

ペチュニアの原種と一代雑種における 花弁色素の HPLC 分析

関野加奈子*, 関口 文彦

日本女子大学理学部理学研究科 育種遺伝学研究室

*現在, 財団法人 日本化学繊維検査協会 技術開発部研究室

(2005年12月20日受理)

要 旨 本研究では新花色品種の作出を研究目的とし, 雑種後代における花弁色の早期検定に結びつく水溶性色素の HPLC 分析を行った。実験材料はペチュニアの交配親の1つである原種のインテグリフォリア (*Petunia integrifolia*) とペチュニア園芸品種 (*P. × hybrida*) の高性一重咲一代雑種 (F1 雑種) から選んだ赤紫色花, ピンク花および青紫色花である。実験材料の花弁は開花最盛期に色別に採取し, 38°C で一昼夜乾燥させた。次に, 乾燥花弁はメタノール: 酢酸: DW=1:2:7 の混合液による浸漬抽出処理を一昼夜行った。その抽出液をミリポアフィルター (ポアサイズφ0.8 μm) で濾過した後, HPLC で分析し, そのプロファイルを種間または F1 雑種間で比較検討した。

原種のインテグリフォリアでは比較的高いピークが5つ出現した。F1 雑種では7~10のピークが観察された。これらのピークはアントシアニン系の色素であることを予感させた。ペチュニアの品種改良がインテグリフォリアの色素合成に関与する遺伝子の多様化と, 色素構成が複雑化していることを推測させた。雑種後代に含まれる花弁色素の早期検定のための葉からの抽出液による HPLC 分析は検討課題を多く残す結果となった。

キーワード: アントシアニン, F1 雑種, HPLC 分析, 花弁色

はじめに

フラボノイドは, 黄色から青色までの多彩な花色を発現している色素である。この色素は, 化学構造から, 黄色を発現するカルコン, オーロン, フラボノールと, オレンジ, 赤色, 紫色, 青色などの幅広い色相を示すアントシアニンなどのグループに分類される。他の植物色素としては, 黄色から橙色までの花色を示すカロチノイド, 緑色のクロロフィル, 黄色や赤紫色を現わすベタレインなどが知られている (齊藤, 2002)。色素の生合成経路はどの植物においても, アントシアニン 3-グルコシドまでは基本的には変わらないことの文献が多い (星野ら, 2004; 中島ら, 2002; 田中・勝元, 2002)。

アントシアニン色素の生合成に関する遺伝子とその発現調節の研究は多くの変異体をもつトウモロコシで, まず進展した。次に, キンギョソウ, ペチュニア, アサガオなどで良く研究され, 最近では実験モデル植物のシロ

イヌナズナでも研究が展開されている (Que, Q. *et al.*, 1998)。花弁に含まれる色素の特徴は野生型が赤色の花を咲かせるキンギョソウではシアニン系色素, 紫色花のペチュニアではデルフィニジン系色素, 青色花のアサガオではシアニン系色素とされている。つまり, 植物の種類によりアントシアニンの構造も多様化し, アントシアニン色素の生合成遺伝子の発現制御機構が微妙に異なることを示唆している。また, 花のアントシアニンによる色調は基本骨格, 芳香族アシル基の付加による分子内コピグメント作用, 生合成経路により決定される要素だけでなく, 蓄積する液胞の pH, 表皮細胞の形態, 共存する金属イオンなどの影響を受けることが知られている (齊藤, 2004)。

本研究で供試するペチュニアは, ブラジル, アルゼンチンなどの南米を原産とする原種の交雑品種 (*Petunia × hybrida*) である。ナス科に属するこの属は原産地では半耐寒性の多年草となっているが, 日本では1年草として取り扱われている。ペチュニア園芸品種の誕生は, 1830年代にイギリスで行われた原種の *P. axillaris* と *P.*

Contribution No.: CB 05-4

integrifolia の交雑に始まる。最初の品種が誕生してから現在にいたるまで、数えきれないほどの品種が開発されている (<http://www.smartgarden.co.jp/special/052001/pechinia4.html>)。そのため、多彩な花色をもっているペチュニアは花弁色素の同定 (Fukai, Y. *et al.*, 1988; Griesbach, R. *et al.*, 1991; Slimestad, R. *et al.*, 1999; Tatsuzawa, F. *et al.*, 1999; Ando, T. *et al.*, 2000 and 2004) に加えて、新花色品種の作出をアントシアニン色素の生合成に関与する遺伝子の改変により新花色品種の作出 (Tsuda, S. *et al.*, 2004) が試みられている。

本研究では観賞価値の高い新花色品種の作出に結びつく花弁色素の基礎的データ収集を目的とし、花弁に含まれる色素の HPLC 分析を試みた。分析実験にはペチュニア園芸品種をもたらした原種の 1 つであるインテグリフォーリア (*P. integrifolia*) とペチュニア園芸品種の「高性一重咲一代雑種 (F1 雑種)」を供試した。分析結果から、種間や異なる花色 F1 雑種個体間における含有色素の差異を検討した。それに、花弁に含まれる異なった色素の早期検出のため、幼苗期の葉における水溶性成分の HPLC 分析を行った。

材料および方法

1. 実験材料とその育成法

実験に用いたペチュニアの原種インテグリフォーリアは株サカタのタネ (神奈川県横浜市) から購入したポット苗である。一方のペチュニア園芸品種の「高性一重咲一代雑種 (F1 雑種)」は、タキイ種苗 (京都府京都市) から購入した種子の育成個体である。分析実験には代表的な赤紫色、ピンクおよび青紫色の 3 花色が育成個体の中から選ばれた。実験材料は両種ともに、本学のガラス温室の栽培環境下で育成された。

2. 花弁の色素分析のための試料調製

花弁の分析試料は、Ando, T. ら (1999) の方法を参考にして、以下の手順で調製された。

- 1) 病害虫の被害を受けない発色良好な開花期の花 10 個前後を選んで採取する。
- 2) 採取した花弁の色を新配色カード (日本色彩研究所) によって測色値を調べる。
- 3) 採取した花の花筒部分を取り除いた後、38°C のドライオーブンで一昼夜乾燥させる。
- 4) 乾燥花弁をメタノール (MeCH): 酢酸 (HOAc): 超純水 (H₂O) = 2 : 1 : 7 の混合液 25 ml または 30 ml に浸漬し、5°C の冷蔵庫内で一昼夜の抽出操作を行う。
- 5) 抽出液をミリポアフィルター (ポアサイズ直径 0.8 μm) で濾過した後、5°C の冷蔵庫内で分析まで保管する。

3. 葉の色素分析のための試料調製

葉の分析試料は花弁同様の水溶性試料調整法に加えて、末松ら (1992) の方法による次の有機溶媒法で調製された。

- 1) 実験植物から健全な葉を 5 枚ほど採取する。
- 2) 5 枚ほどの葉を細かく切り、乳鉢に入れる。
- 3) 数 ml 加えたアセトン溶液の中で、細切した葉を乳棒ですりつぶす。
- 4) すりつぶした葉を含むアセトン溶液を試験管に移す。
- 5) 移したアセトン溶液量の 2 倍量の石油エーテルを静かに注ぐ。
- 6) さらに、アセトン溶液量と同量の超純水を加える。
- 7) 石油エーテルと超純水を加えた試験管の口をラッピングシートで押さえ、2 ~ 3 回逆さにしながら軽く混ぜ合わせる。
- 8) 数分間、試験管を静置させる。
- 9) 上層と下層に分かれた層のうち、上層のクロロフィルを含む石油エーテル部を排出する。
- 10) 残した下層のカロチノイドを含むアセトンと超純水のみを、分析試料とする。

4. HPLC の分析条件

色素の分析機器には日立の HPLC D-7000 シリーズが用いられた。その分析条件は以下の通りであった。

- 1) ポンプ A 1.5% リン酸 (H₃PO₄)
- 2) ポンプ B 1.5% H₃PO₄, 20% HOAc, 25% MeCH
- 3) ポンプ流量と圧力 1.0 ml/min, 約 1,460 pi
- 4) グラジエント
 - ① 20% B による 5 分間 (非分析時間)
 - ② 20 ~ 85% B の直線性で 40 分間
 - ③ 20% による 15 分間
- 5) カラム Inertsil ODS-2 φ 5 μm, 4.6 I.D. × 150 mm
- 6) 検出波長 UV-VIS 530 nm
- 7) チャート速度 1.0 cm/min

5. 花弁と葉の抽出液における HPLP 分析結果の検討

異なった花色の個体における HPLP 分析結果は、分析時間内に出現した相対的に高いピーク数とそのピークが出現した保持時間などから検討された。

結果および考察

1. 新配色カードによる花弁色の測色値

異なった花色の花弁を新配色カード (日本色彩研究所) との対比によって調べたところ、表 1 に示すような測色値が得られた。その評価は異なった花色では異なった測色値であったが、赤紫色と目視した原種と F1 雑種の花は、全く同じ測色値であった。

表1. 新配色カード (日本色彩研究所) による測色値

実験材料	花卉色	新配色カードによる測色値*
原種	赤紫色	v 1, v 23, v 24
F1 雑種	赤紫色	v 1, v 23, v 24
	ピンク	lt22
	青紫色	v 22, dp 22

* dp: deep, lt: light, v: vivid

2. 異なった花卉色から抽出した水溶性色素の HPLC 分析

1) 原種と F1 雑種個体における HPLC プロファイルの特徴

原種と F1 雑種個体における HPLC プロファイルを図 1 に示し、そのプロファイルから求めた相対的に高いピークが出現した保持時間とその吸光度を表 2 に示す。

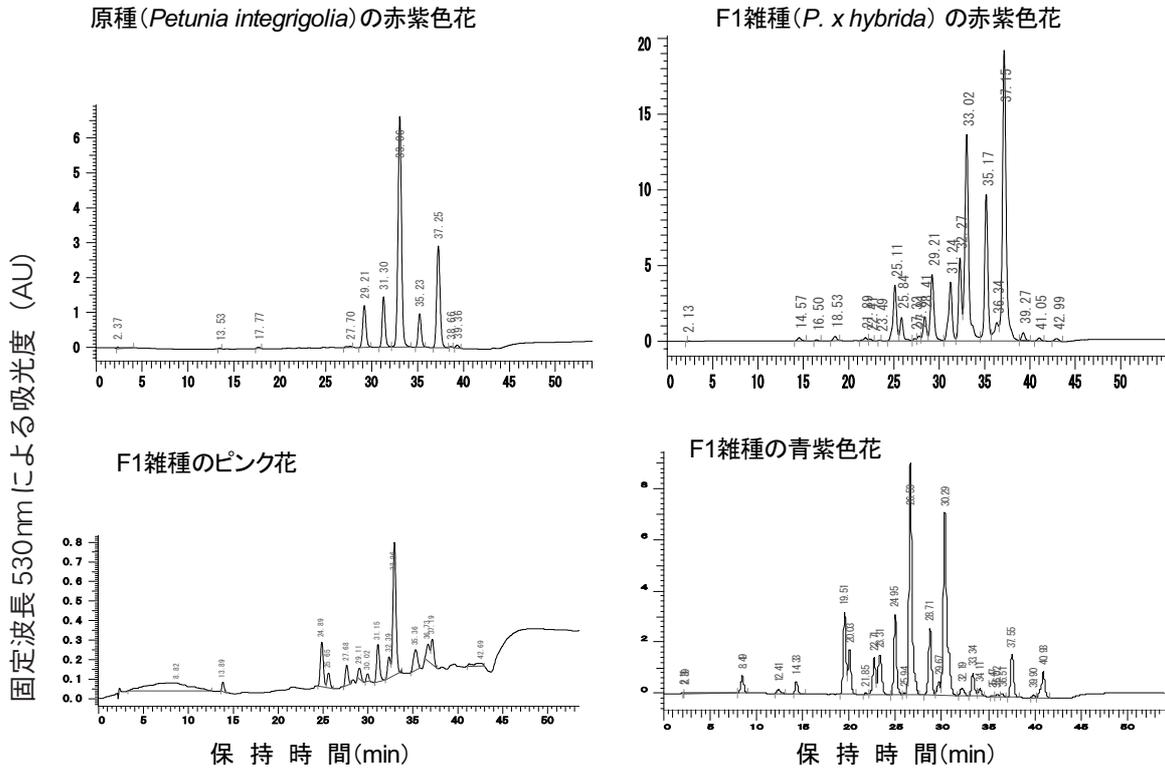


図 1. ペチュニアの原種と F1 雑種個体の花から抽出した水溶液の HPLC プロファイル

表 2. ペチュニアの原種と高性一重咲一代雑種における水溶性色素の HPLC 分析結果

実験材料 (花色)	高いピークが出現した保持時間 (min) とその吸光度 (AU)											
	20*	23*	25	27	29	31	32	33	35	36	37	38
原種 (赤紫色)					1.2	1.4		6.6	1.0		2.9	
F1 雑種 (赤紫色)			4.0		4.3	4.0	5.5	13.5	9.0		19.5	
(ピンク)			0.29			0.28	0.22	0.8	0.25	0.25	0.31	
(青紫色)	3.2/1.9	1.4/1.6	3.1	9.0	2.5	7.1		1.0				1.6

* 接近した 2 つのピークの出現

HPLC プロファイルは供試材料それぞれに、次のような特徴があった。

① インテグリフォリアの赤紫色花

吸光度 1 AU 以上のピークは 5 本確認できた。そのピークの保持時間は約 29 分, 31 分, 33 分, 35 分および 37 分であった。最も大きなピーク (6.6 AU) は、約 33 分付近に検出された。

② F1 雑種の赤紫色花

吸光度 1 AU 以上のピークは 10 本確認できた。検出されたピークの保持時間の範囲は、約 25~37 分の間であった。保持時間約 33 分, 35 分, 37 分に検出されたピークが特に大きく、中でも約 37 分に検出されたピーク (19.5 AU) が最も大きかった。吸光度 1.0 AU 以下の小さいピークも何本か検出された。

③ F1 雑種のピンク花

吸光度 1.0 AU 以上の大きなピークは得られなかった。検出されたピークの保持時間の範囲は、約 25~37 分付近が中心であった。最も大きなピークは 33 分の 0.8 AU だった。0.25 AU 以上の大きなピークは 7 本確認できた。他のプロファイルに比べて、吸光度の数値が低く、また、ベースラインも安定していなかった。

④ F1 雑種の青紫色花

吸光度 1.0 AU 以上の大きなピークは、保持時間約 20 分~37 分の間に 10 本をみる事ができた。保持時間の約 27 分付近と、約 31 分付近にはそれぞれ 9.0 AU と 7.1 AU の著しく大きなピークが検出された。2 本の大きなピーク以外は比較的小さいものが多かった。他の花色のプロファイルに比べて、2 つの近接したピークが約 20 分と 23 分に出現したことは注目される。

原種のインテグリフォリアと F1 雑種間の共通ピークは約 29 分, 31 分, 33 分, 35 分および 37 分のところに見ることができた。しかしながら、相対的に高いピーク数は F1 雑種に比べ、インテグリフォリアのほうが少なかった。つまり、重なっているピークでの振れ幅にも差があり、同色の花色（赤紫色）であっても、含有している色素の比率に違いがあった。これは 530 nm 付近に吸収極大を持つアントシアニンの種類数がインテグリフォリアでは少ないことを示唆し、ペチュニアの品種改良がインテグリフォリアの色素合成に関与する遺伝子の多様化と、色素構成が複雑化していることを推測させた。

2) F1 雑種間における異なった花色の比較

赤紫色花とピンク花では HPLC プロファイルのピーク数にはさほどの差がなかった。しかしながら、2 つの花色における比較的大きなピークが出現したときの吸光度を比較すると、保持時間 33 分付近では約 17 倍、それに保持時間 37 分付近では約 63 倍の差が見られた。この結果は花弁の色素濃度を反映していると思われた。

赤紫色花と青紫色花における比較的大きなピークの出現時間を比較すると、赤紫色花では約 33 分~37 分であったのに対して、青紫色花では約 27 分~31 分の少し早い時間帯となっていた。この 2 つの花の抽出液を等量混合して分析したところ、吸光度 0.5 AU 以上のピークは 10 本みられた（図 2）。そのピークは保持時間約 20 分~37 分の間に出現していた。中でも、最も大きなピークは約 27 分と 31 分にみられた。27 分のピークは青紫色花の固有成分であり、31 分のは両者の共通成分であると推定された。

以上の結果から、ペチュニアの F1 雑種における花色

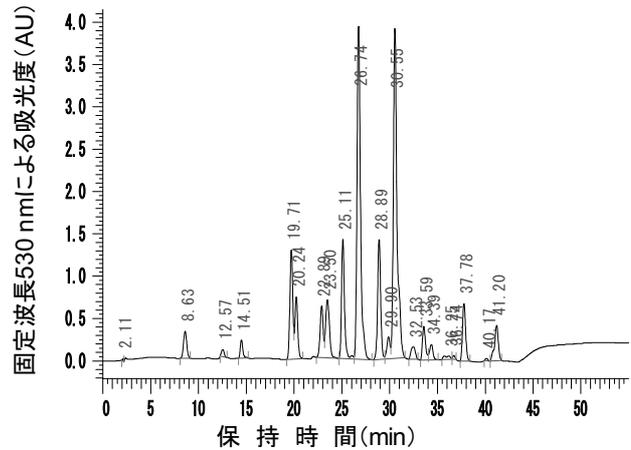


図 2. ペチュニア F1 雑種個体における赤紫色花と青紫色花の水溶性抽出液を等量混合したときの HPLC プロファイル

の違いは出現するピークの保持時間とピーク数と密接に関連していることが推論された。つまり、赤紫色花とピンク花の花弁色素は共通しているが、合成される色素量の差であり、青紫色花との違いは合成される色素の違いであると判断できた。紫色花とピンク花の場合には赤っぽく発現させるシアニン系の色素であり、一方の青紫色花では青っぽく発現させるデルフィニジン系の色素によるものと考えた。

3. 葉の水溶性と脂溶性抽出液における HPLC 分析

葉色を新配色カード（日本色彩研究所）によって調べたところ、v 11, dp 10, d 10 であった。葉からアセトン：石油エーテル：DW=1：2：1 の有機溶媒により抽出した脂溶性試料と、メタノール：酢酸：DW=2：1：7 の混合液で抽出した水溶性試料を分析した結果、いずれもシャープな HPLC プロファイルを得ることができなかった。目視で確認した水溶性試料は花弁のものと似ていた。今後は抽出法の問題なのか、分析カラムの問題なのかをさらに検討する必要がある。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、格別のご指導とご校閲を賜った本学理学部金子堯子教授、並びに庄野邦彦教授に衷心的感谢を申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Ando, T., Saito, N., Tatsuzawa, F., Kakefuda, T., Yamakage, K., Ohtani, E. and Koshi-ishi, M.: *Biochemical Systematics and Ecology* 27 623-650 (1999).
- 2) Ando, T., Takahashi, M., Nakajima, T., Toya, Y., Watanabe, H., Kokubun, H. and Tatsuzawa, F.: *Phytochemistry* 65 2219-2227 (2004).

- 3) Ando, T., Tatsuzawa, F., Saito, N., Takahashi, M., Tunashima, Y., Numajiri, H., Watanabe, H., Kokubun, H., Hara, R., Seki, H. and Hashimoto, G.: *Phytochemistry* **54** 495-501 (2000).
- 4) Bradley, J.M., Davies, K.M., Deroles, S.C., Bloor, S.J. and Lewis, D.H.: *Plant J.* **13** 381-392 (1998).
- 5) Fukai, Y., Kasumi, T., Yoshida, Kondo, T., Matsuda, C. and Nomoto, K.: *Phytochemistry* **45** 1409-1416 (1988).
- 6) Griesbach, R., Asen, R.J. and Leonnarat, B.A.: *Phytochemistry* **30** 1729-1731 (1991).
- 7) 星野 敦, 森田裕将, 飯田 滋: 蛋白質 核酸 酵素 **47** 210-216 (2002).
- 8) <http://www.smartgarden.co.jp/special/052001/pechinia4.html>
- 9) 中嶋淳一郎, 山崎真巳, 齊藤和季: 蛋白質 核酸 酵素 **47** 217-224 (2002).
- 10) Que, Q., Wang, H-Y. and Jorgensen, R.A.: *Plant J.* **13** 401-409 (1998).
- 11) 齊藤規夫: 蛋白質 核酸 酵素 **47** 202-209 (2002).
- 12) Slimestad, R., Aaberg, A., Oyvid, M. and Andersen, M.: *Phytochemistry* **50** 1081-1086 (1999).
- 13) 末松茂孝, 三田村邦彦, 徳田安伸: 図解やさしい農業実験. 農業図書株式会社, 東京 (1992).
- 14) 田中良和, 勝元幸久: 蛋白質 核酸 酵素 **47** 225-230 (2002).
- 15) Tatsuzawa, F., Ando, T., Saito, N., Yoda, K., Kokubun, H., Watanabe, H., Hashimoto, G., Asakura, K., Hara, R. and Seki, H.: *Phytochemistry* **52** 351-355 (1999).
- 16) Tsuda, S., Fukui, Y., Nakamura, N., Katsumoto, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Ohira, K., Ueyama, Y., Ohkawa, H., Holton, T.A., Kusumi, T. and Tananka, Y.: *Plant Biotechnology* **21** 377-386 (2004).

HPLC Analysis of Pigments Including in the Petal of Foundation Species and F1 Hybrid of *Petunia* × *hybrida*

Kanako Sekino* and Fumihiko Sekiguchi

Laboratory of Breeding Genetics, Research Course of Science, Japan Women's University

*Present: Technical Research Laboratory, Japan Synthetic Textile Inspection

Institute Foundation (Kawaguchi, Saitama Pref.)

(Received December 20, 2005)

Summary: The creation of a new color of the flower kind was assumed to be a research purpose in this research, and the water solubility coloring matter related to forecast at the early stage the petal color of hybrid posterity was analyzed with HPLC. The experimental material is flower of purplish red color from a foundation species (*Petunia integrifolia*) that is one of the hybridization parents of the *Petunia* × *hybrida*, and three flowers of red purplish one, pink one and purplish blue one chosen from the F1 hybrid cultivar (*P.* × *hybrida*). The petal of the experimental material was gathered according to the color at the flowering season, and dried all day and all night at 38°C. Then, a dry petal was done soaking extraction with a mixture of a methanol: acetic acid: distilled water = 1:2:7 all day and all night. It analyzed with HPLC after the extracted material was filtered with Milipoafiltar (poasize $\phi 0.8 \mu\text{m}$), and it made comparative study of the profile between two species or among the three petal colors in the F1 hybrid.

As a result of HPLC analysis on different petal colors, five comparatively high peaks appeared in the purplish red color of *P. integrifolia*. In the three different colors of the F1 hybrid, the peak of 7-10 was observed. There was a difference also in the amplitude of the peak that appeared at the same retention time besides the number of peaks, and was a difference in the ratio of the contained pigments though it was this petal color (purplish red color). The number of anthocyanins included in the petal color of *P. integrifolia* is fewer than that of F1 hybrid. It was guessed to have complicated the diversification and the coloring matter composition of the gene that the improvement of *P.* × *hybrida* takes part in the coloring matter synthesis of *P. integrifolia*. The HPLC analysis with the extracted material from the leaf for the authorization at the early stage of the petal pigmentation that would be included at hybrid posterity was a result of a lot of leaving of the examination problem.

Key words: anthocyanin, F1 hybrid, HPLC analysis, petal color