

近赤外分光法による赤インゲンマメ煮熟粒色の非破壊評価

富沢 ゆい子*¹ 齋藤 優介*²

赤インゲンマメの育種選抜では煮熟粒色の評価が重要であるが、煮熟粒色を測定するには試料を浸漬処理もしくは煮熟する必要があるが、測定により試料は損失する。そのため、品質項目の測定は中後期世代から実施しているが、育種効率の向上のためには初中期世代からの育種選抜が重要である。そこで、試料を損失せずに煮熟粒色を評価する手法として、近赤外分光法の活用を検討した。赤インゲンマメの煮熟後粒色は近赤外分光法により少量の試料かつ非破壊で推定可能で、推定精度はL*値（明度）では高く、a*値（赤味度）は中程度であった。本手法を用いることで赤インゲンマメの選抜効率は向上するが、推定精度や作業量等を総合的に判断すると、現在の育種選抜における活用は難しかった。

緒言

主に北海道で生産される赤インゲンマメ品種は金時と呼ばれ、多くは煮豆や甘納豆などに加工されている。また、近年はサラダ等の新規用途への赤インゲンマメの利用も拡大しているが、これら用途には海外産の赤インゲンマメ（レッドキドニー）などが利用されている。この新規用途向けに対して実需者の求める重要な加工特性として、煮熟後の種皮色（以降、煮熟粒色と表記）が赤く鮮やかであることと、皮切れおよび煮くずれが少ないことが挙げられており¹⁾、北海道産金時類はこれら加工適性の面でレッドキドニーに劣る。実需者は付加価値の高い国産原料が供給されることを要望しており、北海道立総合研究機構（道総研）ではこれらの品質特性を備えた品種の育成に取り組んでいる。

赤インゲンマメの煮熟粒色のL*値（明度）とa*値（赤味度）は高い負の相関関係にあり、サラダ等用途において実需者評価の高いレッドキドニー（海外産赤インゲンマメ）の煮熟粒色は相対的にL*値が低く、かつa*値が高いことで「暗く赤色が濃い」と表される一方、評価の低い金時類（「大正金時」「福勝」など）はL*値が高く、かつa*値が低いことで「明るく赤味が淡い」と表される。

このことから煮熟粒色はL*値とa*値の比較により評価することが可能であり、育種選抜における重要な評価項目となっている。しかし、煮熟粒色の評価は原粒の目視では不可能であり、試料を浸漬処理¹⁾もしくは煮熟して測定する必要があることから、測定により試料は損失する。そのため育種における品質項目の評価は、比較的試料量が多い中後期世代の系統を対象に行っている。育種効率の向上のためには、初中期世代において加工特性の評価を行うことが望ましいが、その世代では一点あたりの試料量が少ないため、煮熟粒色の評価が困難となっている。

評価後の子実試料を次世代の栽培用に供試するためには、非破壊で各種品質項目を評価する必要があるが、有効な手法として近赤外分光法が挙げられる。近赤外分光法は対象物に光を照射した際の透過光や反射光のスペクトルを測定・解析することで各種項目を推定するため、対象物を破壊せずに評価することができる。さらに、浸漬処理をした赤インゲンマメの種皮色は煮熟粒色と高い相関関係があり、浸漬処理により種皮から溶け出す色素の主成分はアントシアニンであることが明らかとなっている¹⁾。アントシアニンは、複数の農作物において近赤外分光法により色素含量を推定できる可能性が示されていることから^{2), 3)}、近赤外分光法により赤インゲンマメの原粒から煮熟粒色を推定できる可能性がある。

以上のことから、本成果では近赤外分光法を用いた赤インゲンマメの煮熟粒色の非破壊評価法の開発および、主に初中期世代の育種選抜における本評価法の活用方法を検討したので報告する。なお、育種選抜における本評

2020年12月23日受理

*¹（地独）北海道立総合研究機構中央農業試験場，069-1395 夕張郡長沼町（現：農業研究本部 企画調整部 原子力環境センター駐在）

E-mail: tomizawa-yuiko@hro.or.jp

*² 同十勝農業試験場（現：上川農業試験場）

価法の活用方法の検討は、道総研のインゲンマメ育種で個体選抜を実施する機会が多いF₄世代を対象とした。F₄世代では、圃場における草姿や得られる子実 (F₅種子)の外観により選抜するが、得られるF₅種子量は少なく、ほぼ全量を翌年以降の播種に用いる必要がある。そのため、F₄世代において非破壊で煮熟粒色を評価することで、選抜効率の向上が見込まれる。

試験方法

1 供試材料

煮熟粒色の非破壊評価法の推定式の作成および評価用試料として、2014~2018年十勝農試産の赤インゲンマメの品種および系統 (F₅~F₈世代)、遺伝資源を供試した。年次および世代毎の供試点数は表1の通りである。

推定式を用いた選抜効果の検証では、実測値と推定値の比較および少量試料における適応性の検討にF₄個体選抜由来子実 (2015年産: 5交配組み合わせ55個体, 2017年産: 21交配組み合わせ120個体) を用いた。また、同系統において各世代間で比較し、世代が進んだ場合でも評価が一定の傾向であるかを確認するため、以下の①、②のケースを検討した。各ケースの設定および供試点数は以下の通りである。

- ① 2015年F₄個体選抜→2016年F₅系統選抜→2017年F₆予備選抜 (小規模生産力検定相当) 供試系統, 19系統。
- ② 2015年F₅系統選抜→2016年F₆予備選抜試験→2017年F₇生産力予備検定, 42~50系統。

2 近赤外スペクトルの測定

供試試料を携帯型近赤外分光器 (フルーツセレクター「K-BA100R」・クボタ製) で測定した。機器の設定は、測定波長500~1010nm、蓄積時間200ms、平均回数7、ダミー回数2とした。測定操作は、分光測色計用4.5cm径シャーレ (コニカミノルタ製CM-A128) に原粒を入れ、パッキンを付けた測定部にはめ、黒筒 (分光測色計用ゼロ校正ボックス, コニカミノルタ製CM-A124) をかぶせて遮光して測定した (写真)。これを1試料につき5反復



写真 フルーツセレクターによる近赤外スペクトル測定の様子

測定した。得られたスペクトルはPLS回帰分析 (後述) に使用するために前処理を行った。スペクトル前処理方法は吸光度 (Abs) と、吸光度の二次微分値4パターン (平滑化二次微分点数7, 13, 19, 25point) とした。以上の機器設定およびデータ保存、二次微分値の計算は、本機に接続したPC内の専用ソフト (K-Support) で行った。

3 煮熟粒色の実測値の測定

近赤外分光器で測定した試料について、以下に示す常法により煮熟粒色の実測値を測定した。煮熟粒 (子実に重量の3倍量のイオン交換水を加えて25℃で16時間浸漬後、オートクレーブにより98℃で20分間加熱したもの) を分光測色計 (CM-3500d, コニカミノルタ) のφ3mm試料台に置き、L*値 (明度), a*値 (赤味度), b*値 (黄味度) を、1試料につき20粒を2反復測定した。なお、b*値については現状の育種選抜では重要視されていないが、将来的に活用される可能性を想定して検討を行った。

4 推定式の作成および評価、再評価の手法

前段で得られた煮熟粒色の実測値と、前処理済みのスペクトル値 (Abs, 二次微分7~25point) を用いてPLS回帰分析を実施した。統計解析にはJMP ver.14.0.0 (SAS) を用いた。

表1 推定式の作成および評価に用いた試料 (育種世代, 年次別)

	F ₈ (生検)	F ₇ (生子)	F ₆ (予選)	F ₅	その他 ^{注)}	計
2014年		36	56			92
2015年	9	25	61	77		172
2016年			50	19	96	165
2017年		48	116		98	262
2018年				98		98
計	9	109	283	194	194	789

注) 左記の集計に含まれない品種および系統、遺伝資源。

表1の2014～2017年産試料のうち、3ヶ年分の試料を用いて推定式の作成および評価を行い、残り1ヶ年分の試料を用いて異なる年次の試料による推定式の再評価を行った。この検討は、年次を入れ替えた4パターンで行い、その結果から、推定精度が最も高くなるスペクトル前処理法を選定した。

次に、上記で選定したスペクトル前処理法を用いて、2014～2017年の4ヶ年分の試料で推定式の作成および評価を行い、2018年産試料により推定式の再評価を行った。なお、この推定式を最終的に採用した。

5 推定式を用いた選抜効果の検証

選抜効果の検証には、2015～2017年のF₄集団選抜における選抜系統種子 (F₅種子)、F₅～F₇系統から得られた種子 (F₆～F₈種子)を用いた。煮熟粒色の推定は本報で開発された非破壊評価法(後述)を用い、実測値は前述の方法で煮熟粒を調製して測定した。

結 果

1 非破壊評価法の推定式に使用するスペクトル前処理方法の選定

推定式作成および評価、再評価に用いる試料の年次を

入れ替えた4パターンを検討し、推定精度が最も良好となるスペクトル前処理法を選定した。なお、精度の評価基準は、基本的に推定式再評価時(推定式作成と異なる年次の試料による評価)のEI(精度評価指標)で判断することとした。検討結果は表2に示し、以降、煮熟粒色の項目毎の結果について述べる。

(1) 煮熟粒色L*値

推定式再評価のEIは、4パターン中3パターンで二次微分25pointが最も実用性が高く(データ省略)、平均値で見ても同様の結果であった。このことから煮熟粒色L*値の推定式作成には二次微分25pointを用いることとした。

(2) 煮熟粒色a*値

推定式再評価のEIは、4パターン中3パターンで吸光度が最も実用性が高く(データ省略)、平均値で見ても同様の結果であった。このことから煮熟粒色a*値の推定式作成には吸光度を用いることとした。

(3) 煮熟粒色b*値

推定式再評価のEIは、4パターン中3パターンで二次微分25pointが最も実用性が高く(データ省略)、平均値で見ても同様の結果であった。このことから煮熟粒色b*値の推定式作成には二次微分25pointを用いることとし

表2 異なるスペクトル前処理方法における推定式再評価時の推定精度(4パターン平均値)

スペクトル前処理方法		煮熟粒色L*値	煮熟粒色a*値	煮熟粒色b*値	b*推定値13以下の試料のみ	
					煮熟粒色b*値	煮熟粒色b*値13以下用推定式
吸光度	R	0.841	0.633	0.749	—	—
	SEP	3.41	1.32	2.05	—	—
	EI	29.1	25.0	25.0	—	—
二次微分7point	R	0.878	0.580	0.672	—	—
	SEP	3.05	1.47	2.31	—	—
	EI	26.0	28.0	28.5	—	—
二次微分13point	R	0.900	0.624	0.761	—	—
	SEP	2.86	1.38	2.04	—	—
	EI	24.4	26.1	24.8	—	—
二次微分19point	R	0.904	0.627	0.797	—	—
	SEP	2.78	1.38	1.91	—	—
	EI	23.7	26.0	23.2	—	—
二次微分25point	R	0.909	0.626	0.810	0.590	0.653
	SEP	2.73	1.38	1.84	1.72	1.59
	EI	23.3	26.3	22.2	39.7	36.5
推定式作成用試料点数		287～400	287～400	287～400	273～338	273～338
推定式評価用試料点数		142～199	142～199	142～199	134～187	134～187
推定式再評価用試料点数		92～262	92～262	92～262	92～251	92～251

注) 3ヶ年分の試料で推定式作成および評価を行い、他1年分の試料で推定式の再評価を実施。R, SEP, EIは年次を入れ替えた4パターンの平均値。—は未検討。

R: 重相関係数 SEP: 評価用試料による予測標準誤差

EI: 精度評価指標(水野ら1988)「EI = 2SEP × 100 / (実測値分布幅)」実測値分布幅は79.6(最小値20.4～最大値100)

EIによる実用性判断基準: EI < 25(実用性が高い), 25 ≤ EI < 37.5(実用性が中程度), 37.5 ≤ EI < 50(実用性が乏しい)

R, SEP, EIは以降同じ。

た。ただし、ここでの検討では橙色の種皮色を持つ試料が含まれており、一般的に赤系インゲンマメとして食用とされる試料はb*値の実測値が概ね13以下であった。b*値の推定式で推定値13以下に限って見ると、EIの平均値が39.7と推定精度が低かった。そこで、b*推定値が13以下となった試料を用いて、新たな推定式（以降、b*値13以下用推定式と表記）の作成および評価、再評価を行った。その結果、EIの平均値は36.5となり、推定精度がやや上昇した。しかし、EIの実用性判断基準では実用性が中程度であり、EI値も他の項目と比較して高かったことから、本試験における実用化は困難と判断し、推定式再評価時の検討は中止した。

2 推定式の推定精度の確認

煮熟粒色のL*値およびa*値について、前段で選定したスペクトル前処理方法を使用し、4ヶ年分（2014～2017年産）の試料を用いて推定式の作成および評価を行い、

表3 煮熟粒色の推定式の推定精度

		煮熟粒色 L*値	煮熟粒色 a*値
スペクトル 前処理方法	二次微分 25point		吸光度
推定式の因子数		14	7
推定式 作成	R	0.945	0.732
	SEC	2.15	1.32
推定式 評価	R	0.929	0.740
	SEP	2.40	1.29
	EI	18.2	19.9
推定式 再評価	R	0.959	0.713
	SEP	1.83	1.50
	EI	18.9	31.1
推定式作成用試料点数		462	462
推定式評価用試料点数		229	229
推定式評価用試料点数		98	98

注) SEC：推定式の推定誤差

未知試料（2018年産）による再評価を行った（表3）。

推定式の評価時（推定式作成と同一年次試料による評価）の推定精度は、EIでL*値で18.2、a*値で19.9といずれも高かった。

次に、これらの推定式の再評価時（未知試料）の推定精度をEIでみると、L*値で18.9、a*値で31.1であり、推定式の実用性はL*値では高く、a*値は中程度であった。

なお、再評価用の試料には、白色種皮遺伝資源である「WAF17（十勝農試における保存番号11118）」の交雑後代系統が含まれていたが、これらの試料は推定値が外れる傾向が認められた（図1のWAF17系プロット）。このことから、「WAF17」を交配親とする試料は、非破壊評価法の適用外とし、以降の推定式を用いた選抜効果の検証には供試しなかった。

3 初中期世代における推定式の精度評価および世代間適応性の検討

前項で有望と判断された煮熟粒色（L*およびa*値）の推定式を初中期世代の育種選抜に活用する場合、1個体当たりの少量試料における推定精度を確認する必要がある。また、初中期世代においては系統の特性が固定されていない可能性もあり、どの世代において本評価法を適用できるか検討する必要がある。そこで本推定式を用いた際の、1個体分の少量試料における推定精度の評価と世代間適応性の検討を行った。

まず、F₄個体選抜由来子実（2015年産：5交配組み合わせ55個体、2017年産：21交配組み合わせ120個体）において、煮熟粒種皮色の実測値と推定値の比較を行い、少量試料における適応性を検討した（図2）。

その結果、L*値は相関係数0.925と非常に高い相関係数であった。また、a*値ではやや相関係数は低かったが、概ね実用的な推定精度を得られ、1個体当たりの子実から煮熟粒色（L*およびa*値）を推定することは可能であ

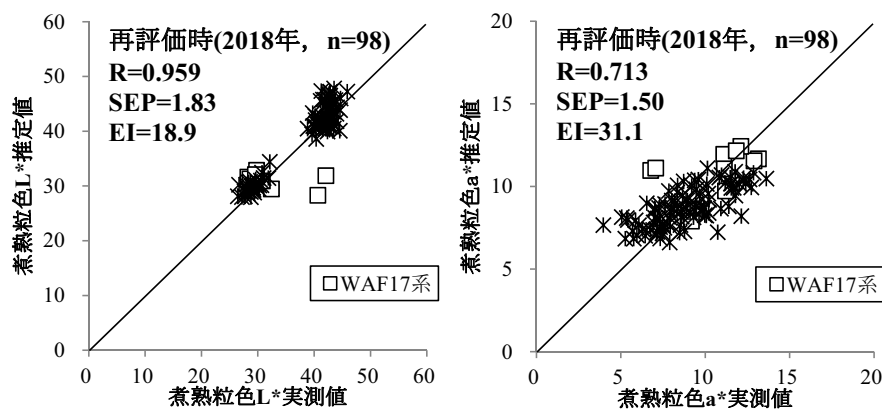


図1 煮熟粒色L*値およびa*値の実測値と推定値の関係（推定式再評価時）

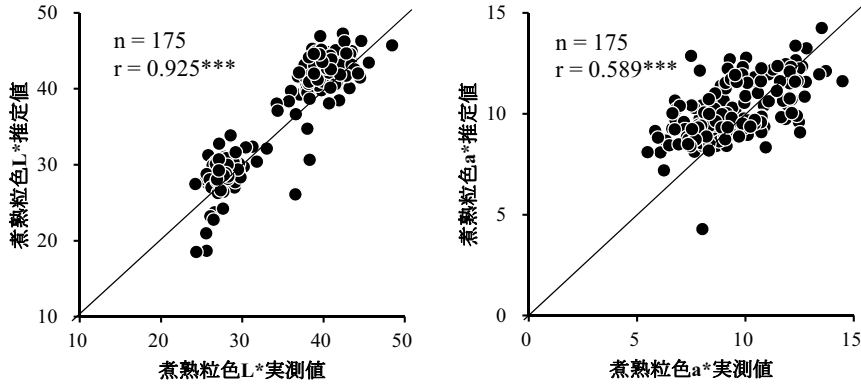


図2 煮熟粒色L*およびa*の実測値と推定値の関係（2015年F₄個体選抜由来子実）

***は0.1%水準で有意であることを示す。

ると判断した。

次に、同系統において各世代間で比較し、世代が進んだ場合でも評価が一定の傾向があるか、以下の2つのケースで検討した。

① 2015年F₄個体選抜→2016年F₅系統選抜→2017年

F₆予備選抜（小規模生産力検定相当）供試系統，19系統（図3）

② 2015年F₅系統選抜→2016年F₆予備選抜試験→2017年F₇生産力予備検定，42～50系統（図4）

その結果、いずれのケースにおいても世代間で本評価

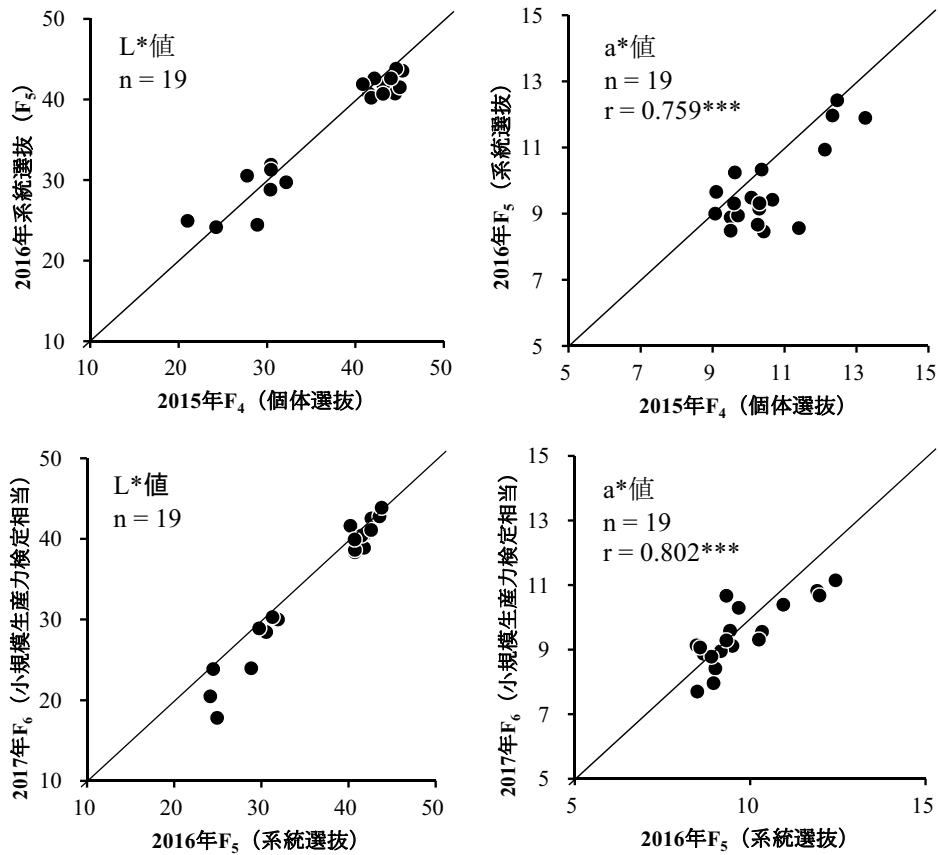


図3 煮熟粒色L*およびa*推定値の世代間比較（ケース①）

***は0.1%水準で有意であることを示す。

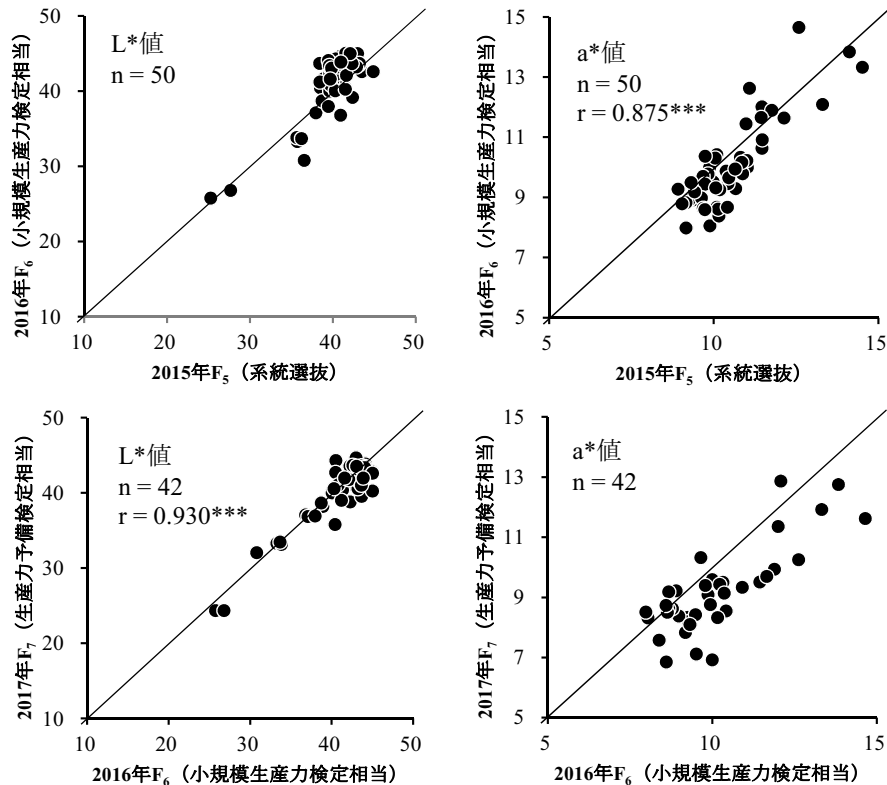


図4 煮熟粒色L*およびa*推定値の世代間比較 (ケース②)

***は0.1%水準で有意であることを示す。

法以上のずれは見られず、推定される煮熟粒色は次世代以降も同様の傾向であった。また、少なくともF₄世代においては、煮熟粒色は遺伝的にある程度固定され、F₄世代において煮熟粒色を評価することは育成の過程においても有効であると判断された。

考 察

1 非破壊評価法による煮熟粒色推定

インゲンマメの種皮色は、浸漬および煮熟処理により赤味が抜けて色が淡くなるが、これは種皮に含まれるアントシアニンが溶出するためと考えられる。インゲンマメに含まれるアントシアニンの吸収波長帯は506~535nmの範囲にあることから⁴⁾、本試験で用いた測定波長範囲500~1010nmの携帯型近赤外分光器で、アントシアニンの溶出に影響を受けるL*値とa*値を推定できたものと考えられた。一方、黄味を示すb*値については、実測値は低い推定値が高くなる試料が複数存在していることで推定精度が下がっており (データ省略)、今回の測定条件では正確に評価できなかった。なお、現状では煮熟粒のb*値は評価項目としては重視されていないため、推定できなくとも実用上の問題は少ないと考えられる。

2 選抜効果の検証と品種育成への活用

本成果で開発された非破壊評価法により煮熟粒色の推定が可能であることが示されたが、実際の育種選抜において活用可能な精度かどうかを評価する必要がある。そこで、F₄世代選抜個体種子および翌年のF₅世代系統種子について、非破壊評価法による選抜の効果を検証した。

検証方法は、非破壊評価法を用いてF₄世代個体を選抜したと仮定した場合、翌F₅世代系統における煮熟粒色の分布割合を予測した。なお、ここでは金時系統については、L*値が42.0以上かつa*値が9.0以下の個体を選抜したと仮定し、F₅世代における実測値の分布を検討した (図5)。同様に、洋風料理向け系統については、L*値が30.0以下かつa*値が11.5以上の個体を選抜したと仮定し、F₅世代における実測値の分布を検討した (図6)。金時系統については煮熟粒色が「明るく赤色が薄い」、従来の金時品種 (「大正金時」など) が含まれる領域、洋風向け系統については「暗く赤色が濃い」、海外産レッドキドニーが含まれる領域から、それぞれL*値およびa*値の選抜基準を設定した。また、それぞれの選抜基準を目標値とした時の選抜効率を、無選抜と比較した結果を図7に示した。

外観評価も含め評価を行わず、選抜を行わなかったと

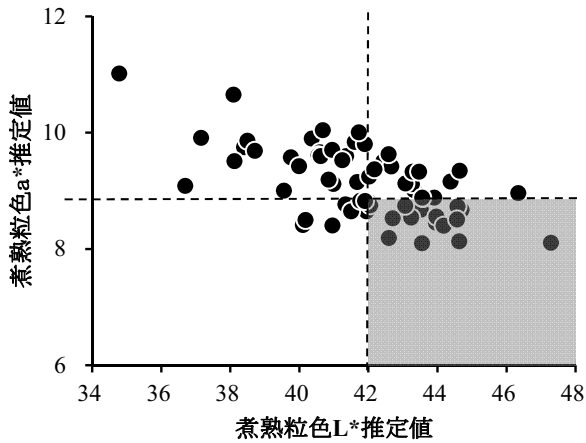


図5 煮熟粒色推定値の分布（供試試料は2017年F₄個体選抜の子実のうち翌年F₅世代のデータがある70点，金時類）
網掛け部分は仮定した選抜目標の領域を示す。

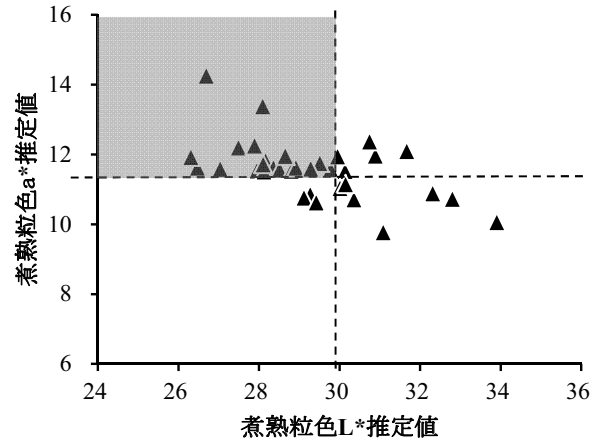


図6 煮熟粒色推定値の分布（供試試料は2017年F₄個体選抜の子実のうち翌年F₅世代のデータがある36点，洋風料理向け赤インゲンマメ）
網掛け部分は仮定した選抜目標の領域を示す。

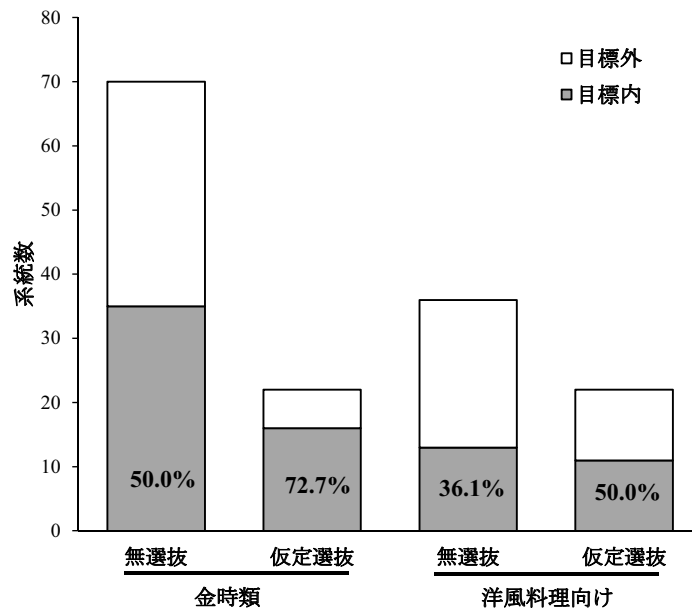


図7 非破壊評価法で選抜したと仮定した場合の選抜効率（供試試料は2017年F₄個体選抜の子実のうち翌年F₅世代のデータがある106点）

無選抜：2017年F₄個体選抜において、選抜を行わなかった場合における系統数
 仮定選抜：2017年F₄個体選抜において、非破壊評価法で選抜したと仮定した場合における系統数
 仮定選抜における目標値は図5または図6と同じ。

仮定した場合（無選抜），F₅系統では実測値が目標値を満たす系統は金時類で50.0%（70系統中35系統），洋風料理向け赤インゲンマメで36.1%（36系統中13系統）であった。一方，目標値を設定した非破壊評価法による選抜をF₄世代で行ったと仮定した場合（仮定選抜），金時類では70系統中22系統が選抜され，翌F₅世代の実測値にお

いて目標値を満たした系統は16系統であった（72.7%）。同様に，洋風料理向け赤インゲンマメではF₄世代で36系統中22系統が選抜され，さらに翌F₅世代の実測値において目標値を満たした系統は11系統であった（50.0%）。いずれもF₄世代で非破壊評価法による煮熟粒色の選抜を実施したと仮定した場合，翌F₅世代において望ましい

煮熟粒色を示す系統の割合は無選抜に比べて上昇した。

以上から、育成初期世代における非破壊評価法による選抜効果の向上が確認された。なお、実際の選抜過程においては、種皮色や煮熟粒色には年次変動が見られるため、その年次ごとに相対評価する必要があるだろう。

一方で、本評価法の推定精度で選抜効率を高めるためには、選抜の目標値を厳しく設定する必要がある、そのため望ましい加工適性を有する系統を廃棄してしまう確率が高まってしまう。特に金時類では優れた系統を廃棄する確率は高く、例えば前述の仮定選抜を行った場合(図7)、優れた煮熟粒色の金時類系統は35系統あったが、非破壊評価法において選抜した場合、35系統中19系統が目標値外と推定され、多くの優れた特性の系統が廃棄される恐れがある。逆に、優れた特性の系統を廃棄しないように選抜の目標値を下げた場合、ほとんどの系統が廃棄されずに残る状況になり、本評価法の測定作業が加わることで全体の作業量を増やすと考えられた。なお、洋風料理向けについては、本評価法により系統の廃棄リスクは金時類より低く、選抜効率を向上させることができた(図7)。しかし、現状の選抜作業は金時類と併せて実施しており、洋風料理向け系統のみ本評価法を導入するのは作業上、難しい状況にある。以上を考慮すると、本評価法の推定精度では現状の育種選抜における活用は難しいと判断された。ただ、子実を非破壊で評価できる手法は増殖率の低いインゲンマメ育種においては有効であることから、今後、洋風料理向け系統の選抜強化などによる育種ルーチンの変更や、推定精度を育種選抜で活用可能な水準まで向上させることにより、本技術が赤インゲンマメの育種選抜で活用されることが期待される。

謝 辞 本試験は公益財団法人日本豆類協会の豆類振興対策事業による試験研究として行った。

引用文献

- 1) 公益財団法人日本豆類協会. 平成24年度試験研究課題成果概要, サラダ用途等の加工適性・病害抵抗性に優れる菜豆品種の開発促進
https://www.mame.or.jp/Portals/0/resources/randd/pdf/h24_randd_05_end.pdf
- 2) 白 文明, 吉村季織, 高柳正夫. 近赤外分光法によるブルーベリー果実の品質評価. 映像情報メディア学会技術報告. 38(4), 33-38 (2014)
- 3) 江口研太郎, 玉置宏之, 三ツ橋昇平. 近赤外分光法による紫トウモロコシ子実のアントシアニン含量および抗酸化活性の1粒非破壊分析. システム農学. 32(1), 19-24 (2016)
- 4) 高宮和彦, 大澤俊彦, グユエン・ヴァン・チュエン,

篠原和毅, 寺尾純二編著. “色から見た食品のサイエンサーアントシアニン色素”. サイエンスフォーラム. 96-103 (2004)

Estimation of the seed coat color of red kidney bean after boiling by near-infrared spectroscopy

Yuiko TOMIZAWA^{*1}, Yusuke SAITO^{*2}

Summary

In red kidney bean breeding, seed sample must be soaked in water or boiled to evaluate the seed coat color of boiled red kidney beans, but the samples are lost. For this reason, the seed coat color of boiled red kidney beans is measured after the middle generation, but breeding selection from primary or middle generation is important to improve breeding efficiency. Therefore, the use of near-infrared spectroscopy was investigated as a method to evaluate the seed coat color of boiled red kidney beans without losing samples. The seed coat color of red kidney beans after boiling can be estimated by near-infrared spectroscopy, with a small amount and without destruction. The accuracy of near-infrared spectroscopy in estimating the seed coat color of boiled red kidney beans was high for L* and moderate for a*. Estimation of the seed coat color of boiled red kidney beans b* was difficult. The efficiency of red kidney bean breeding and selection can be improved by using near-infrared spectroscopy. However, considering the accuracy of estimation and workload, it has been difficult to use this method in breeding selection of red kidney bean.

*1 Hokkaido Research Organization Central Agricultural Experiment Station (Present ; Hokkaido Research Organization Agricultural Research Department, Naganuma, Hokkaido, 069-1395, Japan)

E-mail: tomizawa-yuiko@hro.or.jp

*2 Hokkaido Research Organization Tokachi Agricultural Experiment Station (Present ; Hokkaido Research Organization Kamikawa Agricultural Experiment Station, Pippu, Hokkaido, 078-0397 Japan)