九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

ヤマツツジ(Rhododendron kaempferi Planch.)における花弁内アントシアニン構成の地域変異

宮島, 郁夫
九州大学農学部園芸学講座

高橋, 龍
九州大学農学部園芸学講座

嬉野, 健次
九州大学農学部園芸学講座

松田, 鹿徳
九州大学農学部園芸学講座

https://doi.org/10.15017/23638

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 54 (3/4), pp.103-108, 2000-02. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

九大農学芸誌（Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.）
第54巻　第3・4号　103-108　(2000)

ヤマツツジ（*Rhododendron kaempferi* Planch.）における花弁内アントシアニン構成の地域変異

宮島郁夫・高橋　龍
嬉野健次・松田鹿徳
九州大学農学部園芸学講座

（1999年10月8日受付，1999年11月5日受理）

Regional Variations of Anthocyanin Constitutions in the Petals of *Rhododendron kaempferi* Planch.

Ikuo MIYAJIMA, Ryu TAKAHASHI, Kenji URESHINO and Shikanori MATSUDA
Laboratory of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 46-01, 812-8581 Japan

緒　言

日本に自生する常緑性ツツジのなかで，ヤマツツジ（*Rhododendron kaempferi* Planch.）は分布域が最も広く，九州から北海道中部まで自生している（斎藤，1969）．ヤマツツジの葉は光沢がなく，芽鱗は小型，春葉は夏葉よりも大きく，葉，葉柄，枝，がく等に毛がある．花冠は盃状形で花径は3～5cm，花色は朱赤色～赤色を基本とする（斎藤，1969）．これらのなかで，本州北部から北海道中南部に自生するものはエゾヤマツツジ（*R. kaempferi* f. *latesepalum*）とよばれるが，花色は赤色で，基本種と形態的な違いはほとんどみられない（斎藤，1969）．さらに，九州南部には野生の状態で朱紅色，桃色，さらに紅紫色など多彩な花色の変化を示すサタツツジ（*R. sataense*）が自生しているが，本種は花形や枝の上伸性などがヤマツツジによく似ているため，その地方変異として取り扱われている（山崎，1976）．特に，鹿児島県大隅半島の高峠やそれに連なる高隈山地および桜島にはサタツツジが濃密に分布しているため（阿部，1976），この周辺地域に自生する朱赤色～赤色の花色をもつツツジがヤマツツジか，またはサタツツジかの区別はきわめて困難である．

このように形態による分類が困難な場合，植物体の内生成分による分類が試みられる場合がある．例えば，Harborne and Williams (1971) および Harborne (1986) は葉に含まれるフラボノイド色素を指標にしてシャクナゲの分類を試みている．われわれもこれまでに花器の形態と花弁内のフラボノイド系色素，特に，フラボノール色素構成を指標に，九州に自生するツツジ類の変異の多様性の実態解明と野生ツツジ類の花色変異の要因の解明を試みてきた（宮島ら，1995；Miyajima *et al.*, 1997；Miyajima *et al.*, 1999）．しかしながら，ヤマツツジの花弁にはフラボノール色素がほとんど含まれていないため，この色素を指標にヤマツツジの地域変異の実態を解明することはできない（宮島ら，1995）．

そこで，本研究ではヤマツツジの花弁に含まれるアントシアニンに着目し，その構成を指標にヤマツツジの地域変異の様相を明らかにすることを目的とした．

材料および方法

九州大学農学部松原圃場の無加温ビニルハウスで栽培した挿し木3年生のヤマツツジを材料とした．東北地方のヤマツツジとして岩手県盛岡市周辺および同岩手郡雫石町周辺の集団，また，九州北部地方のヤマツツジとして佐賀県黒髪山の集団，および九州南部地方のヤマツツジとしては鹿児島県大隅半島大箆柄岳の集

団を用いた．

1．花色と花弁内アントシアニン構成

各地域のヤマツツジの開花当日の花弁を採取し，ブロッチのない下花弁の色調を色差計（NR-3000，日本電色工業製）で測定した．つぎに，これらの下花弁（2～3花）に50%酢酸を約2ml加え，一晩冷浸してアントシアニンの粗抽出液を得た．得られた粗抽出液にその5倍量の水を加え，メンブランフィルターでろ過後，セップパックカートリッジ（C_{18}，ウオーターズ社製）に通し，アントシアニンを吸着させた．吸着後，充分量の水で洗浄したのち，少量の50%酢酸を加えてアントシアニンを溶出し高速液体クロマトグラフ（HPLC）用の試料とした．HPLCのポンプはLC-6A（島津製作所製），カラムはCosmosil $5C_{18}$（内径4.6mm×長さ250mm，ナカライテスク製）を用い，流速は1.0ml・min^{-1}とした．溶媒はA液を4%リン酸水溶液，B液をアセトニトリルとし，B液濃度を20分で10%から20%へと変化させる濃度勾配法を用い，その後，B液濃度20%を20分間維持した．なお，検出波長は520nmとした．

2．花弁内アントシアニンの定性

供試したほとんどのヤマツツジ個体の花弁に共通して見いだされたアントシアニンと一部の地域の個体にのみ見いだされたアントシアニンの定性を試みた．

(1) アントシアニンの単離

ヤマツツジの新鮮花弁のブロッチのない下花弁のみを集め，EAW（エタノール：酢酸：水＝10：1：9．v/v/v）を加え，充分磨砕したのちろ過し，40℃減圧条件下でエバポレーターにより濃縮した．濃縮後，色素液をろ紙（40×40cm，TOYO No.51-B）に線着した．これをiBAW（イソブタノール：酢酸：水＝8：2：3，v/v/v）で展開し，風乾後，目的とするアントシアニンのバンドを切り取り，MAW（メタノール：酢酸：水＝90：5：5，v/v/v）で溶出した．この溶出液を再度，濃縮し以下の実験に供した．

(2) 酸加水分解

単離・濃縮したアントシアニン溶液に2N塩酸を2ml加えたのち，100℃で60分間加水分解した．得られた加水分解液に約2倍量の水を加えメンブランフィルターでろ過後，セップパックC_{18}カートリッジに通し，加水分解により得られたアントシアニジンを吸着させた．その後，カートリッジを充分量の水で洗浄したのち，少量のEAWで溶出してHPLC用の試料とし，既知の標品を用いて，そのアントシアニジンを同定した．

標品として用いたデルフィニジン（Delphinidin；Dp），シアニジン（Cyanidin；Cy），ペチュニジン（Petunidin；Pt），ペラルゴニジン（Pelargonidin；Pg），ペオニジン（Peonidin；Pn）およびマルビジン（Malvidin；Mv）は，それぞれツユクサ花弁，キンギョソウ花弁，ペチュニア紫青色花花弁，イチゴ果実，シャクヤク花弁およびシコンノボタン花弁から調整した．

また，結合糖の種類を確認するために，セップパック処理で溶出した水層を陰イオン交換カラム（アンバーライトIRA400，オルガノ製；カラム直径19mm×長さ160mm）に通したのち，濃縮・乾固した．これに少量のエタノールを加え，セルロース薄層プレート（20cm×20cm，アビセルSF，フナコシ製）に点着して標品のガラクトース（Galactose；Ga），グルコース（Glucose；G），アラビノース（Arabinose；Ar），ラムノース（Rhamnose；Rm）とともにEPAW（エタノール：ピリジン：酢酸：水＝5：5：1：2，v/v/v/v）で展開した．展開後，アニリン－リン酸溶液（Bryson and Mitchell, 1951）を用いて糖のスポットを検出し，その色調とRf値を測定した．

結果および考察

1．花色と花弁内アントシアニン構成

ヤマツツジの花色をa*およびb*値で評価すると，東北地方産のヤマツツジではa*，b*のいずれの値も九州産の2集団より低い個体が多かった．逆に，九州南部産の集団ではこれらの値が高い個体が最も多かっ

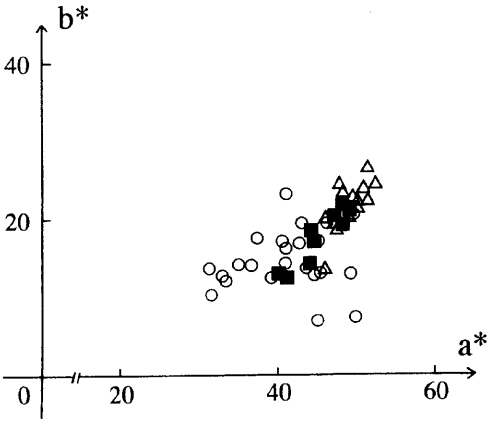

Fig. 1. Flower color variation in *R. kaempferi*.
○：Tohoku, ■：Northern Kyushu, △：Southern Kyushu

た（Fig. 1）．a*およびb*の数値は大きくなるほど，色は鮮やかになり，数値が0に近づくほどくすんだ色となる（寺主，1991）．今回の調査の結果，供試した各地のヤマツツジの花色に大きな違いは認められなかったが，東北地方のヤマツツジの花色は比較的くすんだ赤色であるのに対し，九州南部には鮮やかな赤色の花をもつ個体が多い傾向が認められた．

HPLCにより各地のヤマツツジ花弁の50%酢酸抽出液を分析したところ，そのアントシアニン構成はさまざまだった（Fig. 2）．これらの色素のうち，主要なものは8つであり，それぞれをA1，A2……A8とした．これら8つのアントシアニンを5%以上含む個体の出現頻度を調査したところ，A2とA4は地域に関係なくヤマツツジに広く認められるアントシアニンだった（Table 1）．これに対して，A5，A6，A7は九州南部の大箆柄岳の個体にのみ見いだされ，逆に，A8は東北地方の個体にのみ見いだされた（Table 1）．

このように，地域間でヤマツツジの花色には大きな

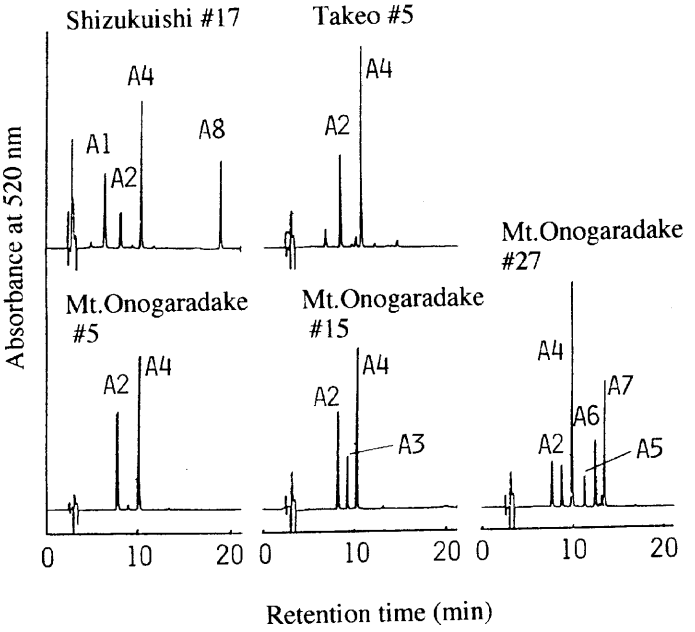

Fig. 2. HPLC tracing of anthocyanins in the petals of *R. kaempferi*. Peaks（A1～A8）were explained in the text.

Table 1. Percentage of appearance of 8 anthocyanins from the petals of *R. kaempferi*.

Sampling site	Anthocyanin[z]							
	A1	A2	A3	A4	A5	F6	A7	A8
Morioka (7)[y]	86	100	0	100	0	0	0	86
Shizukuishi (7)	86	100	0	100	0	0	0	86
Mt. Aburayama (9)	22	100	0	100	0	0	0	0
Mt. Kurokamiyama (28)	28	100	4	100	0	0	0	0
Takeo (9)	78	100	0	100	0	0	0	0
Mt. Onogaradake (42)	0	100	48	98	7	19	19	0

[z] Each anthocyanin corresponds to the peaks shown in Fig. 2.
[y] Number of plants examined.

Table 2. Aglycones of two major anthocyanins isolated from the petals of *R. kaempferi*.

Sample	Retention time (min)
Aglycone	
A4	6.8
A8	6.8
Standard	
Delphinidin	4.6
Cyanidin	6.9
Petunidin	7.7
Pelargonodin	10.9
Peonidin	13.4
Malvidin	15.2

Table 3. Identification of combined sugars in two major anthocyanins isolated from the petals of *R. kaempferi*.

Sample	Rf values (×100) in EPAW[z]	Color
A4	52	Gray
A8	—[y]	—
Standard		
Glucose	42	Brown
Galactose	42	Brown
Arabinose	52	Brown
Rhamnose	55	Dark green

[z] EPAW ; ethyl acetate : pyridine : acetic acid : water=5 : 5 : 1 : 2.
[y] Not identified.

Table 4. Anthocyanin constitutions of the petals in *R. kaempferi* distributing in Tohoku district.

Sampling site	Accession	Anthocyanin[z]							
		A1	A2	A3	A4	A5	F6	A7	A8
Morioka	1	−	+	−	++	−	−	−	+++
	2	++	++	−	+++	−	−	−	++
	3	++	++	−	+++	−	−	−	++
	4	+	++	−	+++	−	−	−	++
	5	+	++	−	+++	−	−	−	++
	6	+	+	−	+++	−	−	−	++
	7	+	++	−	+++	−	−	−	−
Shizukuishi	1	++	++	−	+++	−	−	−	++
	2	++	++	−	+++	−	−	−	++
	3	++	++	−	+++	−	−	−	++
	4	−	++	−	+++	−	−	−	++
	5	++	++	−	+++	−	−	−	+
	6	+	++	−	+++	−	−	−	+
	7	+++	++	−	+++	−	−	−	−

−, < 5 %; +, 5 ~10%; ++, 11~30%; +++, >30%
[z] Each anthocyanin corresponds to the peaks shown in Fig. 2.

違いは認められないものの，花弁に含まれるアントシアニン構成はさまざまであり，特に九州南部において変異に富んでいた．

2．花弁内アントシアニンの定性

自生地に関係なく，供試したほとんどのヤマツツジに共通して認められたA4，および東北地方のヤマツツジの花弁からのみ検出されたA8の2色素について定性を試みた．

まず，これらのアントシアニンを加水分解したところ，得られた分解物はいずれもCyだった（Table 2）．次に結合糖を調査したところ，A4の結合糖はアラビノースと同定したが，A8の結合糖は同定できなかった（Table 3）．

これまで，ヤマツツジの花弁内アントシアニンとしては，Cy-3G，Cy-3Ga およびCy-3Arが知られていることから（De Loose, 1970），A4はCy-3Arと思われた．ただ，A8は加水分解の結果からCy配糖体であることは明らかだったが，塩酸メタノール中で

不安定な性質を示したため（データ省略），これまで報告されていないアントシアニンである可能性がある．

このA8は東北地方のヤマツツジにのみ見いだされ，しかも，調査したほとんどすべての個体がこのアントシアニンを含んでいたことから（Table 4），これは東北地方のヤマツツジを特定する色素である可能性が示唆された．

ツツジ類は他家受粉性の植物であり，花弁は花粉を媒介する昆虫を誘引する重要な器官である（山口，1980）．横川・堀田（1995）は霧島山系におけるツツジ類の訪花昆虫を調査し，桃紫色から紅紫色で小輪の花をつけるミヤマキリシマには，ハナバチやハナアブのような小型の昆虫が訪れるのに対し，ヤマツツジのような大型で赤色の花にはアゲハ類などの大型の蝶類が多く訪花することを観察している．昆虫類はその種類によって色の知覚能力に違いがあり，誘引される花色が異なるといわれている（高橋・深海，1977）．今回調査した3地域のヤマツツジの花色は，肉眼ではその色調に大きな違いは認められなかったが，東北地方のヤマツツジの花弁にはA8という特異的なアントシアニンが含まれていたことから，この色素が花弁に含まれていることが，その地域に生息する花粉媒介昆虫を誘引するためには効果的であり，その結果，分布域の拡大や種の維持に有利に働いている可能性も考えられる．

今回指標にした花弁内アントシアニン構成では，九州北部産のヤマツツジと同南部産のそれとを明確に区別することはできなかった．しかしながら，東北地方と九州北部に自生するヤマツツジに比べ，九州南部産のヤマツツジは花弁内アントシアニン構成において変異に富むことが明らかとなったことから，Sakata *et al.*（1991）が指摘したように，九州南部のヤマツツジには他の常緑性ツツジ類の影響が現れている可能性が示唆された．さらに，A8のように東北地方の個体にのみ見いだされるような地域特異的な色素が存在したことから，花弁に含まれるアントシアニンはヤマツツジの地域変異を探るうえで有効な指標となりうることが示唆された．

要　　約

東北地方，九州北部および同南部産のヤマツツジを材料に，花色と花弁内アントシアニン構成を調査した．

各地のヤマツツジの花色に大きな違いは認められなかったが，東北地方のヤマツツジの花色は比較的くすんだ赤色であるのに対し，九州南部には鮮やかな赤色の花をもつ個体が多かった．

花弁内アントシアニン構成では，九州北部産のヤマツツジと同南部産のそれとを明確に区別することはできなかったが，後者のヤマツツジは花弁内アントシアニン構成において変異に富んでいた．

東北地方のヤマツツジには九州産のそれにはみられない特異的なアントシアニンが見いだされた．

これらの結果から，花弁内アントシアニン構成はヤマツツジの地域変異を探るうえで有効な指標となるものと思われた．

文　　献

阿部定夫　1976　サタツツジとキリシマツツジ　東京山草会編：シャクナゲとツツジ．誠文堂新光社，東京，155-158頁

Bryson, J. L. and T. J. Mitchell 1951 Improved spraying reagents for the detection of sugars on paper chromatograms. Nature, **167**: 864

De Loose, R. 1970 Flavonoid glycosides in the petals of some *Rhododendron* species and hybrids. Phytochemistry, **9**: 875-879

Harborne, J. B. 1986 Flavonoid patterns and phytogeography: the genus *Rhododendron* section Vireya. Phytochemistry, **25**(7): 1641-1643

Harborne, J. B. and C. A. Williams 1971 Leaf survey of flavonoids and simple phenols in the genus *Rhododendron*. Phytochemistry, **10**: 2727-2744

宮島郁夫・上本俊平・坂田祐介・有隅健一　1995　雲仙山系のミヤマキリシマ（*Rhododendron kiusianum* Makino）とヤマツツジ（*R. kaempferi* Planch.）における花器の形態と花色素の変異．園芸学会雑誌，**64**(2)：393-399

Miyajima, I., S. Uemoto, Y. Sakata and K. Arisumi 1997 Morphology and flower pigments of wild evergreen azaleas (*Rhododendron sataense* Nakai) in southern Kyushu. J. Japan. Soc. Hort. Sci, **66**(2): 385-391

Miyajima, I., K. Miyahara and K. Ureshino 1999 Contribution of *Rhododendron eriocarpum* Nakai to the flower color variation in *R. sataense* Nakai. J. Fac. Agr. Kyushu Univ., **43**(3・4): 403-409

斎藤文治　1969　ヤマツツジとその仲間．東京山草会編：シャクナゲとツツジ．誠文堂新光社，東京，125-143頁

Sakata, Y., K. Arisumi and I. Miyajima 1991 Some morphological and pigmental characteristics in *Rhododendron kaempferi*

Planch., *R. kiusianum* Makino and *R. eriocarpum* Nakai in southern Kyushu. J. Japan. Soc. Hort. Sci., **60**(3) : 669-675
高橋英一・深海 浩訳 1977 ハルボーン：化学生態学. 文永堂, 東京, 37-53頁
寺主一成 1991 おもしろい色のはなし. 日刊工業新聞社. 東京
山口 聡 1980 ミヤマキリシマの受粉生態実験. 植物研究雑誌, **55**(12) : 25-26
山崎 敬 1976 ツツジ属の分類. ガーデンライフ編：ツツジその種類と栽培. 誠文堂新光社, 東京, 50-57頁
横川水城・堀田 満 1995 西南日本の植物雑記Ⅱ. 霧島山系におけるミヤマキリシマ, キリシマツツジ, ヤマツツジ諸集団の形質変異. 植物分類, 地理, **46**(2) : 165-183

Summary

Although there were few differences of flower colors among these groups, large number of individuals of *Rhododendron kaempferi* in southern Kyushu showed vivid red color whereas the almost all individuals in Tohoku district showed relatively somber red.

It was unable to distinguish the individuals of northern Kyushu from those of southern Kyushu by anthocyanin constitutions of the petals. However, the latter individuals showed wider variations in the anthocyanin constitutions than the former.

The unique anthocyanin was detected in the individuals in Tohoku district.

From these findings, the anthocyanin constitutions of the petals were seemed to be the useful indices of regional variation of *R. kaempferi* distributing in Japan.