

## 落花生育種における簡易シヨ糖分析の確立と高シヨ糖含有系統の選抜

桑田主税・黒田幸浩・清島浩之・長谷川 誠・鈴木 茂

キーワード：落花生，シヨ糖，バイオケミストリーアナライザー，分析精度，育種

### I 緒 言

千葉県の落花生は、栽培面積（2011年）が5,580haで全国の75%を占め、本県を代表する特産作物である。千葉県では1927年頃から品種育成を進め、現在の主要品種である「千葉半立」を1952年に、「ナカテユタカ」を1979年に育成している。現在は、収量、莢の外観品質、食味などが優れていることを主たる育種目標にしている。

落花生の食味について、屋敷・高橋（1983）は、子実の硬さと食味及び甘味と食味の間、さらに官能評価による甘味とシヨ糖含量の間には高い相関があり、シヨ糖含量が食味の一指標となり得ることを示した。

落花生子実中のシヨ糖含量は、熱アルコール抽出を行った後、液体クロマトグラフィーで測定する方法が一般的である（鈴木，1996）。この方法は前処理などが煩雑であり、通常24点当たり2日間を要する。

現在、落花生育種には集団育種法を用いており、 $F_5$ ～ $F_6$ 世代に1,500個体前後の集団の中から、生育、収量、子実品質が良好な数十個体を選抜している。初期段階の数十～数百の個体の中から高シヨ糖含有個体を迅速かつ簡便に選抜することができれば、育種効率は高まるものと考えられる。また、1個体当たりの採種数は30～50粒で、次年度の系統育成試験等には最低25粒の種子を供している。よって、次年度種子を確保するために、最低5粒程度で分析できることが必要とされる。

バイオケミストリーアナライザーは固定化酵素膜センサーを使用した迅速測定が可能な成分分析機で、主に、食品及び医薬分野などで用いられている。原理は、膜に固定された数種の酵素により測定物質に反応して過酸化水素を生成させ、その量を電気プローブで測定する。本試験ではこの分析機を用い、簡易な水抽出による前処理のみで落花生子実のシヨ糖含量を測定する方法を確立した。さらに、 $F_6$

世代からの個体選抜時に本法を適用し、高シヨ糖含有系統を選抜することができたので報告する。

### II 材料及び方法

#### 1. 分析条件

(1)抽出時間が分析値に及ぼす影響

自然乾燥した落花生子実（品種：「ナカテユタカ」）を1昼夜70℃で通風乾燥させ、種皮を除去した後、分析に用いた。試料の粉碎は、ハンディフードプロセッサー（Bamix M200, Cherry Terrace Inc.）を用い、粒子が1mm以下になるまで15～20秒間粉碎した。試験管に粉碎物1gを秤量し、蒸留水10mLを加え、10秒間試験管ミキサー（TM-2F, ㈱アズワン）で攪拌し、静置した。以降、30分毎に1回10秒間攪拌し、抽出液をメッシュフィルター（100 $\mu$ m, Partec Inc.）でろ過し、このろ液を試料としてバイオケミストリーアナライザー（YSI-2700, ㈱フェニックスサイエンス）でシヨ糖含量を測定した。同一の粉碎物を用いて18本の試験管に抽出液を作り、30～180分までの30分毎に3本ずつ攪拌前のろ液におけるシヨ糖含量を測定した。

(2)試料量が分析値に及ぼす影響

試料として(1)で得た粉碎物を用い、それぞれ0.25g, 0.5g, 1g, 2g秤量し、蒸留水10mLを加えて、(1)の方法で120分抽出した後、ろ液を作製し、シヨ糖含量を測定した。これを繰り返し4回行った。

(3)従来法との比較

2011年5月25日播種の「ナカテユタカ」, 「千葉半立」, 「関東113号」及び「関東114号」と、6月15日播種の「関東114号」の子実を収穫し、分析に供した。なお、各品種・系統とも開花期後日数を目安とした適期に収穫した。簡易分析法では5粒ずつ4回繰り返して(1)の方法で120分抽出した後、ろ液を作製し、シヨ糖含量を測定した。

従来法である高速液体クロマトグラフィーによる分析は、(財)日本食品分析センターに委託した。各品種・系統毎に20gを試料として、熱アルコール抽出を行った後、高速液体クロマトグラフィーにより定量した。

#### 2. 育種選抜時における簡易シヨ糖分析の利用

2004年6月4日に $F_6$ 世代の1交配組合せ（「千交346」:母本

受理日2012年8月8日

本報は、農林水産省育種指定試験事業及び新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「食料自給率向上を目指した豆類優良品種の育成」（2011年度～）の一環として実施した。

「郷の香」, 父本「関東96号」)を約1,500粒播種した。開花期後75日前後に、全株を掘り上げ、草姿、着莢状態を中心に、圃場で85株を選抜、収穫した。自然乾燥後、莢・子実重、品質などを調査し、各株の上実3~5粒を試料として、(1)の方法で120分抽出した後、ろ液を作製し、シヨ糖含量を測定した。

2011年、交配番号「千交346」の選抜後代F<sub>13</sub>である「関東114号」, 対照品種「ナカテユタカ」及び「千葉半立」の自然乾燥した子実を供試し、(1)の方法でシヨ糖分析を行った。子実は莢の裏側の着色状況(長谷川ら, 2011)により、未熟~やや未熟、適熟~やや過熟の2段階に分け、2粒莢のうち子房柄側の基豆1粒ずつ各品種・系統12粒を分析に供した。また、収穫時期を同一とするため、早生の「関東114号」, 「ナカテユタカ」は9月26日及び29日に収穫した晩播区(播種日:6月15日), 晩生の「千葉半立」は9月29日に収穫した早播区(播種日:5月9日)の子実を用いた。圃場条件、施肥量、栽植様式は同一とした。

### Ⅲ 結果及び考察

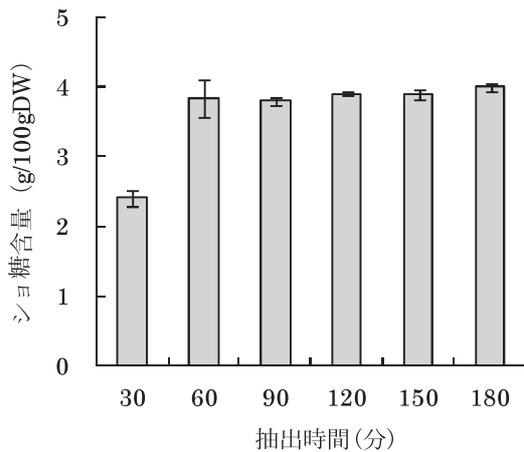
#### 1. 分析条件

##### (1)抽出時間が分析値に及ぼす影響

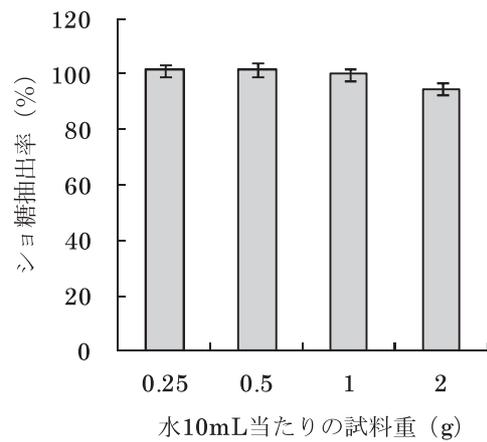
抽出時間とシヨ糖含量の関係を第1図に示した。30分ではろ液中の分析値はまだ低く、60分で頭打ちとなり、90分以降の値はほとんど変わらなかった。ただし、60分では値のばらつきが大きく、これは抽出液の攪拌が不十分で、ろ液中のシヨ糖濃度が不均一であったと考えられた。抽出時間は最低でも90分必要であると判断された。

##### (2)試料量が分析値に及ぼす影響

水抽出時における蒸留水10mL当たりの試料重を0.25~2gに変えてシヨ糖含量を測定し、1gの平均値を100とした場合の抽出率を第2図に示した。その結果、0.25~1gまでは100%近い抽出率となり、高い再現性が認められた。一方、2gでは抽出率が低く、水10mLに対して試料2gは多すぎであり、十分な攪拌及び抽出ができていないと考えられた。なお、子実の粉碎物を秤量する時の作業性及び精度の



第1図 抽出時間とシヨ糖含量の関係  
注) バーは標準偏差 (n=3).



第2図 水10mL当たりの試料重とシヨ糖抽出率の関係  
注1) 抽出率は1g区におけるシヨ糖含量の平均値を100とした値。  
2) バーは標準偏差 (n=4).

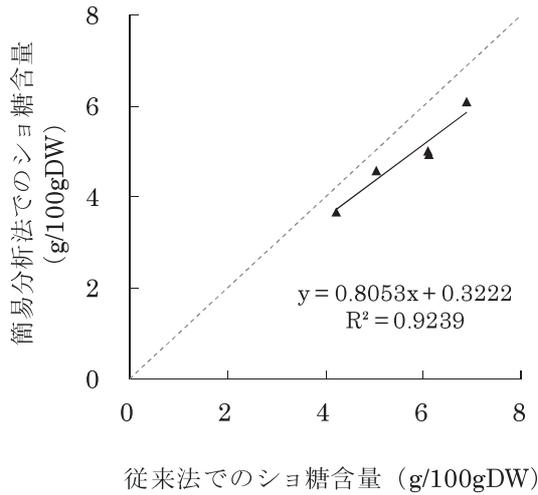
第1表 分析法別のシヨ糖含量

品種・系統名	播種日	収穫日	成熟日数 (開花期後日数)	シヨ糖含量(g/100gDW)	
				従来法	簡易分析法
関東113号	5月25日	9月20日	80	4.21	3.69 ± 0.38 c
関東114号	5月25日	9月16日	74	6.08	5.03 ± 0.41 b
関東114号	6月15日	9月26日	74	6.87	6.11 ± 0.34 a
ナカテユタカ	5月25日	9月20日	79	5.02	4.60 ± 0.46 b
千葉半立	5月25日	10月5日	92	6.10	4.96 ± 0.27 b

注1) 従来法は高速液体クロマトグラフィーで各20gを分析。

2) 簡易分析法はバイオケミストリーアナライザーで5粒ずつ4回繰り返して測定。数値は平均±標準偏差。

3) 簡易分析法によるシヨ糖含量の異なる文字間には5%水準で有意差あり (Tukey-Kramer法)。



第3図 従来法と簡易分析法の比較

観点から、0.25g未満の分析は実用的ではないと判断した。

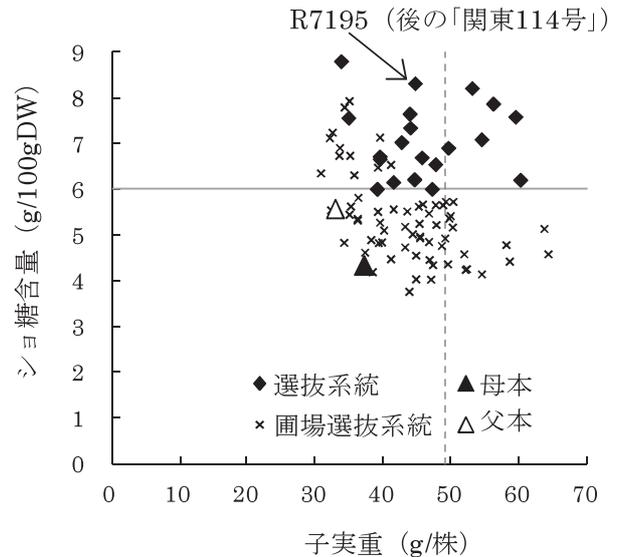
日本で栽培されている落花生品種は大粒種がほとんどであり、黒田ら（2011）によると、国内で育種に利用されることが多い主要な遺伝資源の百粒重は、34～133gであった。今回の試験において0.25g以上で再現性が高かったことで、粉碎時のロスが30%程度としても、子実1粒ごとに分析が可能であることが明らかとなった。

### (3)従来法との比較

品種・系統、播種日が異なる5試料を供して、高速液体クロマトグラフによる従来法との比較を行った結果を第1表に示した。シヨ糖含量は6月15日播種の「関東114号」が従来法と簡易分析法ともに最も高く、「関東113号」が低かった。

回帰分析の結果を第3図に示した。従来法と簡易分析法には $y=0.8053x+0.3222$ 、決定係数 $R^2=0.924$ の関係があった。品種・系統や収穫時期の異なる試料間でも高い相関が認められた。簡易分析法によるシヨ糖含量がやや低いが、これは水抽出の場合、シヨ糖が完全に溶出しておらず、子実中のシヨ糖全量を計測していないと考えられた。今回の目的は、系統間のシヨ糖含量の比較を簡易に行うこととしているので、分析の簡易さから実用性は高いと判断される。よって、品種・系統の形質の一つとしてシヨ糖含量を表示する場合は、簡易分析法ではなく従来法による分析値を用いるべきである。

簡易分析に要する時間は、粉碎時間を含めて、72点を8時間程度で分析できた。高速液体クロマトグラフィーで測定する従来法は、前処理を含めて通常24点当たり2日間を要するので、簡易分析法は約1/6の所要時間で分析が可能となった。



第4図 F<sub>6</sub>個体選抜における子実重とシヨ糖含量の分布

## 2. 育種選抜時における簡易シヨ糖分析の利用

F<sub>6</sub>世代において、圃場選抜した85個体の子実重とシヨ糖含量の関係を第4図に示した。子実重は30.8～64.3g/株、シヨ糖含量は3.77～8.80g/100gDWに分布した。母本「郷の香」、父本「関東96号」のシヨ糖含量はそれぞれ4.35、5.36g/100gDWであり、分析した系統の半数以上が両親に近いシヨ糖含量であったが、両親より高い系統も多く存在した。個体選抜においてはシヨ糖含量6g/100gDW以上で、莢実収量、外観品質に優れる20株を選抜系統とした。なお、その後に選抜を重ねて「関東114号」となった系統「R7195」は、F<sub>6</sub>個体選抜時のシヨ糖含量8.32g/100gDWで、選抜系統の中では2番目に高かった。

F<sub>6</sub>で選抜した20系統は、F<sub>7</sub>では圃場で生育、収量、品質等で選んだ12系統について5株ずつ簡易分析法でシヨ糖含量を測定し、5系統を選抜した。同様にF<sub>8</sub>では5系統65株、F<sub>9</sub>では3系統40株、F<sub>10</sub>では2系統20株、F<sub>12</sub>までに累計295株を簡易分析して、F<sub>13</sub>で最終的に、生育、収量、品質に優れ、なおかつ高シヨ糖含有系統「関東114号」を選抜することができた。これらの点数の成分分析を従来法で行うと、外部委託で1点当たり18,000円と、多額の費用がかかり、また分析時間も25日間と計算され、自前で分析するにも現実的ではなかったが、本簡易分析法を取り入れることで可能となった。

従来のF<sub>6</sub>における個体選抜では、収量と莢子実の外観品質などを重視しており、シヨ糖分析はF<sub>9</sub>世代以降に系統数を1～3点に絞り込んでから実施していた。今回のF<sub>6</sub>個体選抜でこれまでのように子実重の上位20系統を選ぶと、シヨ糖含量6g/100gDW以上は6系統のみ（第4図破線の右側）であり、高シヨ糖含有系統の割合は少なく、今回選抜できた「関東114号」は選ばれなかった。本簡易分析法の

第2表 熟期別のシヨ糖含量

品種・系統名	シヨ糖含量(g/100gDW)	
	未熟～やや未熟粒	適熟～やや過熟粒
関東114号	5.41 ± 0.61 a	5.16 ± 0.52 a
ナカテユタカ	4.46 ± 0.65 b	4.39 ± 0.62 b
千葉半立	4.00 ± 0.75 b	4.35 ± 0.72 b

注1) 簡易分析法により1粒ずつ各12粒分析。  
数値は平均±標準偏差。

2) 異なる文字間には5%水準で有意差あり  
(Tukey-Kramer法)。

適用により選抜初期から高シヨ糖含有系統だけを残すことで、不要な系統の育成を減らし、育種効率を高めることができた。

2011年におけるF<sub>13</sub>世代の「関東114号」と対照品種「ナカテユタカ」及び「千葉半立」の熟期別のシヨ糖含量を第2表に示した。莢の熟期にかかわらず「関東114号」のシヨ糖含量が有意に高かった。屋敷・高橋(1984)は、開花期後日数の経過とともに食味、甘味及びシヨ糖含量は低下し、軟らかくなる傾向が認められ、収穫適期は開花期後日数で「ナカテユタカ」は80日、「千葉半立」は95日であることを報告した。落花生の莢殻の裏側は、成熟とともに茶褐色に着色してくるので、本試験では莢裏が白い未熟～やや未熟と、着色した適熟～やや過熟の2段階に分けて、子実ごとに簡易分析法でシヨ糖含量を分析した。その結果、各品種・系統でいずれの熟期においても値はほとんど変わらず、低下する傾向は認められなかった。本試験で分析した、莢裏から判断した未熟からやや過熟の範囲の子実であれば、「関東114号」は既存品種に比べて高シヨ糖含有系統であることが明らかとなった。

鈴木(1996)は、標準播種と晩播では、晩播の方がシヨ糖含量は高くなり、収穫後の気象環境などによる乾燥条件が食味に大きく影響することを示した。本試験で「関東114号」は晩播においてシヨ糖含量が高くなり、鈴木との報告と一致した(第1表)。今回は、同一の収穫時期しか対照品種との比較調査をしていないが、今後は、播種時期、収穫時期、成熟日数を変えて、より詳細にシヨ糖含量を調査する必要がある。

#### IV 摘要

落花生の良食味品種の育成において、高シヨ糖含有系統を選抜するための、簡易な水抽出法による分析条件を確立するとともに、育種選抜時における簡易分析法の適用を試みた。

1. 粉碎試料に10倍量の蒸留水を加えて時々攪拌させ90分抽出させた後、ろ液を固定化酵素膜センサーで測定することで、落花生子実のシヨ糖含量の簡易な分析ができる。
2. 抽出液10mL当たりの試料重は0.25～1gで再現性は高く、落花生子実1粒でも分析が可能であった。
3. F<sub>6</sub>世代からの選抜で簡易分析法を用いることにより、F<sub>13</sub>世代で対照品種「ナカテユタカ」及び「千葉半立」より高いシヨ糖含量の「関東114号」を選抜することができた。

#### V 引用文献

- 長谷川 誠・桑田主税・清島浩之・鈴木 茂(2011) 豆類の栽培と利用(国分牧衛編)3章ラッカセイ-収穫適期判定. pp171-172. 朝倉書店. 東京.
- 黒田幸浩・桑田主税・長谷川 誠・鈴木 茂(2011) 落花生における主な遺伝資源の生育、収量及び病害抵抗性. 千葉農林総研研報4:141-146.
- 鈴木一男(1996) 落花生の栽培環境が品質、食味に及ぼす影響(第1報) 播種期の早晩と品質との関係. 千葉農試研報37:43-49.
- 屋敷隆士・高橋芳雄(1983) 落花生の栽培条件と品質(第1報) 食味に関する要因及び子実硬度の検定法. 千葉農試研報24:43-48.
- 屋敷隆士・高橋芳雄(1984) 落花生の栽培条件と品質(第2報) 開花期後日数と品質との関係. 千葉農試研報25:55-60.

## Establishment of Simplified Sucrose Analytical Method for Peanut Breeding and Selection of High-sucrose-content Cultivar

Chikara KUWATA, Sachihiro KURODA, Hiroyuki KIYOSHIMA,  
Makoto HASEGAWA and Shigeru SUZUKI

Key words : peanut, sucrose, biochemistry analyzer, analytical precision, breeding

### Summary

To breed high-quality peanuts (*Arachis hypogaea L.*), we established a simplified method of analyzing sucrose content by water extraction. We then applied the method mass selection for breeding.

1. We added a powdered peanut sample to 10 times the amount of distilled water, mixed the sample, and then let it stand for at least 90 min. The sucrose content could then be analyzed easily by quantifying the filtrate using biochemistry analyzer with an immobilized enzyme sensor technology.
2. The method was able to quantify sucrose at 0.25 to 1 g/10 mL extraction water and single-seed analysis.
3. By using this simplified method on F<sub>6</sub> mass selections, we were able to select the high-sucrose-content line 'Kantou-114' by comparison with 'Chiba-handachi' and 'Nakate-yutaka' in the F<sub>13</sub> generation.