

シクラメンの花色素と花色発現について

宮島, 郁夫
九州大学農学部園芸学講座

土井, 一郎
日本たばこ産業株式会社

鹿毛, 哲郎
鹿毛真耕園

<https://doi.org/10.15017/23347>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 45 (1/2), pp.83-89, 1990-12. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

シクラメンの花色素と花色発現について

宮島郁夫・土井一郎*・鹿毛哲郎†

九州大学農学部園芸学講座
(1990年7月30日受理)

Floral Pigment and Flower Color Expression in the Petals of Cyclamen

IKUO MIYAJIMA, ICHIRO DOI* and TETSURO KAGE†

Laboratory of Horticultural Science, Faculty of Agriculture
Kyushu University 46-01, Fukuoka 812

緒 言

シクラメン (*Cyclamen*) 属は小アジアから地中海沿岸地方及びヨーロッパ中部にかけて約20種が分布しているが、一般に栽培されているシクラメンの園芸品種は *C. persicum* MILL 一種から発達したといわれている。1800年代初頭に、ドイツやイギリスで花型の大型化や花色の多様化に関する育種が始まり、赤、桃、白及び紫色等の花卉をもつ園芸品種が育成された。近年ではパステル系品種の作出が相次いだが、既存花色の中間色の発現にとどまっておき、花色の幅が拡大しているとはいえない。したがって、シクラメン品種の多様化を進めるために、青色花または黄色花品種の開発が待たれるが、シクラメンについては花色育種の基礎となる花色素の研究はほとんどなされていないのが現状である。

筆者らは白色花品種の内婚系育成過程で、1982年に黄色株を見だし、黄色花系統を得て、花卉の黄色発現に関与すると思われる主色素を同定した(宮島ら、1990)。これによって、シクラメンの黄色花品種育成の端緒は開かれたといえるが、青色花に関する育種には未だ遺伝子資源を欠くばかりでなく、作出の手がかりも得られていない。

本研究では、特に青色花品種作出のための、基礎資料を得るために、まずシクラメンの有色花卉に含まれる主要なアントシアニンと同定した。次いで、花卉内アントシアニン構成と花色との関係を明らかにすると共に、花色発現に及ぼすコピグメント効果についても

検討を加えた。

材料及び方法

1988年11月から1989年2月にかけて、赤色系、桃色系及び紫色系シクラメンから計40個体を選抜し、それぞれの個体から開花当日の花卉を採取して実験材料とした。花卉は採取後直ちに測色色差計 (ND-K6B, 日本電色工業製) を用いてハンターの Lab 色度図を作成し、花色を表現すると共に、Royal Horticultural Society Colour Chart (以下 R. H. S. C. C.) の color code で花色を分類した。測定後、基部 (eye) を取り除いた花卉を直径 8 mm のコルクボーラーで切抜き、 -20°C で保存して適宜分析に供した。

実験1 花卉アントシアニンの同定

花卉アントシアニンのうち、主要なものはマスペーパークロマトグラフィー (以下 MPC) 及び薄層クロマトグラフィー (以下 TLC) を用いて単離精製した。すなわち、シクラメンの凍結花卉に 5%ギ酸酸性メタノールを加え一昼夜冷浸して粗抽出液を得た。得られた粗抽出液を 35°C で減圧濃縮し、ろ紙 (Whatmann 3MM, $46 \times 57\text{cm}$) に線着し、まず水:酢酸:塩酸 = 82:15:3 (V/V/V, 以下 HAc-HCl) で展開した。目的とするアントシアニンのバンドを分取、濃縮したのち、次にイソブタノール:酢酸:水 = 8:2:3 (V/V/V, 以下 iBAW) で再度精製分取した。得られた抽出液を濃縮し、再度 iBAW を用いセルロース TLC で最終的に単離精製した。

(1) 酸加水分解

単離した各色素の抽出液 1 ml に 2 N 塩酸をそれぞれ 2 ml 加え、 90°C で 120 分間加熱し完全加水分解した。得られた水溶液を Sep-Pak C_{18} カートリッジに通し、

* 現在:日本たばこ産業株式会社

† 鹿毛真耕園

色素を吸着させたのち充分量の水で洗浄し、高極性の夾雑物を除去した。次いで、5%ギ酸酸性メタノール2mlを加え、アントシアニジンを溶出させたのち窒素ガスで濃縮し、n-ブタノール：酢酸：水=4：1：5 (V/V/V, 上層)を用いたTLC法で展開し、既知のアントシアニン標品とのコクロマトグラフィーを行って同定した。なお、標品として用いたデルフィニジン(以下Dp)、ペチュニジン(以下Pt)、マルビジン(以下Mv)、シアニジン(以下Cy)及びペオニジン(以下Pn)はそれぞれ次の植物から調整した。

Dp, ツユクサ花卉；Pt, ペチュニア紫青色花卉；Mv, ハナショウブ花卉；Cy, ヤブツバキ花卉；Pn, シャクヤク花卉。

また、Sep-Pak C₁₈処理で溶出した水層を減圧濃縮したのち、結合糖の種類を確認するために、酢酸エチル：ピリジン：酢酸：水=5：5：1：2 (V/V/V/V)を用い、標品のグルコース、ガラクトース、アラビノース、キシロース、ラムノースとともにセルロースTLC法で展開した。展開後スポットの確認のために発色剤としてアニリン-リン酸溶液(Bryson and Mitchell, 1951)を用いた。

(2) 部分加水分解

単離した各色素の抽出液1mlに2N塩酸2mlを加え、90°Cで5, 10, 15, 30, 60及び90分間それぞれ加水分解を行った。分解後(1)と同様の方法で夾雑物を除去し、HAc-HClを用いたセルロースTLC法で展開し、結合糖の数及びその結合位置を確認した。

実験2 花色素と花色発現

(1) 花卉アントシアニンの構成

シクラメンの凍結花卉に5%ギ酸酸性メタノールを加え一昼夜冷浸し、アントシアニンを抽出した。得られた抽出液をメンブランフィルターでろ過し、高速液体クロマトグラフィー(以下HPLC)の試料とした。HPLCのポンプはLC-6A(島津製作所製)、検出器はSPD-6AV(島津製作所製)を用い、検出波長は535nmとした。カラムはShim-pack CLC-ODS(6mm I. D. ×150mm, 島津製作所製)を用い、A液に10%ギ酸水溶液、B液に10%ギ酸酸性メタノールを用い、B液濃度を10%から18分後に21%へ、さらに28分後に40%へと変化させる濃度勾配溶出法を適用した。なお、流速は0.5ml/minとした。

(2) コピグメント効果

凍結保存したシクラメンの花卉ディスク(直径8mm)10枚に5%ギ酸酸性メタノール1mlを加え一昼夜冷浸し粗抽出液を得た。得られた粗抽出液を35°C減圧下で

乾固したのち、再度5%ギ酸酸性メタノール5mlで定溶し、自記分光光度計(MPS-5000, 島津製作所製)を用い、535nmでアントシアニン色素の吸光度を、また360nmでフラボノール色素の吸光度をそれぞれ求め、アントシアニン色素の吸光度に対するフラボノール色素の吸光度を算出し、これをコピグメント指数とした。

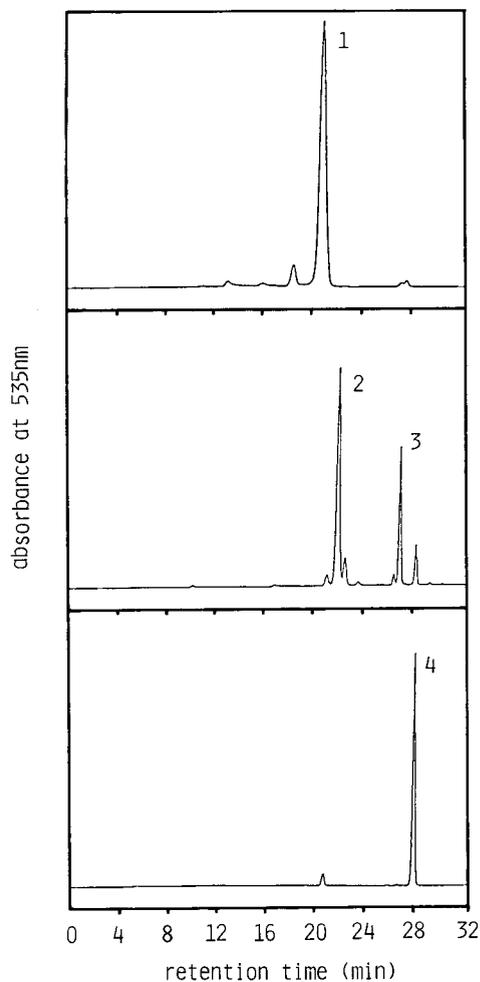


Fig. 1. HPLC profiles of three typical anthocyanin constitutions in petals of cyclamen.

HPLC condition: column, Shim-pak CLC-ODS (6mm I. D. × 150mm); flow rate, 0.5ml/min; solvent A, 10% formic acid; solvent B, 10% formic acid in methanol; solvent B 10% (0min) → 21% (18min) → 40% (28min).

Table 1. Products of complete hydrolysis in four major anthocyanins isolated from cyclamen petals.

| peak No. | | Rf value ($\times 100$) in | | color |
|----------|-------------|------------------------------|--------------------|--|
| | | BAW ¹⁾ | EPAW ²⁾ | |
| 1 | aglycone | 35.7 | | red |
| | sugar | | 32.3 | brown ³⁾ |
| 2 | aglycone | 66.1 | | purple |
| | sugar | | 32.1, 60.0 | brown ³⁾ , dark-green ³⁾ |
| 3 | aglycone | 66.3 | | purple |
| | sugar | | 32.4 | brown ³⁾ |
| 4 | aglycone | 35.8 | | purple |
| | sugar | | 32.5 | brown ³⁾ |
| ----- | | | | |
| | cyanidin | 53.7 | | red |
| | peonidin | 66.3 | | red |
| | delphinidin | 23.2 | | purple |
| | petunidin | 31.6 | | purple |
| | malvidin | 35.8 | | purple |
| ----- | | | | |
| | glucose | | 32.4 | brown ³⁾ |
| | arabinose | | 40.0 | brown ³⁾ |
| | galactose | | 26.4 | dark-brown ³⁾ |
| | xylose | | 48.0 | dark-brown ³⁾ |
| | rhamnose | | 60.1 | dark-green ³⁾ |

¹⁾ n-butanol-acetic acid-water (4:1:5, V/V/V, upper phase) ;

²⁾ ethyl acetate-pyridine-acetic acid-water (5:5:1:2, V/V/V/V) ;

³⁾ reaction with aniline-phosphoric acid (Bryson and Mitchell, 1951).

結果及び考察

実験 1 花卉アントシアニンの同定

Fig. 1 に HPLC による分析で得られたシクラメン花卉のアントシアニン構成について、典型的な三つのタイプのクロマトグラムを示した。供試したシクラメンの全ての個体が図中にみられるピーク 1, 2, 4 のいずれかを主色素として含有し、またピーク 3 も数個体において 20% 以上の含有率を示したので、これら四つの色素を MPC 及び TLC で単離精製し同定した。

(1) 酸加水分解

Table 1 にピーク 1, 2, 3 及び 4 の各色素の酸加水分解産物と既知標品とのクロマトグラフィーの結果を示した。ピーク 1 と 4 のアグリコンの Rf 値 ($\times 100$) は、それぞれ 35.7 と 35.8 で、標品の Mv (同 35.8) とほぼ一致した。また、ピーク 2 と 3 のアグリコンの Rf 値 ($\times 100$) は、それぞれ 66.1 と 66.3 で標品の Pn (同 66.3) とほぼ一致した。

同じく Table 1 にピーク 1, 2, 3 及び 4 の結合糖を同定した結果を示した。ピーク 1, 3 及び 4 の結合糖の Rf 値 ($\times 100$) は、それぞれ 32.3, 32.4, 32.5 で、標品のグルコース (同 32.4) とほぼ一致した。また、ピーク 2 からは二つの結合糖が確認され、Rf 値 (\times

100) は 32.1, 60.0 で、それぞれ標品のグルコース (同 32.4)、ラムノース (同 60.1) とほぼ一致した。

(2) 部分加水分解

Fig. 2 にピーク 1, 2, 3 及び 4 の色素について部分加水分解の結果を示した。ピーク 3 及び 4 の色素では部分加水分解による中間生成物が認められなかったのでモノグリコシドと思われた。また、ピーク 1 では中間生成物が 2 個、ピーク 2 では 1 個確認されたことから、前者は異なった位置に糖が結合したダイグリコシドであることが、また後者は同一箇所には糖が結合したダイグリコシドであることが示唆された。なお、図には示さなかったが、ピーク 2 の部分加水分解で得られた中間生成物は、シヤクヤクの花弁より単離した Pn-モノグリコシドと数種の展開溶媒で Rf 値が一致した。

以上の結果から、ピーク 1, 2, 3 及び 4 は、それぞれ Mv-ダイグリコシド (以下 Mv-dG)、Pn-ルチノシド (以下 Pn-GR)、Pn-モノグリコシド (以下 Pn-mG) 及び Mv-モノグリコシド (以下 Mv-mG) と同定された。

シクラメン花卉の含有アントシアニンについて、Van Bragt (1962) は Pn-mG, Pn-dG, Mv-mG 及び Mv-dG の存在を報告している。本研究の結果も、Pn-mG, Mv-mG 及び Mv-dG の 3 色素についてはこの報

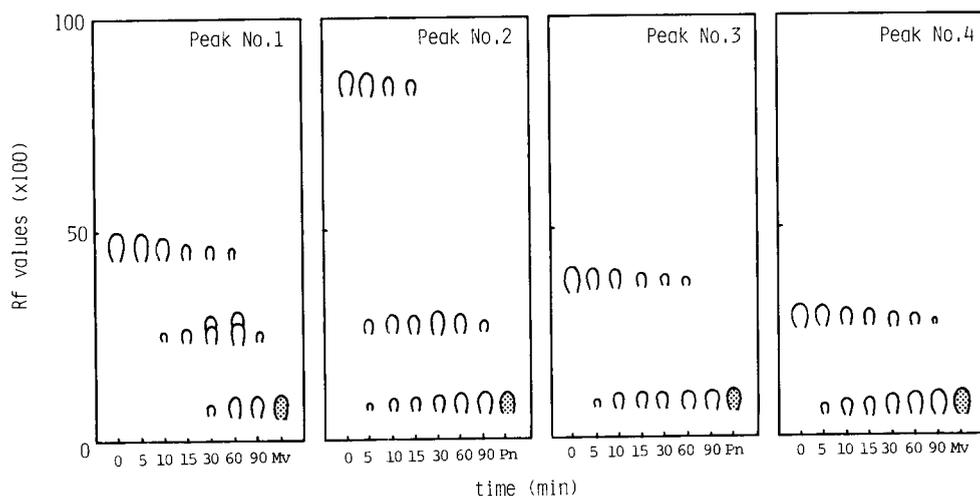


Fig. 2. Thin layer chromatograms of controlled hydrolysis in four major anthocyanins isolated from cyclamen petals.
solvent; water-acetic acid-hydrochloric acid (82:15:3, V/V/V).

告と一致したが、Pn-dGは主要アントシアニンとしては検出されず、新たにPn-GRが主要色素として検出された。シクラメンにおいてPn-GRが見いだされたのは本研究が初めてである。

実験2 花色と花色発現

(1) 花卉アントシアニンの構成

前述のように、供試したシクラメン40個体はPn-GR, Mv-mGまたはMv-dGのいずれかを花卉に主要アントシアニンとして含有していた。そこで、これら三つのタイプをそれぞれPn-GR型, Mv-mG型及びMv-dG型とし、花色と花色発現との関係について検討した。

まず、花卉のR. H. S. C. C. 番号とハンターの色度分布より算出した bL/aL 値との関係を色素型別にFig. 3に示した。Pn-GR型はR. H. S. C. C. 番号45の赤色から67の赤紫色までの幅を示し、 bL/aL 値が-0.07から0.26の範囲を、またMv-mG型はR. H. S. C. C. 番号60の桃色から74の赤紫色の幅を示し、 bL/aL 値が-0.27から0.14の範囲を、さらにMv-dG型ではR. H. S. C. C. 番号72の赤紫色から78の紫色の花色幅を示し、 bL/aL 値が-0.54から-0.07の範囲に分布した。このことから、Pn主体の個体群よりもMv主体の個体群の方が、さらにMv主体の個体群の中ではモノグルコシド型よりダイグルコシド型の方が花色に青味が増していることが示唆された。

一般に、アントシアニンはB環の水酸基が多いものほど花色に青味を増すが、結合糖の数やその種類は花

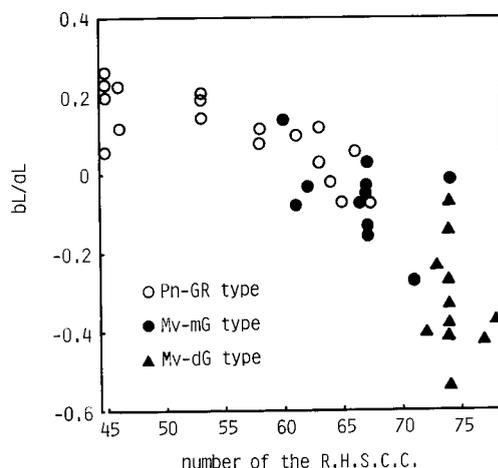


Fig. 3. Relationship between flower color and anthocyanin constitution in the flowers of cyclamen.

弁の色調にほとんど影響を及ぼさないといわれている (Harborne, 1965). 本研究においても、Cy系アントシアニンのPn型よりも、B環に結合した水酸基の数の多いDp系アントシアニンのMv型個体群の花色が青色味が強いという点では一致した。しかしながら、結合糖の数と花卉の色調との関係ではこの見解に相反し、結合糖の数が多いほど、つまりモノサイド型よりもダイサイド型が花色の青色味が増しており、アザレア (De Loose, 1970) やフリージア (有岡, 1974)

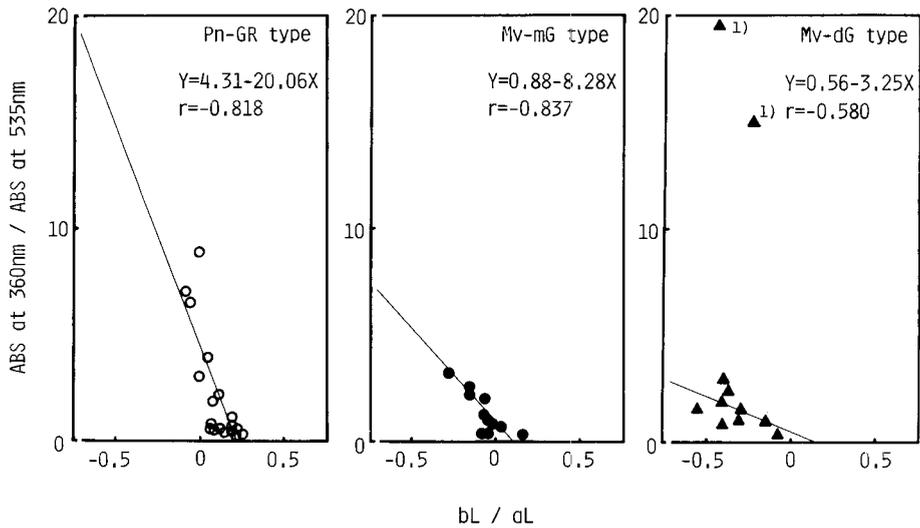


Fig. 4. Relationship between flower color and flavonol/anthocyanin ratio in the flowers of cyclamen.

1) Omitted while calculating correlation coefficient.

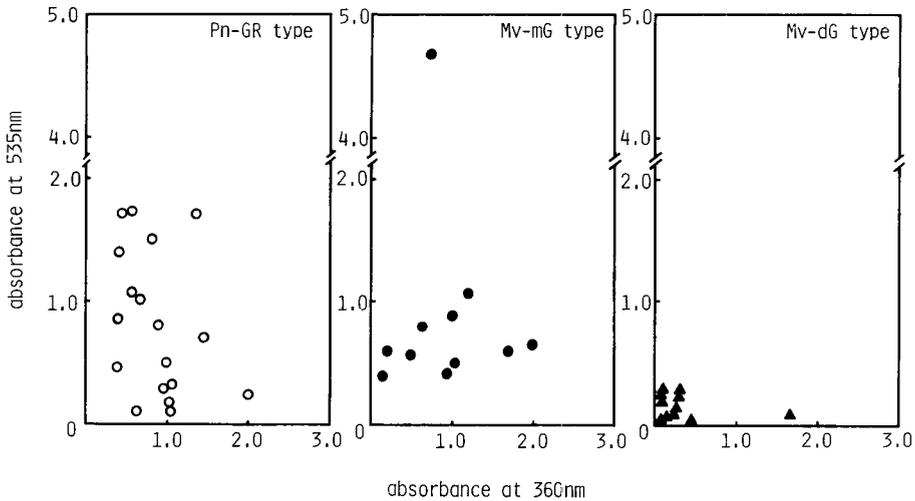


Fig. 5. The amounts of flavonol (absorbance at 360nm) and anthocyanin (absorbance at 535nm) in the flowers of cyclamen.

の結果と一致した。

(2) コピグメント効果

現在までにコピグメント効果によって花色に青色味が強まると報告された例は多く、フクシアの紫青色花 (Yazaki, 1976)、バラの赤紫色花 (Harborne, 1961)、ムクゲの青紫色花 (Kim *et al.*, 1989)、アザレアの赤紫色花 (Asen *et al.*, 1971) などがあげられるが、いずれの場合も花卉に含まれるフラボンやフラボノール配糖体がコピグメント (補色素) となっている。

そこで本研究のシクラメンについて、花卉に含まれるアントシアニン量に対するフラボノール量 (コピグメント指数) と花色との関係を花卉内の色素型別に検討した。

Fig. 4 に示したように、Pn-GR 型では両者間の相関係数は -0.818 、また Mv-mG 型でも -0.837 であり、花色に青色味が増すにつれ、換言すれば bL/aL 値が小さな個体ほど花卉内のアントシアニン量に対するフラボノール量の割合 (コピグメント指数) が高い傾向が

明瞭に認められた。しかし、Mv-dG型では花色とコピグメント指数との間にはっきりとした相関は認められなかった。

Asen *et al.* (1972) はアントシアニン量に対するコピグメント量が増加するほどコピグメント効果は発現しやすいものの、その効果はアントシアニン濃度の高い溶液中ほど顕著であると報告している。そこで次に、シクラメン花卉の色素型別にアントシアニン量とフラボノール量との関係を検討した (Fig. 5)。

Pn-GR型とMv-mG型では、いずれも花卉に含まれるアントシアニン量とフラボノール量に大差はないが、Mv-dG型では他の二つの型に比べ、アントシアニン量、フラボノール量のいずれも少なかった。特に、この色素型では、アントシアニン量が極端に少ない個体が多くみられ、そのためにコピグメント効果が発現しにくくなっているものと思われた。

以上の結果から、シクラメンの青色花品種を作出するには、まず花卉のアントシアニン組成がMv-dG主体である遺伝子型の選抜が前提となることが示唆された。本試験の供試材料のなかにも花卉内アントシアニンの99.7%がMv-dGで占められる個体があったが、これは今後の育種材料としてきわめて重要と思われた。しかしながら、この個体も花色はR. H. S. C. C. 番号74の赤紫色であり、視覚上はとても青色花とはいえ、アントシアニン組成をMv-dG主体にするのみでは青色を発現させることは困難である。したがって、シクラメンの青色花品種の作出には、これまでに得られているMv-dG型の個体に、コピグメント効果が発現できる充分量のフラボノール色素とアントシアニン色素とを蓄積させる方向への育種が必要と思われる。

要 約

シクラメンの青色花作出の基礎資料を得るために、花卉の主要アントシアニンを同定して花色と花色発現との関係について検討し、次の結果を得た。

1. シクラメンの花卉に含まれる主要なアントシアニンは4種で、ペオニジンールチノシド(Pn-GR)、ペオニジン-モノグルコシド(Pn-mG)、マルビジン-モノグルコシド(Mv-mG)及びマルビジン-ダイグルコシド(Mv-dG)と同定された。シクラメン花卉におけるPn-GRの存在については初めての確認である。

2. シクラメンの花色と花卉のアントシアニン構成とを比較検討し、花卉アントシアニンがペオニジン主体の個体群では赤色から赤紫色までの花色を呈し、マルビジン主体の個体群では桃色から紫色までの花色を

呈することを証明し、ペオニジンよりもマルビジンが花色の青色化に貢献することを明らかにした。

3. 花卉のアントシアニン構成がマルビジン主体の個体群でも、Mv-mG型よりMv-dG型の花色の青色味が強いことから、結合糖の数が多いほど花色に青色味が増す傾向にあることを明らかにした。

4. Pn-GR型及びMv-mG型では、花卉のアントシアニン量に対するフラボノール量が多い個体ほど花色に青味が増しており、コピグメント効果が認められた。

5. Mv-dG主体型では明瞭なコピグメント効果が認められなかったが、これは特に花卉内アントシアニン量の少なさに起因すると思われた。

以上の結果に基づき、シクラメンにおける青色花作出のための育種方向について言及した。

文 献

- 有隅健一 1974 *Freesia* の花色に関する研究 第1報 アントシアニンの同定と園芸種における分布について。鹿児島大学農学部学術報告, 24: 1-9.
- Asen, S., R. N. Stewart and K. H. Norris 1971 Co-pigmentation effect of quercetin glycosides on absorption characteristics of cyanidin glycosides and color of Red Wing azalea. *Phytochemistry*, 10: 171-175.
- Asen, S., R. N. Stewart and K. H. Norris 1972 Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, 11: 1139-1144.
- Bryson, J. L. and T. J. Mitchell 1951 Improved spraying reagents for the detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, 20: 864.
- De Loose, R. 1970 Flower pigment composition of natural bud-variants among hybrid Chinese azaleas, *Rhododendron simsii* (Planch.). *J. hort. Sci.*, 45: 265-274.
- Harborne, J. B. 1961 The anthocyanins of roses. Occurrence of peonin. *Experientia*, 17: 72.
- Harborne, J. B. 1965 *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Academic Press, London. (England)
- Kim, J. H., H. Okubo, K. Fujieda and S. Uemoto 1989 Changes of petal colors during senescence in *Hibiscus syriacus*. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 33 (3・4): 259-265.
- 宮島郁夫・前原俊哉・鹿毛哲郎・藤枝國光 1990 黄花シクラメンの黄色フラボノイド色素について。園学雑, 59 (別2), (印刷中)
- Van Bragt, J. 1962 Chemogenetical investigations of flower colours in *cyclamen*. *Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen*, 62 (4): 1-43.
- Yazaki, Y. 1976 Co-pigmentation and the color

change with age in petals of *Fuchsia hybrida*.

Bol. Mag. Tokyo, 89: 45-57.

Summary

The present investigation was conducted to identify the major anthocyanins of petals in cyclamen and to make clear the relationship between floral pigment and flower color expression to obtain the breeding aspects for blue flower cyclamen.

1. Four major anthocyanins derived from two anthocyanidins were identified. They were peonidin-rutinoside, peonidin-monoglucoside, malvidin-monoglucoside and malvidin-diglucoside, respectively. This is the first case in which rutinoside of peonidin was found to occur in cyclamen petals.

2. Petals which contained peonidin glycoside mainly expressed red to reddish-purple flower color, while those contained malvidin glycoside mainly showed pink to purple. It was shown that the latter gave much bluer tone for cyanic cyclamen petals, than former.

3. Malvidin-diglucoside gave bluer tone than malvidin mono-glucoside within malvidin-glycoside.

4. The co-pigmentation effect was clearly observed in peonidin-rutinoside group and malvidin-monoglucoside group, although it was not so clear in malvidin-diglucoside group.

5. Co-pigmentation effect was unclear due to low amounts of anthocyanin in malvidin-diglucoside group.

The aspects for breeding to obtain blue flower cyclamen were discussed.