0.229	5
OPR13-1590	U	45	25	5.714 *	-
OPR13-1220	U	42	28	2.800	8
OPR13-900	A	32	38	0.514	3
OPR13-820	A	32	38	0.514	9
OPR13-730	U	58	12	30.229 **	4
OPR14-1330	U	41	29	2.057	-
OPR14-1160	U	50	20	12.857 **	6
OPR14-650	U	57	13	27.657 **	4
OPS07-1770	A	33	37	0.229	1
OPS07-1400	U	42	28	2.800	1
OPS07-440	A	39	31	0.914	-
OPS08-2140	A	25	45	5.714 *	-
OPS08-1490	A	30	40	1.429	1
OPS08-1100	A	41	29	2.057	11
OPS10-1460	A	30	40	1.429	1
OPS10-790	A	32	38	0.514	10
OPS10-620	U	69	1	66.057 **	2
OPS19-2230	U	50	20	12.857 **	5

Table 2. Continued

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	U type	A type		Group
OPS19-540	U	53	17	18.514 **	5
OPS19-470	A	21	49	11.200 **	-
OPS19-420	A	42	28	2.800	7
OPS19-370	U	36	34	0.057	7
OPT01-1570	A	32	38	0.514	1
OPT01-1400	U	53	17	18.514 **	-
OPT01-940	U	48	22	9.657 **	9
OPT01-770	U	58	12	30.229 **	7
OPT03-1910	U	60	10	35.714 **	7
OPT03-1320	U	62	8	41.657 **	2
OPT03-860	A	28	42	2.800	8
OPV01-2120	A	37	33	0.229	8
OPV01-2000	A	36	34	0.057	-
OPV01-1420	U	44	26	4.629 *	3
OPV01-300	U	54	16	20.629 **	4
OPV07-1750	A	50	20	12.857 **	7
OPV07-1030	A	44	26	4.629 *	3
OPW07-630	A	55	15	22.857 **	5
OPW07-530	U	59	11	32.914 **	7
OPW07-490	A	29	41	2.057	1
OPW10-1980	U	37	33	0.229	8
OPW10-1380	A	57	13	27.657 **	-
OPW10-1020	A	42	28	2.800	11
OPW10-870	U	31	39	0.914	8
OPW10-820	U	38	12	15.371 **	11
OPW16-2000	U	46	24	6.914 **	1
OPW16-1200	A	32	38	0.514	1
OPW16-1070	U	49	21	11.200 **	8
OPW16-620	A	45	25	5.714 *	6
OPW17-1960	U	44	26	4.629	-
OPW17-440	A	23	47	8.229 **	-
OPX06-1750	A	35	35	0.000	-
OPX06-1220	U	40	30	1.429	-
OPX06-960	A	30	40	1.429	5
OPX06-690	A	39	31	0.914	-
OPX07-1860	U	45	25	5.714 *	6
OPX07-1590	A	56	14	25.200 **	2
OPX07-760	A	31	39	0.914	3
OPX12-1560	A	36	34	0.057	3
OPX12-610	A	46	24	6.914 **	4
OPX15-760	A	29	41	2.057	8
OPX15-630	U	41	29	2.057	3
OPX15-590	A	34	36	0.057	5
OPY01-1970	A	39	31	0.914	9
OPY01-1110	A	45	25	5.714 *	4
OPY01-940	A	25	45	5.714 *	-
OPY07-2180	A	43	27	3.657	-
OPY07-880	A	24	46	6.914 **	-
OPY07-790	U	46	24	6.914 **	-

Table 2. Continued

Marker	Marker origin	No. of lines		$\chi^2$	Linkage Group
		U type	A type		
OPY17-2520	A	35	35	0.000	8
OPY17-1950	U	42	28	2.800	8
OPY17-1630	A	32	38	0.514	8
OPY17-480	A	36	34	0.057	9
OPAA14-1430	U	61	9	38.629 **	2
OPAA14-1010	U	64	6	48.057 **	2
OPAA14-980	A	34	36	0.057	6
OPAA14-940	U	59	11	32.914 **	4
OPAA14-910	A	40	30	1.429	8
OPAA15-1330	U	54	16	20.629 **	2
OPAA15-1110	A	27	43	3.657	-
OPAA15-1030	U	49	21	11.200 **	8
OPAA15-890	U	41	29	2.057	3
OPAB04-1650	U	45	25	5.714 *	-
OPAB04-1550	A	19	51	14.629 **	-
OPAB04-1090	A	32	38	0.514	10
OPAB04-850	U	36	34	0.057	3
OPAB11-2750	U	55	15	22.857 **	7
OPAB11-720	A	32	38	0.514	5
OPAB11-440	U	59	11	32.914 **	4
OPAB14-2180	A	37	33	0.229	8
OPAB14-1160	A	46	24	6.914 **	-
OPAB14-1120	U	50	20	12.857 **	9
OPAB14-520	A	34	36	0.057	-
OPAB14-400	A	34	36	0.057	9
OPAB19-2150	U	38	32	0.514	1
OPAB19-1740	A	46	24	6.914 **	-
OPAD04-1020	A	33	37	0.229	-
OPAD04-900	A	41	29	2.057	8
OPAD04-780	U	44	26	4.629 *	6
OPAD04-430	A	41	29	2.057	-
OPAD14-1730	U	36	34	0.057	-
OPAD14-1280	A	41	29	2.057	9
OPAD14-870	U	48	22	9.657 **	8
OPAD16-2070	U	47	23	8.229 **	5
OPAD16-1490	A	21	49	11.200 **	6
OPAD16-740	U	50	20	12.857 **	8
OPAD16-650	A	47	23	8.229 **	10
OPAE12-1750	U	55	15	22.857 **	9
OPAE12-1630	A	44	26	4.629 *	4
OPAE12-1270	A	47	23	8.229 **	7
OPAE12-1020	U	60	10	35.714 **	7
OPAE12-870	U	53	17	18.514 **	-
OPAE14-850	U	62	8	41.657 **	4
OPAE14-750	U	47	23	8.229 **	-
OPAE14-410	A	42	28	2.800	7
OPAE15-2700	U	35	35	0.000	-
OPAE15-1090	U	58	12	30.229 **	4
OPAE15-1040	A	39	31	0.914	9

Table 2. Continued

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	U type	A type		Group
OPAE15-750	A	37	33	0.229	3
OPAF10-1340	A	34	36	0.057	9
OPAF10-1140	U	60	10	35.714 **	4
OPAF10-1000	A	50	20	12.857 **	4
OPAF10-760	A	32	38	0.514	10
OPAF17-1550	U	58	12	30.229 **	4
OPAF17-1130	U	64	6	48.057 **	2
OPAF17-900	A	30	40	1.429	10
OPAF17-570	U	33	37	0.229	-
OPAG07-2280	A	32	38	0.514	8
OPAG07-1450	A	39	31	0.914	-
OPAG07-730	U	44	26	4.629 *	-
OPAG14-1310	A	34	36	0.057	1
OPAG14-730	A	27	43	3.657	-
OPAG14-610	U	25	45	5.714 *	-
OPAG17-2840	A	36	34	0.057	-
OPAG17-1240	U	30	40	1.429	-
OPAG19-2580	A	43	27	3.657	4
OPAG19-1120	U	45	25	5.714 *	9
OPAG19-620	U	45	25	5.714 *	3
OPAG19-310	A	32	38	0.514	6
OPAH06-1300	U	42	28	2.800	3
OPAH06-600	A	31	39	0.914	3
OPAH09-1050	U	44	26	4.629 *	3
OPAH09-900	A	33	37	0.229	10
OPAH09-770	A	34	36	0.057	10
OPAH09-670	A	43	27	3.657	2
OPAH15-1460	U	30	40	1.429	10
OPAH15-1050	A	32	38	0.514	10
OPAI10-1110	A	45	25	5.714 *	-
OPAI10-920	U	45	25	5.714 *	6
OPAI10-570	A	28	42	2.800	-
OPAI10-530	U	58	12	30.229 **	5
OPAI20-1220	U	60	10	35.714 **	-
OPAI20-1160	A	37	33	0.229	-
OPAI20-1060	U	40	30	1.429	6
OPAJ12-2520	A	49	21	11.200 **	3
OPAJ12-1870	U	54	16	20.629 **	-
OPAJ12-1230	U	59	11	32.914 **	7
OPAJ12-950	U	45	25	5.714 *	3
OPAJ12-840	A	20	50	12.857 **	-
OPAJ13-1760	U	59	11	32.914 **	4
OPAJ13-900	U	44	26	4.629 *	8
OPAJ18-1650	U	44	26	4.629 *	-
OPAJ18-420	A	40	30	1.429	4
OPAL04-1800	U	43	27	3.657	1
OPAL04-1210	A	35	35	0.000	9
OPAN10-1170	A	47	23	8.229 **	4
OPAN10-1030	A	34	36	0.057	1

Table 2. Continued

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	U type	A type		Group
OPAN10-560	U	62	8	41.657 **	4
OPAP06-960	U	46	24	6.914 **	3
OPAP06-800	U	45	25	5.714 *	8
OPAP06-740	A	43	27	3.657	4
OPAR15-1980	A	38	32	0.514	9
OPAR15-1000	A	33	37	0.229	7
OPAR19-1880	A	36	34	0.057	3
OPAR19-1510	A	31	39	0.914	-
OPAR19-1160	U	53	17	18.514 **	10
OPAR19-720	U	46	24	6.914 **	-

U and A indicate *V. umbellata* and *V. angularis*, respectively.

\* and \*\* indicate significance at 5% and 1% level, respectively.

カーが検出された (Table 3)。なお、各 RAPD マーカーは、オペロン社のプライマー名の後に、各マーカーの推定分子量をつけて表した。

両集団について、これらのバンドが組換え近交系集団において、期待される 1:1 の割合で分離しているか否かをカイ二乗検定により分析した (Table 2 および 3)。その結果、UA 集団では 228 本 (50.6 %) の、AN 集団では 259 本 (60.0 %) のバンドにおいて、その分離比に歪みが認められた。これらの内訳についてみると、UA 集団では、200 本のバンドでタケアズキ型のパターンを示す割合が高くなっていった。また、AN 集団では、243 本でアズキ型のパターンを示す割合が高くなっており、両集団とも、母親型のパターンを示す割合が高いバンドが圧倒的に多く検出された。

### 連鎖解析

両集団とも、多くの分離に歪みを生じたマーカーが検出されたが、Mapmaker を用いて連鎖解析を行った。その結果、LOD スコア 5.0 以上の条件において、両集団とも、アズキの基本染色体数と一致する 11 の連鎖群からなる地図を作成することができた。UA および AN 集団における連鎖地図を、それぞれ Fig. 3 および Fig. 4 に、また、その概要を Table 4 および Table 5 に示した。なお、両集団の地図とも、各連鎖群にその長さが長いものから順に 1 から 11 の番号をつけてそれらを識別した。

UA 集団では、11 連鎖群に全部で 314 個 (69.6%) の RAPD マーカーが座乗する全長 1702.0 cM、各マーカー間の平均距離 5.62 cM の地図を作成することができた。各連鎖群に座乗するマーカー数は 11 個 (第 11 連鎖群) ~39 個 (第 1 連鎖群) であり、その長さは 97.4 cM (第 11 連鎖群) ~221.7 cm (第 1 連鎖群) であった (Table 4 および 5)。分離に歪みを生じたマーカーは全連鎖群に分布していたが、特に、第 2、第 4 および第 7 連鎖群では、その大部分が歪みを生じたマーカーで構成されており、それらすべてがタケアズキ型の出現頻度の高いものであった (Fig. 3)。なお、アズキ型のパターンを示す割合が有意に高かったバンドは、第 1 および第 6 連鎖群に座乗していた (Table 2)。

一方、AN 集団では、全部で 298 個 (69.0 %) の RAPD マーカーが座乗す

Table 3. Segregation of 432 RAPD markers in AN F<sub>8</sub> population

Marker	Marker origin	No. of lines		$\chi^2$	Linkage Group
		A type	N type		
OPA01-2820	A	38	15	9.981 **	-
OPA01-2340	A	47	6	31.717 **	3
OPA01-1860	N	32	21	2.283	8
OPA01-870	A	26	27	0.019	-
OPA01-570	N	37	16	8.321 **	-
OPA07-1730	N	18	35	5.453 *	1
OPA07-1700	A	44	9	23.113 **	9
OPA07-1230	N	40	13	13.755 **	7
OPA07-1030	N	43	10	20.547 **	6
OPA07-810	A	36	17	6.811 **	3
OPA07-670	A	46	7	28.698 **	7
OPA07-510	N	33	20	3.189	4
OPA07-460	N	12	41	15.868 **	-
OPA08-2020	A	51	2	45.302 **	7
OPA08-1450	N	22	31	1.528	5
OPA08-1150	A	41	12	15.868 **	6
OPA08-900	N	40	13	13.755 **	10
OPA08-620	A	39	14	11.792 **	1
OPA08-510	N	28	25	0.170	3
OPA17-1950	A	48	5	34.887 **	4
OPA17-1860	A	39	14	11.792 **	6
OPA17-1390	N	28	25	0.170	-
OPA17-720	N	22	31	1.528	-
OPA18-1770	N	29	24	0.472	1
OPA18-1250	A	40	13	13.755 **	6
OPA18-1030	A	43	10	20.547 **	8
OPB01-2640	A	37	16	8.321 **	4
OPB01-1990	N	42	11	18.132 **	4
OPB01-1550	N	39	14	11.792 **	7
OPB01-1030	N	30	23	0.925	1
OPB07-1090	A	38	15	9.981 **	1
OPB07-760	A	48	5	34.887 **	10
OPB07-730	N	29	24	0.472	-
OPB07-500	A	30	23	0.925	1
OPB07-430	A	48	5	34.887 **	1
OPB08-1800	A	42	11	18.132 **	4
OPB08-1760	N	24	29	0.472	5
OPB08-1290	N	6	47	31.717 **	-
OPC01-1160	A	40	13	13.755 **	9
OPC01-370	N	32	21	2.283	3
OPC02-2140	A	32	21	2.283	2
OPC02-1190	N	27	26	0.019	5
OPC02-860	A	34	19	4.245 *	1
OPC02-390	A	31	22	1.528	1
OPC02-350	N	50	3	41.679 **	3
OPC04-1550	N	19	34	4.245 *	-
OPC04-1340	A	43	10	20.547 **	6
OPC04-1210	N	29	24	0.472	9
OPC04-1170	A	32	21	2.283	-

Table 3. Continued.

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	A type	N type		Group
OPC04-830	N	27	26	0.019	5
OPC05-1610	N	42	11	18.132 **	7
OPC05-1160	N	24	29	0.472	3
OPC05-1050	A	42	11	18.132 **	4
OPC05-680	N	30	23	0.925	11
OPC05-640	A	39	14	11.792 **	-
OPC06-1650	N	40	13	13.755 **	7
OPC06-1190	A	45	8	25.830 **	7
OPC06-590	N	24	28	0.321	1
OPC06-530	N	34	19	4.245 *	8
OPC06-390	A	26	27	0.019	-
OPC07-1000	N	24	29	0.472	-
OPC08-2520	A	32	21	2.283	5
OPC08-1850	A	39	14	11.792 **	8
OPC08-1020	A	41	12	15.868 **	4
OPC08-870	N	23	30	0.925	5
OPC08-560	N	20	33	3.189	5
OPC08-520	A	45	8	25.830 **	-
OPC09-1940	N	21	32	2.283	-
OPC09-1740	A	32	21	2.283	2
OPC09-1530	N	28	25	0.170	11
OPC10-1230	N	41	12	15.868 **	10
OPC10-910	N	24	29	0.472	1
OPC10-730	A	38	15	9.981 **	4
OPC13-2840	N	38	15	9.981 **	-
OPC13-1030	N	41	12	15.868 **	10
OPC13-660	A	36	17	6.811 **	1
OPC15-2050	A	48	5	34.887 **	3
OPC15-1850	N	17	36	6.811 **	-
OPC15-960	A	29	24	0.472	1
OPC15-770	A	42	11	18.132 **	2
OPC19-1170	N	22	31	1.528	2
OPC19-960	N	42	11	18.132 **	-
OPC19-850	N	19	34	4.245 *	-
OPD01-2650	N	35	18	5.453 *	8
OPD01-1390	A	32	21	2.283	-
OPD01-940	N	23	30	0.925	-
OPD01-760	N	35	18	5.453 *	11
OPD01-550	A	50	3	41.679 **	10
OPD02-910	N	29	24	0.472	4
OPD02-740	N	40	13	13.755 **	4
OPD02-480	A	27	26	0.019	-
OPD02-410	N	25	28	0.170	1
OPD03-1920	A	41	12	15.868 **	2
OPD03-610	N	22	31	1.528	-
OPD05-1510	A	27	26	0.019	-
OPD05-970	N	28	25	0.170	-
OPD05-810	N	40	13	13.755 **	7
OPD08-1270	N	37	16	8.321 **	-

Table 3. Continued.

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	A type	N type		Group
OPD08-1220	A	44	9	23.113 **	3
OPD08-910	A	37	16	8.321 **	4
OPD08-850	A	38	15	9.981 **	3
OPD08-810	N	41	12	15.868 **	10
OPD08-770	N	35	18	5.453 *	6
OPD08-750	N	40	13	13.755 **	10
OPD08-580	A	51	2	45.302 **	3
OPD08-490	N	23	30	0.925	-
OPD09-2140	N	21	32	2.283	2
OPD09-1350	A	34	19	4.245 *	5
OPD09-1070	N	30	23	0.925	4
OPD09-830	N	27	26	0.019	1
OPD10-1590	N	39	14	11.792 **	7
OPD10-960	A	45	8	25.830 **	-
OPD10-670	N	33	20	3.189	8
OPD10-330	A	41	12	15.868 **	3
OPD11-1930	A	44	9	23.113 **	9
OPD11-1810	N	28	25	0.170	-
OPD11-1100	A	35	18	5.453 *	9
OPD13-1320	A	42	11	18.132 **	2
OPD13-970	N	27	26	0.019	8
OPD13-590	A	39	14	11.792 **	1
OPD13-500	N	24	29	0.472	-
OPD15-1430	A	43	10	20.547 **	6
OPD15-1160	A	20	33	3.189	-
OPD15-930	N	19	34	4.245 *	2
OPD15-820	A	45	8	25.830 **	-
OPD15-730	N	36	17	6.811 **	-
OPD16-1650	N	22	31	1.528	3
OPD16-640	N	33	20	3.189	-
OPD16-260	A	38	15	9.981 **	-
OPD18-1840	A	29	24	0.472	1
OPD20-1610	A	40	13	13.755 **	6
OPD20-1000	A	39	14	11.792 **	6
OPD20-730	N	44	9	23.113 **	7
OPD20-650	N	26	27	0.019	1
OPD20-620	N	34	19	4.245 *	-
OPD20-340	N	23	30	0.925	2
OPE01-1660	A	36	17	6.811 **	-
OPE01-1550	N	23	30	0.925	1
OPE01-1140	A	44	9	23.113 **	4
OPE01-980	A	34	19	4.245 *	-
OPE01-940	N	43	10	20.547 **	7
OPE01-740	N	22	31	1.528	2
OPE01-450	N	46	7	28.698 **	7
OPE01-430	A	49	4	38.208 **	7
OPE02-2110	N	41	12	15.868 **	8
OPE02-1590	A	41	12	15.868 **	6
OPE02-1380	A	38	15	9.981 **	-

Table 3. Continued.

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	A type	N type		Group
OPE02-1010	N	37	16	8.321 **	-
OPE02-530	A	42	11	18.132 **	2
OPE03-950	A	40	13	13.755 **	2
OPE03-650	N	27	26	0.019	5
OPE04-1120	N	31	22	1.528	-
OPE04-1020	A	41	12	15.868 **	9
OPE04-680	N	20	33	3.189	10
OPE06-1610	A	37	16	8.321 **	1
OPE06-1390	N	27	26	0.019	-
OPE06-1090	N	36	17	6.811 **	-
OPE06-1000	A	33	20	3.189	-
OPE06-810	A	50	3	41.679 **	3
OPE06-660	A	27	26	0.019	-
OPE06-580	A	31	22	1.528	-
OPE09-2840	N	33	20	3.189	-
OPE09-1360	A	33	20	3.189	-
OPE09-1050	N	23	30	0.925	11
OPE09-790	A	34	19	4.245 *	1
OPE09-660	A	38	15	9.981 **	4
OPE15-1820	A	35	18	5.453 *	-
OPE17-2000	N	27	26	0.019	-
OPE17-1830	A	36	17	6.811 **	-
OPE17-1610	A	30	23	0.925	3
OPE17-1390	N	35	18	5.453 *	10
OPE17-1160	N	29	24	0.472	10
OPE17-750	N	31	22	1.528	-
OPE17-370	N	29	24	0.472	11
OPF03-2550	N	25	28	0.170	10
OPF03-2140	A	42	11	18.132 **	3
OPF05-1000	N	23	30	0.925	2
OPF07-1330	N	20	33	3.189	5
OPF07-700	N	27	26	0.019	1
OPF09-1870	A	47	6	31.717 **	4
OPF09-1180	N	34	19	4.245 *	8
OPF09-840	N	26	27	0.019	5
OPF09-820	A	28	25	0.170	5
OPF13-1510	N	32	21	2.283	-
OPF13-1450	A	43	10	20.547 **	8
OPF13-890	N	23	30	0.925	-
OPF13-350	N	23	30	0.925	-
OPG05-1100	N	16	37	8.321 **	5
OPG05-1030	A	50	3	41.679 **	3
OPG05-850	A	44	9	23.113 **	8
OPG05-790	N	39	14	11.792 **	4
OPG06-1040	N	40	13	13.755 **	6
OPG06-840	N	27	26	0.019	-
OPG06-670	A	38	15	9.981 **	-
OPG10-1490	N	28	25	0.170	-
OPG10-1330	N	31	22	1.528	1

Table 3. Continued.

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	A type	N type		Group
OPG10-1030	A	40	13	13.755 **	6
OPG10-790	N	44	9	23.113 **	10
OPG10-720	A	32	21	2.283	-
OPG10-690	A	36	17	6.811 **	-
OPG10-610	A	40	13	13.755 **	4
OPG10-540	N	31	22	1.528	11
OPG11-1730	N	42	11	18.132 **	7
OPG11-1030	A	44	9	23.113 **	3
OPG12-1930	N	43	10	20.547 **	3
OPG12-1420	N	25	28	0.170	-
OPG12-1090	A	16	37	8.321 **	-
OPG12-920	N	29	24	0.472	1
OPG12-550	N	32	21	2.283	2
OPG12-430	N	27	26	0.019	-
OPG12-360	N	38	15	9.981 **	7
OPG13-1820	A	36	17	6.811 **	4
OPG13-1320	A	33	20	3.189	-
OPG14-1520	N	21	32	2.283	2
OPG14-710	A	44	9	23.113 **	-
OPG18-1180	N	23	30	0.925	-
OPG18-800	N	33	20	3.189	-
OPG18-700	N	44	9	23.113 **	4
OPG18-360	A	37	16	8.321 **	-
OPH04-1160	A	39	14	11.792 **	1
OPH04-920	A	28	25	0.170	11
OPH04-750	N	34	19	4.245 *	7
OPH04-600	A	50	3	41.679 **	10
OPH05-830	N	23	30	0.925	-
OPH05-800	A	48	5	34.887 **	3
OPH05-520	A	25	28	0.170	-
OPH07-2550	N	37	16	8.321 **	-
OPH07-1660	A	36	17	6.811 **	1
OPH07-870	N	28	25	0.170	-
OPH07-290	A	49	4	38.208 **	4
OPH17-940	N	34	19	4.245 *	8
OPH17-890	N	28	25	0.170	2
OPH17-740	N	29	24	0.472	2
OPH17-680	A	44	9	23.113 **	3
OPI03-990	A	35	18	5.453 *	-
OPI03-900	N	26	27	0.019	-
OPI03-430	N	31	21	1.906	2
OPI07-1230	N	23	30	0.925	3
OPI07-660	N	25	38	5.075 *	5
OPI07-530	A	30	23	0.925	1
OPI10-1970	N	28	25	0.170	2
OPI10-1560	A	36	17	6.811 **	-
OPI12-620	N	39	14	11.792 **	4
OPI18-710	N	21	32	2.283	2
OPI20-1740	A	27	26	0.019	-

Table 3. Continued.

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	A type	N type		Group
OPJ13-1580	N	32	21	2.283	8
OPJ13-890	A	37	16	8.321 **	6
OPP03-1820	A	48	5	34.887 **	3
OPP03-1520	N	28	25	0.170	-
OPP05-2180	N	27	26	0.019	1
OPP05-1260	A	34	19	4.245 *	-
OPP05-1100	N	37	16	8.321 **	-
OPP14-2440	A	34	19	4.245 *	2
OPP14-1260	A	49	4	38.208 **	3
OPP14-1020	N	24	29	0.472	1
OPP16-2090	N	28	25	0.170	-
OPP16-1930	N	40	13	13.755 **	9
OPP16-1400	A	42	11	18.132 **	9
OPP16-1240	A	46	7	28.698 **	2
OPP16-420	A	46	7	28.698 **	6
OPQ07-2460	A	28	25	0.170	-
OPQ07-2420	N	41	12	15.868 **	-
OPQ07-1200	A	35	18	5.453 *	-
OPQ07-530	A	47	6	31.717 **	3
OPQ10-1380	N	38	15	9.981 **	-
OPQ14-2480	N	29	24	0.472	-
OPQ14-830	A	43	10	20.547 **	9
OPQ19-2760	A	33	20	3.189	5
OPQ19-2170	A	49	4	38.208 **	3
OPQ19-880	N	22	31	1.528	-
OPR13-530	A	44	9	23.113 **	6
OPR14-850	A	51	2	45.302 **	3
OPR14-360	N	42	11	18.132 **	10
OPS07-440	A	44	9	23.113 **	6
OPS08-2560	A	32	21	2.283	-
OPS08-2140	A	34	19	4.245 *	-
OPS08-1490	A	50	3	41.679 **	4
OPS08-1240	N	27	26	0.019	-
OPS08-1100	A	25	28	0.170	11
OPS08-960	A	35	18	5.453 *	2
OPS10-1720	N	22	31	1.528	1
OPS10-1460	A	41	12	15.868 **	4
OPS10-700	N	39	14	11.792 **	7
OPS10-570	N	30	23	0.925	-
OPS19-2080	N	38	15	9.981 **	3
OPS19-990	N	37	16	8.321 **	7
OPS19-930	A	42	11	18.132 **	6
OPS19-560	N	34	19	4.245 *	3
OPS19-420	A	34	19	4.245 *	2
OPT01-1730	A	39	14	11.792 **	-
OPT01-930	N	33	20	3.189	-
OPT01-830	A	44	9	23.113 **	-
OPT01-570	N	35	18	5.453 *	-
OPT03-1360	N	32	21	2.283	-

Table 3. Continued.

Marker	Marker	No. of lines		$\chi^2$	Linkage
	origin	A type	N type		Group
OPT03-860	A	44	9	23.113 **	8
OPV01-2120	A	39	14	11.792 **	8
OPV01-560	N	34	19	4.245 *	-
OPV07-2170	N	41	12	15.868 **	10
OPV07-1750	A	42	11	18.132 **	2
OPW07-2840	N	39	14	11.792 **	8
OPW07-1230	A	41	12	15.868 **	2
OPW07-920	N	41	12	15.868 **	4
OPW07-670	N	24	29	0.472	1
OPW07-630	A	24	29	0.472	3
OPW07-490	A	43	10	20.547 **	4
OPW10-2360	N	48	5	34.887 **	3
OPW10-1540	A	36	17	6.811 *	5
OPW16-1720	A	28	25	0.170 *	1
OPW16-850	A	37	16	8.321 **	-
OPW16-620	A	47	6	31.717 **	9
OPW16-460	N	35	18	5.453 *	-
OPW17-2020	N	27	26	0.019	-
OPW17-440	A	47	6	31.717 **	6
OPX06-1750	A	39	14	11.792 **	6
OPX06-960	A	46	7	28.698 **	3
OPX06-920	A	46	7	28.698 **	-
OPX07-1460	N	26	27	0.019	1
OPX07-920	A	29	24	0.472	-
OPX12-1560	A	51	2	45.302 **	7
OPX12-1280	N	28	25	0.170	-
OPX12-610	A	32	21	2.283	-
OPX15-760	A	42	11	18.132 **	8
OPX15-590	A	42	11	18.132 **	3
OPX15-510	N	27	26	0.019	11
OPY01-1970	A	32	21	2.283	-
OPY01-1270	N	30	23	0.925	11
OPY01-940	A	43	10	20.547 **	3
OPY07-1580	A	36	17	6.811 **	5
OPY07-1100	N	37	16	8.321 **	7
OPY07-1020	N	55	8	43.566 **	3
OPY07-880	A	43	10	20.547 **	3
OPY07-410	A	42	11	18.132 **	3
OPY17-2520	A	36	17	6.811 **	8
OPY17-1990	N	31	22	1.528	-
OPY17-1630	A	39	14	11.792 **	8
OPY17-1200	N	17	36	6.811 *	-
OPY17-870	N	22	31	1.528	5
OPY17-670	A	36	17	6.811 *	2
OPY17-430	N	42	11	18.132 **	2
OPAA14-1560	A	35	18	5.453 *	2
OPAA14-1450	N	31	22	1.528	8
OPAA14-1200	N	21	32	2.283	5
OPAA14-930	N	20	33	3.189	5

Table 3. Continued.

Marker	Marker origin	No. of lines		$\chi^2$	Linkage Group
		A type	N type		
OPAA15-830	N	38	15	9.981 **	1
OPAB04-1800	N	43	10	20.547 **	4
OPAB04-1020	N	19	34	4.245 *	-
OPAB11-1550	N	22	31	1.528	1
OPAB11-720	A	45	8	25.830 **	3
OPAB14-2080	N	20	33	3.189	-
OPAB14-1440	A	44	9	23.113 **	9
OPAB14-630	N	34	19	4.245 *	1
OPAB14-530	N	28	25	0.170	1
OPAB14-400	A	44	9	23.113 **	10
OPAB19-2080	N	21	32	2.283	-
OPAB19-1880	N	20	33	3.189	-
OPAB19-1740	A	29	24	0.472	-
OPAB19-810	A	45	8	25.830 **	6
OPAD04-880	N	42	11	18.132 **	7
OPAD14-1840	N	41	12	15.868 **	-
OPAD14-1600	A	33	20	3.189	-
OPAD14-1280	A	39	14	11.792 **	10
OPAD14-1130	N	19	34	4.245 *	5
OPAD16-1550	N	23	30	0.925	5
OPAD16-1270	A	36	17	6.811 **	8
OPAD16-650	A	45	8	25.830 **	6
OPAD16-430	A	36	17	6.811 **	1
OPAE12-2470	N	23	30	0.925	5
OPAE12-1980	N	41	12	15.868 **	4
OPAE12-1630	A	33	20	3.189	5
OPAE12-1270	A	31	22	1.528	-
OPAE14-1380	A	40	13	13.755 **	8
OPAE14-530	A	36	17	6.811 **	5
OPAE15-1090	N	27	26	0.019	5
OPAE15-800	N	26	27	0.019	-
OPAE15-750	A	40	13	13.755 **	7
OPAF10-1800	N	28	25	0.170	-
OPAF10-1000	A	32	21	2.283	-
OPAF10-840	N	35	18	5.453 *	9
OPAF17-1290	N	24	29	0.472	2
OPAF17-1180	A	35	18	5.453 *	-
OPAF17-830	N	33	20	3.189	8
OPAG07-1450	A	34	19	4.245 *	-
OPAG14-2840	A	33	20	3.189	-
OPAG14-2040	N	41	12	15.868 **	-
OPAG14-2000	A	45	8	25.830 **	4
OPAG14-1310	A	46	7	28.698 **	4
OPAG17-3200	N	40	13	13.755 **	-
OPAG17-2320	N	33	20	3.189	9
OPAG17-660	N	26	27	0.019	3
OPAG19-2580	A	33	20	3.189	5
OPAG19-1180	N	33	20	3.189	3
OPAG19-980	N	34	19	4.245 *	8

Table 3. Continued.

Marker	Marker origin	No. of lines		$\chi^2$	Linkage Group
		A type	N type		
OPAG19-400	N	24	29	0.472	5
OPAH06-1920	N	31	22	1.528	-
OPAH06-970	N	42	11	18.132 **	9
OPAH09-1340	A	43	10	20.547 **	6
OPAH09-870	N	34	19	4.245 *	8
OPAH15-860	A	38	15	9.981 **	-
OPAH15-740	N	32	21	2.283	-
OPAH15-630	N	29	24	0.472	-
OPAH15-400	N	31	22	1.528	2
OPAI10-1490	N	35	18	5.453 *	7
OPAI10-1400	A	42	11	18.132 **	4
OPAI10-750	N	45	8	25.830 **	7
OPAI20-1430	A	40	13	13.755 **	9
OPAI20-1320	A	33	20	3.189	-
OPAI20-1160	A	37	16	8.321 **	-
OPAJ12-1390	A	38	15	9.981 **	-
OPAJ12-1310	N	40	13	13.755 **	7
OPAJ12-840	A	40	13	13.755 **	-
OPAJ12-690	N	19	34	4.245 *	-
OPAJ13-1670	N	19	34	4.245 *	5
OPAJ13-1470	N	30	23	0.925	1
OPAJ13-760	A	40	13	13.755 **	7
OPAJ13-380	A	44	9	23.113 **	6
OPAJ18-2420	N	31	22	1.528	3
OPAJ18-1620	N	38	15	9.981 **	7
OPAJ18-420	A	39	14	11.792 **	5
OPAL04-1870	N	38	15	9.981 **	4
OPAL04-1210	A	41	12	15.868 **	10
OPAL04-860	N	22	31	1.528	5
OPAN10-1170	A	29	24	0.472	-
OPAN10-1130	N	27	26	0.019	3
OPAN10-730	N	39	14	11.792 **	7
OPAP06-1390	N	14	39	11.792 **	-
OPAP06-740	A	34	19	4.245 *	5
OPAR15-1400	A	44	9	23.113 **	3
OPAR15-480	N	38	15	9.981 **	10
OPAR15-440	N	30	23	0.925	-
OPAR19-1880	A	50	3	41.679 **	7
OPAR19-1560	N	40	13	13.755 **	10
OPAR19-870	A	45	8	25.830 **	2

A and N indicate *V. angularis* and *V. nakashimae*, respectively.

\* and \*\* indicate significance at 5% and 1% level, respectively.

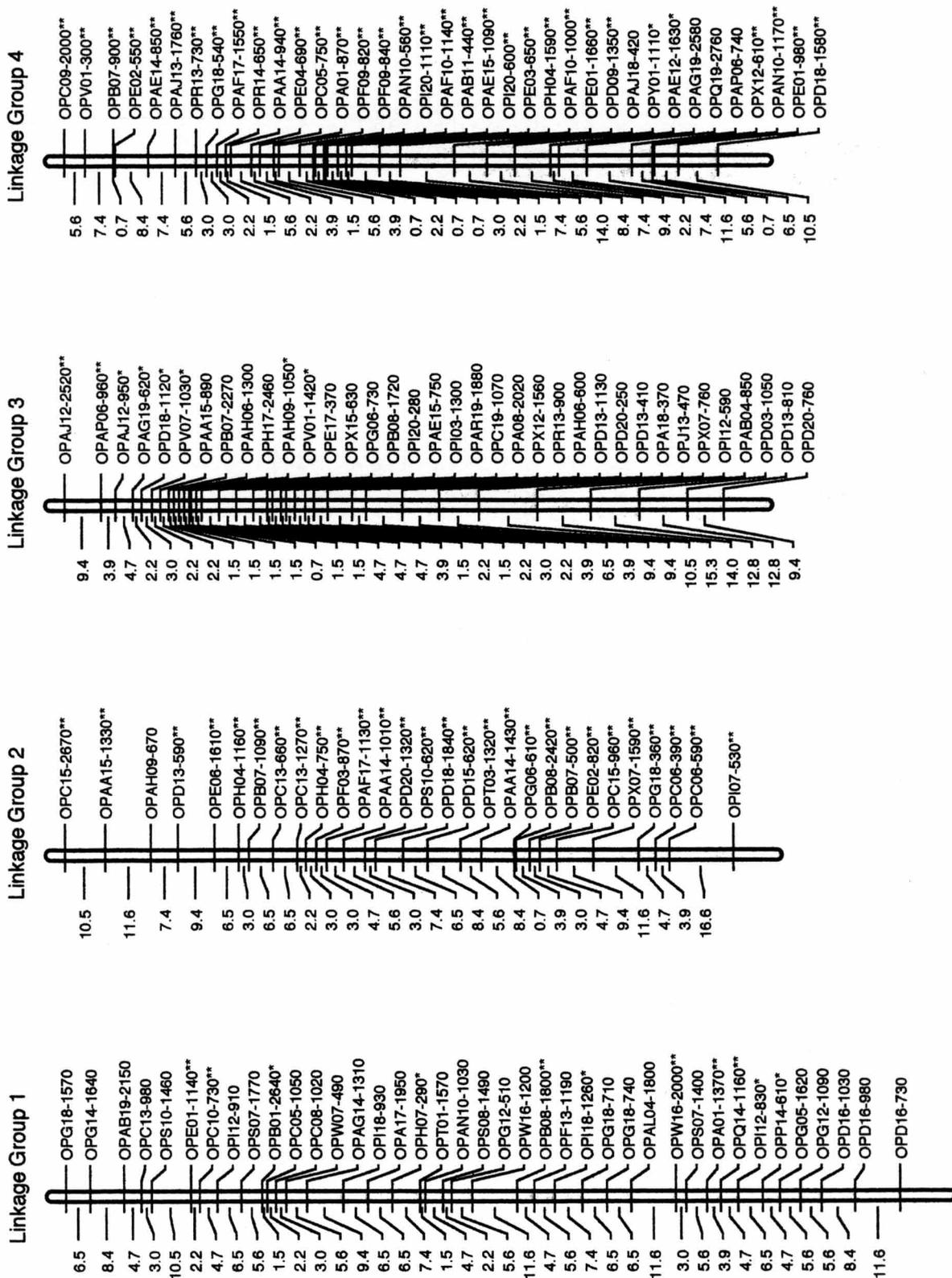


Fig. 3. A linkage map of azuki bean constructed with RAPD markers using F7 population derived from rice bean x azuki bean. Map distance and markers name are shown on the left and right sides of the linkage groups, respectively. \* and \*\* indicate significant deviations from the expected segregation ratios at 5% and 1%, respectively.

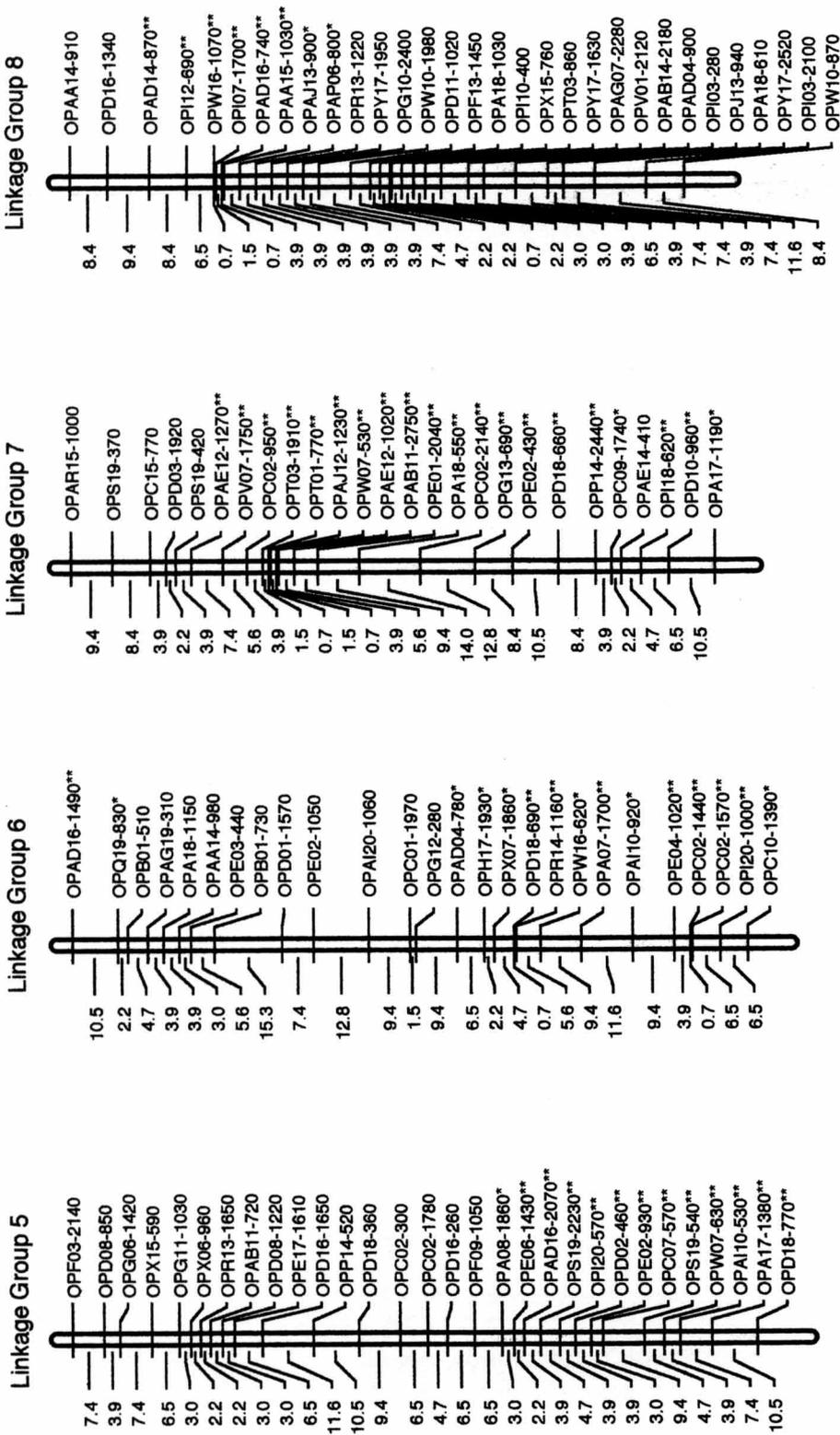


Fig. 3. Continued.

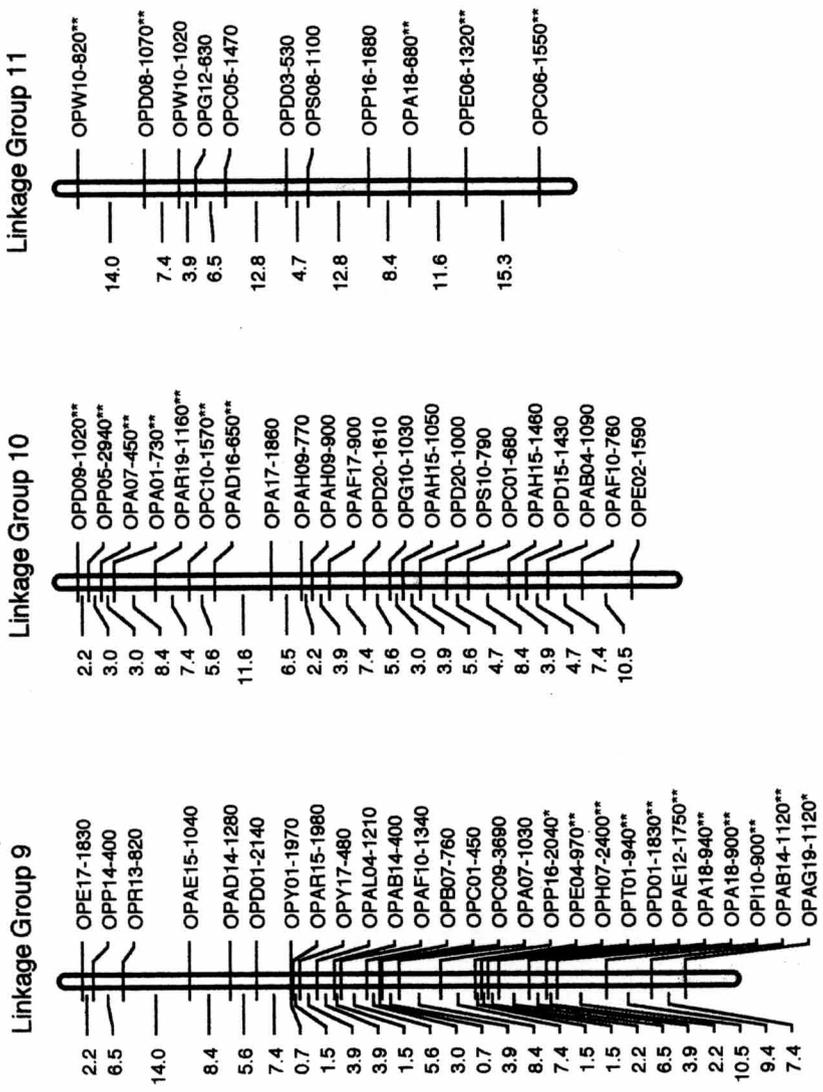


Fig. 3. Continued.

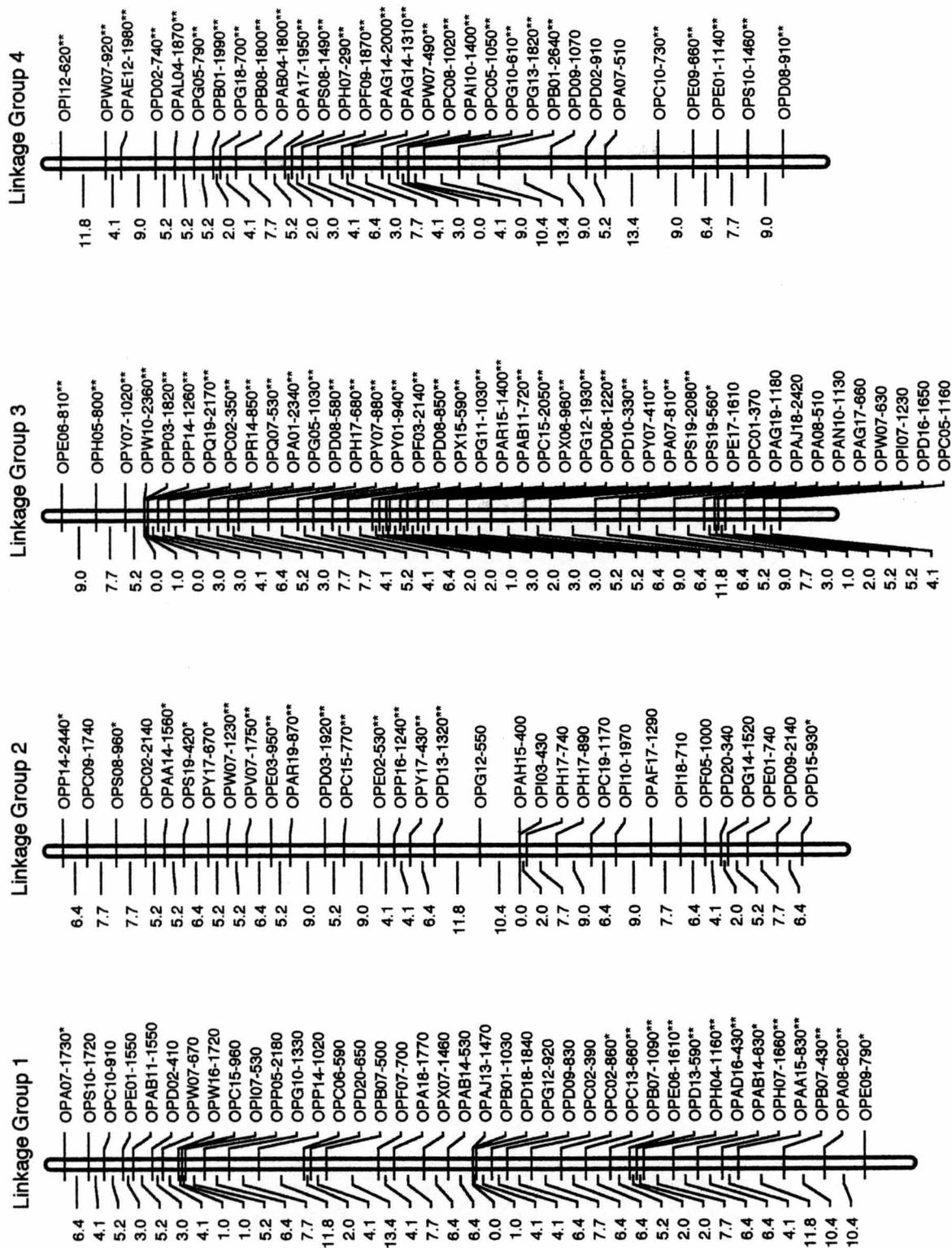


Fig. 4. A linkage map of azuki bean constructed with RAPD markers derived from azuki bean x *Vigna nakashimae*. Map distance and markers name are shown on the left and right sides of the linkage groups, respectively. \* and \*\* indicate significant deviations from the expected segregation ratios at 5% and 1%, respectively.

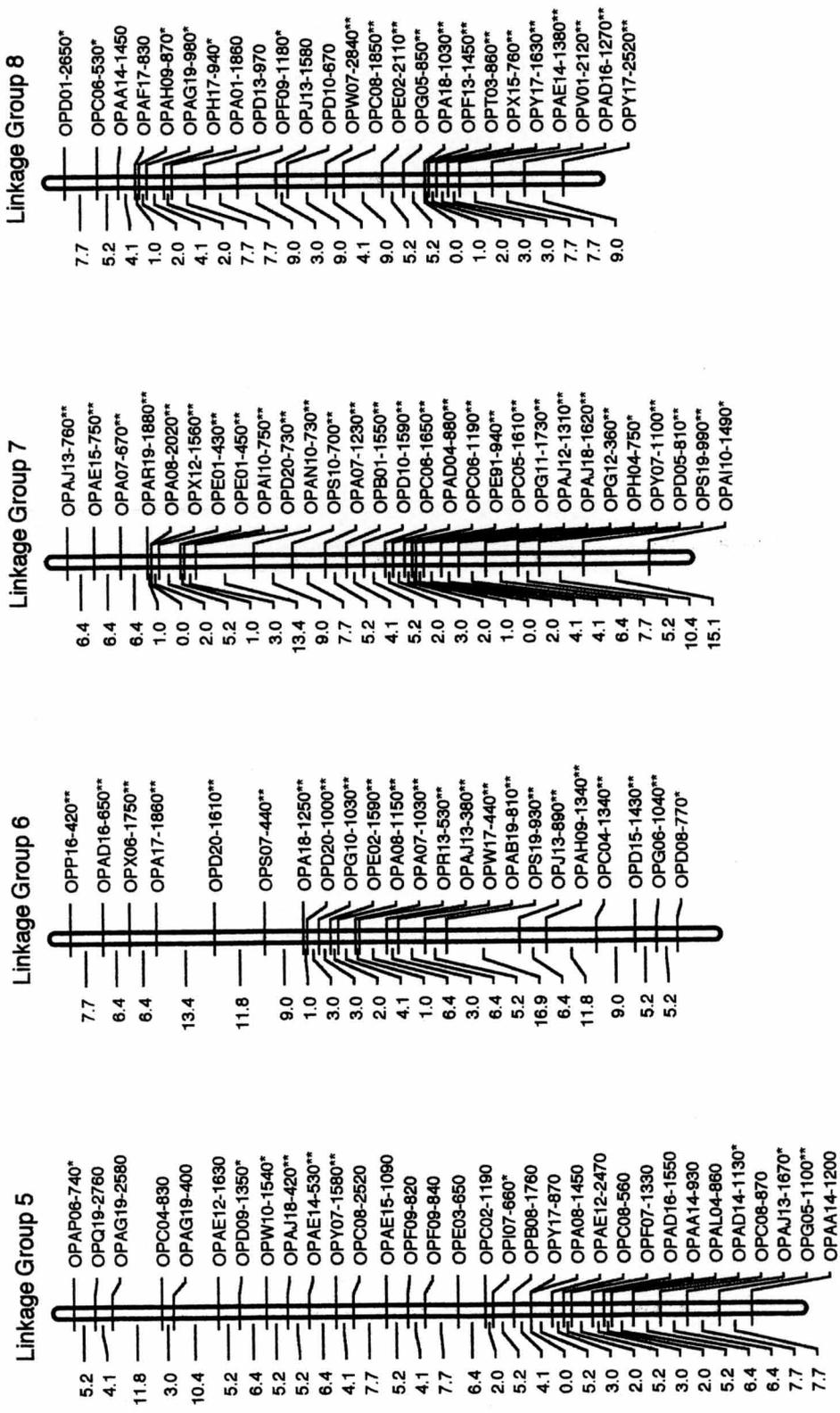
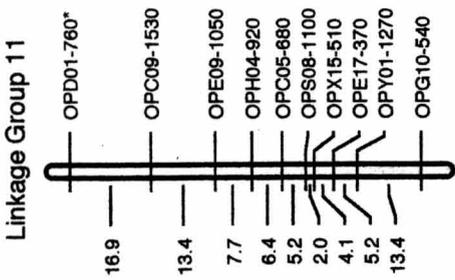
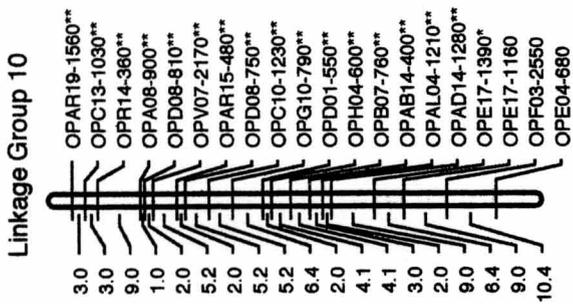
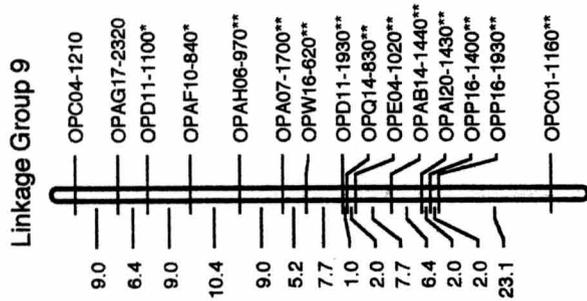


Fig. 4. Continued.



**Table 4 Information on maps in both population**

	UA	AN
No. of linkage groups	11	11
No. of markers	314	298
Total length (cM)	1702.0	1619.0
Average distance between markers (cM)	5.62	5.64
No. of markers on each linkage group	11~39	10~42
Length of each linkage group (cM)	97.4 ~ 221.7	74.3~210.7

**Table 5. The number of markers and the length on each linkage group**

Linkage Group	UA		AN	
	No. of markers	length (cM)	No. of markers	length (cM)
LG1	39 (11) <sup>1)</sup>	221.7	39 (14)	210.7
LG2	29(28)	177.7	32 (16)	194.2
LG3	36 (8)	175.8	42 (31)	191.6
LG4	37 (33)	175.2	31(28)	189.4
LG5	30 (13)	161.5	32 (10)	163.2
LG6	26 (15)	157.3	23 (23)	144.3
LG7	26 (20)	149.9	29 (29)	139.0
LG8	31 (8)	144.8	25 (19)	119.4
LG9	27 (11)	129.7	15 (13)	100.9
LG10	22 (7)	119.0	20 (17)	92.0
LG11	11 (5)	97.4	10 (1)	74.3

<sup>1)</sup> Value in the parentheses indicates the number of markers showing distorted segregation.

る全長 1619.0 cM、各マーカー間の平均距離 5.64 cM の地図を作成することができた。各連鎖群に座乗するマーカー数は 10 個（第 11 連鎖群）～42 個（第 3 連鎖群）であり、その長さは 74.3 cM（第 11 連鎖群）～210.7 cM（第 1 連鎖群）であった（Table 4 および 5）。分離に歪みを生じたマーカーは全連鎖群に分布していたが、特に、第 6 および第 7 連鎖群では、座乗するすべてのマーカーにおいて、また、第 4、第 8、第 9 および第 10 連鎖群でも、ほとんどのマーカーにおいて歪みを生じており、これらすべてがアズキ型の出現頻度の高いものであった（Fig. 4）。なお、ヒメツルアズキ型のパターンを示す割合が有意に高かったバンドは、第 1、第 2 および第 5 連鎖群に座乗しており、特に第 5 連鎖群に多く座乗していた（Table 3）。

#### UA 地図と AN 地図の比較

全部で 121 個の両集団に共通なアズキの RAPD マーカーが検出された。このうち、UA 地図には 84 個が、AN 地図には 91 が座乗しており、両集団ともに座乗していたものは 71 個であった。この 71 個のマーカーの分布状況をもとに、両地図を比較した結果を Fig. 5 に示した。黄色で着色したマーカーが共通のものであり、両地図とも各連鎖群に 1～12 個の共通マーカーが座乗していた。両集団の各連鎖群に座乗する共通マーカーを比較したところ、UA 集団の第 1～第 11 連鎖群に座乗するマーカーは、すべて、それぞれ AN の第 4、1、7、5、3、9、2、8、10、6 および第 11 連鎖群に座乗していた。また、マーカーの順序に関しても、概ね一致しており、両集団の地図の連鎖群の対応関係が明らかになった。この対応関係を Table 6 にも示した。

#### 組換え近交系世代における地図と分離世代におけるそれとの比較

UA 集団についてみると、F3 世代を用いて作成された連鎖地図（Kaga et al. 2000）に記載されている 75 個の RAPD マーカーのうち、本研究では、73 個を検出することができ、そのうちの 63 個を地図上に位置づけることができた。この 63 個のマーカーの分布状況をもとに、両世代の地図を比較した結果を Fig. 6 に示した。この図より、両世代における連鎖群の対応関係を明確にすること



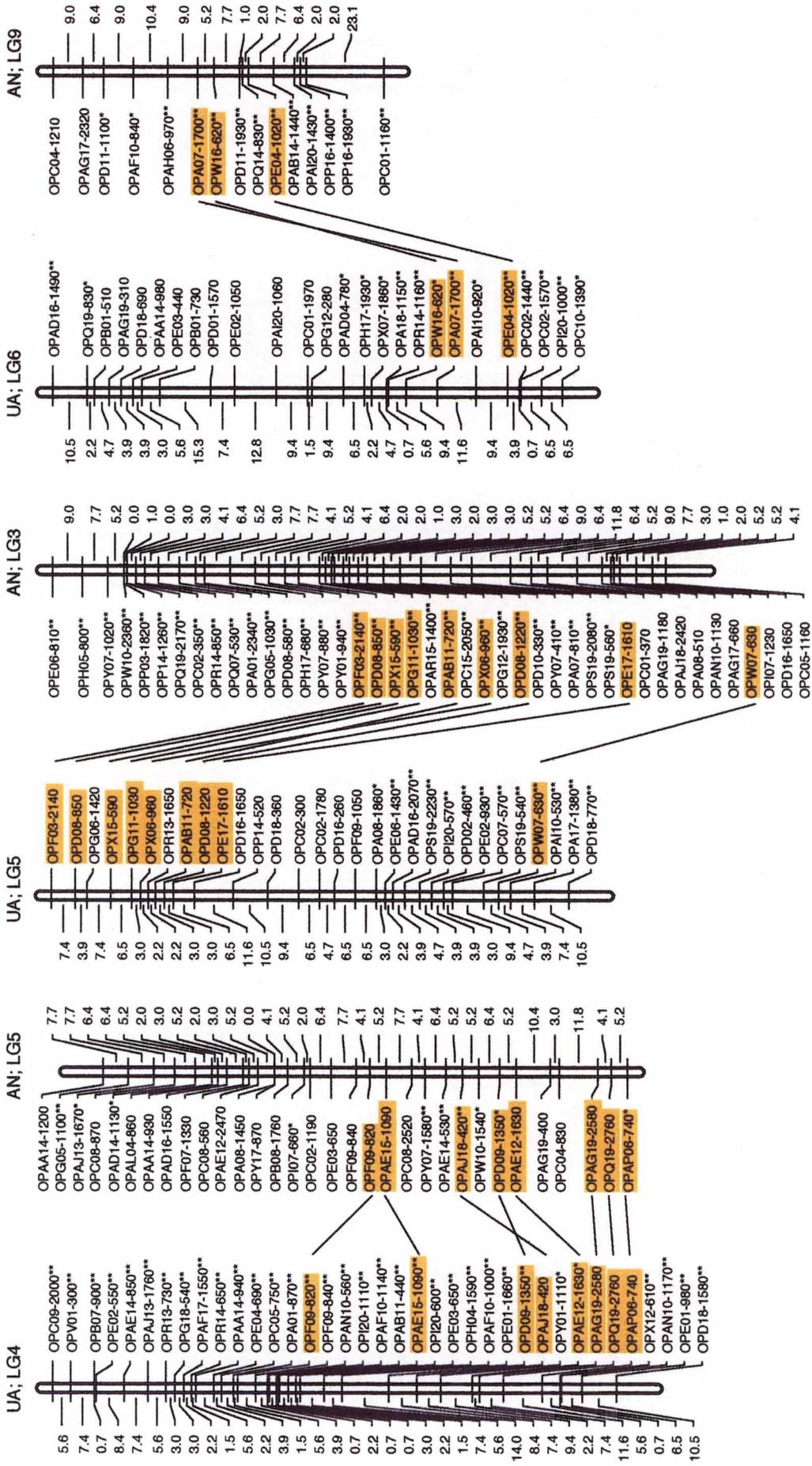


Fig. 5. Continued.

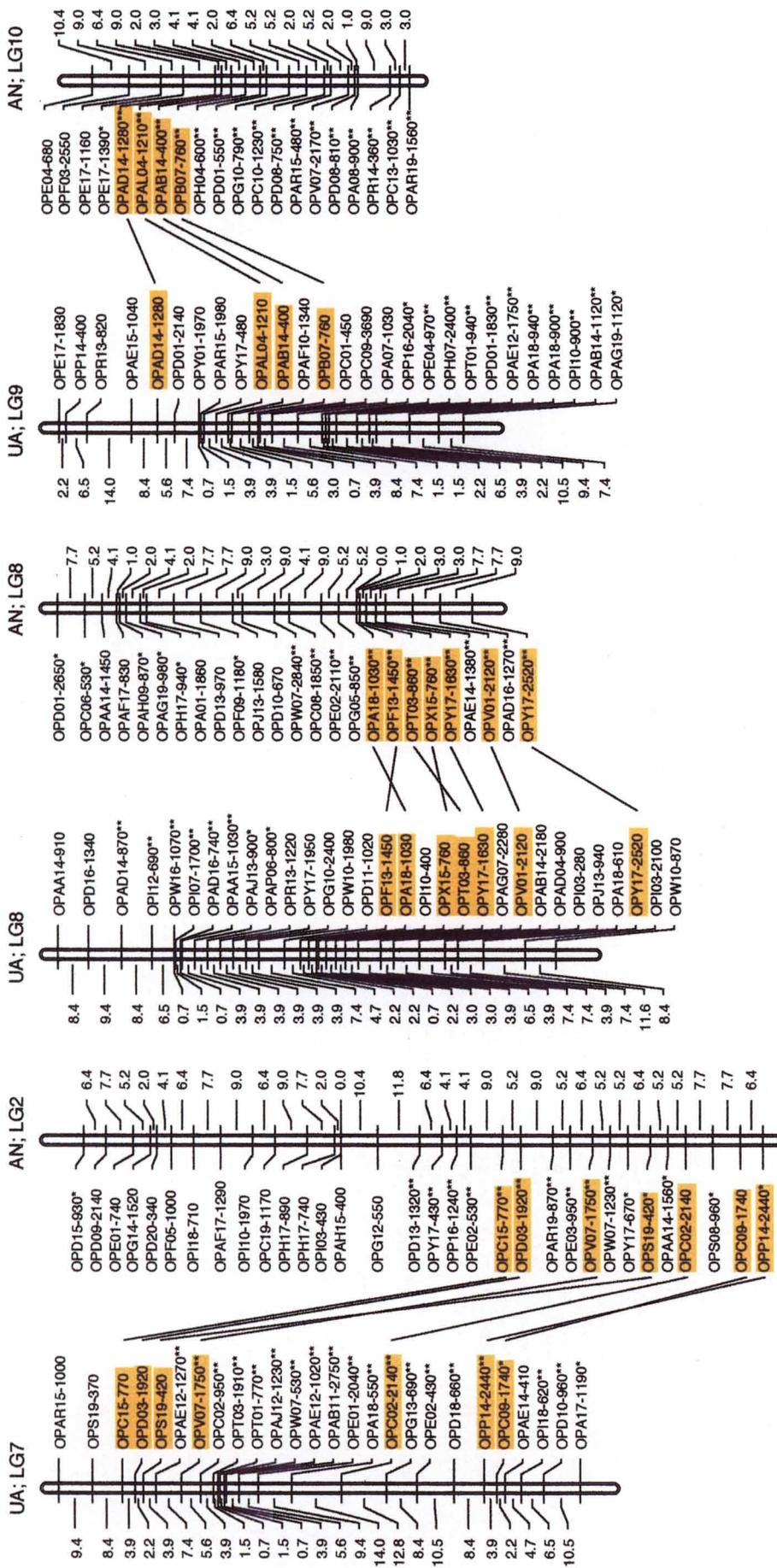


Fig. 5. Continued.



Table 6. Correspondence of linkage groups between UA and AN maps

UA	AN
LG1	LG4
LG2	LG1
LG3	LG7
LG4	LG5
LG5	LG3
LG6	LG9
LG7	LG2
LG8	LG8
LG9	LG10
LG10	LG6
LG11	LG11

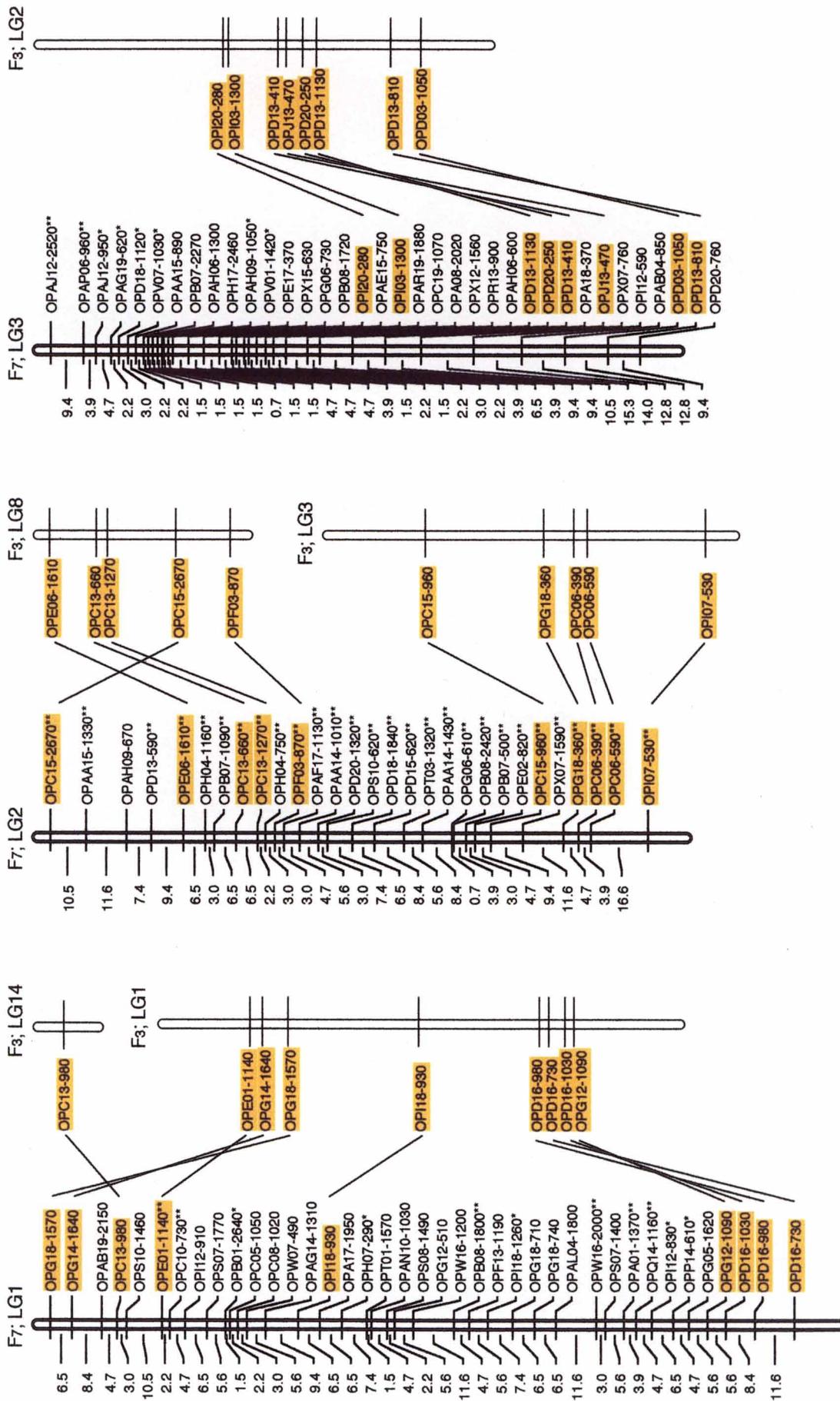


Fig. 6. Comparison between F<sub>3</sub> (right ; Kaga et al. 2000) and F<sub>7</sub> (left) linkage maps derived from rice bean x azuki bean using common RAPD markers. Markers in yellow boxes are common in both maps.

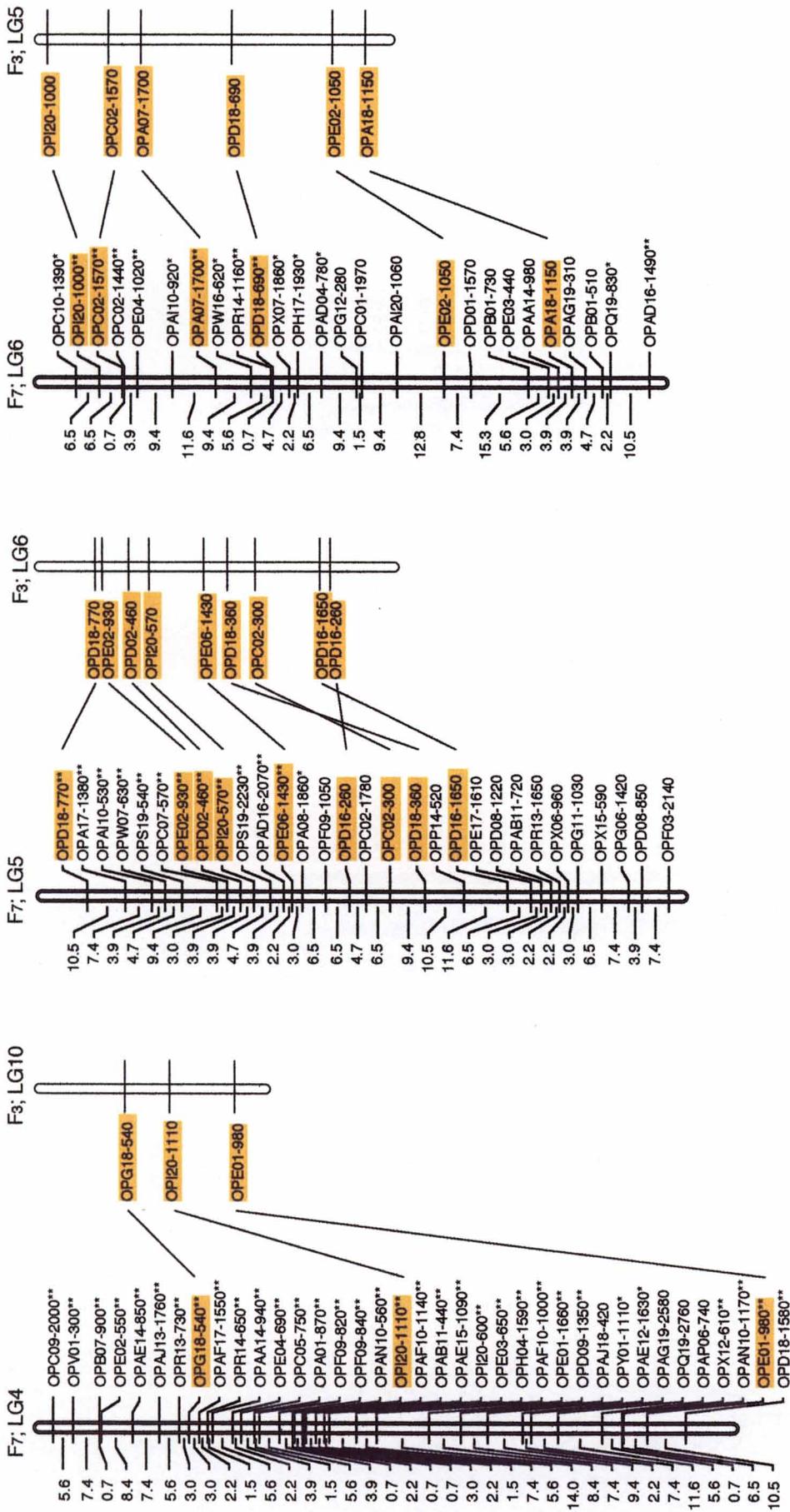


Fig. 6. Continued.

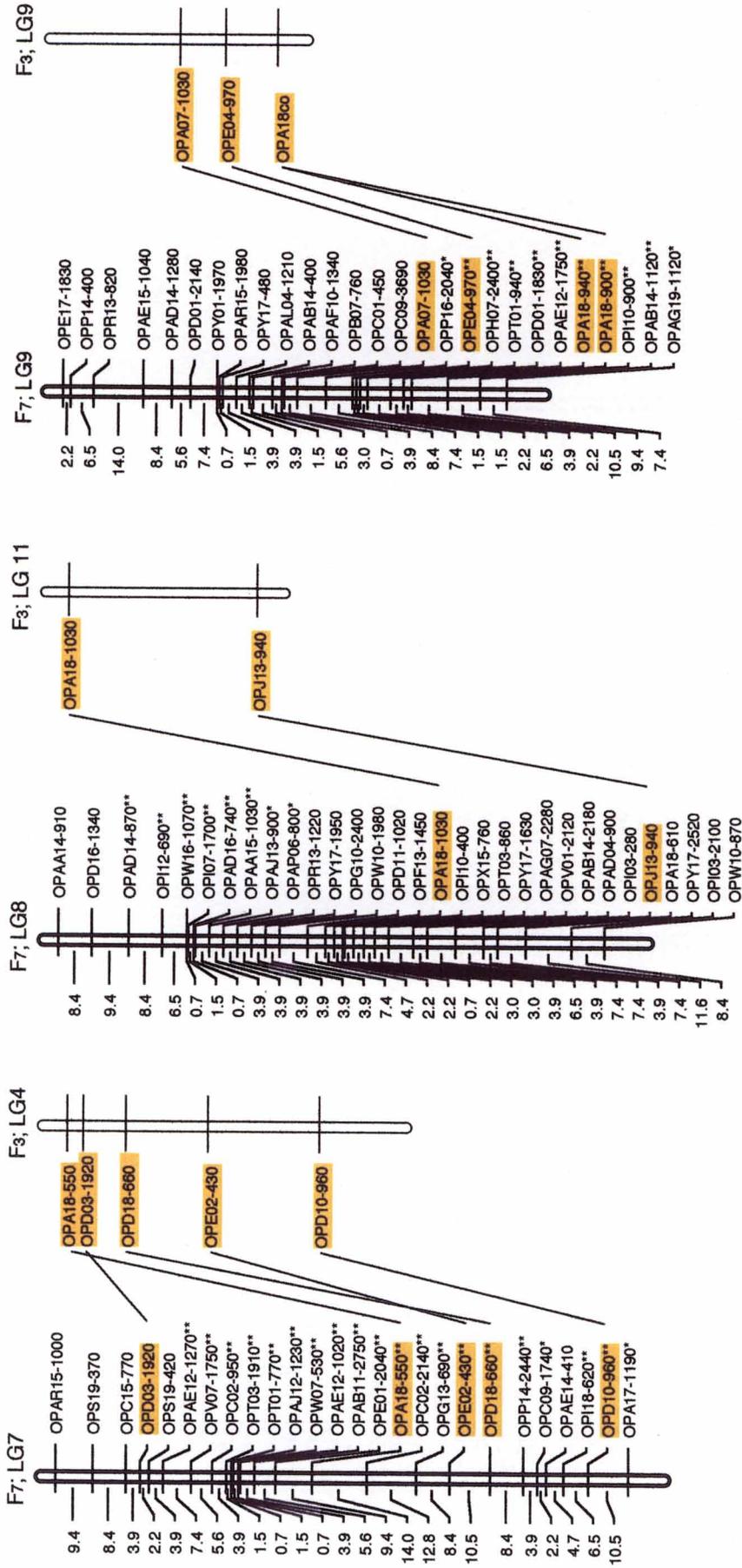


Fig. 6. Continued.

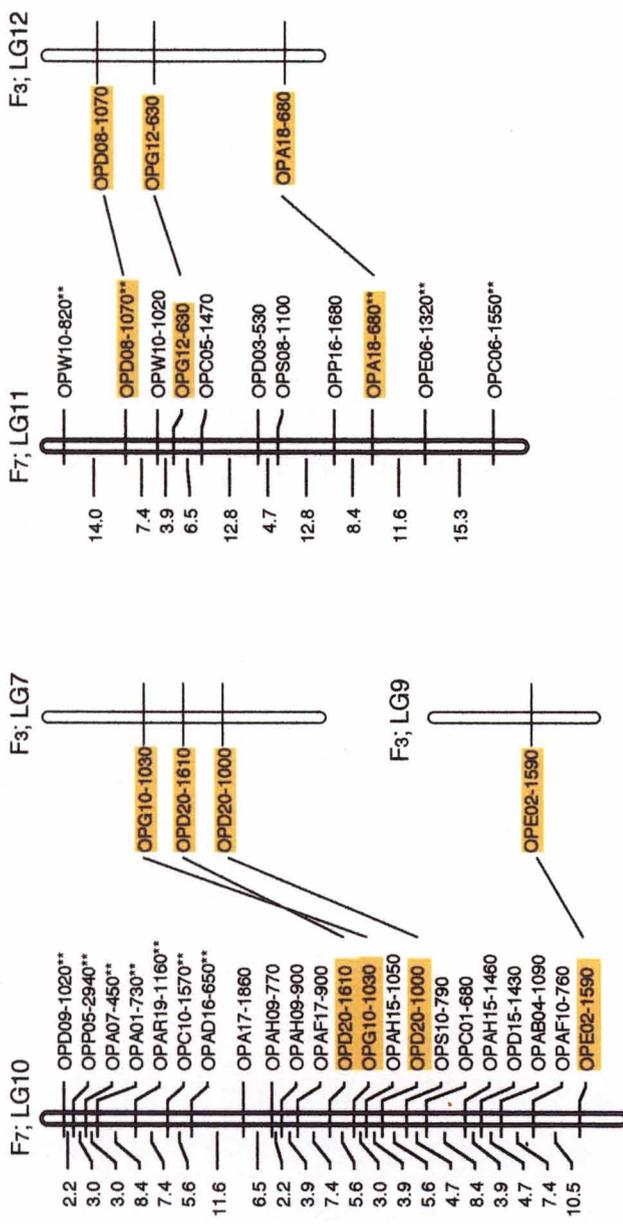


Fig. 6. Continued.

ができ、また、マーカーの配列順序に関しても、それが大きく異なるものが少数存在するものの、ほとんどは一致していることが分かった。本研究で作成した地図と F3 世代におけるそれとの対応関係を Table 7 にまとめた。本研究の第 3、4、5、6、7、8、9 および第 11 連鎖群は、それぞれ F3 世代の第 2、10、6、5、4、11、9 および第 12 連鎖群に対応していた。さらに、本研究の第 1 および第 2 連鎖群は、それぞれ、F3 世代の第 1 と第 14 連鎖群および第 3 と第 8 連鎖群を合わせたものと対応しており、本研究の第 10 連鎖群には、F3 の第 7 連鎖群の全マーカーと第 9 連鎖群の一つのマーカーが座乗していた。

AN 集団についてみると、F2 世代の地図 (Kaga et al. 1996a) において報告されている 98 個の RAPD マーカーのうち、本研究では、94 個を検出することができ、そのうちの 75 個を地図上に位置づけることができた。この 75 個のマーカーの分布状況をもとに、両世代の地図を比較した結果を Fig. 7 に示した。この図より、UA の地図と同様に、両世代における連鎖群の対応関係を明確にすることができ、また、マーカー順序に関しても、大きく異なるものはほとんど認められなかった。本研究の地図と F2 世代におけるそれの対応関係も Table 7 に示した。本研究の第 2、5、8、9 および第 10 連鎖群は、それぞれ F2 世代の第 6、7、10、9 および第 8 連鎖群に対応していた。本研究の第 6 および第 11 連鎖群は、F2 世代の第 5 連鎖群の一部分ずつの領域に対応していた。さらに、本研究の第 1、第 4 および第 7 連鎖群は、それぞれ、F2 世代の第 3 と第 12 連鎖群、第 4 と第 14 連鎖群および第 2 と第 13 連鎖群を合わせたものと対応しており、本研究の第 3 連鎖群には、F2 の第 1 連鎖群の全マーカーと第 4 連鎖群の一つのマーカーが座乗していた。

## 考察

本研究では、2 つの組換え近交系集団を用いて、RAPD マーカーによる連鎖地図を作成した。両地図とも 11 連鎖群に約 300 の RAPD マーカーを座乗させることができ、全長 1,600~1,700 cM、マーカー間の平均距離は約 5.6 cM であった。本研究で得られた地図は、Kaga et al. (1996a, 2000) のものと比べ、

Table 7. Correspondence of linkage groups between RIL and segregating populations

UA		AN	
F7	F3 <sup>1)</sup>	F6	F2 <sup>2)</sup>
LG1	LG1+LG14	LG1	LG3+LG12
LG2	LG3+LG8	LG2	LG6
LG3	LG2	LG3	LG1+LG4
LG4	LG10	LG4	LG4+LG14
LG5	LG6	LG5	LG7
LG6	LG5	LG6	LG5
LG7	LG4	LG7	LG2+LG13
LG8	LG11	LG8	LG10
LG9	LG9	LG9	LG9
LG10	LG7+LG9	LG10	LG8
LG11	LG12	LG11	LG5

<sup>1)</sup> and <sup>2)</sup> are after Kaga et al. (2000) and Kaga et al. (1996a), respectively.







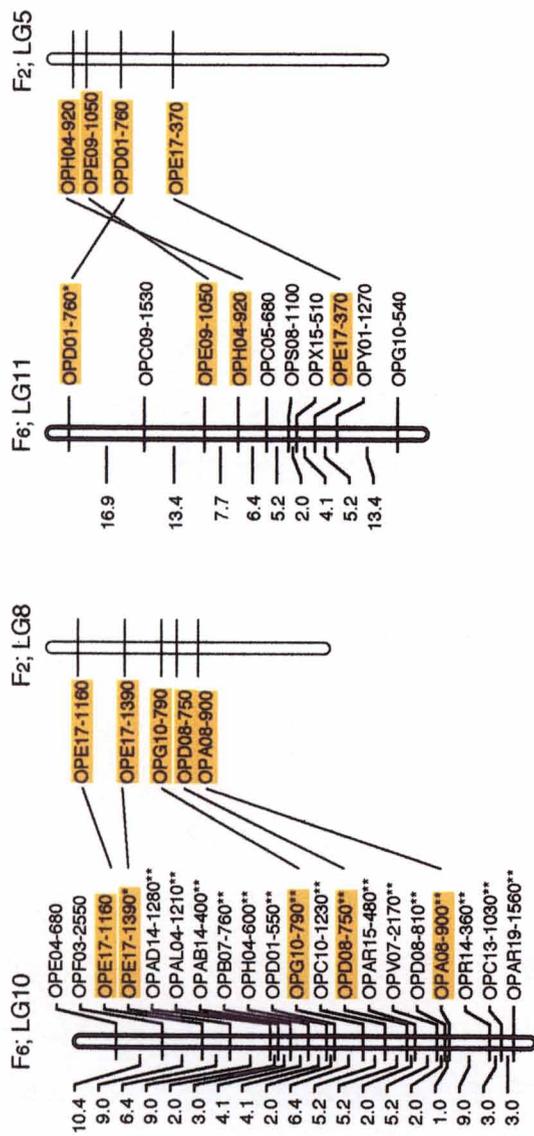


Fig. 7. Continued.

連鎖群の数がアズキの基本染色体数に収束し、座乗マーカー数が多く、マーカー間の平均距離も短くなっていた。マーカー間の平均距離の約 5.6 cM という値は、ササゲ (Menendez et al. 1997) の地図の 6.4 cM、レンズマメ (Eujayl et al. 1998) での 6.0 cM、ヒヨコマメ (Winter et al. 2000) での 6.8 cM などの高密度な地図の値に相当するものであった。しかし、UA 集団の第 11 連鎖群、AN 集団の第 9 および 11 連鎖群では、他の連鎖群と比べて座乗マーカー数が少なく、密度も低かった。さらに、組換え近交系集団は、一般的に、ヘテロ性は少ないため、優性マーカーも共優性マーカーとほぼ同様の分離様式を示すと考えられることから、本研究では優性マーカーである RAPD マーカーだけで連鎖地図を作成した。しかし、本研究で用いた組換え近交系集団の形質を調査したところ、胚軸色や種皮色などにおいて、系統内で分離が認められることがあった。したがって、特に座乗マーカー数の少なかった連鎖群をより精密な地図に仕上げるためには、RFLP やマイクロサテライトなどの共優性マーカーも含めて、さらに多くのマーカーを用いて連鎖解析を行う必要があると考えられる。

本研究で検出されたマーカーのうち、UA 集団では 50.6 % のもので、AN 集団では 60.0 % のもので、分離に歪みが生じていた。このような分離の歪みは、種間や亜種間交雑に由来する雑種集団を用いて作成した地図において、これまでにも多く報告されている (Paterson et al. 1988, Keim et al. 1990, Heun et al. 1991, Kesseli et al. 1994)。例えば、トマトでは、野生種 (*Lycopersicon chmielewskii*) との種間交雑に由来する F<sub>2</sub> 集団において、69 % の高い割合で分離に歪みを生じたマーカーが検出されている (Paterson et al. 1988)。また、イネのジャポニカとインディカとの交雑に由来する集団においても、Wu et al. (2000) は、F<sub>9</sub> 集団において、66 % の高い割合で分離に歪みを生じたマーカーが検出されたことを報告している。このような分離の歪みの原因として、配偶子または接合体レベルでの致死遺伝子の発現などが考えられている (Cheng et al. 1996, Bradshaw et al. 1994)。本研究の結果もこのようなことが原因となっている可能性もあるが、さらに、各系統内で次世代の種子を採取する個体が無作為に選ばれていなかったことが影響している可能性も考えら

れる。

本研究では、各連鎖地図間の対応関係をつけることができた。本研究の組換え近交系世代における地図では、分離世代 (Kaga et al. 1996a, 2000) でのそれらに座乗していて RAPD マーカーのほとんどを検出でき、それらを本地図上に位置づけることができた。また、各連鎖群におけるマーカー順序も概ね一致していた。さらに、UA および AN 集団に関する地図においても、共通のアズキの RAPD マーカーの分布から、両地図の対応関係を明確にし、各対応連鎖群におけるマーカー順序も概ね一致していることを明らかにすることができた。したがって、本研究では、再現性の高い信頼ある地図を作成できたものと考えられる。

本研究で作成した地図には、歪みを生じたマーカーが多く座乗していた。しかし、イネにおいて、Wu et al. (2000) は 66 % の高い割合で分離に歪みを生じたマーカーを用いて連鎖地図を作成し、それを用いてアルミニウム耐性遺伝子の QTL 解析を行うことに成功している。したがって、本研究で作成した地図も、有用遺伝子のマッピングや QTL 解析に利用できると考えられる。タケアズキは、アズキゾウムシ (沢および Tan 1976, Tomooka et al. 2000) やアズキモザイクウイルス病 (沢ら 1984) などに対する抵抗性遺伝子をもち、しかも多収性 (Smartt 1990) を示す。ヒメツルアズキは茎疫病抵抗性遺伝子を有している (Kaga et al. 1996a)。タケアズキおよびヒメツルアズキが持つこのような有用遺伝子はもちろん、開花期、草丈などの諸形質を支配している遺伝子のマッピングや QTL 解析を行うことが重要である。今後、本研究で作成した地図などを利用すれば、このような遺伝子の解析が進み、それらの効果を明らかにすることができ、アズキ育種の効率化が一段と高まるものと期待される。

## 摘要

本研究では、アズキにおいて QTL 解析を行うための基礎として、タケアズキとアズキおよびアズキとヒメツルアズキとの種間交雑に由来する 2 つの組換え

え近交系集団を用いて、RAPD マーカーによる高密度な連鎖地図を作成した。

UA および AN 集団では、それぞれ 451 本および 432 本の RAPD マーカーが検出された。これらのバンドのうち、UA および AN 集団では、それぞれ 228 本 (50.6%) および 259 本 (60.0%) のバンドにおいて、その分離比に歪みが認められ、両集団とも母親型のパターンを示す割合が高いバンドが圧倒的に多く検出された。

連鎖解析を行った結果、両集団ともアズキの基本染色体数と一致する 11 の連鎖群からなる地図を作成することができた。UA 集団では、314 個のマーカーが座乗する全長 1702.0 cM (マーカー間の平均距離 5.62 cM) の地図を、一方、AN 集団では、298 個のマーカーが座乗する全長 1619.0 cM (同 5.64 cM) の地図を作成することができた。両集団で認められた 71 本のアズキ型のバンドを共通マーカーとして、その分布状況をもとに、両地図を比較したところ、各連鎖群に 1~12 個の共通マーカーが座乗しており、UA 集団の第 1~第 11 連鎖群は、それぞれ AN の第 4、1、7、5、3、9、2、8、10、6 および第 11 連鎖群に対応していることが分かった。

組換え近交系世代と F<sub>2</sub> または F<sub>3</sub> 世代において作成された連鎖地図についても比較したところ、以下のことが明らかとなった。すなわち、UA 集団では、63 個の共通マーカーの分布状況から、本研究の第 3、4、5、6、7、8、9、10 および第 11 連鎖群は、それぞれ F<sub>3</sub> 世代の第 2、10、6、5、4、11、9、7 および第 12 連鎖群に対応していた。また、本研究の第 1 および第 2 連鎖群は、それぞれ、F<sub>3</sub> 世代の第 1 と第 14 連鎖群および第 3 と第 8 連鎖群を合わせたものと対応していた。同様に、AN 集団では、75 個の共通マーカーの分布状況から、本研究の第 2、3、5、8、9 および 10 連鎖群は、それぞれ F<sub>2</sub> 世代の第 6、1、7、10、9 および第 8 連鎖群に対応していた。また、本研究の第 6 および第 11 連鎖群は、F<sub>2</sub> 世代の第 5 連鎖群の一部分ずつの領域に対応しており、さらに、第 1、第 4 および第 7 連鎖群は、それぞれ、F<sub>2</sub> 世代の第 3 と第 12 連鎖群、第 4 と第 14 連鎖群および第 2 と第 13 連鎖群を合わせたものと対応していた。

## 第6章 総合考察

我が国には、十勝農試や生物研において、多数のアズキ在来品種やその野生種および近縁種などの遺伝資源が収集・保存されている。しかし、十勝農試を除くと、大規模にアズキ育種を行っている機関はなく、農林水産省登録品種の数も少ないのが現状であり、これらの遺伝資源が育種素材として有効に活用されているとはいえない。そこで、本研究では、それらを育種に有効利用するための基礎的知見を得る目的で、まず、日本国内 38 道府県から収集された在来アズキに加え、韓国、中国、台湾、ブータンおよびネパールにおいて収集された海外のものを用いて、種子貯蔵タンパク質の SDS-PAGE 分析、農業形質の調査および RAPD 分析により、それらの遺伝的変異を分析し、系統の地理的分布と変異との関係を解析した。また、アズキの野生種や近縁種が保持している有用遺伝子を導入し、新品種を育成するための基礎として、タケアズキとアズキおよびアズキとヒメツルアズキとの種間交雑に由来する 2 つの組換え近交系集団を用いて、RAPD マーカーによる高密度な連鎖地図を作成した。

在来アズキにおける遺伝的変異を解析した結果、系統間で大きな変異の存在することが明らかとなった。したがって、遺伝的多様性の小さい日本の主要品種（加賀ら 1993）の遺伝的基盤を拡大したり、新品種を育成したりするのに、このような在来アズキを利用することは有効であるといえる。また、本研究に供試した系統はその収集地域ごとに明確に特徴ある変異を示し、系統の地理的分布と変異との関係を明確にすることができた。このようなことは、どの地域にどのような変異を有する系統が存在しているかの目安となり、それらを遺伝資源として収集する際や育種目標やそれに適った変異を有する交雑親を選定する際に、有用な情報を提供できるものと考えられる。また、このような情報は core collection の開発にも役立つものと考えられる。本研究では、ブータン-ネパール地域の系統が、各解析において日本、韓国、中国および台湾の東アジア地域のものと著しく異なった特性を示すことを明らかにした。この理由については、明確にすることはできなかったが、ブータン-ネパール地域の系統を数

多く用いて、様々な側面から解析した研究事例はなく、今回、この地域の系統について得られた遺伝的変異に関する情報は、これらを育種に利用する際に、有用な知見となるものと考えられる。特に、この地域の系統と東アジア地域のものとの交雑に由来する雑種集団を用いることにより、分子マーカーによる種内レベルでの連鎖地図の作成が可能であることを示唆できた。このような地図が作成できれば、これからのアズキ育種の効率化をはかる上で、意義あることと考えられる。

在来アズキにおける変異の解析では、さらに、収集地域間で変異性の程度に差異が認められた。いずれの解析においても、日本の南西地域の系統において大きな変異性がみられ、ブータン-ネパール地域のそれらは最も小さな変異性を示した。アズキの栽培化の起源および多様性の中心は、一般的に、中国であると考えられている (Tasaki 1963, Yee et al. 1999) が、本研究では、各解析とも中国のものは 2 系統しか分析できず、その正確な遺伝的多様性を評価することはできなかった。しかし、本研究の一連の結果は、日本の南西地域も中国とともに多様性領域の一つである可能性を示した。また、種子貯蔵タンパク質の SDS-PAGE 分析では、日本およびブータン-ネパール地域の系統の中には、これらの地域に特異的なバンドパターンを示すものが存在していた。RAPD 分析においても、これらの地域には、特異的なバンドを有する系統が存在していた。このようなことは、中国以外の地域においてもアズキの栽培化が起きた可能性を示唆するものであり、Takeya and Tomooka (1997) が指摘しているように、各地域の野生アズキと栽培アズキの遺伝的関係を解析し、野生アズキの分布領域の中からアズキの栽培化の起源を再検討する必要があると思われる。

本研究に供試したような在来アズキをより有効に利用するためには、今後、餡への加工適性、様々な病虫害に対する抵抗性や収量性の検定など、より実用的な形質に関する解析が必要であると考えられる。

有用遺伝子を持つアズキの野生種や近縁種を育種素材として利用することは、幅広い遺伝資源を活用する観点から、意義あることと考えられる。本研究では、アズキゾウムシ (沢および Tan 1976, Tomooka et al. 2000) やアズキモザイクウイルス (沢ら 1984) に対する抵抗性を示して多収性 (Smartt 1990) の

タケアズキおよび莖疫病抵抗性遺伝子 (Kaga et al. 1996a) を有しているヒメツルアズキとの種間交雑に由来する 2 つの組換え近交系集団を用いて、それらの有用遺伝子の解析の基礎となる連鎖地図を作成した。両集団ともかなり多くの分離に歪みを生じたマーカーが検出されたが、アズキの基本染色体数と同じ 11 の連鎖群からなり、UA 集団では 314 個のマーカーが座乗する全長 1702.0 cM (マーカー間の平均距離 5.62 cM) の地図を、一方、AN 集団では、298 個のマーカーが座乗する全長 1619.0 cM (同 5.64 cM) の地図を作成することができた。これらの地図は、Kaga et al. (1996a, 2000) の分離世代のものとは比べ、座乗マーカー数が多く、マーカー間の平均距離も短い高密度なものとなっていた。しかし、連鎖群によっては、マーカー数が少なく、密度も粗なものも存在した。また、組換え近交系集団では優性マーカーも共優性マーカーとほぼ同様の分離様式を示すと考えられることから、本研究では RAPD マーカーだけで連鎖地図を作成した。しかし、これらの集団の形質調査では、胚軸色や種皮色などにおいて、系統内で分離が認められる場合があった。したがって、今後、これらの地図をより精密なものに仕上げるために、RFLP やマイクロサテライトなどの共優性マーカーも利用していく必要があるものと考えられる。

本研究では、各連鎖地図間の対応関係をつけることができた。本研究の組換え近交系世代における地図では、分離世代 (Kaga et al. 1996a, 2000) でのそれらに座乗していて RAPD マーカーのほとんどを検出でき、さらに本地図上に座乗させることができた。また、各連鎖群におけるマーカーの配列順序も概ね一致していた。さらに、UA および AN 集団に関する地図においても、共通のアズキの RAPD マーカーの分布から、両地図の対応関係を明確にすることができ、マーカー順序も概ね一致していた。したがって、本研究では、再現性の高い信頼ある地図を作成できたものと考えられる。

上記のように、本研究で作成した地図には、歪みを生じたマーカーが多く座乗していた。しかし、イネにおいて、Wu et al. (2000) は 66% の高い割合で分離に歪みを生じたマーカーを用いて連鎖地図を作成し、それを用いてアルミニウム耐性遺伝子の QTL 解析に成功している。したがって、本研究で作成した地図を用いて、タケアズキおよびヒメツルアズキが保持する有用遺伝子をも

ちろん、草丈や開花期など多くの形質について、それらを支配する遺伝子のマッピングやQTL解析を行うことができるものと考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、本学植物育種学研究室の上島脩志博士、三十尾修司博士および石井尊生博士には、終始、懇篤なるご指導およびご助言を賜り、ここに深く感謝の意を示します。また、植物の栽培、管理等でお世話いただきました本学農学部附属農場の保坂和良博士はじめ技官の方々に感謝申し上げます。さらに、京都府立大学の井上雅好博士、森重之先生および中西宏夫先生には、府立大学に在学の時より絶えまない激励、ご助言を賜り、ここに感謝の意を表します。

加賀秋人氏、山田哲也氏および平林泰平氏には、丁寧な実験指導および貴重なご助言を賜りました。ここに感謝の意を表します。野田千代氏、齋藤大樹氏および松浦敦子氏には、本研究を遂行するうえで、実験のサポートしていただきました。ここに感謝の意を示します。また、池田延行氏をはじめ、研究にご協力いただきました本学植物育種学研究室の大学院生ならびに学部生の皆様にも感謝する次第であります。

本研究を行うに際し、多数の貴重な種子を分譲して頂いた北海道立十勝農業試験場、農林水産省農業生物資源研究所、長野県中信農業試験場、高知大学および宮崎大学の関係各位に感謝の意を表します。本研究の遂行にあたり文部省（現、文部科学省）からの科学研究費補助金（課題番号 08456002）ならびに株式会社本高砂屋からの支援を得ました。ここに記して謝意を表します。

## 引用文献

- Abo-elwafa, A., K. Murai and T. Shimada (1995) Intra- and inter-specific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 90: 335-340.
- Ahmad, F. and A. E. Slinkard (1992) Genetic relationships in the genus *Cicer* L. as revealed by polyacrylamide gel electrophoresis of seed storage proteins. *Theor. Appl. Genet.* 84: 688-692.
- Bradshaw, H. D. and R. F. Stettler (1994) Molecular genetics of growth and development in *Populus*. II. Segregation distortion due to genetical load. *Theor. Appl. Genet.* 89: 551-558.
- Brown, J.W.S., Y. Ma, F.A. Bliss and T.C. Hall (1981) Genetic variation in the subunit of globulin-1 storage protein of French bean. *Theor. Appl. Genet.* 59: 83-88.
- Brown, J.W.S., T.C. Osborn, F.A. Bliss and T.C. Hall (1982) Beans Lectins. part 1: Relationships between agglutinating activity and electrophoretic variation in the lectin-containing G2/albumin seed proteins of French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Theor. Appl. Genet.* 62: 263-271.
- Chen, H.H., L.V. Gusta, C. Tjahjadi and W.M. Breene (1984) Electrophoretic characterization of adzuki bean (*Vigna angularis*) seed proteins. *J. Agric. Food Chem.* 32: 396-399.
- Cheng, R., A. Saito, Y. Takano and Y. Ukai (1996) Estimation of the position and effect of a lethal factor locus on a molecular marker linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 93: 494-502.
- 池主俊昭・島田尚典・今井悌三 (1991) アズキ遺伝資源の特性について. *育雑* 41 (別 2): 180-181.
- Doldi, M. L., J. Vollmann and T. Lelley (1997) Genetic diversity in

- soybean as determined by RAPD and microsatellite analysis. *Plant Breed.* 116:331–335.
- Draper, J. and R. Scott (1988) The isolation of plant nucleic acids. In “Plant genetic transformation and gene expression” Draper, J., R. Scott, P. Armitage and R. Walden (eds.), Blackwell Scientific Publications, London, 212– 214.
- Durante, M., R. Bernardi, M.C. Lupi and S. Pini (1989) *Phaseolus Coccineus* storage proteins. II. Electrophoretic analysis and erythroagglutinating activity in various cultivars. *Plant Breed.* 102: 58–65.
- Eujayl, I., M. Baum, W. Powell, W. Erskine and E. Pehu (1998) A genetic linkage map of lentil (*Lens* sp.) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 97: 83–89.
- Fatokun, C.A., D. Denesh, N.D. Young and E.L. Stewart (1993) Molecular taxonomic relationships in the genus *Vigna* based on RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 86: 97–104.
- Ford, R., E. C. K. Pang and P. W. J. Taylor (1997) Diversity analysis and species identification in *Lens* using PCR generated markers. *Euphytica* 96: 247–255.
- Fukuoka, S., K. Hosaka and O. Kamijima (1992) Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Jpn. J. Genet.* 67:243–252.
- Fulton, T. M., S. Grandillo, T. Beck–Bunn, E. Fridman, A. Frampton, J. Lopez, V. Petiard, J. Uhlig, D. Zamir and S. D. Tanksley (2000) Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentu* x *Lycopersicon parviflorum* cross. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1025–1042.
- Gepts, P. and F.A. Bliss (1988) Dissemination pathway of common bean

- (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from Phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. *Econ. Bot.* 42: 86-104.
- Gepts, P., K. Kbielik, P. Pereira and F.A. Bliss (1988) Dissemination pathway of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from Phaseolin electrophoretic variability. I. The Americas. *Econ. Bot.* 42: 73-85.
- Gepts, P., T.C. Osborn, K. Rashka and F.A. Bliss (1986) Phaseolin protein variability in wild form and landraces of common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. *Econ. Bot.* 40: 451-468.
- Heun, M., A. E. Kennedy, J. A. Anderson, N. L. V. Lapitan, M. E. Sorrells and S. D. Tanksley (1991) Construction of a restriction fragment length map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 34: 437-447.
- 星川清親 (1980) アズキ. “食用作物” 養賢堂, 東京, 460-471.
- 加賀秋人・保坂和良・木村忠彦・三十尾修司・上島脩志 (1993) Random amplified polymorphic DNA (RAPD)分析法のアズキとその近縁属への適用. 神大農研報 20:171-176.
- Kaga, A., T. Ishii, K. Tsukimoto, E. Tokoro and O. Kamijima (2000) Comparative molecular mapping in *Ceratotropis* species using an interspecific cross between azuki bean (*Vigna angularis*) and rice bean (*V. umbellata*). *Theor. Appl. Genet.* 100: 207-213.
- Kaga, A., M. Ohnishi, T. Ishii and O. Kamijima (1996a) A genetic linkage map of azuki bean constructed with molecular and morphological markers using an interspecific population (*Vigna angularis* x *V. nakashimae*). *Theor. Appl. Genet.* 93:658-663.
- Kaga, A., N. Tomooka, Y. Egawa, K. Hosaka and O. Kamijima (1996b) Species relationships in the subgenus *Ceratotropis* (genus *Vigna*) as revealed by RAPD analysis. *Euphytica* 88: 17-24.

- Kawahara, E. (1959) Studies on azuki bean varieties in Japan. Sci. Rep. Tohoku Agr. Exp. Sta. 15: 55-68.
- Keim, P., B. W. Diers, T. C. Olson and R.C. Shoemaker (1990) RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. Genetics 126: 735-742.
- Kesseli, R. V., I. Paran and R. W. Michelmore (1994) Analysis of a detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (Lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers. Genetics 136: 1435-1446.
- Kosambi, D. D. (1944) The estimation of map distance from recombination values. Ann. Eugen 12: 172-175.
- Lakhanpaul, S., S. Chadha and K. V. Bhat (2000) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis in Indian mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) cultivars. Genetica 109: 227-234.
- Lambrides, C. J., R. J. Rawn, I. D. Godwin, J. Manners and B. C. Imrie (2000) Two genetic linkage maps of mungbean using RFLP and RAPD markers. Aust. J. Agric. Res. 51: 415-425.
- Lander, E. S., P. Green, L. Abrahamson, A. Barlow, M. J. Daly, S. E. Lincoln and L. Newburg (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1: 174-181.
- Link, W., C. Dixkens, M. Singh, M. Schwall, A. E. Melchinger and P. Jaccard (1995) Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germplasm revealed by RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 91: 89-97.
- Lumpkin, T. A. and D. C. McClary (1994) Azuki bean - Botany, production and use-. Cab International, Cambridge, UK. pp.268.
- Maciel, F. L., L. T. S. Gerald, and S. Echeverrigaray (2001) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers variability among cultivars and landraces of common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) of

- south-Brazil. *Euphytica* 120: 257-263.
- Menendez, C. M., A. E. Hall and P. Gepts (1997) A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1210-1217.
- Metais, I., C. Aubry, B. Hamon, R. Jalouzot and D. Peltier (2000) Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101: 1207-1214.
- 森重之・山下道弘・高橋博久・中西宏夫 (1992) 京都府在来アズキにおける種子貯蔵蛋白質の電気泳動像変異. *育種*. 42 (別 2): 572-573.
- 村田吉平(1989) マメ類 (2) アズキ. “植物遺伝資源集成 第2巻” 松尾孝嶺監集, 講談社サイエンティフィック, 東京, 465-469.
- 村田吉平 (1999) エリモショウズおよび大粒・耐病性アズキ品種群の育成. *育種学研究* 1:173-179.
- 村田吉平・白井滋久・藤田正平・島田尚典・B. Shrestha・ T. Wangchuk (1995) ネパール・ブータンにおける小豆遺伝資源の収集とその特性. *育種・作物学会北海道談話会会報* 36:120-121.
- Obara-Okeyo, P. and S. Kako (1998) Genetic diversity and identification of *cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica* 99: 95-101.
- Paterson, A. H., E. S. Lander, J. D. Hewitt, S. Peterson, S. E. Lincoln and S. D. Tanksley (1988) Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335: 721-726.
- Raina, S. N., V. Rani, T. Kojima, Y. Ogihara, K. P. Singh and R. M. Devarumath (2001) RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* 44: 763-772.

- Samec, P. and V. Nasinec (1996) The use of RAPD technique for the identification and classification of *Pisum sativum* L. genotypes. *Euphytica* 89: 229-234.
- Santalla, M., J. B. Power and M. R. Davey (1998) Genetic diversity in mung bean germplasm revealed by RAPD markers. *Plant Breed.* 117: 473-478.
- 沢恩・T. S. Tan (1976) Phaseolus 属におけるアズキゾウムシ抵抗性の種間差異. 日作東北支部報 18: 79-81.
- 沢恩・八橋米太郎・月花喜一・坂本甚五郎 (1984) 種間雑種ツルアズキ x アズキについて. 第5報 後代系統に見られる耐病性など若干の特性について. 日作東北支部報 27: 94-95.
- Siriwardhane, D. Y. Egawa and N. Tomooka (1991) Cross-compatibility of cultivated adzuki bean (*Vigna angularis*) and rice bean (*V. umbellata*) with their wild relatives. *Plant Breed.* 107: 320-325.
- Smartt, J. (1990) Evolution and genetic resources. In "Grain legumes" Smartt, J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 140-175.
- Sokal, R. R. and C. D. Michener (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 38:1409-1438.
- Subramanian, V., S. Gurtu, R. C. Nageswara-Rao and S. N. Nigam (2000) Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Genome* 43: 656-660.
- Tasaki, J. (1963) Genecological studies in the azuki bean (*Phaseolus radiata* L. var. *aurea* Prain), with special reference to the plant types used for the classification of ecotypes. *Jpn. J. Breed.* 13:32-44.
- Takeya, M. and N. Tomooka (1997) The illustrated legume genetic resources database on the world wide web. *Vigna angularis*. In "Misc. Publ. Inst. Agrobiol. Resour. No. 11" National Institute of Agrobiological Resources, Ibaragi, 52-53.
- Tateishi, Y. (1984) Contributions to the genus *Vigna* (Leguminosae) in

- Taiwan I. Sci. Rep. Tohoku Univ. 4th ser. (Biology) 38: 335–350.
- Thompson, J. A., R. L. Nelson and L. O. Vodkin (1998) Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. *Crop Sci.* 38: 1348–1355.
- Tomooka, N., K. Kashiwaba, D. A. Vaughan, M. Ishimoto and Y. Egawa (2000) The effectiveness of evaluating wild species: searching for sources of resistance to bruchid beetle in the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis*. *Euphytica* 115: 27–41.
- Tomooka, N., C. Lairungreang, P. Nakeeraks, Y. Egawa and C. Thavarasook (1992) center of genetic diversity and dissemination pathways in mung bean deduced from seed protein electrophoresis. *Theor. Appl. Genet.* 83: 289–293.
- Tozuka, A., H. Fukushi, T. Hirata, M. Ohara, A. Kanazawa, T. Mikami, J. Abe and Y. Shimamoto (1998) Composite and clinical distribution of *Glycine soja* in Japan revealed by RFLP analysis of mitochondrial DNA. *Theor. Appl. Genet.* 96: 170–176.
- Wang, S. M., R. J. Redden, J. P. H. Jiapeng, P. J. Desborough, P. L. Lawrence and T. Usher. Chinese adzuki bean germplasm: 1. Evaluation of agronomic traits. *Aust. J. Agr. Res.* 52:671–681, 2001.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey (1990) DAN polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531–6535.
- Winter, P., A. M. Benko-Iseppon, B. Huttel, M. Ratnaparkhe, A. Tullu, G. Sonnante, T. Pfaff, M. Tekeoglu, D. Santra, V. J. Sant, P. N. Rajesh, G. Kahl and F. J. Muehlbauer (2000) A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* x *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for fusarium wilt races 4 and 5. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1153–1163.
- Wu, P., C. Y. Liao, B. Hu, K. K. Yi, W. Z. Jin, J. J. Ni and C. He (2000) QTL

- and epistasis for aluminium tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1295–1303.
- Yamaguchi, H. (1992) Wild and weed azuki beans in Japan. *Econ. Bot.* 46: 384–394.
- 山口裕文・小菅桂子 (1991) 野生アズキの分類評価 2. 種子貯蔵蛋白質変異から見た野生・雑草・栽培アズキの関係. *育雑.* 41 (別 2): 164–165.
- Yasuda, K. and H. Yamaguchi (1996) Phylogenetic analysis of the subgenus *Ceratotropis* (genus *Vigna*) and an assumption of the progenitor of azuki bean using isozyme variation. *Breed. Sci.* 46:337–342.
- Yee, E., K. K. Kidwell, G. R. Sills and T. A. Lumpkin (1999) Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. *Crop Sci.* 39:268–275.
- Xiao, J. H., J. M. Li, S. Grandillo, S. N. Ahn, L. P. Yuan, S. D. Tanksley and S. R. McCouch (1998) Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. *Genetics* 150: 899–909.
- Xu, R. Q., N. Tomooka and D. A. Vaughan (2000a) AFLP markers for characterizing the azuki bean complex. *Crop Sci.* 40: 808–815.
- Xu, R. Q., N. Tomooka, D. A. Vaughan and K. Doi (2000b) The *Vigna angularis* complex : Genetic variation and relationships revealed by RAPD analysis, and their implications for *in situ* conservation and domestication. *Genet. Resour. Crop Evol.* 47: 123–134.