



九州におけるソバ遺伝資源の諸特性の品種間差異および機能性の選抜法に関する研究

森下, 敏和

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2004-04-23

(Date of Publication)

2010-06-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2761

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002761>

※ 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。



神戸大学博士論文

九州におけるソバ遺伝資源の諸特性の品種
間差異および機能性の選抜法に関する研究

平成16年2月

森 下 敏 和

— 目次 —

第1章 緒言	— 1
第2章 普通ソバ遺伝資源の特性評価	— 4
第1節 九州における普通ソバの農業関連形質の年次変動と品種間差異	— 4
1) 材料および方法	— 4
2) 結果	— 6
3) 考察	— 14
第2節 九州における普通ソバ子実のルチン，粗蛋白および粗脂肪含量の 品種間差異	— 17
1) 材料および方法	— 17
2) 結果	— 19
3) 考察	— 25
第3章 普通ソバ子実のラジカル消去能の測定法の開発と遺伝資源の評価	— 29
第1節 普通ソバ子実のラジカル消去能の簡易測定法の開発	— 29
1) 材料および方法	— 29
2) 結果	— 31
3) 考察	— 34
第2節 九州で栽培，収穫された普通ソバ子実のラジカル消去能の 品種間差異	— 36
1) 材料および方法	— 36
2) 結果	— 38
3) 考察	— 41

第4章 ダッタンソバ遺伝資源の特性評価およびルチン分解酵素の 検出法の開発	―― 4 3
第1節 九州におけるダッタンソバの特性評価	―― 4 3
1) 材料および方法	―― 4 3
2) 結果および考察	―― 4 4
第2節 ソバにおけるルチン分解酵素の分光光度計による簡易測定法の開発	―― 4 9
1) 材料および方法	―― 5 0
2) 結果および考察	―― 5 3
第3節 普通ソバとダッタンソバのルチン分解酵素活性の核磁気共鳴法 による検出	―― 5 5
1) 材料および方法	―― 5 5
2) 結果および考察	―― 5 7
総合考察	―― 6 4
摘要	―― 6 8
謝辞	―― 7 1
引用文献	―― 7 2
S u m m a r y	―― 7 8

第1章 緒言

ソバはタデ科に属する1年生の草本植物である。原産地は中国雲南地方とされている。主要穀物の多くがイネ科に属するのに対してタデ科であるソバは雑穀として扱われている。ソバには十数種類の近縁種があるが、食用に栽培されているのは普通ソバ (*Fagopyrum esculentum*. Moench) とダツタンソバ (*Fagopyrum tartaricum*. Gaertn) の2種で、一般にソバと言えば特に断りのない限り普通ソバを指す。

ソバは九州から北海道にかけて全国各地で栽培されており、様々な生態型を有する在来種が存在する。それらの生態型は地域により異なる。北海道では長日高温下で結実する夏型品種が、九州では短日下で結実する秋型品種が、本州では両者の中間型が主に栽培種として用いられている。そしてこれら夏型・中間型・秋型は主要形質の主成分分析の結果、連続的であること (大澤・堤, 1994; 大澤, 1997), すなわち各地域に適した在来種が存在することが示されている。このように地域に密着した在来種が存在することに加えて、環境適応性が大きく痩地や寒冷地でも栽培可能であること、生育期間が短いこと等により平坦地から高冷山間地において輪作作物あるいは水田転換畑、牧草地あるいは桑園からの転換畑等様々な場面で栽培されている。現在ソバの国内生産量は約2万トンで輸入量は約10万トンである。国内の栽培面積は約2.5万ha, すなわち収量の全国平均は10 kg/a 以下でこの水準は明治時代からほとんど変わっておらず、他の作物と比べると低収量であり、さらには収量は年次により変動しやすい。その要因として、これまで育種による改良が十分でなかったことが大きい。さらにソバは冷涼な気候を好む一方で降霜には極めて弱いこと、耐湿性が弱いこと等があげられる。特に播種直後の過湿は出芽率に、幼苗期は初期生育の抑制となり、ソバは生育期間が短いため生育初期段階の生育の遅れは収量に大きな影響を及ぼす。湿害は減反政策以降の生産量の半分余りを占める水田転換畑の問題でもある。その他にも倒伏しやすいこと、他殖性であること等様々な点があげられている。ソバの安定多収は育種や栽培技術分野における課題である (西牧, 1983; 本田, 2000)。

近年ソバは健康食品あるいは機能性食品として消費者に広く認知されている。消費者の本物志向の高まりもあり質、量の面で特に国産ソバの需要は高い。このような背景もあり、ソバの持つ健康機能性が見直され改めて評価されつつある。イネ科の穀物と比較してタンパク質が多くリジン含量が高く、ソバタンパク質のアミノ酸スコアについては大豆タンパク質よりも高く良質である。食物繊維およびミネラルも多いが、逆に炭水化物は少ないと

いう特徴を有する。ビタミン類に関しても B₁, B₂ さらにはビタミン P とされているルチンを多く含む。ルチンは血管を強化する作用があり、近年ソバに含まれる機能性物質として注目を集めている（金谷, 2000 ; 辻, 2000）。その他ビタミン E, カテキン等の抗酸化物質も明らかにされつつある（Watanabe et al., 1997 ; Watanabe, 1998）。さらにアンジオテンシン阻害能, 降コレステロール作用などの様々な生理活性を有する（辻, 2000）。一方でこれらの生化学あるいは栄養学的な成果の育種, 栽培分野への取り込みは着実に進展しつつある。特にルチンに関しては品種間差異, 環境変動の解明および高ルチン品種の育成等の成果が上がっている（Kitabayashi et al., 1995ab ; Ohsawa and Tsutsumi, 1995ab ; Minami et al., 2001）。

もう一つの栽培種であるダッタンソバは特有の苦味を有することから苦ソバとも呼ばれる。普通ソバと異なり自殖性であるため収量は高い。もともと国内には無かった種で, 栽培されている品種は海外から導入されたものである。現在普通ソバと比較して栽培は僅かであるが, 普通ソバの約 100 倍のルチンを含むことから今後の新規作物として有望視されている。

これまで国内におけるソバ研究の大部分は北海道あるいは関東甲信越地方以北で行われており, 研究対象も夏型あるいは中間型品種に関してであった（外川ら, 1985 ; 沢ら 1985 ; 林ら, 1989 ; 小木曾ら, 1989 ; 林ら, 1990 ; 犬山ら, 1994 ; 本田ら, 1994 ; 大川ら, 1995 ; 山浦・吉川, 1995）。九州の平均収量は約 15 kg/a で他の地域と比較してソバの収量は高いが, 九州の栽培環境と各品種の生育反応との関係, および九州で主に栽培されている秋型品種に関する研究は少ない。今後九州のソバの生産量の増大のためには生産量の安定と九州産のソバの需要拡大が必要である。それには安定多収品種の育成や栽培技術の確立および需要の拡大をもたらす高品質化を図らなければならない。そのためには九州のソバ品種の特性および栽培環境の影響について明らかにする必要がある。さらに将来はダッタンソバの導入を視野に入れた栽培体系を構築することも選択肢の一つとして考えられる。本研究はこれらの課題を受けて今後の九州のソバ栽培の発展のための基礎資料を提供し, 今後の九州のソバの研究方向を定めることを目的として推進された。

本研究は, まず様々な遺伝資源を栽培評価して九州の温暖な環境がソバの農業関連形質や成分特性にどのような影響を及ぼしているか, および九州の秋型在来種の生態型の有利性について明らかにすることを目的とした。それにより九州に適した新品種を育成する際に付与すべき特性について考察した。次にソバの機能性として抗酸化能に着目して, その

簡易迅速な測定法の開発，さらに様々な遺伝資源を評価して内外の遺伝資源の抗酸化能に関する変異について明らかにすることを目的とした．その結果，今後の機能性成分育種の手法が確立され，さらに普通ソバ遺伝資源の抗酸化能に関する基礎データが得られた．最後に現時点においても栽培事例の少ないダッタンソバについて九州における栽培適性を評価して，新規導入作物としての可能性を検討するとともにダッタンソバの苦味の発生の原因とされるルチン分解酵素のスクリーニング法を開発し，ダッタンソバの高品質化につながる同酵素の欠失系統の選抜法の確立を目的とした．さらにダッタンソバの将来性や解決すべき課題について考察した．

第2章 普通ソバ遺伝資源の特性評価

第1節 九州における普通ソバの農業関連形質の年次変動と品種間差異

ソバは環境適応性が大きく生育期間が短いため中山間地の輪作作物あるいは水田転作作物として栽培されている。さらに最近、ソバを栽培し、ソバ加工品を特産品として販売する町村の増加などにより生産量はわずかながら増加傾向にある。一方で、国産ソバは輸入ソバと比較して風味が良いということで高い評価を受けていること、健康食として食品科学的知識が広く消費者に知れ渡ったことなどにより国内の消費量は増加傾向にある。しかし消費の約8割の原料は中国、カナダ、アメリカなどからの輸入によって占められている。

九州は北海道に次ぐソバの生産地であるが、九州におけるソバの研究報告は少ない。長友ら（1982）により4倍体品種「みやざきおおつぶ」が育成された以降は同品種を用いて播種時期、栽植密度など栽培法に関する報告が散見されるようになった（森藤ら，1984；宮下ら，1990）。しかしながらソバは生態型が多様であり、限られた品種のみの調査では九州のソバ栽培の特色を明らかにするには不十分である。品種比較研究については古明地ら（1984）の報告があるが、供試材料は西日本の品種が中心であることや年次間の影響について検討されていないなど必ずしも十分ではない。九州においては8月中旬から9月上旬に播種し11月から12月にかけて収穫する秋ソバ栽培が中心であり、実際これまでのソバの播種時期についての研究は8月から9月の範囲が大部分であった（森藤ら，1984；宮下ら，1990）。しかしながら近年、暖地の春先の温暖な気象を利用した夏ソバ栽培について研究が見受けられるようになった（杉本・佐藤，1999；手塚ら，2000）。本研究は1995年から1997年の3年間、九州農試（熊本県西合志町）において秋栽培の条件下でソバ遺伝資源の農業形質などの特性を調査した。また1995年は4月下旬の春播き栽培（夏栽培）についても検討した。その結果、九州におけるソバ遺伝資源の各農業形質の特徴および九州の在来種に関する知見が得られた。

1) 材料および方法

実験は九州農業試験場の畑作試験圃場（黒ぼく土）で行った。1995年は4月下旬播種初夏収穫の夏栽培（以下夏栽培とした）と8月下旬播種の秋栽培（以下秋栽培とした）、1996年と1997年は秋栽培のみである。1995年の夏栽培は日本、アメリカ、カナダ、ロシ

アおよび中国の普通ソバの品種 40 点を 4 月 27 日に播種した。同年の秋栽培は日本、アメリカ、カナダ、ロシアおよび中国の 76 点を 8 月 23 日に播種した。1996 年は日本、カナダおよび中国の 38 点を 8 月 22 日播種、1997 年は日本、カナダ、中国、パキスタン、およびネパールの 62 点を 8 月 27 日に播種した。各年とも畝幅 60 cm × 株間 6.5 cm で条播し、本葉が 2 ～ 3 枚展開した頃に間引いて 1 本仕立てにした (25.6 株/m²)。1 区面積は 7.2 m²、試験区の配置は乱塊法、2 反復とした。施肥量は全量元肥とし、1995 年は窒素、リン酸、カリそれぞれ成分量として 1.1 g/m², 3.5 g/m², 3.0 g/m², 1996 年と 1997 年は 1.1 g/m², 1.7 g/m², 1.7 g/m² とした。また 3 年とも各作付け前に土壌改良材として苦土石灰 50 g/m², 燐 30 g/m² を投入した。成熟期にそれぞれの区の中央部から 1 区当たり 40 本刈り取り、その内中庸な個体を 10 本選び草丈、主茎節数、一次分枝数などの形態調査に供試した。その後 40 本は 2 週間以上風乾して全重を測定した後脱穀し、果皮の付いた子実を収量と千粒重の調査に供試した。全重、収量および千粒重は自然乾燥後水分込みの値で示した。なお、1995 年の夏栽培は梅雨期に成熟期を迎えたことにより穂発芽が多発したため穂発芽率を調査した。穂発芽率はそれぞれの区から 100 粒を抜き取り発芽粒を選別して算出した。1995 年の秋栽培は一部の品種が成熟期に達しなかったため、播種日から 90 日目に収穫し、生育期間を 90 日として扱った。また 1997 年は 10 月 28 日に霜害、10 月 31 日に凍害を受けたため、その時点で成熟期に達していなかった材料については登熟不良などの影響が認められた。得られた果皮付きの子実は、1995 年は国光社 (株) の小型製粉器 (やまびこ号 L 型) により、1996 年と 1997 年はブラベンダーテストミル (クオドルマット・ジュニア型、ブラベンダー、ドイツ) により製粉し、60 メッシュの篩を通過した粉について重量を測定した。果皮率は篩に残った果皮重と子実重の比率から、製粉歩留は得られた粉重と子実重の比率から算出した。各形質の分散分析は夏栽培と秋栽培、および 3 年間のデータをもとにした処理・年次 2 元配置法で行った。遺伝率は分散分析の結果、得られたそれぞれの平均平方、品種 (MS_v)、年次 (MS_y)、交互作用 (MS_{y × v})、反復 (MS_r) および誤差 (MS_e) より、三留 (1960) の方法でそれぞれの分散、品種 (σ^2_v)、年次 (σ^2_y)、交互作用 ($\sigma^2_{y \times v}$)、反復 (σ^2_r) および誤差 (σ^2_e) を下記の式で算出して推定した。

$$E[MS_v] = \sigma^2_e + v \sigma^2_r + r v \sigma^2_y$$

$$E[MS_r] = \sigma^2_e + v \sigma^2_r$$

$$E[MS_y] = \sigma^2_e + r y \sigma^2_v + r \sigma^2_{y \times v}$$

$$E[MS_{y \times v}] = \sigma^2_e + r \sigma^2_{y \times v}$$

$$E[MS_E] = \sigma^2_E$$

品種数 v , 反復数 r , 年数 y とした.

以上の式をで得られた分散から下記の式で遺伝率 h^2 を推定した.

$$E[h^2] = \sigma^2_w / (\sigma^2_w + \sigma^2_v + \sigma^2_y \times v + \sigma^2_E)$$

また各形質間の相関および年次間相関についても計算した.

2) 結果

(1) 夏栽培と秋栽培の比較

夏栽培で供試した 40 点中成熟期に達したのは 29 点, また 40 点の内夏栽培と秋栽培に共通して供試したのは 26 点で, その内成熟期に達した 24 点について秋栽培と比較した. それらの成熟期, 草丈, 収量, 千粒重および夏栽培の穂発芽率について第 1 表に示した. 秋栽培は夏栽培と比較して収量が大きく, 夏栽培で最も大きかったのは「しなの夏そば」が 8.0 kg/a であったのに対して, 秋栽培の「しなの夏そば」は 13.4 kg/a であった. 「在来種 (五戸)」の秋栽培はさらに大きく 15.2 kg/a であった. その他草丈, 主茎節数, 千粒重

第1表. 1995年の夏栽培と秋栽培の成熟期, 草丈, 収量, 千粒重および夏栽培の穂発芽率.

原産地	成熟期（月・日）		草丈（cm）		収量（kg/a）		千粒重（g）		穂発芽率	
	夏	秋	夏	秋	夏	秋	夏	秋	(%)	
牡丹そば	北海道	7. 5	10. 23	76.0	55.4	6.0	9.7	27.3	28.2	3.0
在来種（五戸）	青森	7.12	11. 9	69.9	69.4	4.1	15.2	23.4	32.7	11.0
階上早生	青森	7.12	10. 30	74.0	71.2	4.4	14.2	25.0	33.3	1.5
岩手農試（選）	岩手	7.10	10. 25	65.5	60.9	2.7	8.2	17.0	33.4	15.0
岩手農試（選）	岩手	7.10	10. 23	68.9	61.7	3.0	7.7	22.8	31.9	10.0
在来種（岩手本場）	岩手	7. 6	10. 25	62.6	60.9	3.0	8.9	22.6	32.8	2.5
滝沢在来	岩手	7.10	10. 29	59.0	69.1	3.1	14.8	20.6	30.7	13.0
滝沢在来	岩手	7.10	10. 29	63.5	65.9	4.5	14.9	25.4	31.7	2.5
在来種（車門）	岩手	7.10	11. 9	57.6	68.4	2.3	9.9	20.9	34.4	5.5
外山在来	岩手	7. 6	11. 8	60.5	62.6	3.4	9.2	23.4	34.0	9.0
外山在来	岩手	7.10	10. 31	57.9	64.1	2.5	9.5	22.8	31.7	3.5
夏そば	長野	6.29	10. 23	65.4	55.9	5.2	9.7	32.2	32.6	17.5
夏そば	長野	6.29	10. 25	71.0	57.8	6.7	9.3	25.0	31.6	7.0
しなの夏そば	長野	7. 5	10. 25	72.2	63.8	8.0	13.4	28.6	33.7	9.0
ソ連産4	ソ連	7. 5	10. 31	57.6	67.0	1.5	7.2	18.0	23.1	8.0
ソ連産5	ソ連	7. 5	10. 26	50.3	64.3	1.0	6.5	17.1	22.7	6.0
ソ連産9	ソ連	7. 5	10. 29	64.1	68.6	1.9	13.5	20.8	33.9	9.0
GLORIA	ソ連	6.26	10. 23	57.2	64.0	2.1	8.3	18.8	27.2	15.0
KURASUNOSUTERERETSUKAYA	ソ連	7. 5	10. 31	63.9	71.2	4.0	9.5	29.8	31.5	13.5
YUBI. RENAYA 2	ソ連	7. 5	10. 29	59.6	69.2	2.6	9.9	19.1	23.5	12.0
MISUKAYA	ソ連	7. 5	11. 8	56.7	65.4	2.1	7.6	25.6	29.6	11.0
SUCOROSUPERAYA 81	ソ連	7. 5	11. 13	67.5	74.3	3.1	7.8	22.2	25.2	13.5
MANKAN	カナダ	6.30	10. 26	67.8	60.5	5.4	13.9	26.1	31.0	4.0
TENPISUTO	カナダ	—1)	11. 13	—	69.7	—	8.1	—	24.0	—
PENKUODO	アメリカ	7.12	10. 25	60.9	65.4	1.1	4.8	25.4	39.1	0.0
雲南	中国	—	—	—	117.9	—	14.3	—	24.6	—
平均				63.7	64.9	3.5	10.1	23.3	31.0	

TENPISUTOと雲南は平均値の計算から除外した.

穂発芽率は秋栽培ではほとんど認められなかったため夏栽培のみ調査した.

1) 成熟期に達せず調査できなかった. 雲南の秋栽培は成熟期が明らかでなかったが, 子実が得られたため調査した.

についても秋栽培の方が値が大きかったが一次分枝数については夏栽培の方が大きかった。草丈についてはソ連産の品種は秋栽培の方が草丈が高く、一方長野の品種は夏栽培の方が高くなる傾向が認められた。第2表にこれらの形質の分散分析の結果と相関係数を示した。草丈以外の全ての形質について栽培時期の差が有意であった。またこれらの形質の夏栽培と秋栽培の間の相関は千粒重と収量のみが5%水準で有意であった。

第2表. 1995年の夏栽培と秋栽培の分散分析の平均平方および相関係数.

	自由度	草丈	主茎節数	一次分枝数	収量	千粒重
全体	95					
品種	23	50.712	1.094**	0.278*	17.235**	46.368**
栽培時期	1	33.666	80.667**	20.258**	1064.124**	1402.066**
交互作用	23	77.179*	0.686*	0.156	6.768	16.283
反復	2	46.386	0.068	0.097	30.678**	37.300
誤差	46	36.952	0.297	0.130	5.897	14.942
夏秋相関係数		-0.214	0.236	0.284	0.494*	0.480*

*, **; 5%水準, 1%水準でそれぞれ有意.

第3表. 1995年～1997年の各品種の成熟期, 草丈, 全重, 収量および千粒重.

原産地	成熟期 (月・日)			草丈 (cm)			全重 (kg/a)			収量 (kg/a)			千粒重 (g)			
	1995	1996	1997	1995	1996	1997	1995	1996	1997	1995	1996	1997	1995	1996	1997	
関東1号	茨城	10.29	10.25	—2)	70.1	92.1	75.0	28.5	40.4	26.2	16.1	22.2	14.1	43.3	37.8	39.7
関東4号	茨城	10.22	10.17	10.24	58.7	69.2	51.4	22.8	20.7	16.1	13.7	9.7	9.6	35.3	31.0	34.8
牡丹そば	北海道	10.23	10.16	10.25	55.4	71.8	53.9	16.9	23.7	20.1	9.7	10.2	11.4	32.7	28.2	33.3
階上早生	青森	10.30	10.21	10.24	71.2	80.8	64.2	27.0	18.2	21.3	14.2	6.5	12.3	33.3	28.3	32.5
在来種 (車門)	岩手	11. 9	10.25	—	68.4	85.5	61.9	20.7	30.0	17.9	9.9	15.4	9.3	34.4	29.7	32.5
鹿沼在来	栃木	11. 7	10.29	—	91.7	111.6	79.4	45.8	53.6	24.9	24.5	25.3	12.3	39.5	38.0	36.4
大野在来	茨城	11. 7	10.25	10.28	79.6	85.0	74.8	30.6	34.3	23.9	14.3	17.1	12.5	36.3	33.0	33.4
夏そば 00035735	長野	10.23	10.16	10.24	55.9	81.4	51.2	16.8	24.8	15.0	9.7	11.1	8.1	32.6	27.5	35.0
夏そば 00035736	長野	10.25	10.16	10.24	57.8	76.8	51.9	18.1	17.6	12.8	9.3	7.1	6.3	31.6	27.0	32.8
しなの夏そば	長野	10.25	10.16	10.25	63.8	85.2	55.1	24.3	25.7	17.6	13.4	12.3	10.4	33.7	28.2	35.0
戸隠そば	長野	10.26	10.21	10.25	57.6	69.4	56.4	15.7	21.4	20.3	8.6	9.2	10.9	31.7	29.0	31.3
久木野在来	熊本	11. 7	10.31	—	91.8	106.7	75.5	48.8	45.4	20.4	25.2	20.4	9.7	31.6	29.9	29.7
西合志在来	熊本	11.20	11. 4	—	101.7	104.0	87.3	48.2	45.5	26.7	23.8	20.7	9.0	31.0	30.2	29.1
宮崎在来	宮崎	11.13	11. 1	—	104.1	108.3	95.4	44.0	41.0	32.1	21.2	19.6	13.6	28.8	31.0	30.5
大隅在来	鹿児島	11.20	11. 6	—	109.1	102.5	91.4	52.7	52.0	38.0	28.2	26.4	13.7	32.7	31.5	30.4
雲南	中国	ND1)	11.15	—	117.9	132.2	112.2	42.9	49.9	35.4	14.3	12.1	3.6	24.6	24.6	22.5
テンピスト	カナダ	11.13	10.27	—	76.3	75.7	66.6	16.3	19.3	15.2	7.8	8.9	7.2	24.1	21.4	24.2
平均					77.9	90.5	70.8	30.6	33.2	22.6	15.5	15.0	10.2	32.8	29.8	32.0

1995年は8月23日, 1996年は8月22日, 1997年は8月27日に播種.

一部のデータは第1表と重複.

1) 極晩生のため成熟期を特定できなかった.

2) 凍霜害により成熟期明らかでなかった.

(2) 秋栽培における農業関連形質

第3表に1995年から1997年まで共通して供試した品種の農業関連形質を示した。1995年と1996年の収量は「大隅在来」がそれぞれ28.2 kg/a, 26.4 kg/aで最も大きかったが、1997年は霜害の影響で13.7 kg/aとなった。「大隅在来」に次いで収量の大きかった「鹿沼在来」についても1995年と1996年はそれぞれ24.6 kg/a, 25.3 kg/aに対して、1997年は12.3 kg/aとなりいずれも過去2年の収量の約半分となった。一方で「牡丹そば」, 「しなの夏そば」など霜害を受ける前に成熟期に達した品種については収量への影響は殆ど認められなかった。その他の形質については、3年を通して最も草丈が高かったのは「雲南」で3年間の平均値は120 cm以上であった。全重が最も大きかったのは「大隅在来」で1995年と1996年は50.0 kg/a以上であった。全重についてもそれぞれの年の平均値を比較すると1997年は先の2年と比較して低くなった。

(3) 秋栽培における収量とその他農業形質間の相関

第4表に各年次の収量とその他農業関連形質との相関を示した。1997年は凍霜害がこれらの形質に影響を及ぼしていると考えられたため、被害を受ける前に成熟した13点について単相関を示した。3年を通して収量と有意な正の相関が認められたのは草丈、分枝数および全重であった。

第4表. 1995年から1997年のそれぞれの年における収量と各農業形質との相関.

	生育日数	草丈	主茎長	主茎節数	一次分枝数	全重	千粒重	果皮率	製粉歩留
1995年 (n=76)	0.432**	0.739**	0.748**	0.544**	0.730**	0.925**	0.190	-0.142	0.275*
1996年 (n=38)	0.555**	0.665**	0.720**	0.487**	0.418**	0.884**	0.623**	-0.084	0.196
1997年 (n=13)	0.385	0.563*	0.530	0.457	0.879**	0.914**	-0.276	0.247	-0.233

*, **: 5%水準, 1%水準でそれぞれ有意.

1997年については凍霜害の被害を受けなかった13点を用いて相関を示した.

(4) 秋栽培における分散分析および遺伝率

第5表に1995年から1997年の3年間の共通品種のデータについて年次を込みにしたそれぞれの形質の分散分析による結果を示した。すべての形質について品種間差と年度間差が有意であった。特に果皮率と製粉歩留は年次の平均平方が品種の100倍近く大きく年次変動の大きい形質と考えられた。また一部の形質において交互作用と反復間差が有意であ

った。1997 年は凍霜害を受けたため、1995 年と 1996 年の 2 年間のデータについて分散分析の結果を第 6 表に示した。収量の年次が有意でなかった以外は全ての形質において品種と年次が有意であった。また前述と同様に一部の形質について交互作用と反復が有意であった。第 5 表と第 6 表の遺伝率を比較すると草丈、主茎長、主茎節数、一次分枝数、収量および千粒重については大きな差は認められなかったが、全重については 1995 年と 1996 年より算出した遺伝率の方が高く、環境に影響されやすい形質であると考えられた。また果皮率および製粉歩留の遺伝率はきわめて低かった。

第5表. 1995年～1997年の3年間の年次を込みにした分散分析の平均平方.

	自由度	草丈	主茎長	主茎節数	一次分枝数	全重	収量	千粒重	果皮率	製粉歩留	
全体	101										
品種	16	2016.349**	1576.765**	29.142**	1.204**	677.029**	133.658**	99.696**	10.140**	13.964**	MS _V
年次	2	3379.302**	3620.439**	7.521**	4.318**	1031.983**	288.390**	81.120**	941.573**	1194.504**	MS _Y
交互作用	32	54.240**	36.277	0.555	0.089	59.918**	26.241**	5.941**	3.925**	5.485**	MS _{Y×V}
反復	3	77.799*	49.776	0.333	0.083	78.514**	13.277	1.272	2.382**	7.326**	MS _R
誤差	48	24.962	24.742	0.353	0.085	27.750	9.826	1.125	0.898	1.227	MS _E
遺伝率1)		0.701	0.652	0.878	0.468	0.579	0.405	0.726	0.033	0.035	

1) $E[MS_V] = \sigma^2_E + 17\sigma^2_R + 34\sigma^2_Y$, $E[MS_R] = \sigma^2_E + 17\sigma^2_R$, $E[MS_Y] = \sigma^2_E + 6\sigma^2_V + 2\sigma^2_{Y \times V}$, $E[MS_{Y \times V}] = \sigma^2_E + 2\sigma^2_{Y \times V}$, $E[MS_E] = \sigma^2_E$.
 $E[h^2] = \sigma^2_V / (\sigma^2_V + \sigma^2_Y + \sigma^2_{Y \times V} + \sigma^2_E)$.
 *, **: 5%水準, 1%水準でそれぞれ有意.

第6表. 1995年と1996年の年次を込みにした分散分析の平均平方.

	自由度	草丈	主茎長	主茎節数	一次分枝数	全重	収量	千粒重	果皮率	製粉歩留	
全体	67										
品種	16	1410.844**	1124.717**	19.771**	0.829**	659.654**	14.284**	71.673**	6.724**	11.111**	MS _V
年次	1	2687.906**	2731.463**	14.269**	2.986**	113.874*	0.512	151.614**	775.683**	160.739**	MS _Y
交互作用	16	70.516**	46.656*	0.551**	0.125*	31.692	1.122	4.967**	4.035**	4.978**	MS _{Y×V}
反復	2	116.038**	74.595*	0.494	0.124	83.582	0.658	0.336	3.064*	10.564**	MS _R
誤差	32	21.052	19.212	0.193	0.054	27.040	10.793	0.859	0.926	1.423	MS _E
遺伝率1)		0.725	0.702	0.858	0.498	0.824	0.381	0.695	0.026	0.158	

1) $E[MS_V] = \sigma^2_E + 17\sigma^2_R + 34\sigma^2_Y$, $E[MS_R] = \sigma^2_E + 17\sigma^2_R$, $E[MS_Y] = \sigma^2_E + 4\sigma^2_V + 2\sigma^2_{Y \times V}$, $E[MS_{Y \times V}] = \sigma^2_E + 2\sigma^2_{Y \times V}$, $E[MS_E] = \sigma^2_E$.
 $E[h^2] = \sigma^2_V / (\sigma^2_V + \sigma^2_Y + \sigma^2_{Y \times V} + \sigma^2_E)$.
 *, **: 5%水準, 1%水準でそれぞれ有意.

(5) 秋栽培における各種農業形質の年次間相関

次に各形質の3年間の共通品種による年次間の相関を第7表に示した。草丈、主茎長、主茎節数、一次分枝数、全重および千粒重など草型および形態に関連する形質については、いずれの年度間においても有意な正の相関が認められた。一方収量については比較的相関

係数は小さく、1995 年と 1997 年の間には有意な相関は認められなかった。製粉歩留も 1996 年と 1997 年度間にのみ 5 %水準の有意な正の相関が認められた。

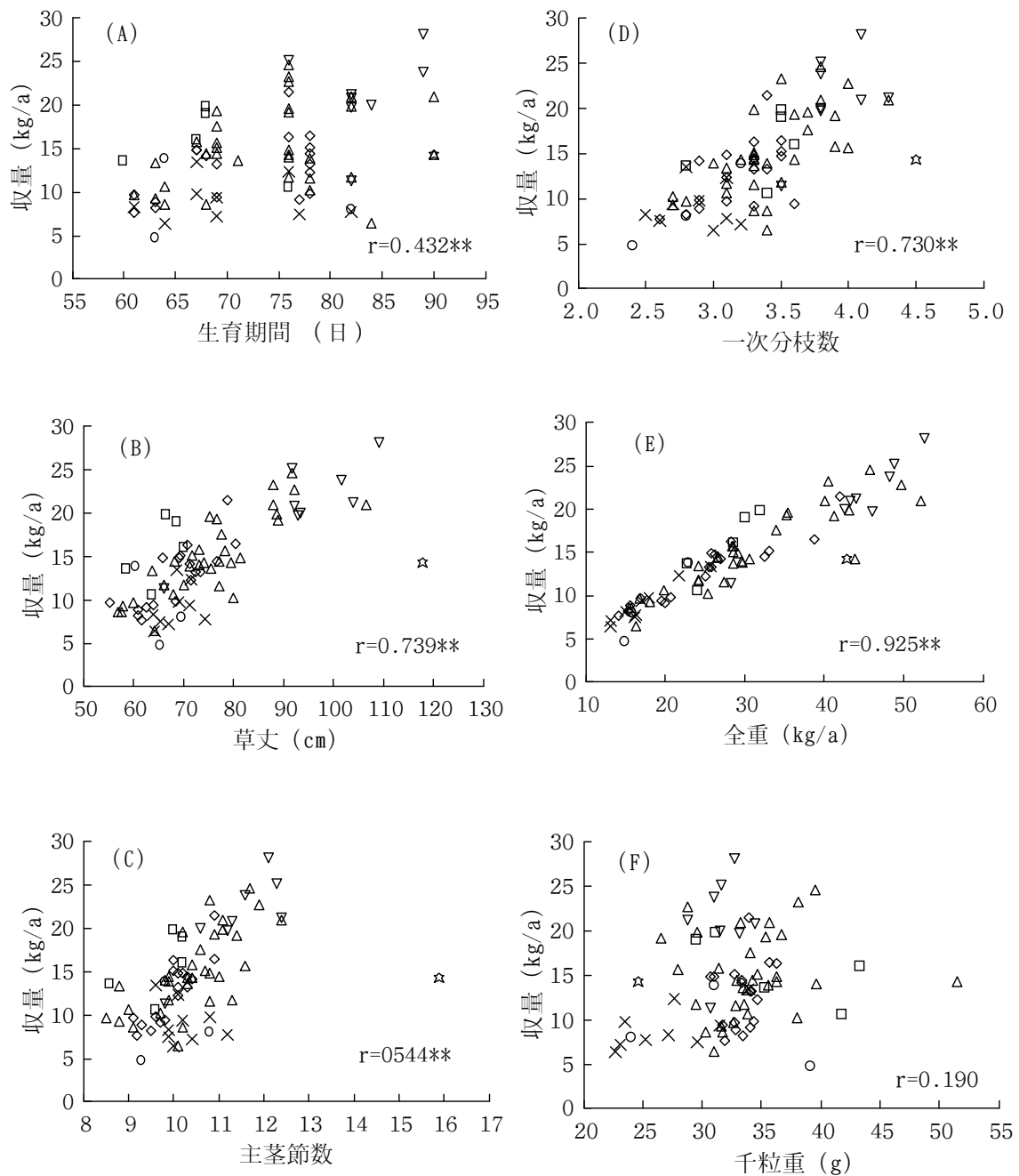
第7表. 3年間の共通品種による各形質の年次間相関 (n=17).

	1995年と1996年	1995年と1997年	1996年と1997年
草丈	0.916**	0.966**	0.906**
主茎長	0.906**	0.971**	0.918**
主茎節数	0.982**	0.969**	0.942**
一次分枝数	0.818**	0.913**	0.795**
全重	0.909**	0.785**	0.802**
収量	0.848**	0.419	0.523*
千粒重	0.879**	0.918**	0.724**
製粉歩留	0.402	0.243	0.492*

*, **; 5%水準, 1%水準でそれぞれ有意.

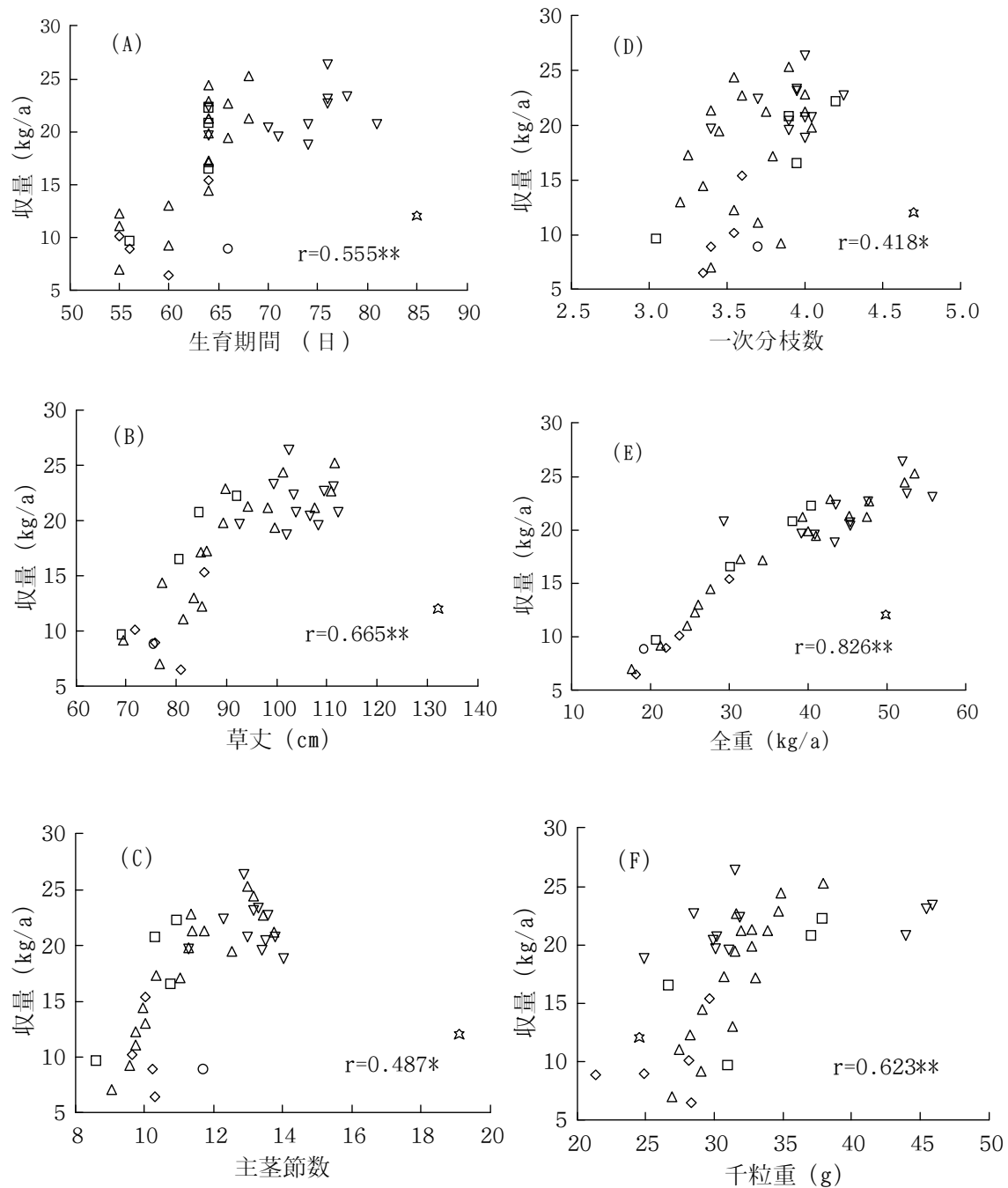
(6) 秋栽培における各種農業形質の品種間差

1995 年, 1996 年および 1997 年の収量と収量関連形質の関係についてそれぞれ第 1 図, 第 2 図および第 3 図に示した. 生育期間については九州の品種は大部分が 70 日以上に分布して晩生であった. 中国産の品種「雲南」はさらに晩生で, 登熟が不十分で収量は低かった. 一方, 北海道・東北およびソ連の品種は早生から中生に分布した. 収量について北海道・東北の品種は平均よりやや低く, ソ連の品種はさらに低く分布した. 草丈, 主茎節数, 一次分枝数および全重について九州の品種は他の地域産よりも高い値を示し, 収量も最も高く分布した. これは凍霜害を受けた 1997 年も同様であった. また中国産の「雲南」は草丈, 主茎節数および一次分枝数が他の品種よりもかなり高い値を示した. その他ネパールの品種は一次分枝および主茎節数が多く千粒重が小さいこと, パキスタンの品種は一次分枝数が少ないなどの特徴が認められた. ネパールおよびパキスタンの品種の収量はきわめて低かった.



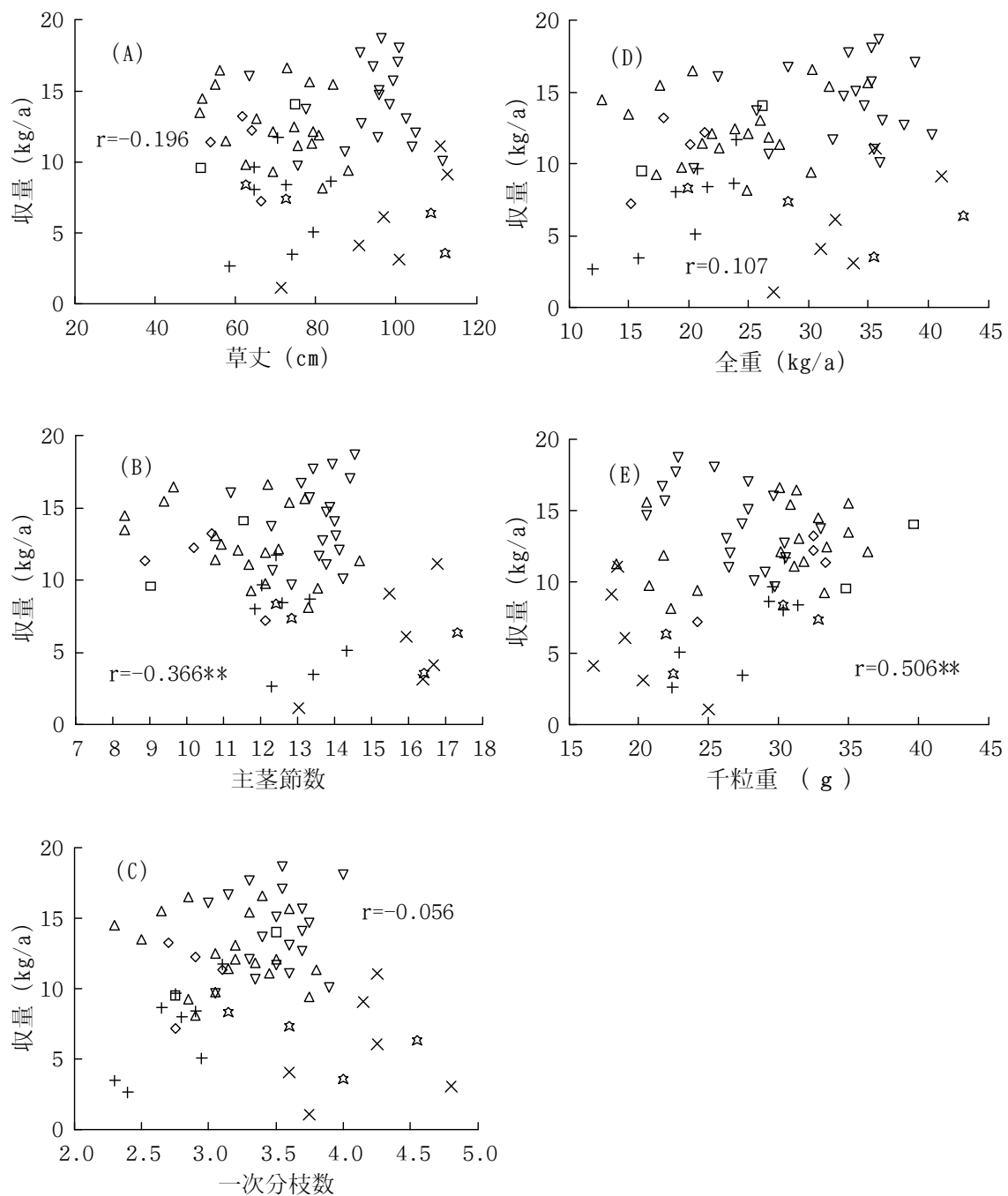
□ 関東育成系統, ◇ 北海道・東北, △ 関東・中部・近畿・中国,
▽ 九州, ○ アメリカ・カナダ, ☆ 中国, × ソ連.

第1図. 1995年の収量と生育期間 (A), 草丈 (B), 主茎節数 (C),
一次分枝数 (D), 全重 (E), 千粒重 (F) との関係.



□関東育成系統, ◇北海道・東北, △関東・中部・近畿・中国,
▽九州, ○カナダ, ☆中国.

第2図. 1996年の収量と生育期間 (A), 草丈 (B), 主茎節数 (C),
一次分枝数 (D), 全重 (E), 千粒重 (F) との関係.



第3図. 1997年の収量と草丈 (A), 主茎節数 (B), 一次分枝数 (C), 全重 (D), 千粒重 (E) との関係.
この年は凍霜害により生育期間が明らかなでないため収量との関係は示さなかった.

3) 考察

九州は北海道に次ぐソバの生産地である。九州におけるソバ栽培は8月下旬から9月上旬にかけて播種する秋栽培が主流で、夏季に収穫する夏栽培はほとんど行われていない。栽培時期に関する研究も秋ソバ型品種を用いた秋栽培が大部分である。本研究において九州の夏栽培品種として具備すべき特性を調査するために多数の遺伝資源を供試した。一般に夏栽培は秋栽培と比較して栄養生長が旺盛である。本研究においても秋型品種に関してはそのような現象が観察されたが、これらの夏栽培で旺盛な生育を示した品種の大部分は登熟不良であったため収穫調査ができず分散分析の対象外とした。そのため夏型品種に限定した分散分析の結果、草丈に関しては栽培時期の差は有意でなかった。なお、本研究は4月下旬播種の条件であり、梅雨期となる6月下旬から7月上旬に殆どの品種が成熟期を迎えた。梅雨期と成熟期が重なるのを避けるにはさらに作期を早くする必要があると考えられた。試験地である熊本県西合志町は遅霜の限界が4月上旬であることから、播種時期をさらに早くすることにより梅雨前に収穫できる作型が考えられた。杉本・佐藤（1999）はポット試験ではあるが播種時期を3月下旬から4月上旬にすることで遅霜と梅雨を避けることができ収量が増加することを示した。さらに手塚ら（2000）は夏ソバ型品種を4月12日に播種すれば15.0 kg/a以上の収量が得られることを示した。また手塚ら（2000）が指摘したように本研究においても穂発芽の発生が認められたことから（第1表）、九州の夏ソバ栽培が成立するためには生育期間が短く難穂発芽性の品種の開発が必要であると考えられた。

九州地域でのソバの品種比較試験については古明地ら（1984）の研究例がある。古明地ら（1984）は西日本の各地から収集した37点の品種を用いて生態型、収量と諸形質との関係について調査した結果、早生群、中生群、晩生群の順に多収であったが、多収な在来種は中生群に見出されたと報告した。一方本研究においては、第1図（A）、第2図（A）で生育期間に対して収量の幅が認められたが、九州の在来種を含む晩生の品種が多収であったこと、さらに沢ら（1985）の報告と同様に1995年と1996年は収量と生育期間の間に有意な正の相関が認められたことなど、古明地ら（1984）と異なる結果となった。古明地ら（1984）の晩生群は11月2日に成熟期に達したのに対して、本研究における晩生群は11月中旬から下旬にかけて成熟期に達したこと、古明地ら（1984）の播種期が本研究とほぼ同じであることから古明地ら（1984）の晩生群の生育期間が本研究と比較して短かったことが晩生群に多収な品種が現れなかった原因の一つとして推測された。また古明地ら

(1984) は収量と草丈、分枝数、主茎節数および茎重との相関は有意でないか、あるいは負の相関が認められたと報告した。それに対して、信州大学で行われた研究例で氏原ら(1974) は個体当たりの子実重は草丈、分枝数、茎葉部乾重と高い正の相関を示すことを報告した。林ら(1990) は「信州大そば」と「信濃 1 号」を比較した結果、生育期間が長く全重の大きい「信州大そば」の収量が多かったと報告した。さらに沢ら(1985) は収量と主茎長、一次分枝数および全重との間に有意な正の相関が認められたと報告した。本研究においても 1995 年と 1996 年の 2 年間は収量と生育期間、草丈、主茎節数、一次分枝数および全重との間に有意な正の相関が認められたことから、生育期間が長く、生育量の大きいことが多収を得るのに有利であることが示された。一方 1997 年は凍霜害の影響と思われるが供試した全品種を用いて相関を調査した場合、古明地ら(1984) の報告と同様に有意な正の相関が認められなかった(第 3 図)。古明地ら(1984) の晩生群は過繁茂気味で、本研究においては凍霜害により正常な登熟ができなかったことなど、正常な登熟が阻害されるような場合には生育量と収量との間に正の相関が得られないことがありうると推測された。

大澤ら(1997) は草丈、開花期、種子重の遺伝率は高く遺伝的に安定していること、収量は他の形質に比べて低いことを報告した。本研究においても草丈、主茎長、主茎節数、および千粒重など形態に関する形質の年次間相関は高いこと、遺伝率も比較的高いことから品種特性を示す指標として安定した形質であることが示された(第 7 表)。一方、全重および収量など生育量に関係する形質は、前述の形態に関する形質と比較して年次間の値の変動が大きいこと、1995 年と 1996 年の間以外の年次間相関が低いこと、1995 年から 1997 年の 3 年間のデータより推定した遺伝率が低いことなど年次による影響が大きいと考えられた。1997 年は登熟期間中に凍霜害の被害を受けたため、1995 年と 1996 年の 2 年から算出した全重の遺伝率は 3 年間のデータから算出した遺伝率よりも高い値を示したことから、全重は気象条件による影響を受けやすい形質であることが示された。収量については誤差成分が相対的に大きくなったため遺伝率は低くなった。また形態に関する形質のうち一次分枝数は他の形態形質と比較して遺伝率および年次相関が低かった。疎植条件による影響が考えられたが、本研究の範囲では栽培条件と一次分枝数の関係は明らかでなかった。また果皮率および製粉歩留は年次変動の大きな形質であることが示されたが、栽培環境との関係は明らかでなく今後の検討課題である。

また本研究の結果、ソバの遺伝資源の特性は原産地毎に特色があることが示された。北

海道・東北の品種は生育期間が比較的短く，生育に適した温度条件を残しているにもかかわらず生育量が少ない状態で成熟期に達したため低収であった．関東から中部・近畿にかけての品種は早生から晩生にかけて広く分布した．九州の品種については大部分が晩生に位置し，生育量も大きく多収を示した（第 1 図，第 2 図）．このように原産地に関して北海道から九州にかけて生態型のクラインが認められた．九州は収穫期が 11 月下旬から 12 月上旬になるまでソバの栽培が可能であるため，短日条件で成熟する秋ソバ型の生態型を発達させたと考えられた．ソ連産の品種は生育期間は北海道・東北の品種と似た分布を示したが，収量については北海道・東北の品種より劣っていた．さらにこの両グループを比較すると草丈，主茎節数，一次分枝数および全重についても北海道・東北の品種が勝っており，両グループの九州の栽培環境に対する適応性の違いが示唆された（第 1 図）．山浦・吉川（1982）による滋賀県の研究では，北海道から九州までの様々な生態型の品種を用いた栽培試験の結果，滋賀県に地理的に最も近い長野県で育成された「信濃 1 号」が多収を示した．本研究の範囲では，ソバはそれぞれの原産地の環境に適応した早晩性および生産性を発達させており，それぞれの在来種が原産地で最も多収を示す生態型を有すると考えられた．

第2節 九州における普通ソバ子実のルチン，粗蛋白および粗脂肪含量の品種間差異

ソバは，昔から健康を維持する食物として利用されてきた．現在では血圧降下作用を有するルチンを含むこと，高蛋白質含量であることが明らかとなり，食材として優れていることが広く知られている．

ルチン含量については品種間差異 (Kitabayashi et al., 1995ab ; Ohsawa and Tsutsumi, 1995a)，高ルチンを目標とした育種 (Ohsawa and Tsutsumi, 1995b ; Minami et al., 2001) 等の報告がある．ルチン以外の成分の品種間差異については蛋白質含量と灰分含量 (柴田ら, 1979)，蛋白質含量 (大澤・堤, 1993)，脂肪含量 (Mazza, 1988)，ビタミン E 含量 (Honda, 1995)，フェノール酸含量 (Oomah et al., 1996) 等の報告がある．しかしながらこれら成分に関する研究は東日本あるいはカナダなど冷涼な地域で採種された夏ソバ型および中間型品種を対象としており，秋ソバ型である九州の晩生品種の評価はほとんど無く，さらにこれらの品種を温暖な九州で栽培評価した報告は無い．したがって本研究は，子実成分の特性を明らかにするために九州農業試験場 (熊本県西合志町) で 1996 年と 1997 年の 2 年間，北海道の早生の夏ソバ品種から九州の晩生の秋ソバ品種，さらに外国の品種など様々な生態型の普通ソバ子実のルチン，蛋白質および脂肪含量等，成分含量の品種間差異および年次変動について検討した．

1) 材料および方法

前節と同じ材料を供試した．すなわち 1996 年と 1997 年の共通品種 22 点 (第 8 表) で，この他 1996 年は日本，カナダおよび中国の普通ソバ遺伝資源および育成品種計 16 点，1997 年は日本，カナダ，中国，パキスタン，およびネパールの同計 40 点を用いた．各年とも畝幅 60 cm × 株間 6.5 cm で条播し，本葉が 2 ～ 3 枚展開した頃に間引いて 1 本仕立てにした (25.6 株/m²)．1 区面積は 7.2 m²，試験区の配置は乱塊法，2 反復とした．施肥は全量元肥とし，窒素，リン酸，カリそれぞれ 1.1 g/m²，1.7 g/m²，1.7 g/m² 施用した．また 2 年とも各作付け前に土壌改良材として苦土石灰 50 g/m²，熔燐 30 g/m² を投入した．1996 年は 8 月 22 日，1997 年は 8 月 27 日に播種した．成熟期に各試験区の中央部から 1 区当たり 40 本刈り取り，2 週間以上風乾後，脱穀して塵を取り除いた子実について子実重を測定し，収量を算出した．なお 1997 年は 10 月 28 日の霜害，10 月 31 日の凍害のため，中生・晩生品種の登熟障害が発生したが，これらの品種については，既に成熟黒化してい

た粒を粒選して供試した。これらの皮付きの子実はブラベンダーテストミル（クオドルマツト・ジュニア型）により製粉し、60 メッシュの篩を通過した粉について成分分析に供試した。製粉歩留は得られた粉と子実重の比率から算出した。ルチン含量は小原ら（1989ab）の方法を参考にした。ソバ粉 1 g を 80 °C のメタノール 20 ml で 2 時間抽出後 3000 rpm で 10 分遠心（05PR-22, 日立）、得られた上澄みを 0.45 μ m のフィルターで濾過して高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した。HPLC は日本分光（株）の 800PU シリーズ、875UV 検出器を用いた。カラムは資生堂（株）の CAPCELLPAK C₁₈, 移動相は 2.5 % 酢酸/メタノール/アセトニトリル（35:5:10）、流速は 1.0 ml/分、検出波長は 360 nm、カラム温度は 40 °C とした。粗蛋白含量はケルダール法によって得られた全窒素に蛋白換算係数 6.31 をかけて求めた。粗脂肪含量はジエチルエーテル抽出によるソックスレー法により定量した。水分含量は 105 °C、3 時間乾燥により求めた。色彩値は日本電色工業（株）のスペクトロカラーメーター SE2000 により L*（明度）、a*（赤度）、b*（黄度）を測定した。分散分析は、2 年間のデータをもとにした処理・年次 2 元配置法で行った。遺伝率は分散分析の結果得られたそれぞれの平均平方、品種（MS_v）、年次（MS_y）、交互作用（MS_{y × v}）、反復（MS_R）および誤差（MS_E）より、三留（1960）の方法でそれぞれの分散、品種（ σ^2_v ）、年次（ σ^2_y ）、交互作用（ $\sigma^2_{y \times v}$ ）、反復（ σ^2_R ）および誤差（ σ^2_E ）を下記の式で算出して推定した。

$$E[MS_Y] = \sigma^2_E + v \sigma^2_R + r v \sigma^2_Y$$

$$E[MS_R] = \sigma^2_E + v \sigma^2_R$$

$$E[MS_v] = \sigma^2_E + r y \sigma^2_v + r \sigma^2_{Y \times v}$$

$$E[MS_{Y \times v}] = \sigma^2_E + r \sigma^2_{Y \times v}$$

$$E[MS_E] = \sigma^2_E$$

品種数 v , 反復数 r , 年数 y とした。

以上の式をで得られた分散から下記の式で遺伝率 h^2 を推定した。

$$E[h^2] = \sigma^2_v / (\sigma^2_v + \sigma^2_y + \sigma^2_{Y \times v} + \sigma^2_E)$$

また各形質間の相関および年次間相関、さらに日本の品種と日本の品種と生態型の近いカナダの品種計 37 点についてルチン含量と登熟期間中（開花期から成熟期まで）の平均気温、平均日射量、積算温度および積算日射量等の気象条件との関係について九州農業試験場で観測された気象データを用いて相関および偏相関を計算した。

2) 結果

第 8 表に 1996 年と 1997 年の両年に共通して供試した 22 点の各種成分含量を示した。両年を比較した結果、ルチン含量と粗脂肪含量は 1996 年の方が高く粗蛋白含量は 1997 年の方が高かった。ルチン含量について 1996 年は 10.7 ～ 29.8 mg/100gDW, 1997 年は 10.6 ～ 23.8 mg/100gDW で両年とも 2 倍を超える品種間差異を示した。粗蛋白含量について 1996 年は 9.3 ～ 10.4 DW %, 1997 年は 9.1 ～ 11.3 DW %, 粗脂肪含量について 1996 年は 1.99 ～ 2.26 DW %, 1997 年は 1.53 ～ 1.98 DW % でルチン含量と比較して品種間差異の幅は小さかった。

第8表. 1996年および1997年の各品種の成分含量.

品種	ルチン (mg/100gDW)		粗蛋白 (DW%)		粗脂肪 (DW%)	
	1996	1997	1996	1997	1996	1997
関東 1 号	15.3	13.5	9.6	9.8	2.15	1.73
関東 4 号	19.5	10.9	10.0	10.6	2.13	1.69
牡丹そば	25.3	15.4	10.2	10.2	2.26	1.80
階上早生	18.7	15.3	9.9	9.9	2.25	1.78
在来種 (車門)	12.6	10.6	10.3	10.4	2.23	1.80
小千谷在来 3	13.2	13.4	9.6	9.5	2.09	1.58
朝日村在来 1	12.2	12.3	10.1	9.8	2.24	1.80
朝日村在来 3	10.7	12.1	9.8	9.8	2.14	1.77
鹿沼在来	12.3	13.3	9.8	10.1	2.13	1.76
大野在来	14.3	13.4	9.7	9.5	2.18	1.64
夏そば (00035735) 1)	24.1	16.6	10.3	11.3	2.28	1.83
夏そば (00035736)	29.8	15.6	10.3	11.0	2.18	1.78
しなの夏そば	21.9	12.8	9.7	9.5	2.17	1.56
戸隠そば	15.9	14.1	9.9	10.1	2.18	1.64
井原市在来	19.4	13.7	9.7	9.2	2.15	1.53
久木野在来	12.8	14.6	10.0	9.8	2.23	1.71
西合志在来	13.4	13.3	9.4	9.7	2.15	1.69
宮崎在来	11.9	13.8	9.4	10.1	1.99	1.75
大隅在来	11.7	14.3	9.3	9.1	2.10	1.67
耶馬溪在来 4	18.2	13.4	9.7	9.5	2.10	1.71
テンピスト	16.4	17.0	10.1	10.9	2.17	1.89
雲南	21.9	23.8	10.4	9.7	2.16	1.98
平均	16.9	14.2	9.9	10.0	2.17	1.73

1) ジーンバンク整理番号.

以下分散分析および年次相関の解析は 2 年間の共通品種 22 点について実施した。第 9 表に年次を込みにした分散分析の結果を示した。ルチン含量の反復以外は有意差があった。ルチン含量と粗脂肪含量は年次の平均平方が、粗蛋白含量は品種の平均平方が最も大きかった。また遺伝率は粗蛋白含量が最も高かった。

第 10 表に 1996 年と 1997 年の年次間相関を示した。ルチン含量および粗蛋白含量については両年次間に有意な正の相関が認められたが、粗脂肪含量については認められなかった。

第9表. 各成分含量の年次を込みにした分散分析の平均平方と遺伝率.

	自由度	ルチン	粗蛋白	粗脂肪	分散の推定値
全体	87				
品種	21	45.759**	0.643**	0.019**	MS_V
年次	1	151.880**	0.279**	4.158**	MS_Y
交互作用	21	21.797**	0.194**	0.012**	$MS_{Y \times V}$
反復	2	1.580	0.451**	0.036**	MS_R
誤差	42	3.830	0.051	0.005	MS_E
遺伝率 ¹⁾		0.271	0.451	0.019	

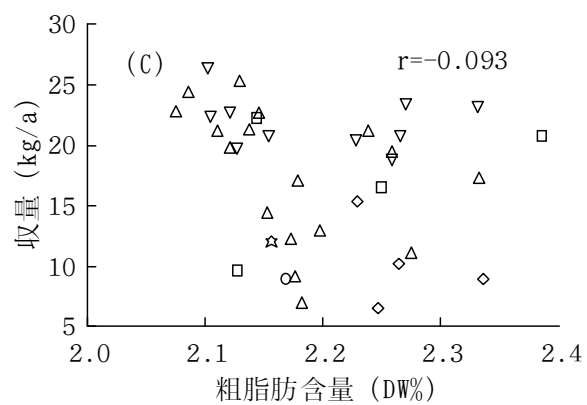
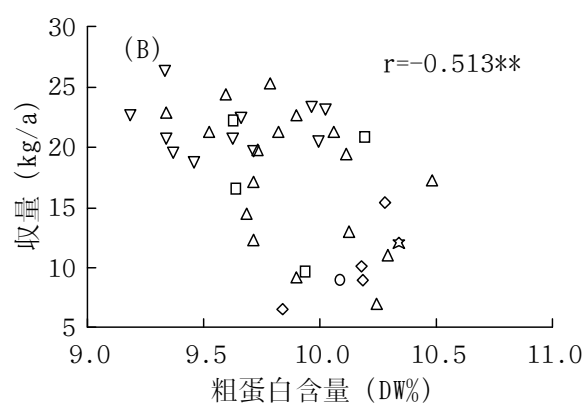
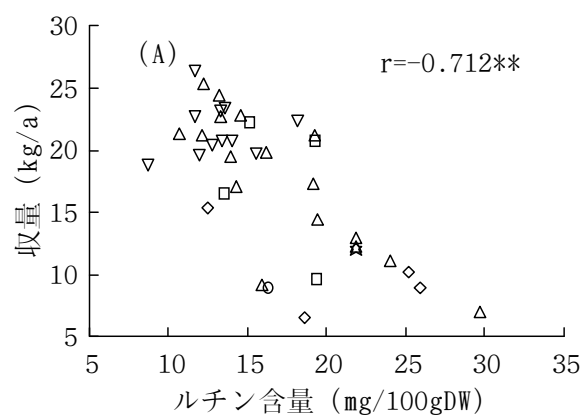
1) $E[MS_V] = \sigma^2_E + 22\sigma^2_R + 44\sigma^2_Y$, $E[MS_R] = \sigma^2_E + 22\sigma^2_R$,
 $E[MS_Y] = \sigma^2_E + 4\sigma^2_V + 2\sigma^2_{Y \times V}$,
 $E[MS_{Y \times V}] = \sigma^2_E + 2\sigma^2_{Y \times V}$, $E[MS_E] = \sigma^2_E$.
 $E[h^2] = \sigma^2_V / (\sigma^2_Y + \sigma^2_V + \sigma^2_{Y \times V} + \sigma^2_E)$.

** ; 1%水準で有意.

第10表. 各成分含量の年次間相関 (n=22).

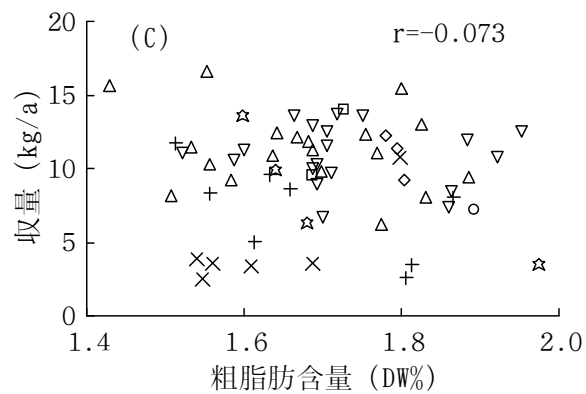
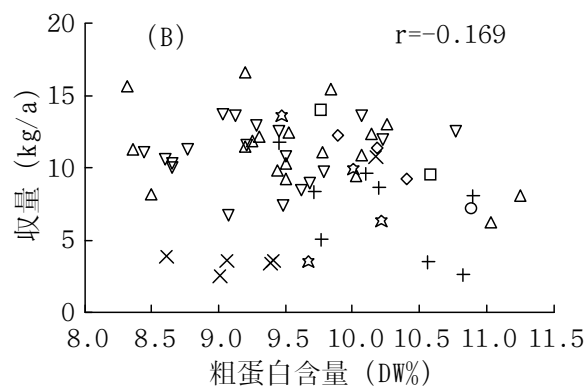
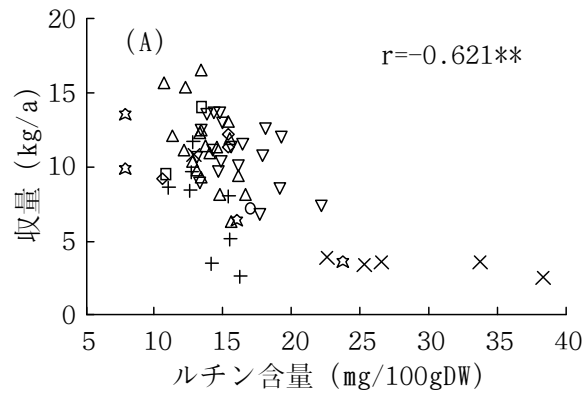
ルチン	粗蛋白	粗脂肪
0.435*	0.641**	0.285

*, ** ; 5%水準, 1%水準でそれぞれ有意.



□関東育成系統, ◇北海道・東北, △関東・中部・近畿・中国, ▽九州,
○カナダ, ☆中国.

第4図. 1996年の収量とルチン含量 (A), 粗蛋白含量 (B), 粗脂肪含量 (C) との関係.



□関東育成系統, ◇北海道・東北, △関東・中部・近畿・中国, ▽九州,
○カナダ, ☆中国, ×ネパール, +パキスタン.

第5図. 1997年の収量とルチン含量 (A), 粗蛋白含量 (B), 粗脂肪含量 (C) との関係.

第4図と第5図に1996年と1997年の収量とルチン含量，粗蛋白含量および粗脂肪含量との関係をそれぞれ示した。両年とも収量とルチン含量の間に1%水準の有意な負の相関が認められた。ネパールの品種のルチン含量は他の地域の品種よりも高かった。一方中国の2品種のルチン含量は低かった。

第11表に1996年と1997年のルチン含量，粗蛋白含量および粗脂肪含量の相関を示した。粗蛋白含量と粗脂肪含量との間には両年とも1%水準の有意な正の相関が認められたが，その他はルチン含量と粗蛋白含量との間には，1996年のみ有意な正の相関が認められたのみであった。

第11表. 各成分間の相関.

	ルチン	粗蛋白
1996年 (n=38)		
粗蛋白	0.540**	
粗脂肪	0.126	0.504**
1997年 (n=62)		
粗蛋白	-0.143	
粗脂肪	0.068	0.629**

**；1%水準で有意.

第12表. 各年次の成分含量と生育日数，千粒重および製粉歩留との相関.

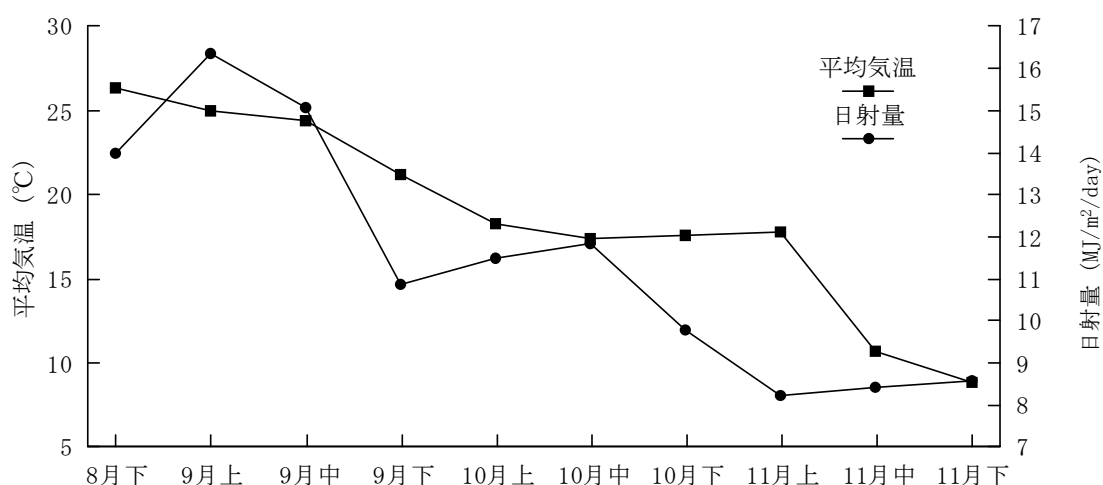
	ルチン	粗蛋白	粗脂肪
1996年 (n=38)			
生育日数	-0.586**	-0.304	-0.064
千粒重	0.330*	-0.141	0.107
製粉歩留	-0.039	-0.002	-0.020
1997年 (n=62)			
千粒重	-0.606**	0.396**	-0.072
製粉歩留	-0.773**	0.478**	0.248

*, **；5%水準，1%水準でそれぞれ有意.

第 12 表に生育日数，千粒重および製粉歩留とルチン含量，粗蛋白含量および粗脂肪含量との相関を示した．1997 年のみ千粒重と製粉歩留はルチン含量との間に有意な負の相関が，粗蛋白含量との間に有意な正の相関が認められた．

また本研究において 1997 年は 10 月下旬に凍霜害を受けたことにより成熟期が調査できなかったが，1996 年の結果は，ルチン含量と生育日数に有意な負の相関が認められた（第 12 表）．そこで生育期間中，特に登熟期間中の気象条件との関連が考えられたため，1996 年の生育期間中の平均気温および日射量の推移を第 6 図に，日本の品種と日本の品種と生態型の近いカナダの品種計 37 点についてルチン含量と登熟期間中の平均気温，平均日射量，積算温度および積算日射量等の気象条件との関係を調査した結果を第 13 表に示した．ルチン含量と登熟期間中の平均気温および平均日射量との間に有意な正の相関が，積算温度および積算日射量との間に有意な負の相関が認められた．一方，気温と日射量との間に相関関係が認められるためルチン含量と気温との真の相関あるいは日射量との真の相関を明らかにするため，相互の影響を除いた偏相関係数を求めた．その結果，ルチン含量と登熟期間中の平均気温および積算温度との間に有意な正の偏相関が，積算日射量との間に有意な負の偏相関が認められた．

第 14 表に各成分含量と色彩値との相関を示した．その結果，ルチン含量と b^* との間には両年とも有意な正の相関が認められた．



第6図．1996年の生育期間中の平均気温および日射量の推移．

第13表. ルチン含量と登熟期間の気象条件との単相関
および偏相関 (n=37).

	単相関	偏相関	偏相関の固定変数
平均気温	0.790**	0.777**	平均日射量
積算温度	-0.741**	0.339*	積算日射量
平均日射量	0.329*	0.245	平均温度
積算日射量	-0.791**	-0.516**	積算温度

*, **; 5%水準, 1%水準でそれぞれ有意.

偏相関は単相関から偏相関の固定変数の影響を除いた値.

第14表. 各年次の各成分含量と色彩値の相関.

	ルチン	粗蛋白	粗脂肪
1996年 (n=38)			
L*	0.529**	0.354*	-0.113
a*	-0.664**	-0.309	0.010
b*	0.737**	0.516**	0.077
1997年 (n=62)			
L*	-0.313*	-0.283*	-0.245
a*	0.685**	-0.340**	-0.144
b*	0.276*	-0.038	0.049

*, **; 5%水準, 1%水準でそれぞれ有意.

L*は明度,

a*は赤方向, -a*は緑方向,

b*は黄方向, -b*は青方向.

3) 考察

本研究においてはルチン含量の品種間差異が有意であり, 過去の長野県 (Kitabayashi et al., 1995a) や新潟県 (Ohsawa and Tsutsumi, 1995a) の結果と同様であった. Kitabayashi et al. (1995a) はルチン含量の遺伝率は, 育種が可能な水準にあると考察した. さらに個体選抜による育種法 (Kitabayashi et al., 1995b), 実際の高ルチン化を目指した育種の試み

(Ohsawa and Tsutsumi 1995b ; Minami et al., 2001) について報告された．その一方で本研究ではルチン含量の遺伝率は農業関連形質よりも低い値が推定されたこと，年次による影響が大きいことから九州においては環境に影響されやすく，育種の際注意が必要と考えられた．

Kitabayashi et al. (1995a) はネパール産の系統のルチン含量が高いと報告している．本研究においても単年度の成績ではあるが「 MITEPHAPAL 」(ジーンバンク整理番号 03008787, 38.4 mg/100gDW) および「 PHAPAL 」(同 03008790, 33.8 mg/100gDW) 等供試したネパール原産の 6 品種のうち 4 品種が 25.0 mg/100gDW を上回っており，他の地域の品種よりもルチン含量が高かった (第 5 図 (a))．

Oomah et al. (1996) はソバ粉の色とフェノール類の含量との間には相関が無いと報告した．しかしながらポリフェノールであるルチンは黄色を呈しているため，黄色の尺度となる b^* との関連が推測されたが，両年ともルチン含量と有意な正の相関が認められたものの，1997 年は有意水準が低く， b^* からルチン含量を推定できるほどの精度は得られなかった (第 14 表)．

粗蛋白含量についても品種間差異は有意であった．しかしルチン含量よりも年次相関および遺伝率は高く，遺伝的要因が比較的大きいと考えられた．過去に遺伝的および環境的要因について柴田ら (1979) と大澤・堤 (1993) は，蛋白含量は夏栽培より秋栽培の方が高いこと，品種間差異があること等遺伝的および環境的影響を示した．さらに柴田ら (1979) は国内品種より外国品種の方が高い傾向を示したと報告した．しかしながら本研究では粗蛋白含量に関して原産地による明らかな特徴は認められなかった．ルチンおよび蛋白質は粒の種皮を含む外層部に多く存在するため (鈴木ら, 1987)，製粉歩留が高い品種の方がこれらの含量は高くなると推測されたが，1997 年に製粉歩留と粗蛋白含量との間に有意な正の相関が認められたのみで，製粉歩留とルチン含量との間には逆に有意な負の相関が認められたこと，さらに 1996 年には製粉歩留と有意な相関は認められなかったことから (第 12 表)，各品種の製粉歩留が成分含量に及ぼす影響は小さい，すなわち製粉歩留の高い品種が高蛋白，高ルチンであるとは限らないと考えられた．また長友ら (1982) は粒大が製粉歩留に関係が深く大粒である四倍体品種「みやざきおおつぶ」が最も低かったと報告した．本研究の供試材料は二倍体のみであるが，千粒重と粗蛋白含量との有意な正の相関が両年とも認められたが有意水準が低いこと，千粒重と他の成分含量と両年を通した有意な相関が認められなかったことから，粒の大きさが各成分含量に及ぼす影響は

小さいと考えられた。

粗脂肪含量については有意な年次間の相関が認められなかったこと、さらに分散分析の結果、交互作用、品種よりも年次の影響が著しく大きかったこと等環境に極めて影響されやすいことが示された（第 9 表）。青木ら（1981）はソバ粉の風味に関係する揮発成分の同定を行った結果、匂いの官能試験評価はヘキサナール、ノナナール、オクタノール等脂肪の酸化分解の結果生じるアルデヒド類のピークと一致すると報告した。したがって脂肪含量は風味に影響する要因として重要である。さらに Mazza（1988）はオレイン酸とリノレン酸含量の間には有意な負の相関があること、これらの含量には品種間差があることから育種的に不飽和度の低いオレイン酸を増やし不飽和度の高いリノレン酸を減少させることで貯蔵性の優れた品種が育成できることを示唆した。一方、本研究では粗脂肪含量の遺伝率は極めて低く、脂肪酸組成など質的な育種と比較して量的な育種は困難である可能性が考えられた。さらに粗脂肪含量についてもルチン含量のような原産地による特徴は明らかでなかった（第 4 図、第 5 図）。

粗蛋白含量および粗脂肪含量は収量との間に有意な相関は認められなかった。一方ルチン含量については両年とも収量と有意な負の相関が認められた（第 4 図、第 5 図）が、新潟県の夏栽培の場合、収量と有意な正の相関が報告された（Ohsawa and Tsutsumi, 1995a）。栽培地および栽培時期が異なるためと思われるが、収量と成分含量の関係についてさらに調査の必要がある。

以上分散分析および遺伝率から、ルチン含量、粗蛋白含量および粗脂肪含量は環境による影響を受けやすいことが示された。これらの内ルチン含量が生育日数と相関が認められたため環境要因として登熟期間の気象条件との関係について検討した。その結果、ルチン含量と登熟期間中の平均気温および積算温度との間に有意な正の相関および偏相関が認められた（第 13 表）。過去にルチン含量に影響する要因として登熟期間中の日射量（小原ら 1989a）、日照時間（Ohsawa and Tsutsumi, 1995a）との関係が指摘されている。Ohsawa and Tsutsumi（1995a）は、夏栽培では開花期の遅い品種のルチン含量が高いと報告した。夏栽培の場合晩生品種の方が登熟期間中の温度が高いと考えられ、本研究の結果と一致している。これらのことから高温下で登熟する栽培がルチンの蓄積に有利であることが示唆された。また積算日射量との間に有意な負の相関および偏相関が認められたことから、九州の秋栽培においては長期間日射を受けることはルチンの蓄積に有利に働かないと考えられた。以上のことから九州の秋栽培においては、ルチンの蓄積に有利な温度の高い時期に登

熟できる感温性の強い早生型品種が高ルチン品種としての一つの条件であると考えられた。本研究において、九州の在来種の成分特性については、前節で示された原産地による特徴が明瞭であった農業関連形質のような地域的な特性は認められなかったが、九州の栽培環境がソバの成分含量に対して他の地域と異なる影響を与えている可能性が考えられた。

第3章 普通ソバ子実のラジカル消去能の測定法の開発と遺伝資源の評価

第1節 普通ソバ子実のラジカル消去能の簡易測定法の開発

近年、食品の機能性が世の中の注目を集め、健康食品素材であるソバに関しても高機能性ソバの育成が求められている。機能性の一つに成人病の原因の一つとされている活性酸素を除去する能力である抗酸化能があげられる。これまでの抗酸化能の評価法は、リノール酸の酸化抑制能力による方法 (Tsuda et al., 1993 ; Suda et al., 1994 ; Suda et al., 1996), 1,3-ジエチル-2-チオバルビツール酸 (DETBA) -マロンジアルデヒド (MDA) 蛍光測定による方法 (Suda et al., 1994), DETBA 法 (須田ら, 1996), 電子スピン共鳴装置を用いたスーパーオキシド消去活性の測定による方法 (須田ら, 1998) 等が用いられてきた。これまでのソバの抗酸化能の評価法にも原理的にはこれらの手法であった。Oomah and Mazza (1996) はカロテン退色反応による方法, 渡辺ら (1995) はリノール酸メチルヒドロペルオキシドを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析してリノール酸の酸化抑制能力として評価する方法であった。しかしこれらの方法は高度な技術, 長時間あるいは高価な機器を要するため大量の育種素材を短時間に評価するには適さない。

近年エタノール溶液中で安定なフリーラジカルである 1,1-ジフェニル-2 ピクリルヒドラジル (DPPH) のラジカル消去に伴う退色を分光光度計で測定する抗酸化能の評価法が用いられつつある。Przybylski et al. (1998) はソバ粉の極性の異なる抽出液についてラジカル消去能について検討した。さらに須田ら (1999) は DPPH 分光法による各種農産物と食品のラジカル消去能の評価に適用可能な方法を開発し, マニュアル化された (須田, 1999)。

本研究において, 須田 (1999) の方法を育種素材のスクリーニングに利用できるようにさらに簡易・迅速化した方法を開発し, その有用性について検討した。

1) 材料および方法

(1) ソバ粉の調製

1998 年に九州農業試験場 (現九州沖縄農業研究センター) の試験圃場で栽培, 収穫された普通ソバ品種・系統のうち 22 点を任意に選んだ。それらの子実を剥皮した後, 小型テストミル (ブラベンダー社製, クオドルマットジュニア) で製粉して 60 メッシュを通

過した粉を分析に供試した.

(2) 抽出液の調製

0.6 g のソバ粉をスクリーキャップ付きの試験管に入れて, 6 ml の 80 %エタノールで 80 °C に加温して抽出した. 抽出時間を検討するため 15 分から 180 分まで設定した. 抽出後, 急冷して 3000 rpm で 10 分間遠心した (05PR-22, 日立). 得られた上澄みを 80 %エタノールで 4 倍に希釈して分析に供試した.

(3) 試薬の調製

DPPH (和光) を 99.5 % のエタノールに 0.4 mM の濃度になるよう溶解して DPPH 溶液を調製した. Trolox 溶液は 80 %エタノールに 0.2 mM の濃度になるよう Trolox[®] (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich) を溶解して調製した.

(4) DPPH ラジカル消去能の測定条件の検討

反応液の組成は 0.4 mM の DPPH 溶液を 0.3 ml, 200 mM の MES 緩衝液 (pH 6.0) を 0.3 ml, 20 %エタノールを 0.3 ml を混合して計 0.9 ml とした. 希釈した抽出液の添加量についても検討した. 80 %エタノールと希釈した抽出液の合計が 0.3 ml (0.30+0.00, 0.27+0.03, 0.24+0.06, 0.21+0.09, 0.18+0.12, 0.12+0.18) となるよう組み合わせた. 希釈した抽出液の添加で反応開始とした. 反応時間を検討するため, 反応開始後 40 分間, 520 nm の吸光度の経時変化を測定した. コントロールとして 80 %エタノールを 0.3 ml, 標準として 0.2 mM の Trolox 溶液を希釈した抽出液の代わりに反応液に加えて検量線を作成した. 得られた結果はコントロールに対する 520 nm の吸光度の差 (ΔA_{520}), あるいは ΔA_{520} を μ mol-Trolox/ml に換算して表した.

(5) 抽出液のポリフェノール含量の測定

各抽出時間における抽出液についてフォーリンチオカルト法によりポリフェノール含量を測定した (Furuta ら, 1998). 1.0 ml の抽出液に 1.0 ml の 2 倍に希釈したフェノール試薬を混合して 3 分間静置後, 1.0 ml の 10 %炭酸ナトリウム溶液を加えて 1 時間静置した. その後 3000 rpm で 10 分間遠心して (05PR-22, 日立), 得られた上澄みの 750 nm の吸光度を測定した. 標品として没食子酸を用いてポリフェノール含量を没食子酸相当量 (μ

gGA/ml) に換算した。

(6) 従来法 (須田, 1999) による DPPH ラジカル消去能の測定

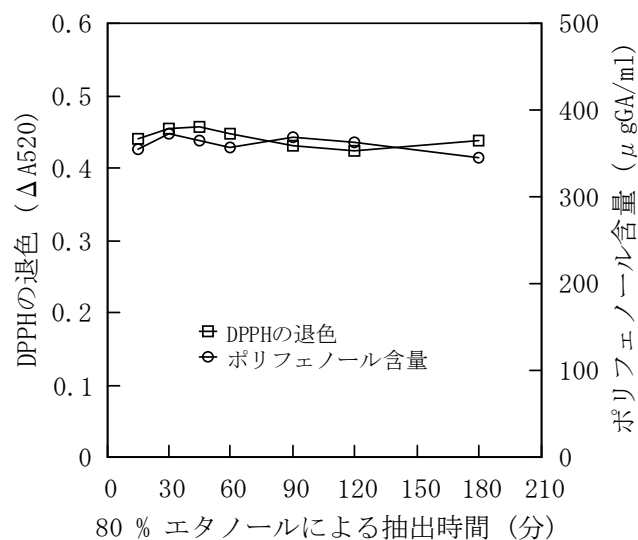
1.25 g のソバ粉を共栓付試験管に入れて、4 ml の 80 %エタノールを加えてポリトロンホモジナイザーでホモジナイズ後、3000 rpm で 5 分間遠心 (05PR-22, 日立), 上澄みを 25 ml メスシリンダーに入れた。さらに沈殿に 6 ml の 80 %エタノールを加えてボルテックスで攪拌して遠心する操作を 2 回繰り返した後、上澄みを 25 ml に定容し抽出液とした。この抽出液 4 ml に 200 mM の MES 緩衝液 (pH 6.0) を 2.0 ml, 蒸留水を 0.4 ml, 50 %エタノールを 1.6 ml 加えたものを分析試料とした。反応液の組成は 0.4 mM の DPPH 溶液を 0.3 ml, 200 mM の MES 緩衝液 (pH 6.0) を 0.15 ml, 蒸留水を 0.15 ml, 50 %エタノール/50 mM MES 緩衝液 (pH 6.0) と分析試料の合計が 0.6 ml (0.60+0.00, 0.54+0.06, 0.48+0.12, 0.42+0.18, 0.36+0.24, 0.30+0.30, 0.24+0.36, 0.18+0.42, 0.12+0.48) となるように組み合わせて反応液に加えた。分析試料の添加で反応開始とし、2 分後に 520 nm の吸光度を測定した。DPPH ラジカル消去能は 520 nm の吸光度の差 (ΔA_{520}), あるいは分析試料の添加量と 520 nm の吸光度の曲線を作成し、吸光度 50 %低下に要する添加量を算出して μ mol-Trolox/ml に換算した。

2) 結果

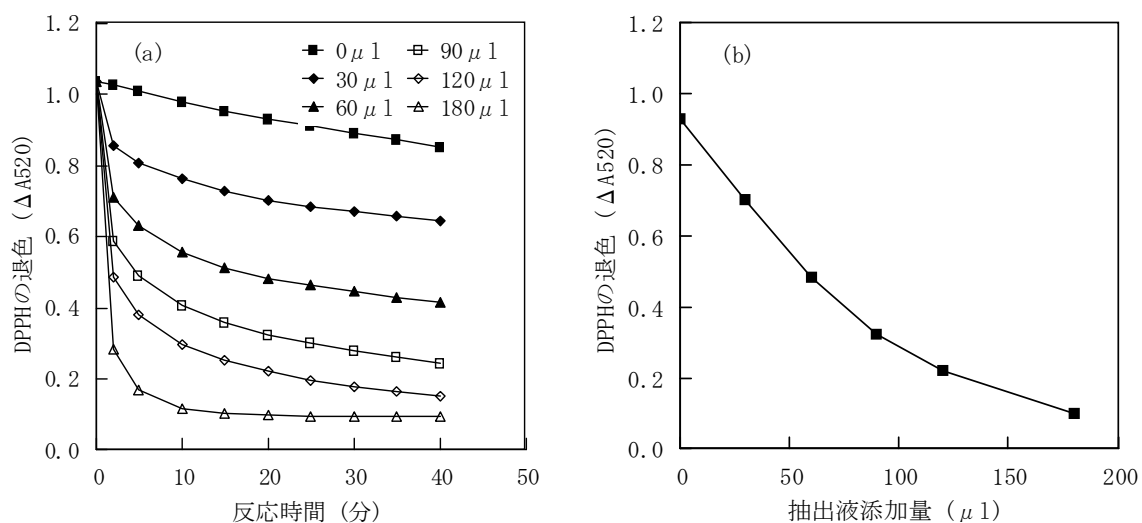
須田ら (1999) は様々な農産物や食品の DPPH ラジカル消去能の測定法を開発した。しかしながらこの方法は簡便ではあるが、大量の育種素材を評価するためにはさらに簡易・迅速な方法の開発が必要である。そこでソバのラジカル消去能の評価に適した方法を従来方法 (須田, 1999) を改良することで開発を試みた。

従来の須田 (1999) の方法では抗酸化物質を含むサンプルを 80 %エタノールにホモジナイザーで繰り返し抽出による調製であるが、煩雑で長時間を要するためソバ粉から抗酸化物を 1 回で抽出する方法について検討した。第 7 図に DPPH ラジカル消去能とポリフェノール含量の 80 °C, 80 %エタノールによる抽出の経時変化を示した。DPPH ラジカルの消去に伴う DPPH の退色値 (ΔA_{520}) とポリフェノール含量とも 15 ~ 180 分間のソバ粉からの抽出時間による変化はほとんど認められなかった。以上の結果、30 分を抽出時間に決定した。

次に反応時間について検討した。第 8 図 (a) に示したように DPPH 溶液の 520 nm の

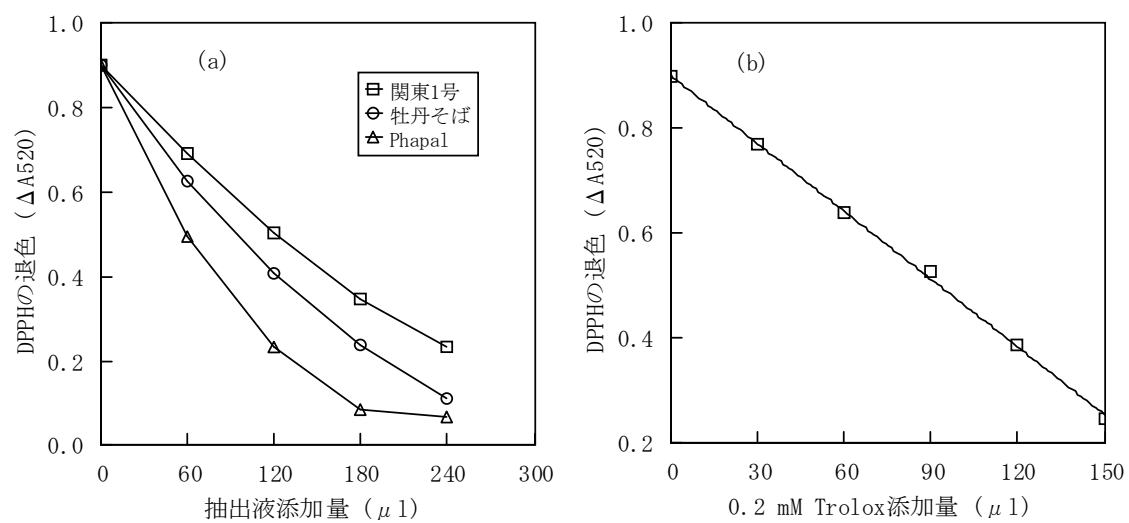


第7図. 80%エタノールによるソバ粉（牡丹そば）抽出時間とDPPHラジカル消去に伴う退色およびポリフェノール含量との関係.

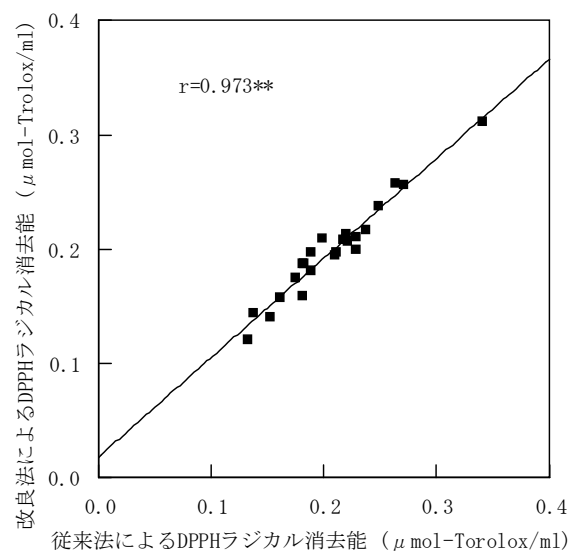


第8図. 牡丹そばのソバ粉からの80%エタノール抽出液によるDPPHラジカル消去に伴う退色.

添加した抽出液の量は0~180 μl の範囲とした (a). 20分経過後, DPPHの退色が安定状態になったとき (a) から ΔA_{520} の値を集計して, 添加液量と20分後のDPPHの退色との関係を示した (b).



第9図. ソバ3品種の抽出液 (a) およびTrolox (b) によるDPPHの退色.



第10図. DPPHラジカル消去能の従来法による測定値と改良法による測定値の相関.

吸光度は希釈した抽出液を加えた直後から 5 分間急速に低下し、その後低下は緩やかとなり、20 分後 DPPH の吸光度は安定となった。したがって反応時間は 20 分に決定した。

第 8 図 (b) に希釈した抽出液の添加 20 分後の添加量と ΔA_{520} の関係を示した。反応液の吸光度は希釈した抽出液の添加量が 0 ～ 0.06 ml の範囲では直線的な減少であった。その結果、反応液に添加する希釈した抽出液の量は 0.06 ml (抽出液 0.015 ml (ソバ粉 1.5 mg) に相当) に決定した。

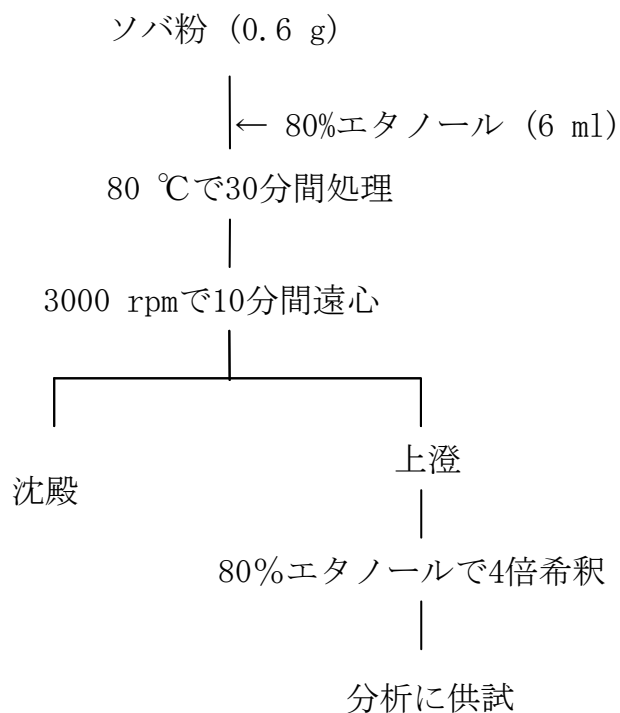
第 9 図 (a) にソバ 3 品種の希釈した抽出液の添加量と ΔA_{520} の関係を示した。吸光度の減少のパターンは第 8 図 (b) に示したのと同様であった。一方第 9 図 (b) に示したように Trolox は添加量の増加と共に吸光度は直線的に減少した。反応液に希釈した抽出液を 0.06 ml 添加した場合、吸光度の減少は 0.4 ～ 0.8 であり、この範囲は 0.2 mM の Trolox 溶液の 0.006 ～ 0.024 ml に相当した。

第 10 図に DPPH ラジカル消去能について須田 (1999) の従来法で得られた値と本研究で確立した方法で得られた値の関係を示した。ここでは ΔA_{520} を $\mu\text{mol-Trolox/ml}$ 抽出液に換算した。両者の間には有意な正の相関 ($r=0.973^{**}$) が認められたため、開発した手法はソバ粉のラジカル消去能を評価するのに従来法と同程度の精度を有することが示された。この確立した測定法に関しては、第 11 図に抽出液の調製法を、第 12 図には DPPH ラジカル消去能の測定法について示した。

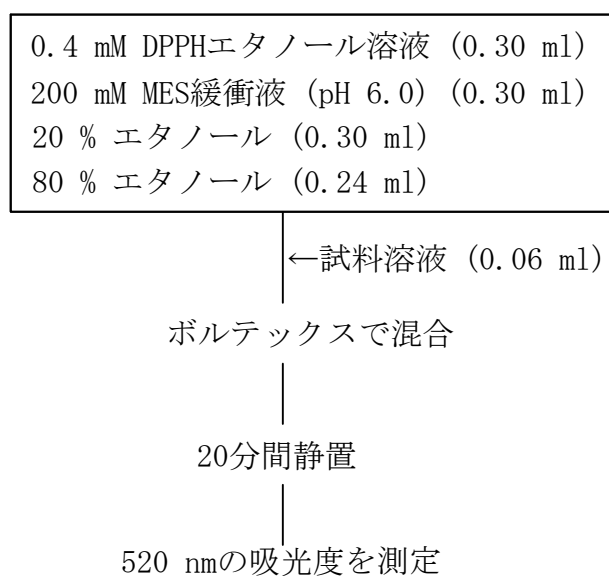
3) 考察

本研究において育種素材のスクリーニングに適したソバ粉の簡易迅速なラジカル消去能の測定法の開発を試みた。この DPPH ラジカル消去能として評価する方法は、DPPH ラジカルの消去に伴う紫色の退色を分光光度計で測定することで評価できるため汎用性に優れている。本法は従来方法 (須田, 1999) と比較して約 10 倍程度の処理速度を達成できたため、さらに短時間で多数の試料の分析が可能となった (一日当たり 100 点以上)。Watanabe et al. (1995) は高抗酸化能の育種素材をスクリーニングするには高ポリフェノール含量で選ぶのが便利であると報告しているが、ポリフェノール法と比較して本法は直接的に抗酸化能を評価できることが利点である。さらに沖ら (2001) はフライドチップの DPPH ラジカル消去能はスーパーオキシドラジカル消去能と高い相関があることを示しており、DPPH 消去法により抗酸化能を評価する方法は十分な信頼性があると考えられる。この方法はソバのみでなく様々な作物に関して高抗酸化能を有する育種素材を実際に選抜

する手段として役立つであろう.



第11図. ソバ粉抽出液の調製手順.



第12図. DPPHラジカル消去能の測定手順.

第2節 九州で栽培，収穫された普通ソバ子実のラジカル消去能の品種間差異

食用作物中の抗酸化物質はフリーラジカルによる酸化的障害から人間の体を守る役割を果たすため注目されている．ソバはビタミン B₁, B₂, E およびルチン，ケルセチン，プロアントシアニジン（縮合タンニン）等のフェノール物質など様々な抗酸化物質を含むことが知られている（渡辺ら，1995；Watanabe et al., 1997；Watanabe, 1998）．

ソバ子実に含まれる抗酸化物質含量の品種間差異についての報告はいくつかある．Kitabayashi et al. (1995) および Ohsawa and Tsutsumi (1995) はソバ粉のルチン含量の品種間差異について報告した．ビタミン E (Honda, 1995) およびフェノール酸 (Oomah et al., 1996) の品種間差異と環境変異についても報告がある．渡辺ら (1995) はソバ子実のエタノール抽出液の抗酸化能が品種によって異なっていること，ポリフェノール含量と相関があることを報告した．さらにソバ殻の抗酸化物質はフラボノイドを含むフェノール物質であること (Watanabe et al., 1997)，子実の抗酸化物質はカテキンであることが報告されている (Watanabe, 1998)．一方 Oomah and Mazza (1996) は抗酸化能とフラボノイド含量との間には有意な相関が認められたがルチン含量との間には認められなかったと報告した．このようにソバ子実の抗酸化能の品種間差異と環境変異についての報告はあるが，いずれも夏型品種の評価が主であり，九州で栽培，収穫された秋型品種のソバ子実の抗酸化能についての報告は無い．

本研究では九州で栽培，収穫された様々なソバ遺伝資源の子実から 80 %エタノール抽出液を調製して，DPPH ラジカル消去能を調査比較した．さらに DPPH ラジカル消去能と総ポリフェノール含量との関係も調査した．

1) 材料および方法

(1) ソバ粉の調製

日本，ロシア，中国，ネパール，カナダ，フランスの普通ソバ品種 32 点を供試した．これらの品種を乱塊法，2 反復で 1998 年 8 月 20 日に九州農業試験場（現九州沖縄農業研究センター）の圃場に播種し，成熟期に収穫した．収穫後，約 2 週間風乾して脱穀した．得られた子実は剥皮の後，小型テストミル（ブラベンダー社製，クオドルマットジュニア）で製粉して 60 メッシュを通過した粉を分析に供試した．

(2) 気象条件

九州農業試験場で生育期間中の気温と日射量を観測した。それぞれの品種における積算気温は毎日の平均気温から、積算日射量は毎日の日射量から計算した。

(3) 抽出液の調製

第 11 図に示した手順で抽出液を調製した。0.6 g のソバ粉をスクリュウキャップ付きの試験管に入れて、6 ml の 80 %エタノールで 80 °C に加温して 30 分間抽出した。抽出後、急冷して 3000 rpm で 10 分間遠心して (05PR-22, 日立)、得られた上澄みを分析に供試した。

(4) DPPH ラジカル消去能の測定

DPPH ラジカル消去能は第 12 図に示す手順で測定した。前記抽出液を 80 %エタノールで 4 倍に希釈して供試した。DPPH 溶液は 99.5 %のエタノールに 0.4 mM の濃度になるよう DPPH (和光) を溶解して調製した。反応液の組成は 0.4 mM DPPH を 0.3 ml, 200 mM MES 緩衝液 (pH 6.0) を 0.3 ml, 20 %エタノールを 0.3 ml, 80 %エタノール 0.24 ml とした。希釈した抽出液を 0.06 ml 加えて反応開始とし、20 分間静置後 520 nm の吸光度を測定した。同時にコントロールとして 80 %エタノール反応液に 0.3 ml, 標準として Trolox® (Sigma-Aldrich, USA) を希釈した抽出液の代わりに加えて検量線を作成した。Trolox 溶液は 80 %エタノールに 0.2 mM の濃度になるよう溶解して調製した。得られた結果はコントロールに対する 520 nm の吸光度の差 (ΔA_{520}) を μ mol-Trolox/ml 換算して表した。

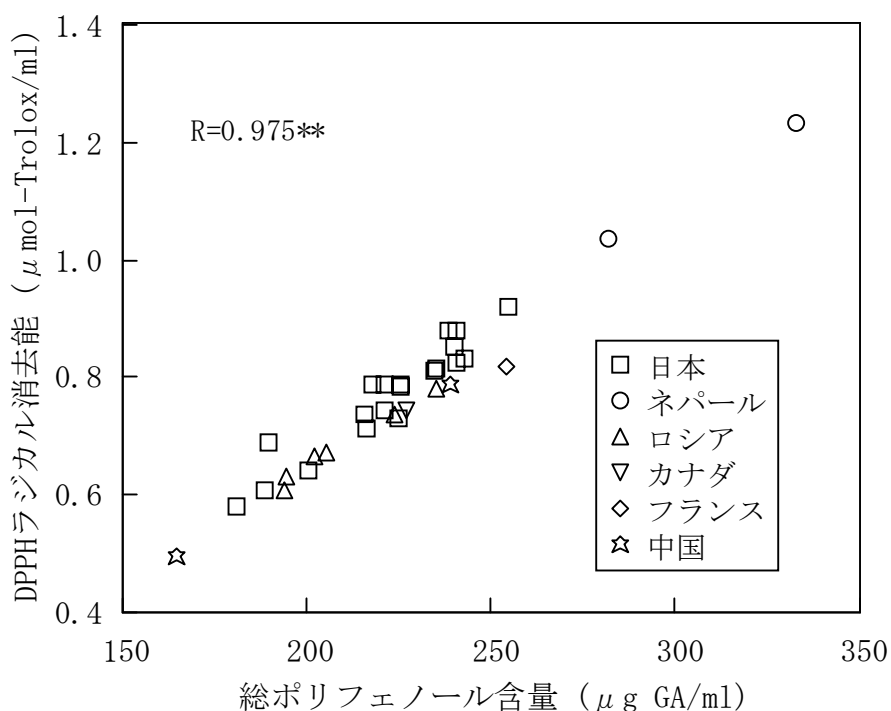
(5) 総ポリフェノール含量の測定

総ポリフェノール含量はフォーリンチオカルト法により測定した (Furuta ら, 1998)。1.0 ml の抽出液に 2 倍に希釈した 1.0 ml のフェノール試薬を混合して 3 分間静置後、1.0 ml の 10 %炭酸ナトリウム溶液を加えて 1 時間静置した。その後 3000 rpm で 10 分間遠心して (05PR-22, 日立) 得られた上澄みの 750 nm の吸光度を測定した。標品として没食子酸を用いて総ポリフェノール含量を没食子酸相当量 (μ gGA/ml) に換算した。

2) 結果

第 15 表にソバ各品種の生育期間中の積算温度と積算日射量を示した．それらの値はそれぞれ 1246.1 ～ 1944.3 °C および 764.2 ～ 1204.2 MJ/m² であった．国内の品種に関しては抗酸化能と気象との相関は認められなかった．第 16 表にソバ各品種の DPPH ラジカル消去能について示した．その値の範囲は 0.497 ～ 1.233 μ mol-Trolox 当量/ml (1 ml は 100 mg のソバ粉に相当) であった．これらの品種の内，ネパールの品種である「PHAPAL」は 1.233 μ mol-Trolox 当量/ml で最も高い値であった．他のネパールの品種「MITEPHAPAL」も高い値を示し，ネパールの品種は高いラジカル消去能を示した．それに次いでカナダとフランスの品種が高かった．中国の品種である「内蒙古 9」は最も低く 0.497 μ mol-Trolox 当量/ml であった．日本の品種は 0.581 ～ 0.922 μ mol-Trolox 当量/ml の範囲で「階上早生」が最も高く「葛生在来」が最も低かった．

これらの品種についてラジカル消去能と総ポリフェノール含量との間に 1 % 水準の有意な正の相関 ($r=0.975$) が認められた (第 13 図)．DPPH ラジカル消去能と総ポリフェノール含量の分散分析を行った結果，両方とも品種間差が有意であった (第 17 表)．



第13図．DPPHラジカル消去能と総ポリフェノール含量との関係．

第15表. ソバ各品種の生育期間中の積算温度および積算日射量.

品種	積算温度 (°C)	積算日射量 (MJ/m ²)
[日本]		
有明*	1490.5	887.4
朝日村在来3	1543.3	909.5
牡丹そば	1246.1	764.2
花園在来1	1562.1	926.1
花園在来2	1283.2	792.2
花園在来3	1526.1	905.8
階上早生	1325.3	810.2
祖谷産	1562.1	926.1
蛇穴在来	1474.8	880.4
関東1号	1438.0	848.4
香川在来	1543.3	909.5
葛生在来	1417.5	847.3
小千谷在来3	1543.3	909.5
大隅在来*	1761.6	1054.3
三度ソバ (美川)	1348.7	821.8
しなの夏そば	1246.1	764.2
徳島	1396.7	844.3
徳島在来	1417.5	847.3
耶馬溪在来4*	1508.0	898.1
矢板在来	1458.1	863.9
[ロシア]		
Ballada	1438.0	848.4
Bogatyr	1490.5	887.4
Gloria	1438.0	848.4
Shatilovskaya5	1438.0	848.4
Skorospelaya86	1458.1	863.9
Sumchanka	1458.1	863.9
[中国]		
内蒙古9	1396.7	844.3
雲南省	1944.3	1204.2
[フランス]		
CV. LF. HELLER	1578.6	943.3
[カナダ]		
TOKYO	1396.7	844.3
[ネパール]		
MITEPHAPAL	1944.3	1204.2
PHAPAL	1944.3	1204.2

*:九州在来種.

第16表. ソバ粉のDPPHラジカル消去能.

品 種	DPPH ラジカル消去能* (μ mol-Trolox 当量/ml)
[日本]	
有明	0.786
朝日村在来3	0.816
牡丹そば	0.825
花園在来1	0.879
花園在来2	0.812
花園在来3	0.788
階上早生	0.922
祖谷産	0.730
蛇穴在来	0.789
関東1号	0.608
香川在来	0.643
葛生在来	0.581
小千谷在来3	0.851
大隅在来	0.788
三度ソバ (美川)	0.834
しなの夏そば	0.879
徳島	0.737
徳島在来	0.713
耶馬溪在来4	0.744
矢板在来	0.689
[ロシア]	
Ballada	0.666
Bogatyr	0.608
Gloria	0.675
Shatilovskaya5	0.782
Skorospelaya86	0.633
Sumchanka	0.738
[中国]	
内蒙古9	0.497
雲南省	0.788
[フランス]	
CV. LF. HELLER	0.819
[カナダ]	
TOKYO	0.746
[ネパール]	
MITEPHAPAL	1.036
PHAPAL	1.233

*:2反復試験の平均値.

第17表. ソバ粉のDPPHラジカル消去能と総ポリフェノール含量の分散分析.

	df	DPPHラジカル消去能			総ポリフェノール含量		
		SS	MS	F	SS	MS	F
合計	63	1.3713	0.0218		69551.4	1104.0	
品種	31	1.1719	0.0378	6.6**	60280.8	1944.5	6.9**
反復	1	0.0223	0.0223	3.9	481.3	481.3	1.7
誤差	31	0.1772	0.0057		8789.3	283.5	

**：1%水準で有意.

3) 考察

九州地方は日本でソバが栽培されている地域の中で最も温暖な地域である. この地域で栽培されている秋型品種は長い生育期間と高い収量が特徴である. 九州の中央部に位置する熊本県ではソバは 11 月下旬まで栽培可能である. 九州全域では 8 月の播種から地域によっては 12 月上旬まで栽培されており, 日本国内では北海道に次ぐソバの産地である. しかしながら九州で栽培されたソバの栄養成分や生理についての報告は少なく抗酸化能についての研究例は皆無である. 過去のソバ粉の抗酸化能についての報告で, 渡辺ら (1995) は日本とロシアの品種 10 点について調査し, 抗酸化能の品種間差について明らかにした. Oomah と Mazza (1996) は抗酸化能の変異は品種間差と環境変異の複合によると報告した. しかしこれらの報告は秋型品種の抗酸化能についての評価は含まれていない. 本研究において様々な地域由来で多彩な生態型の品種 32 点について DPPH ラジカル消去能により評価した結果, 九州で収穫されたソバの抗酸化能は大きな品種間差異を有することが明らかとなった (第 16 表). この品種間差異の幅は過去の報告よりも大きかった. これは九州は既報の試験地より温暖であるため, 秋型品種を含む様々な生態型の品種を供試できたためと考えられた. 特にネパールの品種は他の地域由来の品種よりも高い DPPH ラジカル消去能を示した. これまでにもネパールの品種は高ルチン含量の品種が存在することが報告されている (Kitabayashi et al., 1995a). また一方で Oomah and Mazza (1996) の報告と同様に, 本研究においてもラジカル消去能とルチン含量の相関は認められなかった.

Watanabe (1998) により子実の主要な抗酸化物質はカテキンであることが報告されている。したがってネパールの品種が高ラジカル消去能であるのはルチンのみでなく、カテキンなどその他の抗酸化物質が大きく寄与していることが考えられた。このようにネパールの品種は成分について興味深い特性を有していることが示された。Baniya et al. (1995) はネパールの品種の農業関連形質および形態的特性を調査した結果、大きな多様性を有しソバの改良のための資源として有用であることを示した。本研究においてネパールの品種は、ソバの品質の改良に対しても有用な資源であることを明らかにした。

また九州で収穫されたソバ品種について、DPPH ラジカル消去能と総ポリフェノール含量との間に高い相関が認められた。この結果は東北地方で収穫されたソバ品種について調査した渡辺ら (1995) の結果と一致している。ラジカル消去能に影響するポリフェノールとしてルチン、ケルセチン、プロアントシアニジン等があげられる。今後、高ラジカル消去能（高抗酸化能）の品種を育成するためにはラジカル消去能の改良に寄与するラジカルスカベンジャー（抗酸化物質）の同定が必要である。さらに第2章で示したように子実成分は環境による影響を受けやすいため、効率的にラジカル消去能が高い品種を育成するためには、遺伝的および環境による影響を明らかにし、かつ克服する必要がある。

第4章 ダッタンソバ遺伝資源の特性評価およびルチン分解酵素の検出法の開発

第1節 九州におけるダッタンソバの栽培評価

ソバ属は普通ソバ、ダッタンソバおよび宿根ソバの3種が主要な種である。これらの内、食用に供されているのは普通ソバとダッタンソバである。普通ソバが各地で栽培され広く食用に供されている一方で、ダッタンソバは国内においては限られた地域で栽培されているに過ぎない。しかしながら近年ダッタンソバは普通ソバと比較して血圧調整作用をもつルチンを約100倍含むこと (Kitabayashi et al. 1995c), 高蛋白質であること (大澤ら, 1993) 等、栄養性および機能性の面で優れていることが明らかとなり、健康食品素材として注目されつつある。さらにダッタンソバは自殖性であるため他殖性の普通ソバと比較して稔実歩合が高い長所がある (古明地, 1990)。このように普通ソバよりも優れた特性を持つ一方でダッタンソバは普通ソバよりも脱粒しやすい (Oba et al., 1999), 苦みが強い (古明地, 1990) などの問題点も有する。ダッタンソバの栽培評価に関する報告は普通ソバと比較して少ない。Kitabayashi et al. (1995c) のルチン含量の品種間差異について、木村・川勝 (1995) の栽培方法の検討、木村ら (1997) の寒地における夏型ダッタンソバの収量および品質の品種間差等の報告はあるが、ダッタンソバを九州で栽培評価した報告は無い。第2章の普通ソバで示されたように、ダッタンソバについても九州の気象条件を含めた栽培環境が収量、品質に影響を及ぼすと考えられる。本研究はダッタンソバを九州の秋栽培の条件下で栽培評価し、九州における新規導入作物としての可能性について検討した。

1) 材料および方法

1995年と1996年の両年ともソ連、ネパール、ユーゴスラビアおよびフランス原産地のダッタンソバ5品種を供試した。各年とも畝幅60 cm×株間6.5 cmで条播し、本葉が2～3枚展開した頃に間引いて1本仕立てにした (25.6 株/m²)。1区面積は7.2 m²、試験区の配置は乱塊法、2反復とした。施肥は全量元肥とし、1995年は窒素、リン酸、カリそれぞれ1.1 g/m², 3.5 g/m², 3.0 g/m², 1996年は1.1 g/m², 1.7 g/m², 1.7 g/m²施用した。また2年とも各作付け前に土壌改良材として苦土石灰50 g/m², 熔燐30 g/m²を投入した。1995年は8月23日、1996年は8月22日に播種した。成熟期に各試験区の中央部から1区当たり40本刈り取り、2週間以上風乾後、脱穀して塵を取り除いた子実について子実重を

測定し収量を算出した。これらの皮付きの子実は、1995 年は国光社（株）の小型製粉器（やまびこ号 L 型）により製粉した。1996 年はブラベンダーテストミル（クォドルマット・ジュニア型）により製粉し、60 メッシュの篩を通過した粉について成分分析に供試した。製粉歩留は得られた粉と子実重の比率から算出した。ルチン含量は第 2 章第 2 節と同様に小原ら（1989ab）の方法を参考にした。ソバ粉 0.1 g を 80 °C のメタノール 20 ml で 2 時間抽出後 3000 rpm で 10 分遠心、得られた上澄みを 0.45 μ m のフィルターで濾過してさらにメタノールで 10 倍希釈の後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した。HPLC は日本分光（株）の 800PU シリーズ、875UV 検出器を用いた。カラムは資生堂（株）の CAPCELLPAK C₁₈、移動相は 2.5 % 酢酸/メタノール/アセトニトリル（35:5:10）、流速は 1.0 ml/分、検出波長は 360 nm、カラム温度は 40 °C とした。粗蛋白含量はケルダール法によって得られた全窒素含量に蛋白質換算係数 6.31 をかけて求めた。粗脂肪含量はジエチルエーテル抽出によるソックスレー法により定量した。水分含量は 105 °C、3 時間乾燥により求めた。色彩値は日本電色工業（株）のスペクトロカラーメーター SE2000 により L*（明度）、a*（赤度）、b*（黄度）を測定した。分散分析は、2 年間のデータをもとにした処理・年次 2 元配置法で行った。遺伝率は分散分析の結果得られたそれぞれの平均平方、品種（MS_v）、年次（MS_y）、交互作用（MS_{y × v}）、反復（MS_R）および誤差（MS_E）より、三留（1960）の方法でそれぞれの分散、品種（ σ^2_v ）、年次（ σ^2_y ）、交互作用（ $\sigma^2_{y \times v}$ ）、反復（ σ^2_R ）および誤差（ σ^2_E ）を下記の式で算出して推定した。

$$E[MS_y] = \sigma^2_E + v \sigma^2_R + r v \sigma^2_y$$

$$E[MS_R] = \sigma^2_E + v \sigma^2_R$$

$$E[MS_v] = \sigma^2_E + r y \sigma^2_v + r \sigma^2_{y \times v}$$

$$E[MS_{y \times v}] = \sigma^2_E + r \sigma^2_{y \times v}$$

$$E[MS_E] = \sigma^2_E$$

品種数 v, 反復数 r, 年数 y とした。

以上の式をで得られた分散から下記の式で遺伝率 h^2 を推定した。

$$E[h^2] = \sigma^2_v / (\sigma^2_y + \sigma^2_v + \sigma^2_{y \times v} + \sigma^2_E)$$

また各形質間の相関および年次間相関も計算した。

2) 結果および考察

第 18 表に 1995 年および 1996 年の成熟期、草丈、全重、収量および千粒重について示

第18表. 1995年および1996年の各品種の成熟期, 草丈, 全重, 収量および千粒重.

原産地		成熟期（月・日）		草丈（cm）		主茎節数		一次分枝数		全重（kg/a）		収量（kg/a）		千粒重（g）	
		1995	1996	1995	1996	1995	1996	1995	1996	1995	1996	1995	1996	1995	1996
ユーゴスラビア	ユーゴスラビア	11. 15	11. 4	57. 8	72. 5	14. 9	18. 0	6. 8	7. 0	26. 9	31. 8	15. 4	17. 8	19. 0	18. 7
Tubercuiatum	ソ連	11. 13	11. 4	46. 5	47. 1	13. 0	14. 1	6. 3	6. 5	18. 1	25. 2	10. 9	15. 1	18. 7	18. 9
Rotundatiem	ソ連	11. 15	11. 7	117. 5	110. 8	18. 9	21. 8	8. 4	8. 3	47. 7	54. 1	23. 2	29. 0	18. 3	18. 2
Pontivy	フランス	11. 15	11. 7	88. 7	91. 4	17. 9	19. 6	8. 0	7. 4	33. 6	38. 3	20. 0	22. 2	18. 1	18. 0
Nepal（SIMKOT）	ネパール	11. 7	11. 12	87. 7	82. 8	20. 4	21. 5	8. 9	10. 8	36. 6	38. 1	18. 3	18. 3	19. 6	18. 0
平均				79. 6	80. 9	17. 0	19. 0	7. 7	8. 0	32. 6	37. 5	17. 6	20. 5	18. 7	18. 4
普通ソバ	最大値	—1)	11. 5	117. 9	132. 2	15. 9	19. 1	4. 5	4. 7	52. 7	58. 7	28. 2	26. 4	51. 5	45. 9
	最小値		10. 22	10. 16	55. 4	69. 4	8. 5	8. 6	2. 4	3. 1	13. 2	17. 6	4. 8	6. 5	22. 7

1) 成熟期に達しなかった.

第19表. 1995年から1997年のそれぞれの年における収量と各農業形質との相関.

	生育日数	草丈	主茎長	主茎節数	一次分枝数	全重	千粒重	果皮率	製粉歩留
1995年 (n=5)	0. 111	0. 970**	0. 958**	0. 830	0. 823	0. 966**	-0. 327	-0. 459	0. 465
1996年 (n=5)	0. 192	0. 930*	0. 940*	0. 713	0. 177	0. 964**	-0. 583	0. 474	-0. 393

*, **; 5%水準, 1%水準でそれぞれ有意.

第20表. 1995年と1996年の年次を込みにした分散分析の平均平方と遺伝率.

	自由度	草丈	主茎長	主茎節数	一次分枝数	全重	収量	千粒重	果皮率	製粉歩留	分散の推定値
全体	19										
品種	4	10463. 318**	9450. 020**	148. 611**	29. 523**	1876. 319**	385. 172**	2. 408	25. 007**	41. 840**	MS _V
年次	1	8. 450	13. 778	19. 602**	0. 545**	120. 726**	42. 277**	0. 724	45. 086**	93. 634**	MS _V
交互作用	4	284. 863*	228. 474*	3. 567	3. 359	18. 330	19. 417	1. 848	6. 906**	20. 205**	MS _{V×V}
反復	2	77. 956	61. 960	0. 976	0. 218	53. 111	13. 604	0. 855	0. 221	1. 096	MS _R
誤差	8	137. 367	114. 828	13. 962	3. 790	85. 492	23. 643	2. 480	0. 777	5. 214	MS _E
遺伝率1)		0. 930	0. 937	0. 819	0. 693	0. 899	0. 803	0. 071	0. 355	0. 204	

1) $E[MS_V] = \sigma^2_E + 5\sigma^2_R + 10\sigma^2_V$, $E[MS_R] = \sigma^2_E + 5\sigma^2_R$,
 $E[MS_V] = \sigma^2_E + 4\sigma^2_V + 2\sigma^2_{V \times V}$,
 $E[MS_{V \times V}] = \sigma^2_E + 2\sigma^2_{V \times V}$, $E[MS_E] = \sigma^2_E$.
 $E[h^2] = \sigma^2_V / (\sigma^2_V + \sigma^2_E + \sigma^2_{V \times V} + \sigma^2_E)$.

*, **; 5%水準, 1%水準でそれぞれ有意.

した. 成熟期は両年とも 11 月上旬から中旬にかけてであった. 草丈については 1995 年は 46.6 ~ 117.5 cm, 1996 年は 47.1 ~ 110.8 cm で両年とも 2 倍を超える品種間差異を示した. 全重, 収量についても同様に両年とも約 2 倍の品種間差異を示した. その一方で千粒重は両年を通して 18.0 ~ 19.6 g で品種間差異の幅は小さかった. 普通ソバと比較すると, 主茎節数および一次分枝数が多く, 千粒重は小さかった. またダットンソバは普通ソバよりも多収であるとされている. 本研究では収量の最高値が 29.0 kg/a で同年に栽培した普

通ソバの最高値が 28.2 kg/a であったことから、普通ソバの多収品種と同程度の生産能力が示された。木村ら（1995）は 150 ～ 300 粒/m² の播種密度が多収を得るのに適していると報告しているが、本研究は疎植条件であったが木村ら（1995）の収量を上回っていた。

このように普通ソバの多収品種と同程度の子実生産能力が示される一方で、ダッタンソバの栽培が確立するためには環境に対する安定性も重要である。第 19 表に両年の収量と各農業形質の相関を示した。草丈、主茎長および全重との間には両年とも有意な正の相関が認められたが、その他の形質との間には有意な相関は認められなかった。

第21表. 各形質の年次間相関.

草丈	0.962**
主茎長	0.967**
主茎節数	0.954**
一次分枝数	0.864
全重	0.981**
収量	0.914*
千粒重	0.141
製粉歩留	0.508

*, **; 5%水準, 1%水準で
それぞれ有意.

第22表. 1996年の各品種の子実の成分含量と粉の色彩値.

品 種	ルチン (mg/100gDW)	蛋白質 (DW%)	脂肪 (DW%)	L*	a*	b*
ユーゴスラビア	1528.4	11.80	2.292	82.14	-1.67	13.32
Tubercuiatum	1704.1	12.04	2.347	82.14	-1.52	12.99
Rotundatiem	1742.9	12.09	2.494	82.05	-2.08	14.70
Pontivy	1616.9	10.38	2.288	81.90	-1.89	14.00
Nepal (SIMKOT)	2010.8	13.38	2.581	83.98	-2.21	14.63
普通ソバ 最大値	29.8	10.49	2.386	90.11	-0.12	7.51
普通ソバ 最小値	8.8	9.19	1.988	85.36	-0.82	6.22

第 20 表に年次を込みにした分散分析の結果を示した。品種については千粒重以外の全ての形質が有意であった。また年次については主茎節数、一次分枝数、全重、千粒重、果皮率および製粉歩留が有意であった。品種年次の交互作用については草丈、主茎長、果皮率および製粉歩留が有意であった。一方で草丈、主茎長、主茎節数等形態に関する形質および全重、収量等生育量に関する形質の遺伝率は 0.8 を上回る高い値を示したこと、第 21 表に示したように草丈、主茎長、主茎節数及び全重は 1 %水準で、収量は 5 %水準で有意であったことからこれらは安定した形質であることが示された。しかしながら全重および収量等生育量に関する形質は第 2 章の普通ソバでも示したように、基本的には気象条件などの環境に影響されやすい形質であることに留意する必要がある。一方形態に関する形質のうち一次分枝数の遺伝率は他の形質よりも低く、千粒重はさらに低い値となった。一次分枝数については疎植条件による影響が考えられたが、本研究の範囲では栽培条件と一次分枝数の関係は明らかでなかった。千粒重については供試した品種の変異幅が小さかったため遺伝率は相対的に低い値となったが、年次間差が小さかったことから安定した形質であると考えられた。

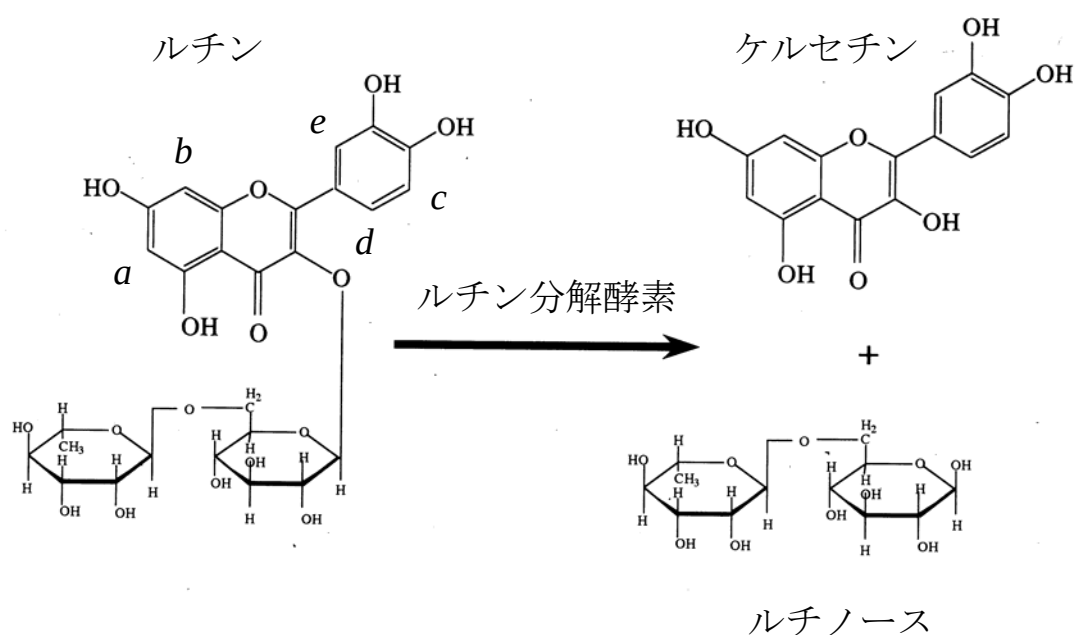
第 22 表に 1996 年の各品種の子実の成分含量を示した。ルチン含量は 1528.4 ~ 2010.8 mg/100gDW で草丈等の形態に関する形質と比較して変異幅は小さかった。粗蛋白質および粗脂肪含量についてはそれぞれ 10.38 ~ 13.38 DW %, 2.288 ~ 2.581 DW %でルチン含量よりもさらに変異幅は小さかった。Kitabayashi et al. (1995c) の報告と同等にダッタンソバのルチン含量は普通ソバの約 100 倍含まれていた。また粗蛋白含量および粗脂肪含量とも普通ソバより高かった。ダッタンソバ粉の色彩値について調査した結果、L*は 81.90 ~ 83.98, a*は-2.21 ~ -1.52, b*は 12.99 ~ 14.70 の範囲であった。同年に調査した普通ソバ粉と比較して白度が低く黄緑が強い特徴があった。

以上のようにダッタンソバは普通ソバと形態および子実成分が異なっていることが確認された。本研究で報告された収量、品質はこれまでに報告された水準を満たしていることから九州においてもダッタンソバの栽培は十分可能であると考えられた。一方でダッタンソバには脱粒性、苦みなどの改良点が残されている。脱粒性については大場ら (2001) と藤村ら (2001) は、普通ソバはダッタンソバよりも小枝が太いため小枝の抗張強度は強く脱粒しにくい、断面積強度はダッタンソバが普通ソバよりも強かったこと、4 倍体化により小枝を太くすることで脱粒性が改善されることを示した。苦味については原因物質の一つにケルセチンが挙げられている (川上ら, 1995)。ケルセチンはルチンのルチン分解

酵素による加水分解の結果生成する。ダッタンソバは普通ソバよりもルチンは多く含み、ルチン分解酵素の活性も普通ソバと比較して極めて高い（安田ら，1992）。この酵素を欠失させることが食味向上の手段の一つと考えられる。今後これらの点が改良されて栽培が広く普及することが望まれる。

第2節 ソバにおけるルチン分解酵素の分光光度計による簡易測定法の開発

ソバ子実にはアミノ酸、ビタミン、ミネラル、フラボノイドなど様々な物質が含まれる。ソバ子実に含まれるフラボノイドの中でも大部分を占めるルチンは抗酸化能 (Suzuki et al., 1991) と血圧降下作用を示す (Matsubara et al., 1985)。普通ソバ子実には 10 ~ 30 mg/100gDW, ダツタンソバ子実には 1 ~ 2 g/100gDW のルチンを含む (鈴木ら, 1987 ; Kitabayashi et al., 1995ab ; Ohsawa and Tsutsumi 1995a ; 第2章および前節)。そのためダツタンソバは高ルチン食材としての利用が期待されている。しかしながら小原ら (1989b) によって製麺の工程でルチンの損失が生じることが示され, この損失がルチンの酵素的な分解によると明らかにされて以来, この酵素 (ルチン分解酵素) に関する関心が高まっている。この酵素はルチンがケルセチンと二糖であるルチノースに分解される反応を触媒する (第14図)。これによって生じるケルセチンはルチンと同様の生理活性を示すが, 苦味成分であることが示され (川上ら, 1995), ソバの食味に大きな影響を及ぼす。かつてケルセチンは変異原活性を有すると報告されていたが (Kuroda et al., 1985), 一方でビタミンC存在下で抗ガン活性を有することが示され (Blasiak et al., 2002), 最近ではこの点に関してあまり問題視されていない。ダツタンソバは高ルチンではあるが, ルチン分解酵素が多く含まれるため, 現在ダツタンソバの製造工程では加熱による酵素の失活処理を行っている (安田, 2000 ; Yasuda, 2001)。したがって, ルチンを多く含みルチン分解酵素の欠失したダツタンソバの育成は機能性食品の素材として非常に有望であると考えられる。ルチン分解酵素については高速液体クロマトグラフィーによる活性測定法が報告されているが (安田ら, 1992), 測定のためには長時間と多くの操作を必要とする。従って本研究において, 育種素材のスクリーニングに対応した分光光度計によるルチン分解酵素の簡易・迅速な測定法の確立を試みた。



第14図. ルチン分解の反応式.

1) 材料および方法

(1) 材料

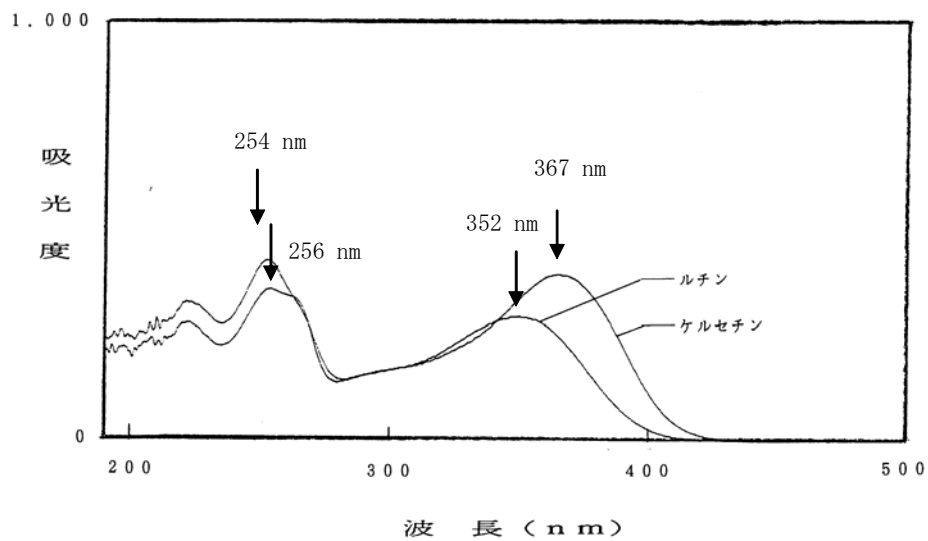
1994 年度に吸収農業試験場において栽培・収穫された普通ソバ 3 品種（階上早生，夏そば，大隅在来）およびダッタンソバ 5 品種（Rotundatiem, Tuberculatum, Pontivy, ユーゴスラビア, Nepal (Simikot)）を供試した.

(2) 抽出液の調製

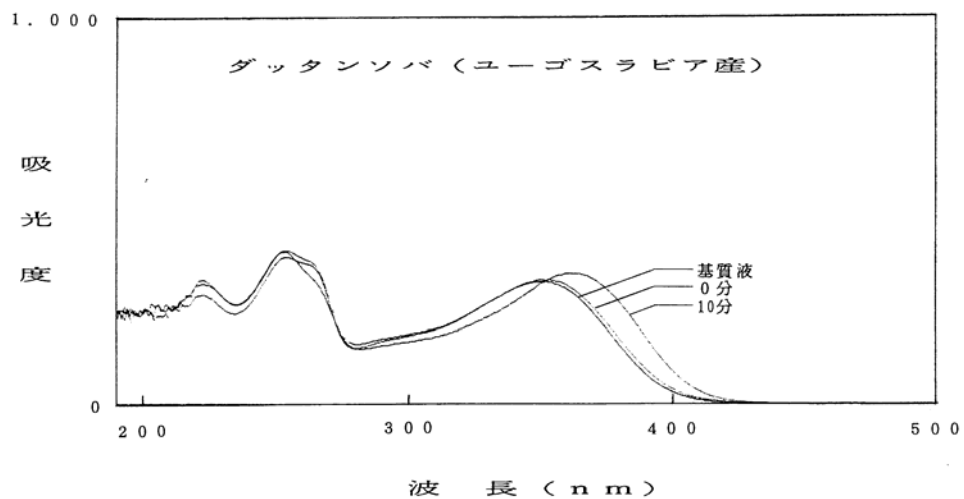
剥皮した普通ソバおよびダッタンソバ種子を乳鉢と乳棒で粉碎した. 得られたソバ粉 10 mg に 1.0 ml の 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を加えてホモジネートし, 静置して得られた上澄みを抽出液として供試した.

(3) 検量線の作成

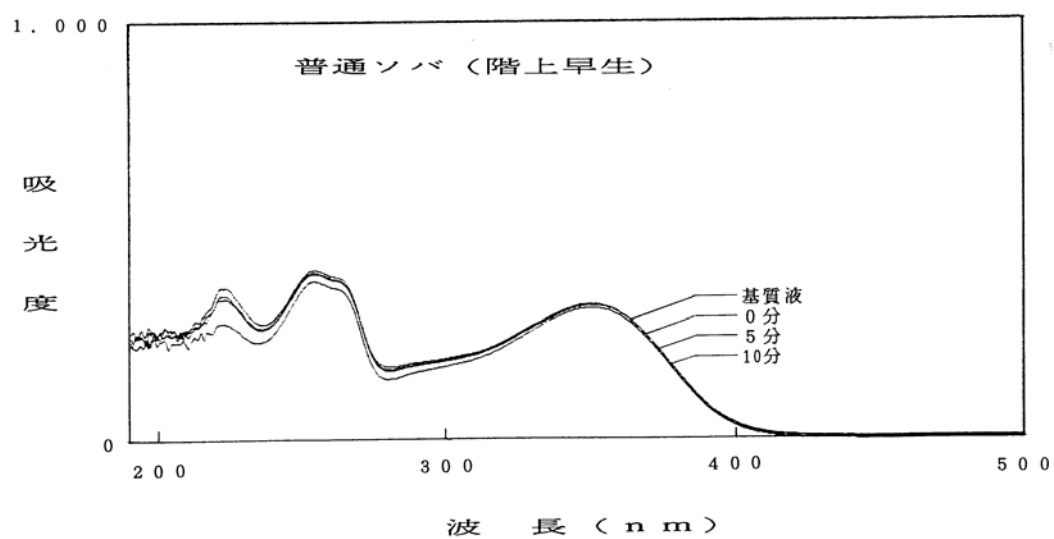
ルチンとケルセチンをそれぞれ 1.0 mg/ml の濃度となるようにメタノールに溶解後, それぞれを 0.2 M の酢酸緩衝液 (pH 5.0) で 10 倍に希釈して 100 μ g/ml に調製した. 予備試験におけるルチンとケルセチンのスペクトルパターンの分析の結果, ルチンは 256 nm と 352 nm に, ケルセチンは 254 nm と 367 nm に吸光度のピークが認められた (第 15 図).



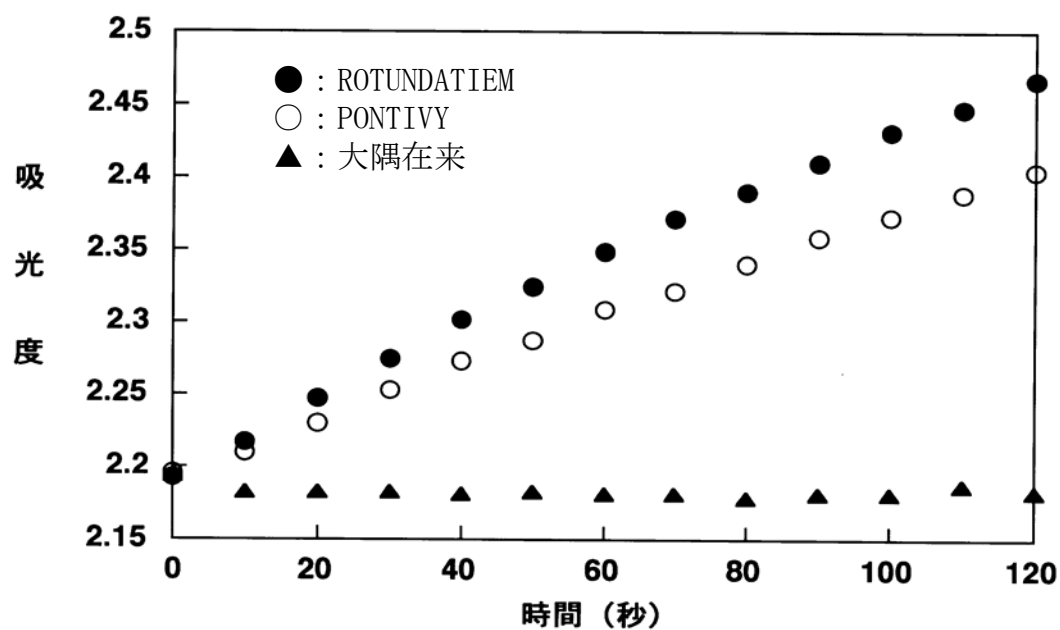
第15図. ルチンおよびケルセチン溶液のスペクトル吸収パターン.



第16図. ダッタンソバのルチン分解酵素によるルチン溶液のスペクトル吸収パターンの経時変化



第17図. 普通ソバのルチン分解酵素によるルチン溶液のスペクトル吸収パターンの経時変化.



第18図. ルチン溶液のソバ抽出液添加による367nmの吸光度の変化.

ルチン分解酵素を多く含むとされるダッタンソバの抽出液をルチン溶液に添加した場合、スペクトルパターンがルチンのパターンからケルセチンのパターンにシフトすることが確認された（第 16 図）。一方ルチン分解酵素を含まないか微量とされる普通ソバの場合、スペクトルパターンの変化は認められなかった（第 17 図）。そこでルチンとケルセチンのスペクトルパターンを比較した結果 367 nm の吸光度の差が最も大きかったため、この波長におけるルチンとケルセチンのそれぞれの検量線を作成して、ルチンとケルセチンの吸光度の差からルチン分解量の検量線を作成した。

（4）ルチン分解酵素酵素活性の測定

基質液は 1.0 mg/ml のルチンのメタノール溶液を 0.2 M 酢酸緩衝液（pH 5.0）で 10 倍に希釈して 100 μ g/ml の濃度に調製した。3 ml の基質液に 0.01 ml のソバ抽出液を添加後、40 $^{\circ}$ C、10 秒間隔で 367 nm の吸光度の変化を測定した。予備試験でダッタンソバ 2 品種「Rotundatiem」と「Pontivy」と普通ソバ 1 品種「大隅在来」の抽出液をルチン基質溶液に添加した後の 367 nm の吸光度の変化を確認したところ、酵素活性は抽出液添加後 1 分間は吸光度の直線的な増加が維持されたため（第 18 図）、10 ～ 40 秒間の吸光度変化の初期勾配から酵素活性を算出した。酵素活性の単位は 1 分あたり 1 μ mol のルチンが分解される活性を 1U（unit）として表した。ソバ子実抽出液のタンパク含量は牛血清アルブミンを標準として Lowry ら（1952）の方法で比色定量し、酵素活性は U/mg タンパクとして表した。

2）結果および考察

小原ら（1989b）によりそばの製麺中にルチンが酵素的に分解されることが示されて以来、安田ら（1992）によりダッタンソバの子実はルチン分解酵素活性は高く、普通ソバの子実は低いことが示された。これまでに報告された小原ら（1989b）および安田ら（1992）の方法は HPLC を用いており分析に 15 ～ 20 分を要する。本研究はさらに短時間で判定可能な分光光度計による方法について検討した。予備試験の結果、ルチンとケルセチンのスペクトルパターンが異なり、特に 367 nm の差が大きかったこと、およびルチン分解酵素を含むダッタンソバ抽出液をルチン溶液に添加するとルチンが分解してケルセチンが生じることによる吸光度の上昇が確認されたことにより、分光光度計による分析は可能であると判断した。この方法により供試したダッタンソバ品種のルチン分解酵素活性は、4 ～ 6

U/mg タンパクであった（第 23 表）。この結果は安田ら（1992）の報告により示された 61 U/mg タンパクの活性値よりもかなり低い値であった。この差の理由として安田ら（1992）は部分的に精製された酵素を用いたこと、および本研究で用いた濃度の 10 倍の基質液を用いたためと考えられた。そのような高濃度の基質液は分光光度計の測定限度を超えるため本研究では採用しなかった。しかしながら基質溶液に抽出液の添加後 1 分間は吸光度の直線的な増加が維持されるため（第 18 図）、基質濃度が低い条件での活性を示している。本法はルチン分解活性の最大速度を表していないが、吸光度の変化をモニターするのみでルチン分解酵素の有無の判定ができるため、1 点当たり 1 分未満で検定が可能である。普通ソバとダッタンソバの交配によって得られた雑種、あるいは変異原処理したダッタンソバのルチン分解酵素の有無について、多数の素材のスクリーニングに適した簡易迅速な方法である。

第23表. ソバ各品種の子実中の
ルチン分解酵素活性.

品種	酵素活性*
ダッタンソバ]	
Rotundatiem	5.835
Tuberculatum	4.102
ユーゴスラビア	6.226
Nepal (Simikot)	4.925
Pontivy	5.170
普通ソバ]	
階上早生	N D
夏そば	N D
大隅在来	N D

* : U/mgタンパク

第3節 普通ソバとダッタンソバのルチン分解酵素活性の核磁気共鳴法による検出

ソバ、特にダッタンソバの利用においてルチン分解酵素の存在が製麺上大きな問題となっている。この酵素が欠失したダッタンソバの素材を見出すことは、ダッタンソバの品質向上のために重要である。安田ら（1992）はルチン分解酵素活性は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分析できること、および前節では分光光度計を用いることで検出できることを示した。しかしながらそれぞれの長所と短所をあげると HPLC 法は正確であるが分析に長時間を要するのと試料の前処理が煩雑なこと、一方分光光度計による方法は簡易迅速であるが、吸光度の変化が直接に分解反応を反映しているか確認することは困難である。ここで検討する核磁気共鳴法（NMR）はチャートのシグナルから化学構造が推定でき、化学構造の変化を直接とらえることができる。本研究では、ソバのルチン分解酵素活性の検出に NMR 法が適しているかどうかを検討した。さらに育種素材のスクリーニングに NMR 法の利用適性について評価した。

1) 材料および方法

(1) 材料

九州農業試験場の試験圃場に 1995 年 8 月 23 日に播種し、成熟期に収穫した普通ソバ 3 品種（大隅在来，久木野在来，階上早生）とダッタンソバ 5 品種（Rotundatiem, Tuberculatum, ユーゴスラビア, Nepal (SIMIKOT), Pontivy) を供試した。

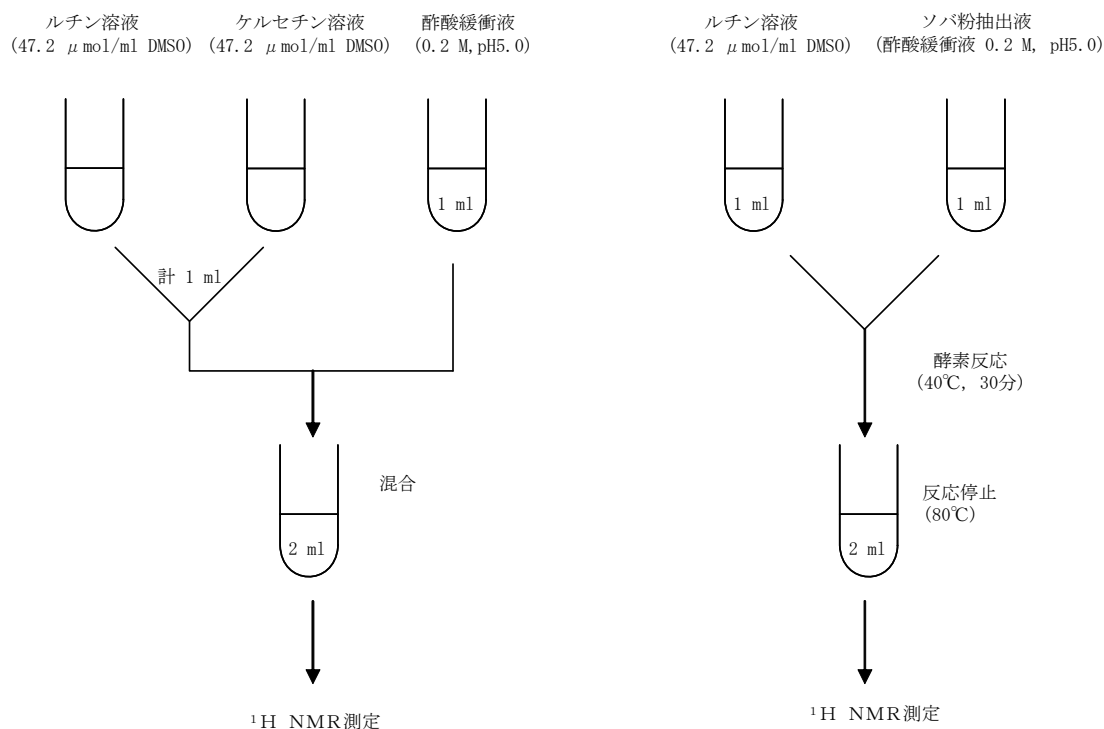
(2) 標準液の測定

市販されているルチンとケルセチン（Sigma Chemicals Co., MO, USA）を標準として供試した。後述の溶媒系とそろえるために、第 19 図（a）に示す手順で次のようにして測定した。NMR の分析には高濃度のルチンおよびケルセチン溶液を要するが、HPLC 法で用いたメタノールでは溶解度が不十分であるため、NMR 法では溶解度の高いジメチルスルホキシド（DMSO）を溶媒として用いた。しかし DMSO は酵素活性を阻害する。安田ら（1995）は 60 % DMSO 溶液までは活性は維持されることを報告した。そこで予備実験の結果、溶媒系を DMSO : 0.2 M 酢酸緩衝液=1 : 1 混合溶液に決定した。DMSO はルチンとケルセチンの溶解に、酢酸緩衝液は酵素の粗抽出（後述）に用いるものである。ルチン、ケルセチンおよびそれらの混合液（2:1, 1:1, 1:2）を DMSO 溶液から調製した。それらに

等量の 0.2 M の酢酸緩衝液 (pH 5.0) を加えた．このようにしてルチン標準液 (28.8 mg/ml, (47.2 μ mol/ml)) とケルセチン標準液 (16.0 mg/ml, (47.2 μ g/ml)) および混合液を調製した．その溶液を NMR サンプルチューブ (直径 5 mm) に深さ 50 mm となるように加え, NMR シグナルの位置の測定に供試した．

(a) ルチンとケルセチンの標準液の測定

(b) ルチン分解酵素活性の測定



第19図 NMR測定のための試料調製の手順.

(3) ルチン分解酵素活性測定試料

ルチン分解酵素活性測定試料は, 第 19 図 (b) に示す手順で調整した．普通ソバおよびダッタンソバ子実を剥皮して乳鉢と乳棒で粉碎した．得られたソバ粉 200 mg を 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に 20 分間懸濁の後, 2000 rpm で 5 分間遠心した．得られた上澄みは酵素活性の分析に供試した．基質液はルチンを DMSO に 28.8 mg/ml 溶かして調製した．基質液と上澄み液を等量に混合した．その他は先述した溶液を用いた．40 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間反

応させた後、80℃に加熱して反応を停止させた。反応の後、これらの溶液は NMR と HPLC (高速液体クロマトグラフィー) の分析に供試した。

(4) ^1H -NMR の測定

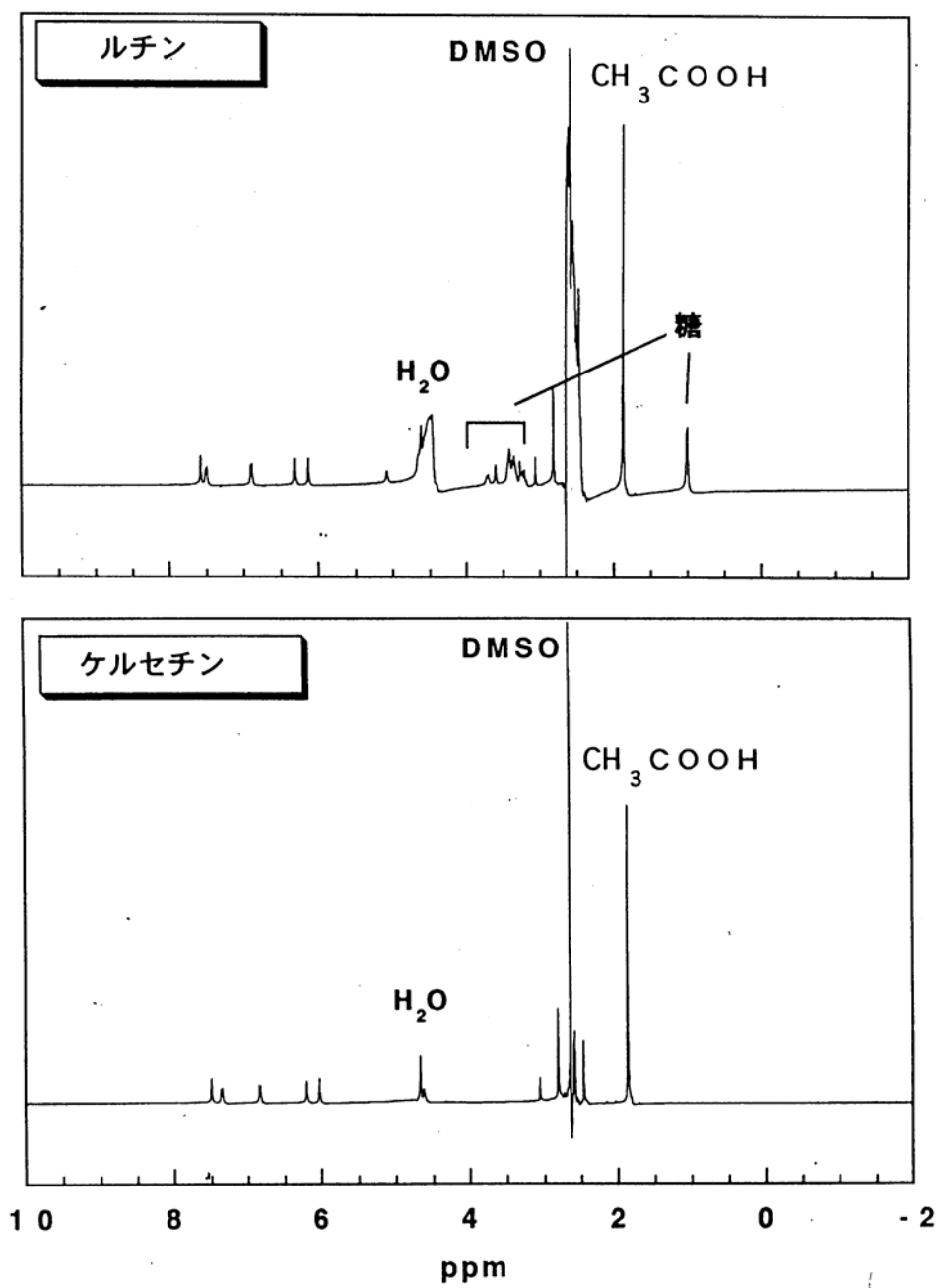
^1H -NMR スペクトラムは CPF/EX400FT NMR スペクトロメーター (400 MHz, JEOL, 東京) で測定した。測定条件は以下の通りである。PW1 (パルス幅) は 5.7 μ 秒 (45 度パルス)。積算回数 32 回とした。ACQTM (データの取り込み時間) は 2.048 秒, PD (データ取り込み完了から次のパルスまでの待ち時間) は 4.952 秒, ACQTM+PD が測定の 1 サイクルである。データポイント 32768 点を測定, 観測範囲は 8000 Hz とした。サンプルチューブを 16 rpm でスピンさせ, 0.25 Hz のブロードニングファクターでフーリエ変換した。NMR 測定での 0 ppm 調整には, DMSO+緩衝液を添加した D_2O +3 トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム-2,2,3,3- d_4 (TSP- d_4) (0 ppm 調整; ISOTEC Inc., OH, USA) の系を用いた。以降の NMR 測定は同じ条件で行った。

(5) HPLC による分析

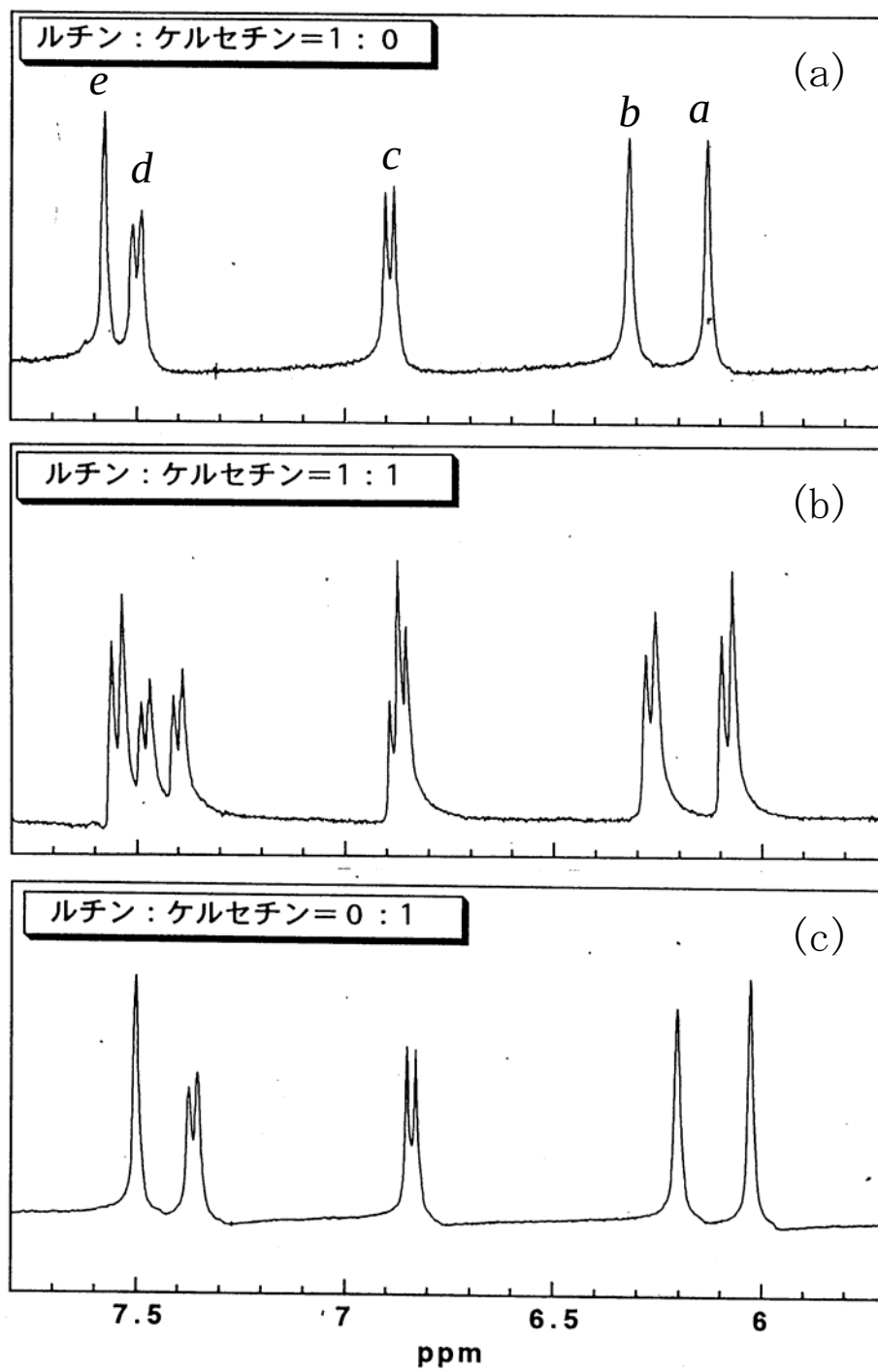
NMR の測定に供試した試料の一部は HPLC による分析にも供試した。手順はこれまでと同様に小原ら (1989ab) の方法を参考にした。小原ら (1989ab) の方法はルチンとケルセチンを同時に分析するには移動相に濃度勾配をつける必要があるが、本研究でこれまで用いた方法は、単一の移動相でルチンとケルセチンの同時分析が可能であった。試料は 0.45 μ m のフィルター (Whatman Inc., NJ, USA) で濾過後, 10 μ l の試料をルチンとケルセチンの定量に供試した。HPLC は日本分光 (株) の 800PU シリーズ, 875UV 検出器を用いた。カラムは資生堂 (株) の CAPCELLPAK C_{18} , 移動相は 2.5 % 酢酸/メタノール/アセトニトリル (35:5:10), 流速は 1.0 ml/分, 検出波長は 360 nm, カラム温度は 40℃とした。

2) 結果および考察

これまでルチン分解酵素の測定には HPLC 法 (安田ら, 1992) および前節の分光光度計による方法が示されている。本研究ではさらに H_2O と DMSO の系を用いた NMR 法について検討した。まずルチンとケルセチン, およびその混合液を NMR の測定に供試した。第 20 図にルチンとケルセチンの NMR シグナルを示した。 H_2O のプロトンシグナルは 4.8

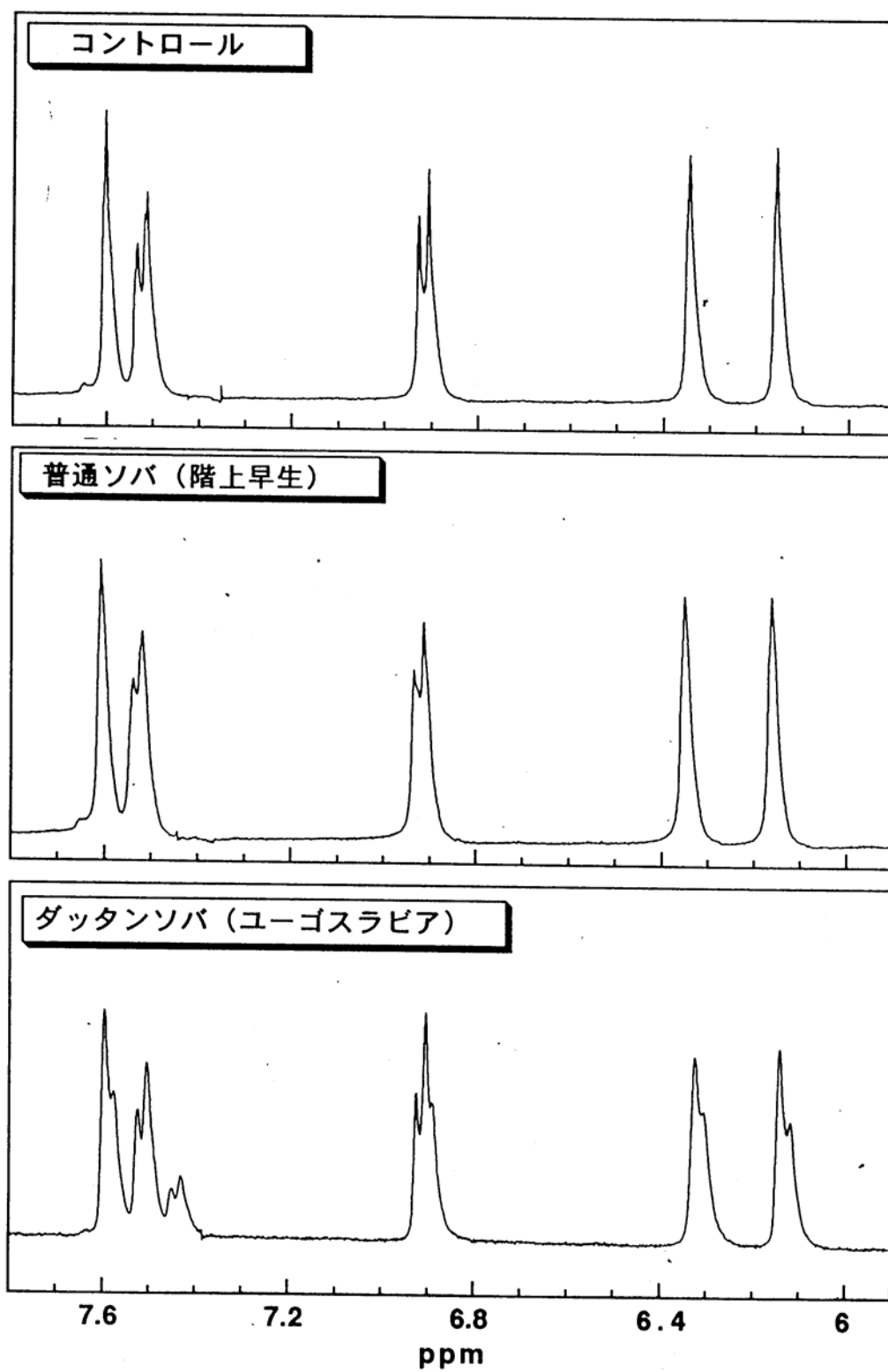


第20図. ルチンとケルセチンの標品のNMRシグナル.



第21図. ルチン溶液, ケルセチン溶液および混合液 (1:1) のNMRシグナル.

ppm に、DMSO は 2.7 ppm に認められた。H₂O と DMSO の強いシグナルを抑えてルチンの弱いシグナルを検出するために NMR 測定はダブルホモゲート (DHMG) デカップリングモードで行った。そのエネルギーを H₂O と DMSO の部分に二重照射してそれらのシグナルを抑えた。この二重照射 NMR 法によってルチンとケルセチンのシグナルは明瞭に検出できるようになった。酢酸のメチル基のプロトンシグナルは 2.0 ppm に認められた。その他のシグナルはルチンとケルセチン由来である。1.0 ppm から 5.0 ppm のシグナルはルチンの糖残基、6.0 ppm から 8.0 ppm はフラボン骨格由来である。フェノールの OH のプロトンは電離のためこの測定条件では認められなかった。またルチンとケルセチンの NMR シグナルを比較すると明らかに異なっていることが示された (第 20 図)。糖に由来するシグナルはルチンには認められたが、ケルセチンにはルチノース基が無いため認められなかった。糖残基のシグナルは分解反応後の溶液中にも存在するためこの位置は分析には利用できないと考えられた。一方、フラボンシグナルも両者に存在したが、ケルセチンのシグナルはルチンと比較してより高磁場側へシフトしていた。第 21 図にルチンのフラボンのシグナル (a)、ケルセチン (c) およびルチンとケルセチンの混合液 (b) を示した。NMR ハンドブック (1985) によるとフラボン骨格 (第 14 図 a, b, c, d, e) のシグナルは第 21 図に示したとおりである。a, b, e に示されたプロトンのシグナルは孤立したプロトンであるためシングレットシグナルであった。c と d に示されたシグナルはプロトンが結合している炭素原子が互いに隣接しているためダブレットであった。混合液のシグナルはルチンとケルセチン両方のパターンを示した。そのためルチン分解酵素が働いてルチンがケルセチンに分解された時、この反応はシグナルの変化として検出できると考えた。ソバ抽出液を反応液に添加した後のシグナルについて第 22 図に示した。その結果、ルチン分解酵素を含むダッタンソバ粉 (品種：ユーゴスラビア) の粗抽出液を添加した反応液のシグナルが第 21 図 (b) のルチンとケルセチンの混合液と同様のパターンを示したことから、ルチン分解酵素活性をルチンからルチンとケルセチンの混合液へのシグナルの変化として検出できることが示された。一方でルチン分解酵素活性が低いとされる普通ソバ粉 (品種：階上早生) の粗抽出液からは酵素活性は検出できなかったことも確認された。さらに普通ソバおよびダッタンソバの他の品種について調査した結果を第 24 表に示した。普通ソバの子実中にはルチン分解酵素は認められなかった。一方ダッタンソバの子実中からは検出された。同時にこれらの試料は NMR によるデータを確認するため HPLC で分析した。NMR の結果は既報の HPLC による結果 (安田ら, 1992) と前節の分光光度計による結果と一致



第22図. 粗抽出液添加30分後のNMRシグナル.

第24表. NMRとHPLCによるルチン分解酵素の検出.

品種	NMR*	H P L C**	
		ルチン (mg/ml)	ケルセチン (mg/ml)
コントロール	未検出	28.2	0.02
普通ソバ	階上早生	未検出	27.7
	大隅在来	未検出	29.5
	久木野在来	未検出	28.3
			0.01
ダッタンソバ	ユーゴスラビア	検出	20.5
	Pontivy	検出	22.5
	Tuberculatum	検出	19.8
	Rotundatiem	検出	23.1
	Nepal (SIMIKOT)	検出	24.1
			2.60

* :NMRによるルチン分解酵素の検出の有無.

** :酵素反応停止後のルチンとケルセチンの濃度.

していることを示した. このように NMR 法はシグナルの変化を測定することによって酵素活性の検出が可能であること, HPLC 法や分光光度計による方法と同様に有用であることを示した. これらの 3 つの分析法で, HPLC 法は正確であるが長時間 (約 20 分) かかり, 多くの複雑な操作を要する. 分光光度計による方法は簡易迅速であるが吸光度の変化と構造的な変化との関係が明らかでなく実際に分解反応が起こっているかどうかを決定することは困難である. また NMR 法は短時間での測定が可能である (約 5 分). 正確さが必要でないなら反応時間と測定時間の短縮が可能である. 例えば分光光度計法と HPLC 法は試料の濾過を必要とするが, NMR 法はこの手順の省略が可能である. さらに NMR 法は NMR (プロトン, C-13) のシグナルは化学構造を反映して, チャート上に様々な位置に現れるため, 分子構造の変化を直接検出できるという利点がある. 一方, 分光光度計法はルチンとケルセチンの混合液中に含まれるルチン分解酵素のもう一つの産物であるルチノース (グルコースとラムノースが結合した二糖体) の効果が不明なため, 測定に与える影響を評価することが困難である. 一方 NMR 法はフラボノイドのプロトンシグナルの位置がオリゴ糖のプロトンの位置と異なっているためルチノースによる影響を受けない. このようにルチン分解酵素活性の分析に対する NMR 法の適性が確認された. この方法は

普通ソバとダッタンソバの雑種を含む育種素材から高ルチンでルチン分解酵素の欠失した素材を選抜するのに簡易迅速である。本研究において使用した溶媒は H_2O と DMSO であるが、二重照射を行うことで他の溶媒も利用可能である。NMR 法は分光光度計や HPLC で測定できない酵素活性の検出、あるいはこれらの機器による分析を補完することができる。さらに将来オートサンプラー等の機器が開発されれば NMR は育種を選抜手段として用いられる可能性を有する。

総合考察

九州は北海道に次ぐソバ産地でありながら九州のソバ栽培あるいは九州の在来種に関する研究は少なく九州向けの品種の育成例も僅かである．このように九州のソバに関する研究は少ないにもかかわらず他の地域と比較して収量は高い．その理由を明らかにするため、本研究は九州の在来種に着目してその特性について調査した．さらに今後の品種育成のための予備調査として多数のソバ遺伝資源を栽培、評価して生育反応や品質への影響についても調査した．

これまでソバは生態型が連続的でありそれぞれの地域に最も適した独自の在来種が存在することが示されている（大澤・堤，1994；大澤，1997）．本研究においても九州の栽培環境においては九州の在来種が九州の秋の栽培可能な期間を最大限に利用できる生態型を有すること，また九州の在来種の中でも久木野在来や耶馬溪在来等の標高の高い地域の在来種と九州南部の在来種との間にも生態型の差が示された．一方北海道，東北および長野県で用いられている夏型品種は短期間で成熟期を迎えるため生育量が少なく低収量であった．逆に九州の秋型品種よりも短日性が極端に強い外国の品種に関しては生育量が多いが，登熟する前に低温となり十分な収量を得ることができなかった．このように国内のソバの遺伝資源に関しては生態型や農業関連形質の地域適応性が明瞭であったのに対して，子実成分特性に関しては原産地による特徴が認められなかった．このことは，生態型や農業関連形質などの可視的な形質については長年各地域の栽培体系において選抜されてきたことに対して，成分特性については不可視的な形質であるため選抜されなかったことが原因と考えられた．また成分特性については国外の品種は国内の品種以上に変異幅が広いことが明らかとなった．

一方，ソバの栽培環境と各品種の反応から見た九州は，他の栽培地域と異なっていることが示された．九州では秋型品種を秋栽培するのが最も多収であるが，夏型品種でも夏栽培よりも秋栽培の方が収量が高く，品種の生態型に関わらず秋栽培が有利である．それに対して夏型品種として「しなの夏そば」を，秋型品種として「信濃1号」用いている長野県では「しなの夏そば」を秋栽培（8月上旬播種）した場合，夏栽培（5月中旬播種）と比較して収量の減少が認められ，作期と生態型との関係が明瞭である（林ら，1989）．しかし秋栽培でも「信濃1号」より生育期間の長い「信州大そば」の収量はさらに高く（林ら1990），生育期間が長い秋型品種が多収を得るのに有利であることは九州と同様である．

その他の地域においても、用いられている品種や環境条件は異なるが、青森県の場合、6～7月にヤマセによる影響を受けるという特殊な事情があるが、夏型品種の「階上早生」をヤマセの過ぎた7～8月上旬播種の秋栽培の方が4月～5月播種の夏栽培のよりも収量が高かった（外川ら，1985）．愛知県でも長野県と同様に秋栽培では生育期間の長い「信州大そば」が「信濃1号」よりも多収であると示されている（小木曽ら，1989；大川ら，1995）．滋賀県の場合は9月上旬播種の間中型品種「信濃1号」が最も多収であった（山浦・吉川，1995）．国内では最も生産量の多い北海道は夏栽培のみで、ソバの生育に適した期間が非常に短いため、夏栽培のみの結果ではあるが、「キタワセソバ」や「キタユキ」の標準播が晩播よりも生育期間が長くなり収量が高いことが示されている（犬山ら，1994；本田ら，1994）．このように各地域ごとに生態型の異なるソバ各品種の生育や収量に及ぼす効果は異なるが、各地域で共通しているのは、収量は夏栽培よりも秋栽培が勝り、さらに生育期間が長い品種を用いる方が有利ということである．この点からも晩秋から初冬にかけて温暖で秋栽培の生育可能期間が長く、その期間を最大限に利用できる品種を有する九州が他の地域よりも多収である理由を説明することができる．

このように九州におけるソバ栽培が様々な点で他の地域と異なることが示される一方で、九州のソバ栽培の拡大のためには安定多収であり、高機能性の新品種の開発が必要である．これまで各作物の成分育種は低タンパク低アミロースイネ（佐々木ら，1990），低アミロースコムギ（氏原ら，1995），リポキシゲナーゼ欠失ダイズ（羽鹿ら，2001），無エルカ酸ナタネ等，デンプン，タンパク質および脂肪等の主成分に関する改良が主で、機能が強化された品種の育成は十分ではなかった．しかしながら近年、機能性成分の向上を目的とした作物の育種が進められ、ゴマの高リグナン品種（安本ら，2003），高色素含量のカンショ（山川ら，1997；1999）やバレイショ（高田，2002）等が育成されている．ソバに関しては高ルチン品種の育成が報告されている（Minami et al., 2001）．この理由として、大部分の機能性成分は二次代謝産物であり、分析に高度な技術や機器および時間を要することから、多数の試料を分析しなければならない育種現場にはこれまでは不向きとされていたが、最近になって分析技術の進歩とともに機能性成分の向上を育種目標として挙げられ、品種開発が盛んになってきたことによる．本研究は、ソバの機能性として抗酸化能に着目して、まず大量にスクリーニング可能な手法の開発を目指した．さらに各種遺伝資源の抗酸化能に関して評価を試みた．その結果、ネパールの品種には優れた抗酸化能を有する品種が存在すること、およびルチン含量と同様に国外の品種には国内の品種以

上に大きな変異が存在することを示した。したがって今後さらに国内外の遺伝資源を評価して機能性育種に適した育種素材を見出し、実際の高機能性品種育成につなげることが重要である。また本研究においては様々な品種を用いた結果、過去の報告以上の変異幅が認められた。この理由として、先に述べたように九州の栽培環境は他の地域と比較して短日条件でも比較的温暖であるため様々な生態型の品種の栽培が可能であったことによる部分が多い。このことは九州の栽培環境が品種の育成および導入について日本の他の地域以上に有利であることを示している。しかしながら、温暖で多雨の条件はソバの登熟環境としては厳しく、今後新品种の育成あるいは他品種を導入する場合には耐倒伏性、難穂発芽性等に考慮しなければならない。

一方、成分育種の効率化を目指す研究も着実に進んでいる。近赤外分光分析法による育種素材の選抜はイネや大豆に関してはすでに実用化されており、ソバに関しても水分、蛋白質、油分、灰分、ポリフェノール、抗酸化能等の推測が可能であると報告されていることから (Suzuki et al., 1984 ; Morishita et al., 1998 ; Sato et al., 2001)、将来育種素材の実用的な選抜法として有望である。近赤外分光分析法によるルチン含量の推定に関しては未開発ではあるが色彩値以上の精度が期待できると考えられる。今後分析技術の進歩とともに成分育種の発展が期待される。

ダッタンソバは普通ソバと比較して栽培事例は極めて少ないが、収量性、機能性において普通ソバよりも優れている。さらに自殖性であることは品種維持の点でも有利である。北海道においては栽培試験報告例があるが (木村・川勝, 1995)、九州地域を含めた西日本では試験例がほとんど無く栽培適性が全く未知であった。本研究の結果、収量は普通ソバの多収品種と同程度の収量を示したこと、ルチン含量も普通ソバの約 100 倍含まれることが確認されたため、九州においてもダッタンソバの優れた特性が十分発揮されることを示した。しかしながら脱粒性、食味について改良しなければならない点も数多く残されているが、ここでは食味の改良の可能性について述べる。ダッタンソバの苦み成分の主成分としてケルセチンが挙げられている (川上ら, 1995)。ケルセチンは製麺時にソバ粉に水を添加されるとルチン分解酵素が働くことによって生じる (小原ら, 1989b)。ダッタンソバ麵の生産工程においては加熱処理により酵素を失活させて苦味を抑えているが (安田 2000 ; Yasuda, 2001)、育種によりこの酵素の欠失系統が育成されれば今後有望な素材として期待が大きい。しかしながら現在のところ欠質系統の作出には至っていない。ルチン分解酵素にはアイソザイムが 2 種類存在するため (Yasuda and Nakagawa, 1994)、これらが

同時に欠質させる必要がある．子実タンパク質の欠失育種の例として放射線突然変異によるダイズのリポキシゲナーゼ欠失品種の育成例があるが（羽鹿ら，2001），1つのタンパク質の欠失変異体の出現率は数千あるいは数万分の1の確率で，アイソザイム2種の同時欠失となるとその確率はさらに低くなる．今後アイソザイムを個別にスクリーニングする方法や新しい育種素材を開発する必要がある．一方で近年イオンビームなど様々な変異誘発技術が開発されている．ソバの放射線突然変異に関してもガンマ線およびイオンビームの効果が明らかにされ，変異誘発の最も効果的な線量も明らかにされつつある（Morishita et al., 2001 ; Morishita et al., 2003）．これらの技術の進歩もソバ育種の促進に寄与できるであろう．本研究によりソバの遺伝資源の重要性が認識されるとともに，今後の九州に適した品種育成のための基礎資料を示すことができた．今後，九州におけるソバの研究のさらなる発展を期待したい．

摘要

九州は日本の他の地域と比較してソバの収量の高い地域である。しかし九州の温暖な環境がソバに及ぼす影響、あるいは九州の在来種の特性に関しては未解明な部分が多い。本研究は九州で栽培された普通ソバ遺伝資源の農業関連形質および子実の成分特性について明らかにした。またソバの機能性として抗酸化能に着目してその評価法の開発および遺伝資源の評価を行った。さらにダッタンソバの九州における栽培適性および子実の苦味成分の発生原因であるルチン分解酵素の検出法について検討した。結果の概要は以下の通りである。

1. 普通ソバ遺伝資源の特性評価

(1) 九州においてソバ遺伝資源における各農業形質の特徴を明らかにするため、九州の在来種など、内外の遺伝資源を用いて栽培調査をした。まず 1995 年に夏栽培について検討した結果、夏栽培が成立するためには生育期間が短く難穂発芽性品種の開発が必要であることが示された。1995 年から 1997 年の 3 年間の秋栽培について農業関連形質を調査した結果、全ての形質について品種および年次間差が有意であった。全重、収量などの形質は年次間差が有意であり栽培環境による影響を受けやすいと考えられた。一方で、草丈、主茎節数、千粒重など形態に関する形質の年次相関は高く、品種特性を示す指標となると考えられた。また多収を得るには草丈、全重などの生産量を表す特性が大きいことが有利であることが示された。これらの調査に供試した遺伝資源は生育日数、形態など原産地毎に地域特性が認められた。特に九州の在来種は生育期間が長く多収を示したことから九州の気象条件に適応した生態型を有することが示された。

(2) 九州で栽培されたソバ遺伝資源の子実の化学成分の特徴を明らかにするため、九州の在来種を含む内外の遺伝資源を 2 年間栽培し、ルチン、粗蛋白および粗脂肪の含量について調査した。ルチン含量の品種間の変異幅は蛋白質および脂肪の含量と比較して大きかった。ルチンおよび脂肪の含量は品種間差異よりも年次間差異が大きかった。ネパールの品種にはルチン含量の高い品種が認められたが、ネパール以外では原産地別の品種の特徴が明らかでなかった。一方、ルチンの蓄積には環境要因として登熟期間中の温度が高いと有利であることが示唆された。収量とルチン含量の間には両年とも有意な負の相関が、蛋白

質含量と脂肪含量の間には兩年とも有意な正の相関が認められたが、千粒重や製粉歩留等と各成分含量との関係は明らかでなかった。

2. 普通ソバ子実のラジカル消去能の測定法の開発と遺伝資源の評価

(1) 普通ソバ子実の抗酸化能を評価するため 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去能を利用して簡易迅速に評価する方法を検討した。確立した手順は以下の通りである。まず 0.6 g のソバ粉に 6 ml の 80 %エタノールを加えて 80 °C で 30 分間抽出した。抽出後遠心で得られた上澄みを 80 %エタノールで 4 倍に希釈し、その希釈抽出液を 1.14 ml の DPPH 溶液に 0.06 ml の添加して反応開始とした。20 分の反応時間の後 520 nm の吸光度を測定してコントロールとの 520 nm の吸光度の差 (ΔA_{520}) を μ mol-Trolox/ml 換算してラジカル消去能を算出した。この方法で得られた値は従来法で得られた値と高い相関があり、育種素材の選抜手法として役立つであろう。

(2) 九州で栽培、収穫された普通ソバ 32 品種から得られたソバ粉のラジカル消去能を評価した。ソバ粉の 80 %エタノール抽出液の DPPH ラジカル消去能は 0.497 ~ 1.233 μ mol-Trolox 当量/ml (1 ml は 100 mg のソバ粉に相当) の範囲であり、品種間差異は有意であった ($P < 0.01$)。日本の品種のラジカル消去能の範囲は 0.581 ~ 0.922 μ mol-Trolox 当量/ml の範囲であった。これらの内ネパールの 2 品種は最も高いラジカル消去能を有し、ソバ育種素材として有用であることが示された。さらに DPPH ラジカル消去能と総ポリフェノール含量との間に有意な正の相関が認められた ($r=0.975$, $P < 0.01$)。

3. ダッタンソバ遺伝資源の特性評価およびルチン分解酵素の検出法の開発

(1) 九州においてダッタンソバ導入の可能性を検討するため 1995 年と 1996 年の 2 年間栽培調査した。その結果、収量については普通ソバの多収品種と同程度得られることが示された。また普通ソバと比較して主茎節数、一次分枝数が多いこと、千粒重が小さいこと等普通ソバと形態的な特性が異なっていた。草丈、主茎長、主茎節数、全重および収量などの形質は年次相関が有意で遺伝率も高かったことから安定した形質であると考えられた。また多収な品種は草丈、主茎長および全重が大きかった。品質に関してはルチン含量は普通ソバの約 100 倍、粗蛋白含量と粗脂肪含量も普通ソバより高く、粉色は普通ソバと比較して白度が低く黄緑が強いことが示された。本研究の結果、これまで他所で実証された収

量、品質を維持していることから九州においてもダッタンソバの栽培は十分可能であると考えられた。

(2) ソバ種子に含まれているルチン分解酵素の活性を分光光度計を用いて簡易迅速に測定する方法について検討した。ルチンとケルセチンのスペクトル吸収パターンを調べた結果、それぞれ異なったパターンを示し、特に 367 nm の吸光度の差が大きいことから分析にはこの波長を用いることとした。10 mg のソバ粉を 1.0 ml の 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で抽出し、上澄みを分析に供試した。基質液は 1.0 mg/ml のルチンのメタノール溶液を 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で 10 倍量に希釈して調製した (終濃度 100 μ g/ml)。3 ml の基質液に 10 μ l の抽出液の添加で反応開始とし、40 $^{\circ}$ C で 367 nm の吸光度の変化を測定した。ダッタンソバの抽出液を添加した場合は吸光度の変化としてルチン分解酵素を検出できたが、普通ソバの場合は検出できなかった。本手法は簡易・迅速であるため、大量の育種素材を短期間で選抜するのに適している。

(3) ソバ属植物のルチン分解酵素活性の核磁気共鳴 (NMR) 法による検出について検討した。まず標準としてルチンとケルセチンのプロトン NMR シグナルについて測定を行った。ルチンとケルセチンのシグナルを効率よく取得するために、溶媒である DMSO と水の大きな NMR シグナルを抑制するため二重照射を行った。その結果、これらのフラボノイド骨格のプロトンシグナルの位置が異なっていることが明らかになった。次に、ソバ粉に酢酸緩衝液 (pH 5.0) を加えて得た抽出液を粗酵素液とし、DMSO に溶解したルチン溶液に添加し、標準と同様の溶媒系にして、この二重照射 NMR 法によってソバ数品種の酵素活性を測定した。酵素活性はルチンからケルセチンへの NMR シグナルの変化として検出が可能であることを明らかにした。すなわち、普通ソバの抽出液を添加した場合には NMR シグナルに変化は認められなかったが、ダッタンソバの抽出液を添加した場合にはルチンからケルセチンへの NMR シグナルの変化が認められた。このように、NMR 法は複数溶媒系を用いた酵素活性の検出に有用であること、また育種におけるスクリーニングの手法として用いることが可能であることを明らかにした。

謝辞

本論文をとりまとめるに当たり、適切な御指導、御助言および御助力を賜りました神戸大学農学部安田武司教授に深く感謝申し上げます。

また本論文の作成に当たり御指導と有益な御助言を賜りました神戸大学農学部上島脩志教授、杉本敏男教授、東哲司助教授に謹んで御礼申し上げます。

さらに本研究を遂行するに当たり、御指導、御助言および御協力頂きました独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構九州沖縄農業研究センター（旧九州農業試験場）作物機能開発部（旧作物開発部）最上邦章元部長、氏原和人前部長、松井重雄部長、佐藤哲生上席研究官、手塚隆久暖地特産作物研究室（旧資源作物研究室）室長、原貴洋同研究員、須田郁夫食品機能開発研究室（旧流通利用研究室）室長、野田高弘同主任研究官（現北海道農業研究センター品質制御研究チーム主任研究官）、羽鹿牧太大豆育種研究室主任研究官（現作物研究所豆類育種研究室室長）、酒井真次資源作物研究室前室長、畑作研究部畑作物変換利用研究室石黒浩二主任研究官、独立行政法人食品総合研究所流通安全部永田忠博部長に深く感謝申し上げます。

最後にソバの試験研究を推進するに当たり御助言賜りました筑波大学農林学系大澤良助教授に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 青木雅子・小泉典夫・小川玄吾・吉崎朋三 1981. そば粉の揮発性成分の同定とその製粉区分別のフレーバー比較. 食工誌 28: 476 - 481.
- Asahi Research Center Co., Ltd.(Ed.) 1985. Handbook of Proton-NMR Spectra and Data. 5 Academic Press, Inc., NY.
- Baniya, B. K., D. M. S. Dongol and N. R. Dhungel 1995. Further characterization and evaluation of Nepalese buckwheat (*Fagopyrum* spp.) landraces. Current Advances in Buckwheat Research (Proc. 6th Intl. Symp. Buckwheat at Ina). : 295 - 304.
- Blasiak, J., A. Trzeciak, A.Gasiorowska, J. Drzewoski and E. Maiecka-Panas 2002. Vitamin C and quercetin modulate DNA-damaging effect of N-methyl-N-nitrosoguanidine. Plant Food for Human Nutrition 57: 53 - 61.
- 藤村桂子・大場伸哉・堀内孝次 2001. 肥料条件と倍数性が栽培ソバ 2 種 (*Fagopyrum* spp.) の脱粒性に及ぼす効果. 日作紀 70: 221 - 225.
- Furuta, S., I. Suda, Y. Nishiba and O. Yamakawa 1998. High tert-butylperoxy radical scavenging activities of sweet potato cultivars with purple flesh. Food Sci., Technol. Int. Tokyo, 4: 33 - 35.
- 羽鹿牧太・高橋将一・異儀田和典・酒井真次・中澤芳則 2001. ダイズ新品種「いちひめ」の育成とその特性. 九農研報 40: 79 - 93.
- 林久喜・小松宏光・上杉壽和・土屋弘道 1989. 「しなの夏そば」の秋ソバ型栽培. 長野中信農試報 7: 43 - 50.
- 林久喜・中山利明・小松宏光・上杉壽和 1990. 「信州大そば」の栽培特性と収量性. 長野中信農試報 8: 1 - 7.
- 本田裕・犬山茂・古山三郎・木村正義・笠野秀雄 1994. ソバ品種「キタユキ」の育成とその特性. 北農研報 159: 11 - 21.
- Honda, Y. 1995. Varietal difference of the content of vitamin E homologues in buckwheat. Current Advances in Buckwheat Research (Proc. 6th Intl. Symp. Buckwheat at Ina). :777 - 781.
- 本田裕 2000. 新特産シリーズソバ. 農文協
- 犬山茂・本田裕・古山三郎・木村正義・笠野秀雄 1994. ソバ品種「キタワセソバ」の育成とその特性. 北農研報 159: 1 - 10.
- 金谷健一郎 2000. そばの栄養成分. そばの栄養. 日本蕎麦協会 12 - 17.

- 川上晃・茅原紘・氏原暉男 1995. ダツタンソバ (*Fagopyrum tartaricnm*) の苦味の特性とその除去. 食工誌 42: 892 - 898.
- 木村正義・川勝正夫 1995. 重粘土壤 (灰色台地) におけるダツタンソバの栽培方法. 日作紀 64(別 1): 54 - 55.
- 木村正義・船附秀行・我妻正迪 1997. ダツタンソバ品質の品種間差. 日作紀 66 (別 2): 77 - 78.
- Kitabayashi, H., A. Ujihara, T. Hirose and M. Minami 1995a. Varietal differences and heritability for rutin content in common buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench. Breeding Science 45: 75 - 79.
- Kitabayashi, H., A. Ujihara, M. Minami, T. Ohsawa, K. Sato and A. Horii 1995b. Genetic variation of seed rutin content in buckwheats. Current Advances in Buckwheat Research (Proc. 6th Intl. Symp. Buckwheat at Ina). : 373 - 377.
- Kitabayashi, H., A. Ujihara, T. Hirose and M. Minami 1995c. On the genotypic differences for rutin content in tartary buckwheat, *Fagopyrum tartaricum* Gaertn. Breeding Science 45: 189 - 194.
- 古明地通孝・財津昌幸・田中滋郎 1984. 暖地ソバ品種の生態的特性 2. 暖地ソバ品種の子実重と諸形質との関係. 九農研 46: 62.
- 古明地通孝 1990. 新資源作物アマランサス, ダツタンソバの研究展望. 農業技術 45: 247 - 251.
- Kuroda, K., Y. Young S., T. Yoshikura and T. Ishikura 1985. Mutagenicity of natural food additives. Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences 47: 24 - 30.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265 - 275.
- Matsubara, T., H. Kumamoto, Y. Iizuka, T. Murakami, K. Okamoto, H. Miyake and K. Yokoi 1985. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in citrus unshiu peelings. Agric. Biol. Chem., 49(4) : 909 - 914.
- Mazza, G. 1988. Lipid content and fatty acid composition of buckwheat seed. Cereal Chem. 65: 122 - 126.
- Minami M., H. Kitabayashi, K. Nemoto and A. Ujihara 2001. Breeding of high rutin content common buckwheat,"SunRutin". Advances in Buckwheat Research (Proc. 8th Intl. Symp.

Buckwheat at Chunchon). : 367 – 370.

三留三千男 1960. 農業実験計画法. 朝倉書店 331 – 343.

宮下茂樹・持留信雄・吉田典夫・溝口一郎 1990. 4 倍体そば「みやざきおおつぶ」の栽培法. 鹿児島農試研報 18: 1 – 5.

森藤信治・大賀康之・三善重信 1984. 4 倍体ソバ「みやざきおおつぶ」の播種時期, 播種密度について. 九農研 46: 60.

Morishita, T., I. Uezono, T. Sato and T. Tetsuka 1998. stimation of protein and moisture content of buckwheat flour by near-infrared spectroscopy. Advances in Buckwheat Research (Proc. 7th Intl. Symp. Buckwheat at Winnipeg). : III 88 – 94.

Morishita, T., H. Yamaguchi and K. Degi 2001. The dose response and mutation induction by gamma ray in buckwheat. Advances in Buckwheat Research (Proc. 8th Intl. Symp. Buckwheat at Chunchon). : 334 – 338.

Morishita, T., H. Yamaguchi and K. Degi, N. Shikazono, A. Tanaka and T. Abe 2003. Dose response and mutation induction by ion beam irradiation in buckwheat. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B 206: 565 – 569.

長友大・足立泰二・藪谷勤 1982. そば新品種 “みやざきおおつぶ “について. 宮崎大農報 29: 293 – 305.

西牧清 1983. ソバ栽培の現状と技術的課題. 農業及び園芸 58: 140 – 146.

Oba, S., A. Suzuki and F. Fujimoto 1998. Breaking strength of pedical and grain shattering habit in two species of buckwheat (*Fagopyrum* spp.). Plant prod. Sci. 1: 62 – 66.

大場伸哉・藤村桂子・山住容子・濱島良子・堀内孝次 2001. ソバ属 (*Fagopyrum* spp.) 植物の脱粒性と小枝強度の比較. 日作紀 70(別 1): 196 – 197.

小原忠彦・大日方洋・村松信之・松橋鉄治郎 1989a. 高速液体クロマトグラフィーによるルチンの定量. 食工誌 36: 114 – 120.

小原忠彦・大日方洋・村松信之・大池和威・松橋鉄治郎 1989b. そば製麺中におけるルチンの酵素分解. 食工誌 36: 121 – 126.

大川浩司・浅山哲・小木曾正敏 1995. ソバの生産安定技術 (第 2 報) 種子熟度, は種量及びは種期が生育収量に及ぼす影響. 愛知農総試研報 25: 133 – 139.

大澤良・堤忠広 1993. そば遺伝資源におけるたんぱく質含量の変異. 育雑 43 (別 2): 179.

大澤良・堤忠宏 1994. 異なる作期の特性に基づく我国主要そば品種の主成分分析による

分類. 育雑 44 (別 2) : 267.

Ohsawa, R. and T. Tsutsumi 1995a. Inter-varietal variations of rutin content in common buckwheat flour (*Fagopyrum esculentum* Moench.). Euphytica 86: 183 – 189.

Ohsawa, R. and T. Tsutsumi 1995b. Improvement of rutin content in buckwheat flour. Current Advances in Buckwheat Research (Proc. 6th Intl. Symp. Buckwheat at Ina). : 365 – 372.

大澤良・堤忠広・鶴飼保雄 1997. そば農業形質の品種比較による遺伝率の推定. 育雑 47 (別 1) : 181.

大澤良 1997. 我が国におけるそば育種の現状と未来. 育種学最近の進歩 39: 55 – 58.

沖智之・増田真美・古田収・西場洋一・須田郁夫 2001. 紫サツマイモを原材料としたチップスのラジカル消去活性. 食工誌 48: 926 – 932.

小木曾正敏・内藤博務・倉島秀雄 1989. ソバの生産安定技術 (第 1 報) は種期及び施肥量が生育収量に及ぼす影響. 愛知農総試研報 21: 151 – 157.

Oomah, B. D., C. G. Campbell and G. Mazza 1996. Effects of cultivar and environment on phenolic acids in buckwheat. Euphytica 90: 73 – 76.

Oomah, B. D. and C. Mazza, 1996. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. J. Agri. Food Chem. 44: 1746 – 1750.

Przybylski, R., Y. C. Lee and N. A. M. Eskin 1998. Antioxidant and radical-scavenging activities of buckwheat seed components. J. Am. Oil Chem. 75: 1595 – 1601.

佐々木多喜雄・佐々木一男・柳川忠男・沼尾吉則・相川宗嚴 1990. 水稻新品種「きらら 397」の育成について. 北海道立農試集報 60: 1 – 18.

Sato, T., T. Morishita, T. Hara, I. Suda and T. Tetsuka 2001. Near-infrared reflectance spectroscopic analysis of moisture, fat, protein, and physiological activity in buckwheat flour for breeding selection. Plant prod. Sci. 4: 270 – 277.

沢豊則・久保良幸・浅生秀孝 1985. そばの生育量と収量との関係. 北陸作物学会報 20: 43 – 44.

柴田茂久・今井徹・竹生新治郎・宮原萬芳 1979. 品種および栽培時期とソバ粉の成分. 食総研報 34: 1 – 7.

外川真稔・藤田正男・熊谷憲治・竹村達夫 1985. ソバ「階上早生」の作期別生育特性. 東北農研 37: 109 – 110.

Suda, I., S. Furuta and Y. Nishiba 1994. Fluorometric determination of a

1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid-malondialdehyde adduct as an index of lipid of peroxidation in plant materials. Biosci. Biotech. Biochem. 58: 14-17.

須田郁夫・古田収・西場洋一 1996. 簡易迅速な抗酸化能試験法の開発とカラフル野菜への応用. 九農研 58: 31.

須田郁夫・古田収・西場洋一・野田高弘・山川理・杉田浩一・松ヶ野一郷 1998. カンシヨジュースのスーパーオキサイド消去活性. 九農研 60: 36.

須田郁夫 1999. 分光光度計による DPPH ラジカル消去能の測定. 食品の機能性評価マニュアル集. 農林水産省農林水産技術会議事務局 食品総合研究所 16 - 18.

須田郁夫・緒方裕子・水城尚美・高畑康浩・西場洋一 1999. DPPH 分光法による有色農産物・食品のラジカル消去能の測定. 九農研 61: 32.

杉本秀樹・佐藤亨 1999. 西南暖地における夏ソバ栽培 ー播種期の違いが生育・収量に及ぼす影響. 日作紀 68: 39 - 44.

Suzuki, T., M. Iwamoto, R. K. Cho, J. Uozumi and T. Imai 1984. Application of near infrared reflectance method to moisture, protein and ash measurements of buckwheat flours. Nippon shokuhin Kogyo Gakkaishi 31: 200 - 202.

鈴木建夫・桜田尚子・目黒熙・鈴木彦市・坂上孝彦・氏原暉男 1987. そばのルチン含量と分布について. New Food Industry 29: 29 - 32.

Suzuki, T. and T. Miyazawa 1991. Flavonoids. J. Act. Oxyg. Free Rad. 2 (2) : 239 - 245.

高田明子 2002 成分・機能性に着目したバレイショ品種の育成. 育種学研究 4 (別 2) : 38 - 39.

手塚隆久・松井勝弘・原貴洋 2000. 暖地における春まきソバ栽培の収量性. 日作紀 69 (別 2) : 256 - 257.

辻啓介 2000. そばの栄養成分と機能. そばの栄養. 日本蕎麦協会 18 - 22.

氏原暉男・鳥越洋一・俣野敏子 1974. ソバの収量成立過程に関する 2,3 の考察. 北陸作物学会報 9: 30 - 34.

氏原和人・藤田雅也・吉川亮・谷口義則 1995. 小麦新品種「チクゴイズミ」の育成. 九農試報 28: 195 - 217.

渡辺満・佐藤暁子・大澤良・寺尾純二 1995. ソバ種子の抗酸化活性と育種素材評価のためのその迅速測定法. 食工誌 42: 649 - 655.

Watanabe, M., Y. Ohshita and T. Tsushida 1997. Antioxidant compounds from buckwheat

- (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls. J. Agri. Food Chem. 45: 1039 – 1044.
- Watanabe, M., 1998. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. J. Agri. Food Chem. 46: 839 – 845.
- 山川理・吉永優・日高操・熊谷亨・小巻克巳 1997. カンショ新品種”アヤムラサキ”の育成. 九農試報 31: 1 – 22.
- 山川理・熊谷亨・吉永優・石黒浩二・日高操・小巻克巳・久木村久 1999. カンショ新品種”サニーレッド”の育成. 九農試報 35: 19 – 40.
- 山浦実・吉川善司 1982. 滋賀県湖西地域におけるそばの栽培生態型と適品種について. 滋賀県農試研報 24: 159 – 161.
- 安田俊隆・正木和好・柏木隆史 1992. ダッタンソバ種子に含まれるルチン分解酵素について. 食工誌 39: 994 – 1000.
- Yasuda, T. and H. Nakagawa 1994. Purification and characterization of rutin-degrading enzymes in tartary buckwheat seeds. Phytochemistry 37: 133 – 136.
- 安田俊隆・篠山浩文 1995. 水溶性有機溶媒共存下におけるルチン分解酵素活性. 食工誌 42: 1012 – 1018.
- 安田隆俊 2000. ダッタンソバの利用開発. そばの栄養. 日本蕎麦協会 44 – 48.
- Yasuda, T. 2001. Development of tartary buckwheat noodles through research on rutin-degrading enzymes and its effect on blood fluidity. Advances in Buckwheat Research (Proc. 8th Intl. Symp. Buckwheat at Chunchon). : 499 – 502.
- 安本知子・勝田眞澄・杉浦誠・奥村善直・本田裕・古明地通孝 2003. 高リグナン含有ゴマ新品種「ごまぞう」の育成. 作物研究所報告 4: 45 – 58.
- Zielinski, H. and H. Kozłowska, 2000. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. J. Agri. Food Chem. 48: 2008 – 2016.

Summary

Varietal differences of various characteristics and evaluation of the function of genetic resources of buckwheat cultivated in the Kyushu area

The buckwheat yield in the Kyushu area is the highest in Japan. The area is warmer than other parts of Japan, and the cultivated local buckwheat varieties are autumn types those are short-day types with a long growing period. However, the precise effects of a warm environment on the yield, quality, and characteristics of the Kyushu varieties of buckwheat are not entirely clear. This study has clarified the agronomic characteristics and chemical components of the genetic resources of buckwheat cultivated in the Kyushu area. Furthermore, methods for the analysis of antioxidative activity as a buckwheat function were developed, and the genetic resources were evaluated. In addition, the suitability of cultivating tartary buckwheat in the Kyushu area was investigated, and a method for screening of the rutin-degrading enzyme, which causes a bitter taste in tartary buckwheat, was developed. The results are summarized in the following section.

1. Evaluation of the characteristics of the genetic resources of common buckwheat

(1) Research was conducted to define the characteristics of common buckwheat in the Kyushu area by using local and breeding varieties containing various origins and ecotypes. In 1995, summer cultivation was researched, and the results showed the need to develop a new variety that has a short growing period and resistance to pre-harvest germination for summer cultivation in the Kyushu area. As a result of autumn cultivation, using 3 years of data from 1995 to 1997, the differences in years and variety were found to be statistically significant for all agronomic characteristics. It seemed that the characters of productivity, however, such as total weight and grain yield, were influenced easily by environmental effects. On the other hand, there were high year-to-year correlations of morphological characters, such as plant height, number of nodes, and 1,000-grain weights, showing that these characters were indicators of varietal characteristics. It was indicated that characteristics for large growth in a plant are advantageous for obtaining high grain yield. These genetic resources showed varietal differences, depending on their origins. The

native varieties of the Kyushu area, especially, had a long growing period and high grain yield, showing that they were suitable ecotypes for that area.

(2) Research was conducted to define the characteristics of rutin, protein, and oil content of common buckwheat in the Kyushu area with the use of local and breeding varieties containing various origins and ecotypes. The analysis of variance showed that the differences among varieties and years were significant at the 1% level for the rutin, protein, and oil content. The range of the varietal differences of rutin content was larger than that observed in the protein and oil content. Except for the protein content, the environmental variations were bigger than the genetic ones. Many high-rutin-content varieties have been found in Nepal, but no varietal characteristics depending on origin have been found in plants of other origins. High temperatures were shown to be advantageous for rutin accumulation during maturing. There was an inverse significant correlation between the grain yield and rutin content and a significant correlation between the protein and oil contents. However, it was unclear that a relationship existed among the flour-to-grain ratio, 1,000-grain weight, and these contents.

2. Development and evaluation of radical-scavenging activity in genetic resources of common buckwheat grains

(1) A simple and rapid assay method for estimating 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity in buckwheat flours was developed by modifying a method used previously. The recommended procedure is as follows: 0.6 g of buckwheat flour and 6 ml of 80% ethanol were combined and warmed to 80 °C for 30 min. After centrifugation, the obtained supernatant was diluted by one fourth with 80% ethanol. The reaction was started by adding 0.06 ml of the diluted extract to 1.14 ml of the DPPH solution. The absorbance of the reaction mixture at 520 nm was measured after 20 min holding, and the fading of the DPPH (ΔA_{520}) was expressed as a Trolox equivalent. The radical-scavenging activity of the improved method showed good correlation with the previous method ($r=0.973^{**}$). Consequently, the analysis speed was 10-fold higher than that of the previous method, and the improved method resulted in a new technique for breeding.

(2) Radical-scavenging activity in the flour obtained from 32 cultivars of buckwheat harvested in the Kyushu area was investigated by a method using DPPH. The radical-scavenging activity of DPPH in buckwheat flour extract with an 80% ethanol solution varied in the range of 0.497 to 1.233 μ mol-Trolox equivalent/ml (1 ml equivalent to 100 mg of buckwheat flour), and the varietal difference was statistically significant ($P < 0.01$). Japanese buckwheat varieties showed radical-scavenging activity in the range of 0.581 to 0.922 μ mol-Trolox equivalent/ml. Among those tested, 2 varieties originating from Nepal possessed the highest radical-scavenging activity, suggesting that they would be suitable resources for the breeding of buckwheat with a high radical-scavenging activity. In addition, DPPH radical-scavenging activity was correlated with the total polyphenol content ($r=0.975$, $P < 0.01$).

3. Evaluation of the characteristics in genetic resources of tartary buckwheat and development of an assay method for a rutin-degrading enzyme

(1) To define the suitability of tartary buckwheat for cultivation in the Kyushu area, research was conducted in 1995 and 1996. The results showed that the yield of tartary buckwheat was as same as high grain yield variety of common buckwheat. The number of nodes in the main stem and the number of primary branches were greater in the tartary buckwheat than they were in the common buckwheat, while 1,000-grain weights of tartary buckwheat were smaller than those of common buckwheat. In a similar manner, these morphological characters were different between common and tartary buckwheat. There were high year-to-year correlations and heritability in plant height, main stem length, number of nodes in main stem, total weight, and grain yield. It was indicated that high grain yield varieties exhibit high plant height and heavy total weight. Varieties with a high yield of grain had greater plant height and total weight. As regards grain quality, the rutin content in tartary buckwheat grain was about 100-fold greater than in common buckwheat. The protein and oil content of tartary buckwheat grain were also higher than those of common buckwheat. The tartary buckwheat flour was less white and more yellow-green than that from common buckwheat flour. The results of this study indicate that it is possible to cultivate tartary buckwheat in the Kyushu area because the characters of yield and quality were the same as those

reported in other research studies.

(2) A simple and rapid spectrophotometric method could be developed to examine the activity of the rutin-degrading enzyme contained in buckwheat grains. A spectrum analysis study indicated that commercial reagents, rutin and quercetin, showed different absorbance patterns. The difference of absorbance at 367 nm was especially remarkable, and this wavelength was adopted for analysis. Ten mg of buckwheat flour was homogenated with 1.0 ml of a 0.2 M acetate buffer (pH 5.0), and the obtained supernatant was used for analysis. The substrate solution was prepared with 1.0 mg/ml of a rutin solution in methanol and diluted with 10 volumes of a 0.2 M acetate buffer (pH 5.0). The reaction was started by adding 10 μ l extract to 3 ml of a substrate solution. The change of absorbance at 367 nm was monitored at 40 °C. In the case of adding the extract of tartary buckwheat, which is known to have a high rutin-degrading enzyme activity, an increase of absorbance was observed; however, this was not the case with common buckwheat, which is known to have very low activity. This method may be used to screen breeding materials because it is simple and fast (1 min/sample).

(3) Using the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) method, the detection of the activity of the rutin-degrading enzyme in buckwheat was examined. A mixture of dimethylsulfoxide (DMSO) and an acetate buffer (i.e., water) solvent was selected, and a double-homogate (DHMG) decoupling technique was used in the NMR measurement in order to suppress large solvent signals and detect the signals of rutin and quercetin. The NMR signals of aromatic H of the flavonoid in rutin were detected at different positions from those in quercetin. The activity of the enzyme in buckwheat was then examined by the NMR method. The crude extract solution of the enzyme (acetate buffer solution pH 5.0) was added to rutin in a DMSO solution, and the activity was measured by the NMR method. The enzyme activity could be detected by the appearance of the NMR signals of quercetin, which were observed in the shifted position, i.e., in a higher field than that of rutin. When the extracts from common buckwheat were added, the NMR signals did not change. However, when the extracts from tartary buckwheat were added, NMR signals, which shifted from those of rutin in the higher-frequency region, were observed. The NMR method was

useful to detect the enzyme activity. Furthermore, it was confirmed that common buckwheat did not show rutin-degrading enzyme activity, unlike tartary buckwheat.