

トルコギキョウ白色系生花卉の紫外光下における明暗像とフラボノイド含量との関係

福田直子^{1*}・宮坂昌実²・斉藤涼子³・朽津和幸³・中山真義¹

¹花き研究所生理遺伝部 305-8519 つくば市藤本

²長野県野菜花き試験場育種部 381-1211 長野市松代町大室

³東京理科大学大学院理工学研究科 278-8510 野田市山崎

The Relationship between Characteristics of Optical Image under UV Light and Flavonoid Content in Acyanic Petals of *Eustoma grandiflorum*

Naoko Fukuta¹, Masami Miyasaka², Ryoko Saito³, Kazuyuki Kuchitsu³ and Masayoshi Nakayama¹

¹National Institute of Floricultural Science, Tsukuba, Ibaraki 305-8519

²Nagano Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station, Matuhiro, Nagano 381-1211

³Department of Applied Biological Science Tokyo University of Science, Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510

Summary

We investigated the relationship between petal brightness under ultraviolet light (365 nm) and flavonoid concentrations using 75 pale color lines of *Eustoma grandiflorum*. Flavonoid concentrations of the dark color petals were above 10 mg/g f. w., while those of the bright color petals were below 3 mg/g f. w. Several lines showed an image of bright petals with dark edges. A purple picotee petal and a white petal derived from 'Candy Marin' also showed such images. The edge tissue contained a 30- times higher concentration of flavonoids than the other tissue in both petals, suggesting that the same mechanism affects the flavonoid distribution. We can roughly estimate flavonoid concentration in pale color petals of *Eustoma* using this method. This method could be applied to other plants including *Dianthus* and *Petunia*. Because information on the flavonoid concentration in many flowers can be obtained immediately and non-destructively, this method could contribute to breeding selection and studies on the regulation of flavonoid-anthocyanin biosynthesis.

キーワード： フラボノイド, 白色花, 簡易判別, 紫外光, トルコギキョウ

緒 言

トルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) の自生地における花色はほとんどが紫色であるが, 白, 桃色, 黄色, 白地で弁端が紫の覆輪が確認されている (大川, 1990). 日本には紫色の自生種が 1935 年頃に導入され, 民間育種家や種苗会社によって多様な花色 (模様) や花型の品種が作出されている. 中でも白色花はバラやカーネーションに置き換わる形で, 冠婚葬祭用の仕事花として年間を通じた需要が増加している. そのため, 作期適応性が高く花型, 草型等の諸形質に優れた純白の品種の育成が求められている.

トルコギキョウの花弁における主要色素はアントシアニンを含むフラボノイド系化合物である (Asen ら, 1986; Markham・Ofman, 1993). 白色品種として分類される花

弁ではアントシアニンの含量は少なく, 主に黄色系のフラボノイド (以下フラボノイド) が存在する. トルコギキョウの主要フラボノイドはケンフェロール, イソラムネチンなどのフラボノールであることが報告されている (Markham・Ofman, 1993). 可視光領域に吸光特性を持つ色素が花弁表皮細胞にごく少量しか含まれず, 花弁から反射する光の波長域の偏りが無い場合に白色花として認識されることから (斉藤, 1990), 純白の品種の育成にはフラボノイド含量の, より低いものの選抜が有効と考えられる.

フラボノイドは白色花の色素である他に, 赤~紫花の色素であるアントシアニンの前駆体の代謝物質としての性質を有する. そのため, フラボノイドの含有量や組成の情報からアントシアニンの生合成経路上の制御部位を推定することができる (斉藤ら, 2003). また, アントシアニン生合成の異なる代謝部位を制御する遺伝子は補足遺伝子として働きうるため, 白色花個体どうしの交配でアントシアニンを生産する着色品種を育成できる可能性も

2004年10月5日 受付. 2004年12月13日 受理.

本研究の一部は平成14年度園芸学会秋期大会において発表した.

* Corresponding author. E-mail: faba@affrc.go.jp

あることから、フラボノイドの情報はアントシアニンを主要色素とする桃色、赤紫、青紫花品種の育成にも有益であると考えられる。

一般にフラボノイドは吸光極大を 360 nm 付近の紫外光領域に有している。可視光領域である 400 nm 以上の波長を僅かに吸収する淡い黄色を示す色素であり、花卉中に多量に存在する場合は淡黄色やクリーム色に見える。淡黄色色素であるフラボノイドの可視光下での肉眼による検出限界濃度は他の色素に比較して高いために、これまでフラボノイドの情報を得るためには有機溶媒によって抽出した試料を HPLC 等の機器を用いて分析する手法が用いられてきた。品種育成を目的として多くの個体を調査するためにはより迅速で廉価なフラボノイドの検出方法が求められる。さらに、トルコギキョウでは覆輪やかすりなどの多様な花模様の品種も存在することから、これらの解析を行う上で花卉上のフラボノイドの局在性に関する情報も重要である。非破壊的なフラボノイドの検出法を開発することによってこれらの問題の解決が期待できる。我々はトルコギキョウの花弁を 365 nm の紫外光下で観察することで、フラボノイド含量を非破壊的に簡便に判別できることを見いだした。

材料および方法

1. 植物材料

長野県野菜花き試験場にて育成したトルコギキョウ白色系品種および平成 12~13 年に交雑を行った 381 系統の中より、淡緑色、淡黄色、淡紫色を含む白色系花色の計 75 品種・系統を用いた。耕種概要は 2002 年 1 月 6 日および 3 月 1 日に播種し、4 月 11 日および 5 月 7 日にビニルハウス内へ定植を行い、以降無加温栽培にて慣行管理を行った。8 月 1 日に各品種・系統について 1 輪を採取し、分光測色計 (SPECTRO COLORIMETER CD100, YOKOGAWA) で花弁の色彩を $L^*a^*b^*$ 表色系で測定した。

紫覆輪の‘キャンディマリン’((株)ミヨシ)を 2003 年 5 月 1 日に育苗用培養土 (メトロミックス 350) を詰めた 288 穴セルトレイに播種し、20°C 恒温、光量子量 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 16 時間日長の人工気象室で育苗した。人工培養土 (クレハ園芸培土) とバーミキュライトを 3:1 の割合で混合して詰めた直径 10.5 cm のビニルポットに 7 月 13 日に鉢上げし、約 200 個体をガラス温室で栽培した。このうち白色花の個体が 1 個体分離したので、他の個体の紫覆輪花とともに紫外光下の観察と化学分析に供試した。

ガラス温室内で栽培した白色のペチュニア‘バカラホワイト’((株)サカタのタネ)の花冠を紫外光下の観察とフラボノイドの分析に用いた。また、生産者から提供を受けた、純白色品種‘ホワイトマインド’を含む白色のカーネーション 3 品種・系統を紫外光下での観察に用いた。

2. 紫外光下での観察

波長 365 nm の紫外線ランプ (15W) 2 本が点灯する暗箱 (CSN-15 AC/AC コスモバイオ社) 内において花の明暗像を観察した。花卉が青白く明瞭に見えるものを 1、背景と同様に黒く見えるものを 3、これらの中間を 2 とする UV 判定値で遠観評価した。あわせてデジタルカメラで像を記録した。

3. HPLC 分析

紫外光下で観察したものと同一の花を分析した。花卉から緑色の花底部分を除き分析試料とした。覆輪品種は 3 個体から 1 輪ずつ採取し、花底色部分を除き先端側着色部と基部側白色部に切り分けて供試した。覆輪品種から分離した白色花 1 個体からは第 1 花から第 3 花を採取し、緑色の花底色部分を切除した後に花卉を紫外光下で観察し、黒く見える先端側と青白く見える基部側に切り分けた。

生花卉 0.1 g 当たり 1 ml の 50% 酢酸水を添加し、ガラス棒で花卉を磨碎して一晩静置し、上清を回収した。残渣に 1 回目の 2 分の 1 量の抽出溶媒を添加して上清を回収する操作を 2 回行い、脱脂綿で濾過した抽出液 10 μl を分析に用いた。分析条件は ODS カラム (Inertsil ODS-2, 5 μm , 4.6 ϕ \times 250 mm, GL Sciences Inc.) を装着した HPLC (Hewlett Packard Series 1100) を用いて、溶媒は 1.5% リン酸液とアセトニトリル 50%, 酢酸 40%, リン酸 1.5% リン酸液の比が 90:10 から 40 分後に 50:50 になるようグラジェントをかけて 1 分当たり 0.8 ml の流速で溶出した。検出波長は 360 nm としフラボノイド量をルチン当量として定量した。

結果

1. 紫外光下像とフラボノイド含量の品種間差

1) 供試花弁の色彩

供試した白色系花弁には可視光下で淡緑色、淡黄色、淡紫色と判別できるものを含んでおり、花弁の明度 L^* は最低 77.9、最大 94.2 に分布し、平均値は 90.7 であった。白色花は a^* が -2~0、 b^* が 5~12、淡黄色花は a^* が -6~-2、 b^* が 12~25、淡緑色花は a^* が -12~-5、 b^* が 20~40、淡紫色花は a^* が 2~4、 b^* が 0~5 の領域にほぼ分布していた (第 1 図)。明度と彩度 ($C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$) との間には 0.1% 水準で有意な負の相関が認められ ($r = -0.652$)、彩度が高いほど明度が低下する関係が認められた。

2) 紫外光下像

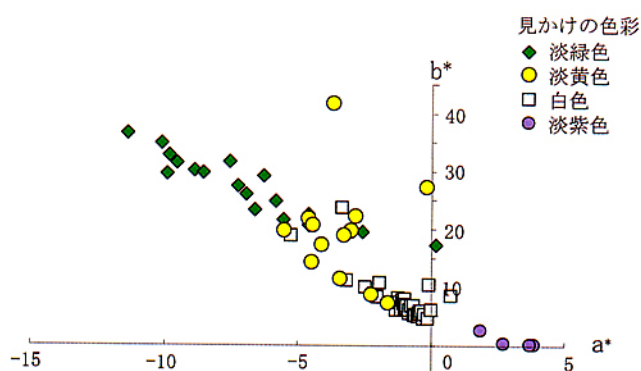
紫外光下において多様な明暗像が観察された (第 2 図)。花卉が青白く見える 39 系統を UV 判定値 1、黒く見える 29 系統を判定値 3、これらの中間の黒さを示す 7 系統を判定値 2 と評価した。判定値 1 の 17 系統、判定値 2 の 4 系統、判定値 3 の 1 系統は花卉の明度が不均一であった。

3) フラボノイド含量

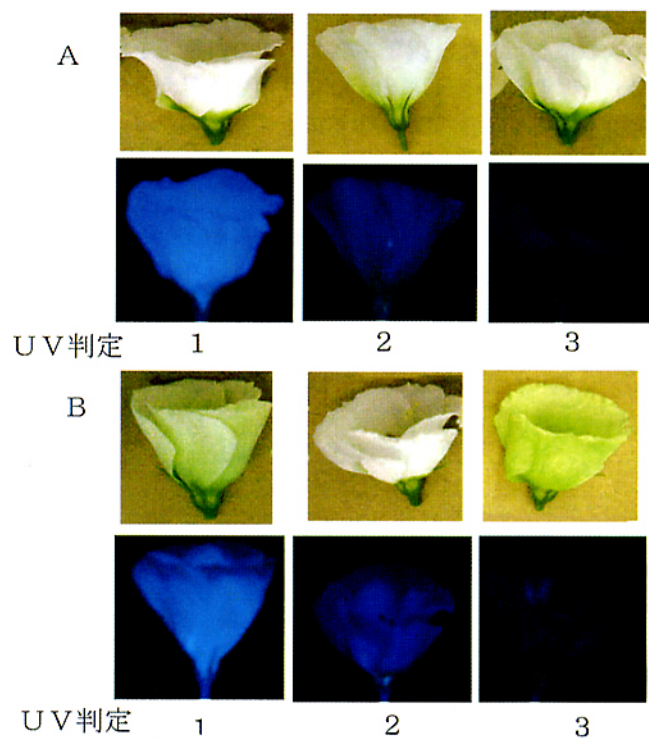
生花卉 1 g 当たりのフラボノイド含量は最低 0.6 mg、

最高 30 mg と品種・系統間に大きな差異が認められた(第3図). UV判定値1の花弁のフラボノイド含量は0.6~3 mg/g, 判定値2は5~10 mg/g, 判定値3は10 mg/g以上であった.

淡黄色花弁のフラボノイド含量は9 mg/g以上であり, ほとんどは判定値3と評価された. 淡紫色花弁は2 mg/g以下で判定値1と評価された. 淡緑色花弁と白色花弁のフラボノイド含量は0.8~20 mg/gの広い範囲に分布し, 判定値も1から3のいずれにも評価された. これら白色系花弁においては紫外光下での花弁の像の黒さとフラボノイド含量には明らかな相関が認められた. また, フラボノイド含量と花弁のL*, a*, b*との間の相関係数はそれぞれ-0.196, 0.151, 0.397で明瞭な関係は認められなかった.



第1図 供試白色系花弁の色彩分布



第2図 白色系花弁のUV光下像とUV判定値

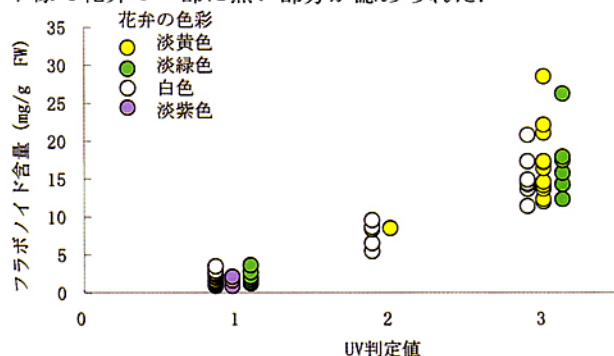
A: 紫外光下像の明暗が均一のもの,
B: 紫外光下像の明暗が不均一なもの

2. 紫外光下像とフラボノイド含量の同一花弁内の部位間差

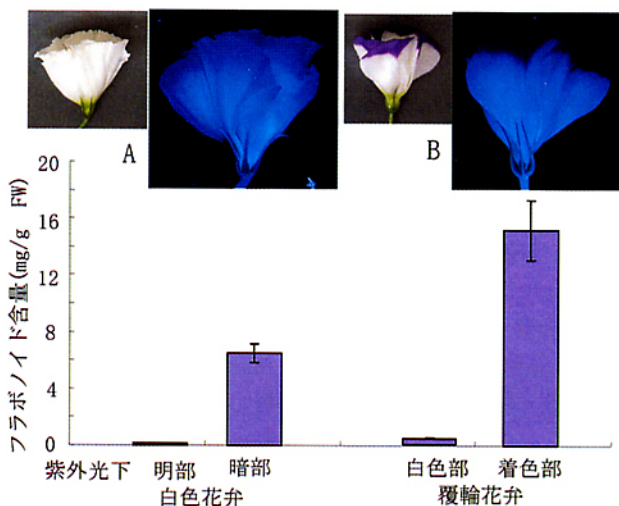
紫覆輪品種‘キャンディマリン’において, 花弁先端側の着色部はUV判定値3と評価され, そのほかの白色部分は判定値1と評価された. フラボノイド含量は先端側で15 mg/gであるのに対し, その他の白色部では0.4 mg/gであった(第4図). ‘キャンディマリン’から分離した白色花の先端側はUV判定値2と評価され, その他の部位は判定値1と評価された. フラボノイド含量は先端側では7 mg/gであるのに対してその他の部分は0.2 mg/gであった(第4図).

3. トルコギキョウ以外の白色花における紫外光下像とフラボノイド含量の品種間差と花弁内分布

カーネーションの純白色品種‘ホワイトマインド’(第5図1a中央)は紫外光下で花弁全体が白く, 他の白色品種と明らかに異なっていた. ‘ホワイトマインド’の紫外光下像で花弁の一部に黒い部分が認められた.

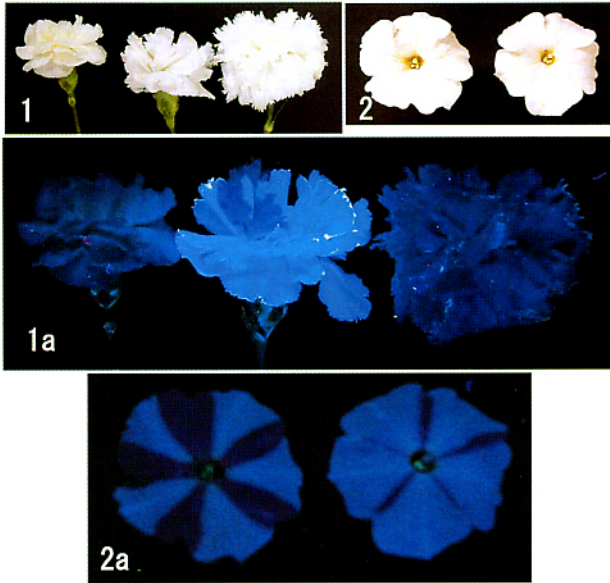


第3図 UV判定値とフラボノイド含量および花弁の色彩との関係



第4図 覆輪花弁と紫外光下で覆輪様の像を示す白色花弁の部位別フラボノイド含量

A: 白色花のUV光下像, B: 覆輪‘キャンディマリン’のUV光下像
垂直線は標準誤差(n=3)を示す



第5図 カーネーションとペチュニアの白色花の紫外光下像
 1:カーネーション,中央は‘ホワイトマインド’, 2: ペチュニア‘バカラホワイト’
 1aと2aはそれぞれ1と2のUV光下像で、暗色部はフラボノイドの分布を示す

ペチュニアの白色品種‘バカラホワイト’の花弁に、紫外光下で星形の模様は黒く見える個体が多く存在した。黒く見える部分の面積は個体や花ごとに異なっていた(第5図2a)。白い部分からはフラボノイドが検出されないのに対して、黒い部分のフラボノイド含量は7.3 mg/gであった。

考 察

トルコギキョウの白色系品種・系統の花弁におけるフラボノイド含量は0.8 mg/gから20 mg/gの広い濃度範囲に分布していた。可視光下での観察ではこの領域のフラボノイド含量を推定することはできなかった。また、花弁のL*, a*, b*値とフラボノイド含量との間には相関が認められなかったことから、分光測色計を用いても推定は困難である。

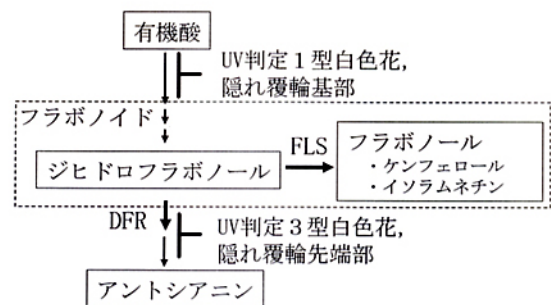
365 nmの紫外光下での観察では、フラボノイド含量と花弁の明暗との間に相関が認められ、フラボノイド含量が3 mg/g以下のものは青白く明るく見え(UV判定値1)、10 mg/g以上のは黒く(UV判定値3)見えた。この方法により可視光下での観察では判別できない10 mg/g以下の低いフラボノイド含量の情報を得られることが示された。

淡緑色や淡紫色などの色彩の花弁についても、紫外光下ではフラボノイド含量と対応した像が観察された。緑の花の色素であるクロロフィルや、赤~紫を示すアントシアニン、さらには黄色~橙色を示すカロテノイド等の色素はそれぞれの極大吸収波長の吸光度よりも365 nmの波長域の吸光度が低い。すなわち淡色の植物組織においては

365 nmの波長の吸収は主にフラボノイドによるものと考えられる。365 nmの紫外光下における生花弁の像の明暗をもとに、見かけの色彩に影響されずにフラボノイド含量を評価できることが示された。

フラボノールとアントシアニンは、ジヒドロフラボノールを共通の生合成前駆体としており、それぞれFLSとDFRという異なる酵素によって代謝が触媒される(星野ら, 2002)。トルコギキョウの覆輪花弁においてフラボノール含量が低い白色組織は、ジヒドロフラボノールが生合成される前の過程で代謝が抑制されている(福田ら, 2003)。また、カーネーションのフラボノール含量の高い白色花弁ではジヒドロフラボノールからアントシアニンに至る過程で代謝が抑制されていることが報告されている(Matoら, 2000)。したがってトルコギキョウにおいても同様に、フラボノイド含量が高いUV判定値3の白色花ではジヒドロフラボノールからアントシアニンに至る過程で、フラボノイド含量が低いUV判定値1の白色花はジヒドロフラボノールの生合成前で代謝が抑制されていると考えられる(第6図)。すなわちフラボノイド含量から白色花におけるアントシアニンの生合成経路上の代謝阻害部位を推測することが可能となる。本方法は簡便で迅速にフラボノイド含量の情報を得られることから、育種素材の検索や選抜への利用が期待できる。

紫外光下において花弁の先端や縁が暗くて基部が明るい、像の明暗が不均一な品種・系統が複数観察された(第2図B)。F₁品種の紫覆輪‘キャンディマリン’から分離した白色花個体も、紫外光下での花弁の明暗が不均一で覆輪状の像を示した。以下このタイプの白色花を「隠れ覆輪」と称する。「隠れ覆輪」の花弁の黒く見える先端部には白く見える花弁基部の30倍以上の濃度のフラボノイドが存在していた(第4図)。したがって紫外光下での花弁の不均一な明暗像は、フラボノイドが不均一な濃度で分布することによって生じることが明らかとなった。キャンディマリンの有色組織と白色組織のフラボノイド含量の比は隠れ覆輪と同程度であることから、隠れ覆輪の基



第6図 トルコギキョウの花弁色素の主要生合成経路と白色花における生合成の推定阻害部位
 DFR: ジヒドロフラボノール4-レダクターゼ
 FLS: フラボノールシクターゼ

部におけるフラボノイドの生合成は、有色の覆輪と同じ機構で抑制されていると考えられる。また、隠れ覆輪の花弁先端側はジヒドロフラボノールからアントシアニンへの生合成が抑制されていると考えられる(第6図)。

可視光のみの情報をもとに花卉からフラボノイドを抽出し分析した場合、花卉全体の平均値しか得られない。これに対して 365 nm の紫外光下で生花卉を観察する本方法は非破壊分析であり、花卉上のフラボノイドの分布状況が判別できることが示された。

カーネーションにおいてもフラボノイド含量の異なる白色花の品種群が見いだされている(Onozakiら, 1999)。「ホワイトマインド」(第5図1中央)は純白でフラボノイド含量が顕著に少ない(Matoら, 2000)。紫外光下において本品種はフラボノイドを蓄積する他の白色花よりも明らかに紫外光下で白い像を示した(第5図1a中央)。さらに、「ホワイトマインド」の花弁の一部が黒くなっている様子が観察され、この部分にフラボノイドが偏在していると考えられる。白色花のペチュニアについても紫外光下で花冠上に黒い星形の模様が観察され、この部分に特異的なフラボノイドの蓄積が認められた。トルコギキョウ以外の花きにおいても紫外光下で白色系花卉を観察することにより、大まかなフラボノイドの含量や分布を簡便かつ非破壊的に得られることが示された。アサガオなど多くの花きで見られる斑入りや絞り状の模様となるアントシアニンの局在は、アントシアニンの生合成酵素遺伝子がトランスポゾン等により機能を失う、あるいは回復することによって発現することが知られている(星野ら, 2002)。フラボノイドも同様の制御を受けていると考えられるが、可視光下ではその局在性が判然としないために解析が進んでいない。本方法はこの機構を解明する上で有用であると考えられる。

以上のようにトルコギキョウの白色系花卉にはフラボノイド含量の多寡とともに分布の偏在が認められ、その成立機構や遺伝性の相違が予想された。このような情報源となるフラボノイドの含有量や分布は 365 nm の紫外光下における花卉の像の明暗を基に非破壊で簡便に判別することができ、その有効性と汎用性が示された。

摘 要

白色系トルコギキョウ 75 品種・系統の花弁を用いて、365 nm の紫外光下での花卉の像とフラボノイド含量を調査した。紫外光下において黒く見える花卉には 10 mg/g 以上のフラボノイドが存在し、白く見える花卉のフラボノイド含量は 3 mg/g 以下と少なかった。紫外光下におけ

る花卉の像の明暗とフラボノイド含量との間に明らかな相関が認められた。紫外光下で先端側が黒く基部が白い、覆輪状の像を示す白色花卉が複数存在した。紫覆輪品種「キャンディマリン」から分離した白色花は紫外光下で同様の覆輪状の像を示し、先端側は基部側の 30 倍のフラボノイドを含んでいた。紫覆輪品種の花弁の先端側と基部側のフラボノイド含量比が同じであることから、白色花卉上のフラボノイドの局在は同様の機構で発現していると考えられた。本方法は多くの試料について短時間に非破壊的にフラボノイドの情報が得られることから、育種素材の選抜やフラボノイド-アントシアニンの生合成の情報を得ることに役立つと期待される。

引用文献

- Asen, S., R. J. Griesbach, K. H. Norris and B. A. Leonhardt. 1986. Flavonoids from *Eustoma grandiflorum* flower petals. *Phytochem.* 25: 2509-2513.
- 福田直子・大宮あけみ・伊藤佳央・小関良宏・野田尚信・菅野善明・鈴木正彦・中山真義. 2003. トルコギキョウの覆輪形成に関与するフラボノイド系色素の生合成制御. 園芸学会雑誌. 72(別1): 360.
- 星野 敦・森田裕将・飯田 滋. 2002. 花を彩る遺伝子. 蛋白質核酸酵素. 47: 210-215.
- Markham, K. R. and D. J. Ofman. 1993. Lisianthus flavonoid pigments and factors influencing their expression in flower colour. *Phytochem.* 34: 679-685.
- Mato, M., T. Onozaki, Y. Ozeki, D. Higeta, Y. Itoh, Y. Yoshimoto, H. Ikeda, H. Yoshida and M. Shibata. 2000. Flavonoid biosynthesis in white-flowered Sim carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Sci. Hort.* 84: 333-347.
- 大川 清. 1990. トルコギキョウ品種改良の流れ. P. 62-69. 農耕と園芸 11月号別冊バイオホルティ 6. 誠文堂新光社. 東京.
- Onozaki, T., M. Mato, M. Shibata and H. Ikeda. 1999. Differences in flower color and pigment composition among white carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars. *Sci. Hort.* 82: 103-111.
- 齊藤規夫. 1990. 白色花に含まれる色素-特にフラボノイド色素と関連化合物. P. 49-55. 農耕と園芸 9月号別冊バイオホルティ 4. 誠文堂新光社. 東京.
- 齊藤涼子・福田直子・大宮あけみ・伊藤佳央・小関良宏・朽津和幸・中山真義. 2003. ペチュニアの覆輪形成に関与するフラボノイド系色素の生合成制御. 園学雑. 72(別2): 468.