

長井系ハナショウブにおける有用形質の
遺伝・生理学的解析と育種学的利用に関する研究

2014.3

東京農工大学大学院

連合農学研究科

生物生産科学専攻

北原 かおり

目次

第1章 緒論

第1節	アヤメ属植物について	4
第2節	ハナショウブについて	6
第3節	ハナショウブの花色素について	8
第4節	長井系ハナショウブに関して	9
第5節	本研究の目的	10

第2章 長井系ハナショウブの特性の解明

第1節	緒言	11
第2節	材料および方法	12
第3節	実験結果	23
1.	長井系ハナショウブの形態的特性	23
2.	長井系ハナショウブの体細胞染色体数	27
3.	長井系ハナショウブの花粉稔性	27
4.	長井系ハナショウブの花被片の主要アントシアニンの同定	30
5.	長井系ハナショウブの花色と主要アントシアニン組成による 品種の類別	45
第4節	考察	49
1.	長井系ハナショウブの花の形態と染色体数および花粉稔性	49
2.	長井系ハナショウブのアントシアニン	50
3.	長井系ハナショウブの主要アントシアニンに基づく品種の 類別	53

第3章 長井系ハナショウブ3品種より得た後代植物の特性

第1節	緒言	56
-----	----	----

第 2 節	材料および方法	57
第 3 節	実験結果	61
	実験 1 . 長井系ハナショウブ 3 品種より得た Op_1 植物の特性の調査	
	1 . 形態学的調査	61
	2 . Op_1 植物の交配結果	68
	3 . Op_1 植物の色素分析	72
	実験 2 . 長井系ハナショウブ‘爪紅’の Op_1 植物の自殖次代植物 (S_1Op_1) の特性	
	1 . S_1Op_1 植物の形態的特性の調査	79
	2 . S_1Op_1 植物における矮性個体の出現	105
	3 . S_1Op_1 植物の種子稔性	105
	4 . S_1Op_1 植物の色素分析	108
	実験 3 . 矮性個体の特性の調査	
	1 . ‘爪紅’から得た Op_1 植物の自殖次代植物 (S_1Op_1) において出現した, 矮性および半矮性個体の形態調査	120
	2 . S_1Op_1 植物で出現した矮性、半矮性個体の種子稔性	120
	3 . 矮性, 半矮性個体の自殖後代植物 (S_2Op_1) の形態調査	123
	4 . 斑入り個体の葉の細胞学的観察	123
	5 . 後代植物の獲得のための胚培養について	126
第 4 節	考察	128
	1 . 後代植物の形態特性に関して	128
	2 . 長井系ハナショウブ‘爪紅’から得た Op_1 植物とその自殖次代植物 (S_1Op_1) の花色素特性に関して	129
第 4 章	総合考察	132
要約		141

Summary · · · · ·	144
謝辭 · · · · ·	147
参考文献 · · · · ·	148

第 1 章 緒論

第 1 節 アヤメ属植物について

アヤメ科 (Family Iridaceae) は、北半球の北緯 20 度から 65 度の亜熱帯から亜寒帯を中心に分布する多年草の植物であり、70 属約 1500 種に分類される (岩科 2005)。このうち、アヤメ属の植物 (Genus *Iris*) は、約 200~250 種があり、園芸種としてはハナショウブ (*Iris ensata* Thunb, 体細胞染色体数 $2n=24, 25$), カキツバタ (*I. laevigata*, $2n=32$), ジャーマンアイリス (*I. germanica*, $2n=16, 24, 40, 48$), およびアヤメ (*I. sanguinea*, $2n=28$) などが知られている。日本には、帰化種も含めて 8 種と、ヒオウギアヤメ (*I. setosa* var. *setosa*, $2n=38, 39$) の変種であるキリガミネヒオウギアヤメ (*I. setosa* var. *hondoensis*, $2n=52, 53, 54, 56, 57$) とナスヒオウギアヤメ (*I. setosa* var. *nasuensis*, $2n=54$), そして Akiyama and Iwashina (2009) によってアヤメの変種として学名が付けられたトバタアヤメ (*I. sanguinea* var. *tobataensis*) の 3 変種が分布する。

また、最近の研究では、ヒオウギアヤメの 2 変種はカキツバタとの雑種であることが示唆され (岩科・大谷 1998, Inoue *et al.* 2008), また、GISH 法や FISH 法を用いた調査により *I. versicolor* ($2n=108$) が *I. virginica* ($2n=70$) とヒオウギアヤメを祖先種とする異質倍数体であること (Yoong *et al.* 2007) が示されるなど、アヤメ属植物の類縁関係が明らかにされつつある。

アヤメ属に分類される植物の花器形態は、雌蕊と雄蕊を持つ両性花で、花卉のように見える部分は‘花被片’と呼ばれ、がく片に相当する大型で反り返った形をした外花被と、花卉に相当する外花被よりも基本的に小さく直立する内花被の 2 器官からなる (Fig. 1-1)。そして、花被片の下部には‘苞’という薄い膜状の器官に包まれた状態で子房がある。また、ハナショウブの場合、内花被は‘鉾’, 雌蕊は‘芯’という独特の名称で呼ばれ、雌蕊の形状も、先が三つに裂けているものや、‘蜘蛛手’と呼ばれるヒダ状になっているものなど様々である。

アヤメ属の植物では、花器の構造から同花受粉しにくい障壁 (しょうへき) 受精で、ミツバチなどによる虫媒受粉に最適の形態をもっているが、人工受粉を行った場合、放任状態に置いたものに比べ結実率は良好となることから、自家受粉も他家受粉も可能である (富野 1963)。

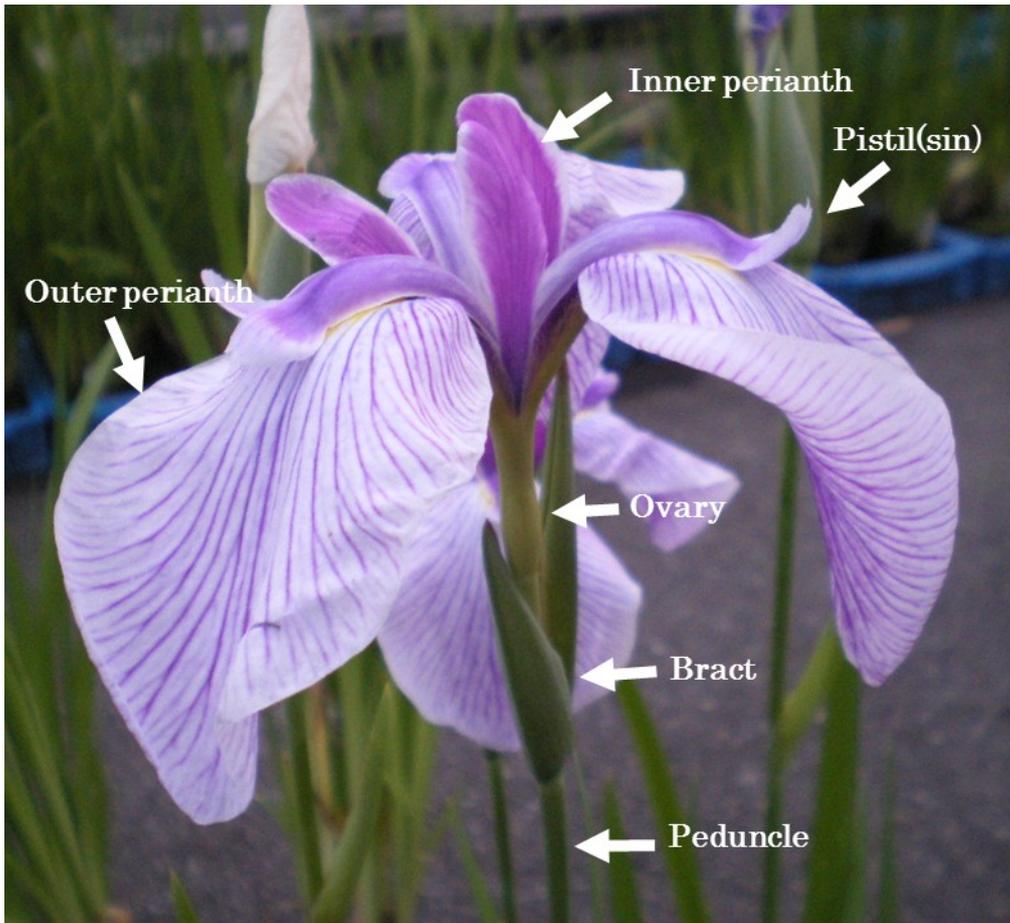


Fig. 1-1. Flower parts of the genus *Iris*.

第2節 ハナショウブについて

ハナショウブは、日本においてノハナショウブ (*I. ensata* var. *spontanea*, $2n=24$) 1種をもとにして改良された。ノハナショウブの特徴としては、草丈約40~80 cm, 花期は6~8月頃, 花色は紅紫色または青紫色をしていることなどが挙げられる。永田(2007)によると、ロシアや朝鮮半島に自生する個体は、えんじ色をした濃い紅紫色の個体が多く、日本でも北日本の海岸草原に自生する個体は、濃い紅紫色で比較的大型の花をつける。一方、本州の東北地方より南に自生する個体は、やや薄紫色の個体や花色に濃淡があり、紫に近いものなど自生地によって変異が見られ、中には純白や桃色のような珍しい花色もある。こうした変異個体は江戸中期以前から発見され、一ヶ所に集められ栽培されることで互いに交雑し、多様な個体が生まれたと考えられている。

その後、ハナショウブは、長井系、江戸系、伊勢系、肥後系に大別され、現在では2000以上もの品種がある。この植物は、日本で古くから栽培されてきた園芸品種で、現在でも庭園や切り花、鉢植えなどに用いられ、幅広く人々に親しまれている。ハナショウブの花色は青紫・紅紫・白、さらにぼかし・脈入り・覆輪・絞り・砂子というような多彩な変異を持ち、花形の種類も Fig. 1-2 で示したような三英花(さんえいか)・六英花(ろくえいか)・八重咲き・受け咲き・爪咲き等がある。

ハナショウブの育種は、基本的には多彩な花色を持つ品種間交雑であるが、新花色品種を目指して、ハナショウブとその他の種との種間雑種の作出も試みられている。種間雑種の獲得には胚培養が有効とされ (Yabuya and Yamagata 1980, 1981), 例として、Yabuya (1984) によってカキツバタとの間で種間雑種が得られ、その後、コルヒチン処理による複二倍体の作出 (Yabuya 1985), さらに、その複二倍体とハナショウブとの交雑親和性の調査 (Yabuya 1991a) も行われた。Yabuya and Noda (1998) は、カキツバタとハナショウブの同質異質四倍体も作出している。一方、ハナショウブには本来黄色の花色がなく、黄花品種が望まれていた。富野と桜井 (1972) によってキショウブ (*I. pseudacorus*, $2n=24, 30, 32, 34$) を片親とした種間雑種が初めて報告され、その後、黄色の花色を持つ‘愛知の輝’, ‘金冠’および‘堺の黄金’といった品種の育成が進んできた (清水 2000)。他にも *I. virginica* や *I. versicolor* とハナショウブ間の種間雑種も胚培養を通して作出されている (藪谷 2007)。さらに、ジャーマンアイリスの多彩



Type of Edo-line-San-eika
(江戸系三英花)

Type of Edo-line-Roku-eika
(江戸系六英花)

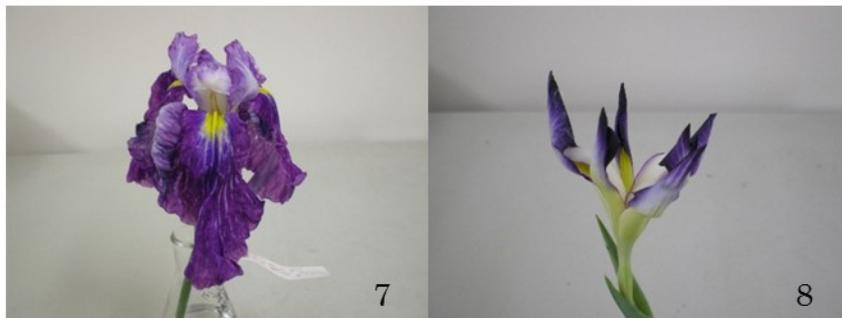
Type of Edo-line-Ukezaki
(江戸系受け咲き)



Type of Higo-line-San-eika
(肥後系三英花)

Type of Higo-line-Roku-eika
(肥後系六英花)

Type of Higo-line-Yaezaki
(肥後系八重咲き)



Type of Ise-line-San-eika
(伊勢系三英花)

Type of Tumesaki
(爪咲き)

Fig. 1-2. Flower types of *Iris ensata*.

- 1: Banri-no-hibiki (‘万里の響’), 2: Inazuma(‘稲妻’)
 3: Satsuki-bare(‘五月晴’), 4: Sen-hime(‘千姫’),
 5: Chiyoda-jo(‘千代田城’), 6: Nemuri-jishi(‘眠り獅子’),
 7: Matsusakatsukasa(‘松阪司’),
 8: Nagai-taka-no-tsume(‘長井鷹の爪’).

な色や形の導入を目的として、ジャーマンアイリスとの間での体細胞雑種 (Shimizu *et al.* 1999, Tsukatani *et al.* 2002) も得られている。また、ダッチアイリスのプロトプラスト培養も Hida *et al.* (1999) によって成功しており、今後、ダッチアイリスとハナショウブの体細胞雑種の作出も期待される。種間雑種および体細胞雑種の作出により、ハナショウブの花色は多様になってきた。しかし、ハナショウブの花色は未だダッチアイリスやジャーマンアイリスほどに多彩とはいえず、より一層、花色の幅を広げる育種が望まれている。

第3節 ハナショウブの花色素について

ハナショウブの花色は、アントシアニンが深く関係していることが報告されており (林ら 1978), そのため、アントシアニンの有用変異の探索が重要とされている。アントシアニンはフラボノイド系色素の一つであり、赤・青・紫色などの色を呈する花や果実、ハツカダイコンの根の色の発現要因となる色素である。この色素はアグリコン (アントシアニン) に一つまたはそれ以上の糖が結合した配糖体となり液胞中に存在する (林 1980)。

アヤメ属植物においては、ハナショウブの花色素の研究が最も進んでいる。

Hayashi (1940) によって、主要アントシアニンである *ansatin* (*malvidin 3-(p-coumaroylrutinoside)-5-glucoside* , *malvidin 3pCRG5G*) の単離・同定がなされ、江戸系、伊勢系、肥後系、約 200 品種を用いて分析した結果、アントシアニンの品種間変異の存在が明らかにされた (林ら 1978)。また、肥後系の花色素の分析は Ishikura and Yamamoto (1978) によっても行われている。

最近では、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた分析も行われ、ハナショウブの栽培品種や野生種の主要アントシアニン構成による類別 (Yabuya 1991b, Yabuya *et al.* 1994a, 2001, Imayama and Yabuya 2003) や、種間雑種の色分析も行われている (Yabuya 1987)。また、ハナショウブにおいて、アントシアニンとフラボンとの間での分子間コピグメンテーションが報告されており (Yabuya *et al.* 1994b, 1997), ハナショウブのフラボンの分離・同定もなされている (Iwashina *et al.* 1996)。さらに、Yabuya *et al.* (2000) は、コピグメンテーションによって花色が安定することも明らかにしている。アン

トシアニンとフラボン間での分子間コピグメンテーションの報告は、ダッチアイリスにおいても報告がある (Mizuno *et al.* 2013).

また、ハナショウブの花色素(アントシアニン)では、Pelargonidin, Cyanidin, Peonidin, Delphinidin, Petunidin および Malvidin の主要 6 種類中、赤やオレンジの花色の発現に重要な Pelargonidin のみ報告されていない。また Pelargonidin は他のアヤメ属植物でも検出されていない (岩科・大谷 1998)。したがって、ハナショウブをはじめとする、アヤメ属植物での Pelargonidin 型色素を持つ品種の育成には、Pelargonidin 型の色素を有する種や個体の探索を進めるか、遺伝子組換え等による遺伝子導入が必要と考えられる。しかし、このような知見は、長井系以外の品種で主に行われており、長井系品種群に関する知見は殆どない。

第 4 節 長井系ハナショウブに関して

本論文の実験材料である長井系ハナショウブは、山形県の長井市あやめ公園に保存されており、江戸中期頃のハナショウブや原種であるノハナショウブに似た形質を持つ小輪花が多い。この系統は長井市の南に位置する飯豊町萩生で昔から栽培されていた野生種の色変わりを、明治 43 年に、長井市横町の金田勝見氏が“ドンタク場”と呼ばれる西置賜郡長井町宮地区の茶屋を開き、そこにハナショウブの苗を植えたのがはじまりとされている (長井市商工観光課 2010a)。また、柿間 (1997) によると、長井古種の品種特性のルーツは飯豊山系に自生するものに極めて近いといわれている。長井古種として認知されたきっかけは、昭和 37 年に日本花菖蒲協会の調査会での、「長井の特色花を記念に選出していただきたい」という柿間氏の願いが、長井古種の発見につながり、探索中に他の品種群には見られない独特な花が見出され、「長井古種」花銘‘野川の鷺’が選出された。この時、‘野川の鷺’をはじめとした約 30 品種が選抜命名され、「長井古種」として登録されるに至った (柿間 1997)。その後、長井古種から派生した「長井系」と呼ばれる品種も見られるようになり、長井あやめ公園が 100 周年を迎えた 2010 年に、新たに 20 品種が登録され、現在では、昭和 37 年に選出命名された長井市指定天然記念物 13 種と長井古種 21 品種、および、その後に命名された長井系ハナショウブ 24 品種の計 58 品種が存在する (長井市商工観光課 2010a)。しかし、昭和 37 年以前の文献記録が残っておらず、

江戸中期からの品種がそのまま伝わっているかは不明である。永田（2007）は、当地由来の野生に近い個体に江戸の改良品種が交雑した可能性も考えている。最近では、ハナショウブの四つの品種群の葉緑体DNAによる調査も行われ、その結果から、長井系はハナショウブの栽培種の起点となっている可能性も挙げられた（小林ら 2006）。しかし、長井古種は、ハナショウブの代表的な古種として親しまれているが、その特性についてはほとんど研究されていない。

第5節 本研究の目的

本研究では、長井系ハナショウブの花色素などの特性を明らかにするとともに、長井系の育種的な利用を図るための基礎的知見を得ることを目的としている。そこで、第2章では、長井系ハナショウブの体細胞染色体数の調査および花被片に含まれるアントシアニン構成を明らかにするとともに、主要アントシアニンの同定を行った。第3章では、長井系品種‘爪紅’、‘三淵の流れ’および長井系品種を親とする栽培品種‘薄紅’の3品種から自然交配で得られた実生第一代植物（ Op_1 ）の花色の変異状況と、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて、花色の質的変異の解明を試みた。さらに、後代植物での形態や花色素の変異をみるために、 Op_1 植物の自殖次代植物（ S_1Op_1 ）とその自殖二代植物（ S_2Op_1 ）における分離状況を調査した。最後に、第4章では、第2～3章を基に、長井系ハナショウブの育種利用について総合的に考察した。

第 2 章 長井系ハナショウブの特性の解明

第 1 節 緒言

長井系ハナショウブは，第 1 章でも述べたように，山形県長井市あやめ公園にて保存され，江戸時代中期頃の品種やノハナショウブに似た小輪花の多い品種群である．杉林を伐採した荒れ地付近に，野生のハナショウブが数株散見され，これを集めて育て始め茶店を開いたことが，長井系ハナショウブと長井市あやめ公園の始まりとされている（長井市商工観光課 1999）．

昭和 37 年の日本花菖蒲協会の鑑賞会で 30 数種が命名されて以来，現在までに 58 品種が長井系品種群として存在している（長井市商工観光課 2010a, 2010b）．しかし，その特性に関しては体系的な調査が行われていない．

ハナショウブの他の品種群では，富野（1963）によって体細胞染色体数の調査や花粉稔性の調査等がなされている．279 品種について行われた体細胞染色体数の調査では，江戸系 71 品種と肥後系 73 品種は，調査品種の全てが $2n=24$ の二倍体であった．しかし，伊勢系では 110 品種中，‘松阪司’や‘落葉衣’を含めた 22 品種が $2n=25$ の異数体であることが明らかにされた．

また，ハナショウブの花色にはアントシアニンが関係していることが林ら（1978）によって報告されており，その後，肥後系では Ishikura and Yamamoto（1978）によって花色素の分析がなされ，また，HPLC を用いた主要アントシアニン構成による分類（Yabuya 1991b, Yabuya *et al.* 1994a, 2001, Imayama and Yabuya 2003）や，種間雑種の色素に関する報告も他の品種群を中心に行われている（Yabuya 1987）．しかし，花色素についても長井系品種に関する報告は殆どない．

そこで本章では，現在，江戸系，伊勢系，肥後系と同じく親しまれている品種群でありながら，その特性に関する知見のない長井系ハナショウブの基本特性を明らかとするため，体細胞染色体数と花粉稔性などの特性調査を実施した．さらに，他の品種群において研究が進んでおり，花色の発現に深く関与しているとされる花色素，特にアントシアニンについての分析を行い，未解明であった長井系ハナショウブの花被片に含

まれる主要アントシアニンの同定および花色素の特性を調査し、長井系ハナショウブの育種的利用の有用性を考察した。

第2節 材料および方法

1. 植物材料

本実験に用いた長井系品種は、山形県長井市あやめ公園にて栽培、管理されている52品種とノハナショウブを用いた (Fig. 2-1)。また、長井系ハナショウブとの比較を兼ねた予備実験として、本研究室で栽培している江戸系、伊勢系および肥後系の栽培品種89品種も併せて行った。

2. 実験項目

(1) 花色

花色の調査は、開花最盛期に実施し、長井系品種は長井古種花菖蒲図録 (長井市商工観光課, 2010b) を参考に分類し、栽培品種については、永田 (2007) の著書「色分け花図鑑 花菖蒲」、および日本花菖蒲協会発刊の写真集と写真品種解説 (2008) を参考にした。

(2) 花粉稔性

各個体または品種の花粉稔性は、一番花または二番花の花粉を用い、1%酢酸カーミンで染色、約500粒を観察し、濃染されたものを稔性花粉とみなし、算出した。

(3) 根端細胞における体細胞染色体数の観察

長井系ハナショウブの根端細胞における体細胞染色体数の観察は、次のように行った。山形県長井市あやめ公園にて栽培されている個体から新しい根端組織を品種ごとに採取し、8-オキシキノリン水溶液で約24時間前処理した後、カルノア液で固定した。固定後、根端組織をよく水洗いし、60°Cの1N塩酸で約15分間加水分解と温湯柔化処理を施した。根端細胞における染色体数の観察は、押しつぶし法によって行い、染色は塩基性フクシンとアセトカーミンによる二重染色法で行った。



Fig. 2-1. Cultivars of Nagai line of *Iris ensata* used in this study.
 1 : Asahi-no-mine(‘朝日の峰’), 2 : Kakkodori(‘郭公鳥’),
 3: Kozakura-hime(‘小桜姫’), 4 : Jitsugetsu(‘日月’), 5: Tsumabeni(‘爪紅’),
 6: Dewa-musume(‘出羽娘’), 7: Nagai-komurasaki(‘長井小紫’),
 8: Nogawa-no-sagi(‘野川の鷺’), 9: Mifuchi-no-nagare(‘三淵の流’),
 10: Ranzuma(‘藍島’), 11: Reijin(‘麗人’).



Fig. 2-1. -(Continued)-

- 12: U-no-hanahime(‘卯の花姫’), 13: Kasuri-otome(‘かすり乙女’),
 14: Shiryu-no-tsuno(‘紫竜の角’), 15: Tanabata(‘七夕’),
 16: Tsumugi-musume(‘紬娘’), 17: Dewa-no-minazuki(‘出羽の水無月’),
 18: Nagai-kotyau(‘長井胡蝶’), 19: Nagai-taka-no-tsume(‘長井鷹の爪’),
 20: Nagai-furu-murasaki(‘長井古紫’), 21: Nogawa-no-atari(‘野川の辺’),
 22: Hagi-komachi(‘萩小町’), 23: Hayama-no-yuki(‘葉山の雪’).



Fig. 2-1. -(Continued)-

- 24: Fuji-no-kagayaki(‘藤の輝’), 25: Beni-ranzuma(‘紅藍島’),
 26: Mai-komachi(‘舞小町’) , 27: Mahora(‘まほら’),
 28: Mifuchi-no-nami(‘三淵の波’), 29: Mogami-no-nagare(‘最上の流’),
 30: Yachi-no-shirasagi(‘谷地の白鷺’), 31: Yuki-goromo(‘雪衣’).



Fig. 2-1. -(Continued)-

- 32: Ayahime(‘綾姫’), 33: Usugoromo(‘薄衣’), 34: Kifujin(‘貴婦人’),
 35: Koi-murasaki(‘恋紫’), 36: Koto-no-yume(‘古都の夢’),
 37: Sazanami(‘さざ波’), 38: Shion(‘紫音’),
 39: Tennyo-no-kanzashi(‘天女のかんざし’), 40: Nagai-suzaku(‘長井朱雀’),
 41: Nagai-ja-no-me-gasa(‘長井蛇の目傘’),
 42: Nagai-tsuru-no-mai(‘長井鶴の舞’), 43: Nagai-beni-senryo(‘長井紅千両’).

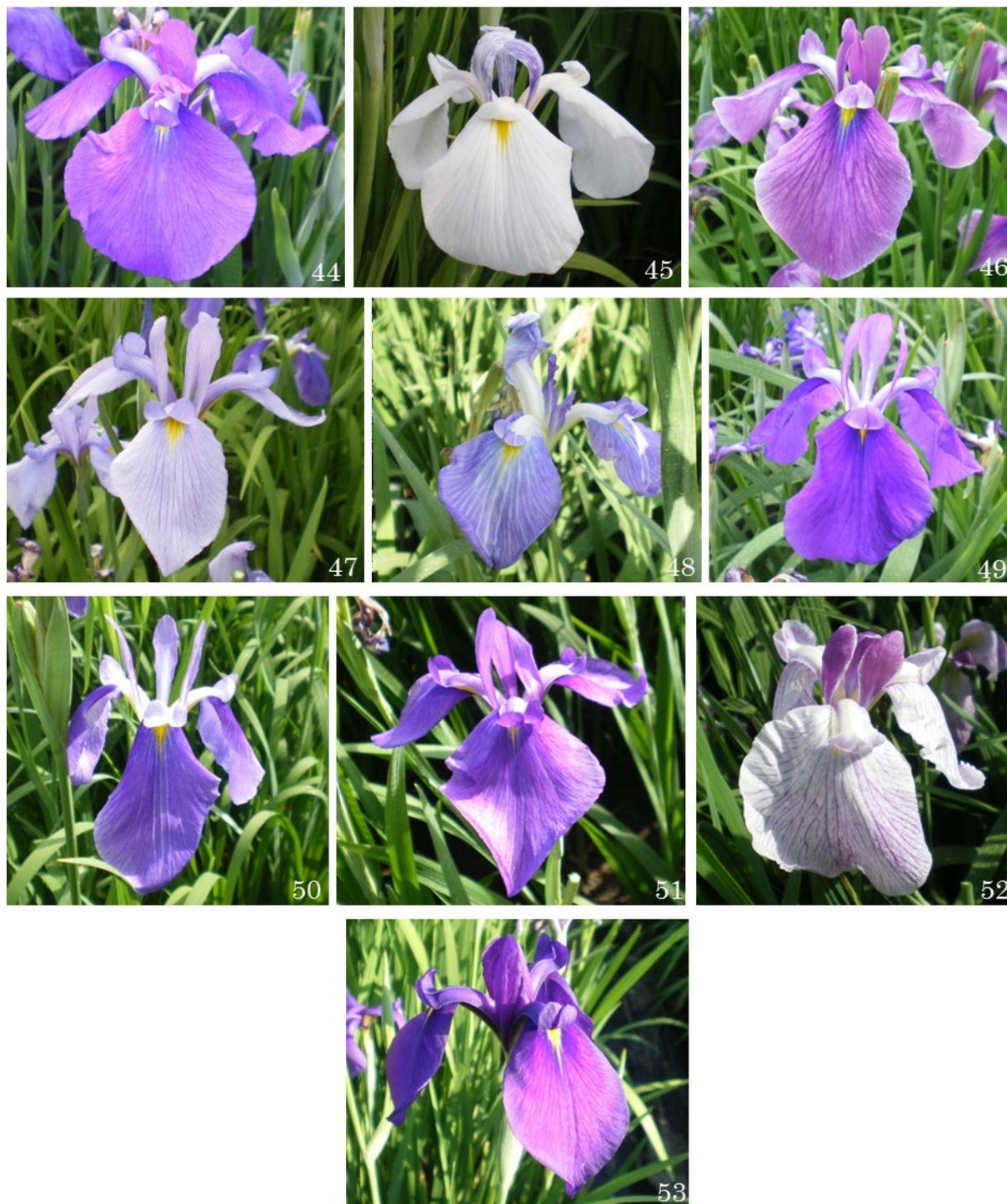


Fig. 2-1. -(Continued)-

- 44: Nagai-maiko(‘長井舞妓’), 45: Nagai-yuki-komachi(‘長井雪小町’),
 46: Murasaki-gozen(‘紫御前’), 47: Murasaki-suisho(‘紫水晶’),
 48: Murasaki-no-shizuku(‘紫雫’), 49: Murasaki-no-tsuru(‘紫の鶴’),
 50: Murasaki-hotaru(‘紫蛍’), 51: Murasaki-mimai(‘紫美舞’),
 52: Yukata-musume(‘浴衣娘’), 53: *I. ensata* var. *spontanea*(ノハナショウブ).

(4) 花色素の定量分析

長井系ハナショウブの花色素特性の解明と、ハナショウブの花色素種に有用な色素構成の探索のため、HPLC等による花被片のアントシアニン色素の分析をおこなった。

アントシアニンの抽出は、開花日当日の新鮮な花被片の単色花であれば中央部付近を、砂子や白地に脈入りの花被片であればよく色が入る部分を0.1 g量り取り、2 mlのFMW（蟻酸／アセトニトリル／水＝8：20：72，v/v）で一晩抽出し、HPLC用前処理カートリッジ（マイショリディスク H-13-5，東ソー株式会社）で濾過したものを定量分析に用いた。

(5) 花色素の定性分析

アントシアニンの抽出は、開花最盛期に長井市あやめ公園にて採集した花被片（約850 g）をFM（蟻酸／メタノール＝7：93，v/v）で抽出し、濾過したものを粗抽出液とした。

花被片より抽出したアントシアニンの分離・精製は、①吸着型カラムクロマトグラフィー，②マスペーパークロマトグラフィー，③分取高速液体クロマトグラフィー，④分配型カラムクロマトグラフィーを用いて行った。各方法の詳細を以下に示す。

①吸着型カラムクロマトグラフィー

粗抽出液を濃縮乾涸し，少量の5%蟻酸水に溶かしたものをアンバーライト XAD-7（オルガノ製）に通して色素を吸着させ，余分な多糖類などの水溶性物質を5%蟻酸水で十分に洗浄した。その後，吸着した色素を5%蟻酸性メタノールで溶出した。

②マスペーパークロマトグラフィー（mass-PC）

吸着型カラムクロマトグラフィーのアンバーライト XAD-7に通した後のサンプルを，減圧下で少容量に濃縮し，ADVANTEC No. 51A 濾紙（30×60 cm）に添着して，展開溶剤 BAW（*n*-ブタノール／酢酸／水＝4：1：5，v/v，上層）で12～14時間展開し，風乾後，アントシアニンのバンドを切り取り，アントシアニンバンドはMAW（メタノール／酢酸／水＝50：5：45，v/v）で溶出して濃縮

した.

③分取高速液体クロマトグラフィー (prep. HPLC)

マスパークロマトグラフィー後, 濃縮されたサンプルは, 下記の装置を用いた分取高速液体クロマトグラフィーで, 各種成分を分離した.

- ・ポンプ : 東ソー株式会社 CCPS
- ・検出器 : 東ソー株式会社 UV - 8020
- ・記録計 : 東ソー株式会社 Chromatocorder 21
- ・カラム : ジーエルサイエンス株式会社
Inertsil ODS - 4 (I.D.10×250 mm)
- ・流速 : 1.5 ml/min
- ・注入量 : 400 μ l
- ・検出波長 : 530 nm
- ・分析溶媒 : 蟻酸 / アセトニトリル / 水 (5 : 15 : 80, v/v)

④分配型カラムクロマトグラフィー

分取高速液体クロマトグラフィーにて分離したアントシアニン, それぞれセファデックス LH - 20 を充填したカラムクロマトグラフィーにより MAW で展開し, 不純物を取り除きアントシアニンを精製した.

アントシアニンの同定には, 精製した各アントシアニンを用いて, ①紫外・可視吸収スペクトルの測定, ②アルカリケン化, ③酸加水分解, ④薄層クロマトグラフィー, ⑤高速液体クロマトグラフィーおよび⑥質量分析を行い, 標品サンプルの分析結果との比較により, 各アントシアニンの同定を行った. また, 一部のアントシアニンについては, ⑦核磁気共鳴スペクトル (NMR) の測定も行い, 構造解析も行った. 各手法の詳細は以下に記した通りである.

①紫外・可視吸収スペクトル

精製したアントシアニンの紫外・可視吸収スペクトル測定には, 島津マルチパーパス自記分光光度計 MPS - 2000 型を用いた. アン

トシアニンの測定は 220～600 nm の波長域で行い，サンプルを 0.01%メタノール性塩酸に溶かして測定した．次に，その溶液中に塩化アルミニウム (AlCl_3 ，無水 AlCl_3 5 g をメタノール 100 ml に溶解) を 5 滴添加し，軽く攪拌して再度測定する．

一般的なアントシアニンにおける各種試薬を添加して測定した吸収スペクトルによる構造の評価は以下のとおりである．

I . 0.01%メタノール性塩酸中の吸収スペクトル特性

a) アントシアニンは，紫外部 (275 nm 付近) と可視部 (500～550 nm) にそれぞれ吸収極大を一つずつ持つ．
→アシル化されていないアントシアニン．

b) 紫外部と可視部，さらに 310～335 nm に吸収極大を持つ．
→ケイ皮酸誘導体が結合しているアシル化アントシアニン．

c) 440 nm での吸光係数 E_{440} と可視部吸収極大での吸光係数 E_{max} との比率 (E_{440}/E_{max} 値)
→5 - 位の水酸基が遊離であるものが，置換されているものより値が大きくなる．Delphinidin の場合，前者の E_{440}/E_{max} 値は約 10%となる (Harborne 1958)．

d) 紫外部の有機酸に対応するピークの吸光係数 E_{acid} と可視部吸収極大での吸光係数 E_{max} との比率 ($E_{\text{acid}}/E_{\text{max}}$)
→結合有機酸の数の推定．値が大きくなるほど結合有機酸の数が多し．

II . 塩化アルミニウム (AlCl_3) の添加による吸収極大の変化

a) 吸収極大が著しく長波長側に移動する
→B 環に 2 個以上の隣接する遊離水酸基が存在する．

②アルカリケン化

精製した各アントシアニンをさらに濃縮乾涸し，それをマイクロチューブに適量入れ，少量の蒸留水を加えて溶かした後，キシレンを

マイクロチューブの半分位まで入れ，溶液が空気に接しないように膜を作り，2N 水酸化ナトリウム水溶液を 2～3 滴マイクロチューブの側面に伝わらせながら静かに加えてよく混ぜ，15 分間放置して反応させる．15 分後，溶液を酸性に戻すため，2N 塩酸水溶液を溶液が紅くなるまで少しずつ加える．その後，キシレン層を除去し，ジエチルエーテルを十分に加えて攪拌し，遊離した有機酸をエーテル層に移行させ，エーテル層を得る．これを 2～3 回繰り返す．水層に残った脱アシル化アントシアニンを，中和反応で生じた塩を取り除くために濃縮乾涸して，5% 蟻酸性エタノールを加えて塩を沈殿させ，上澄みをマイシヨリディスクにとおして精製後，定性用のサンプルとする．

③ 酸加水分解

単離・精製されたアントシアニンが，アシル化されている場合はアルカリケン化をおこない，脱アシル化した後に酸加水分解によりアントシアニンと糖に分離する．まず，精製したアントシアニンサンプルを濃縮乾涸し，12% 塩酸を加えてよく攪拌した後，直火で 3 分間振とうする．その後，直ちに流水で冷却し，少量のイソアミルアルコールを加えて振り，これに水を加えアントシアニン（アグリコン，イソアミルアルコール層）と糖（水層）に分ける．

④ 薄層クロマトグラフィー（TLC）

酸加水分解後に得られた糖を含む水層を濃縮し，TLC（薄層クロマトグラフィー）を用いて結合糖の同定を行う．TLC は，セルロース MERCK 薄層プラスチックプレートで行い，展開溶剤は BBPW（*n*-ブタノール/ベンゼン/ピリジン/水 = 5 : 1 : 3 : 3, v/v），BTPW（*n*-ブタノール/トルエン/ピリジン/水 = 5 : 1 : 3 : 3, v/v）を用い，室温上昇法により実施する．標品は，グルコース，ガラクトース，アロース，グルクロン酸，アラビノース，キシロースおよびラムノースを用いる．加水分解後に得たサンプルとこれらの標品サンプルを，濾紙にマイクロピペットで点着し，展開後ドラフト内で風乾し，発色試薬として 1% メタノール性塩酸アニリンを噴霧した後，80°C に温度設定したオーブンで約 30 分間加熱し，スポットを発色させて R_f 値を測定する。

⑤ 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

HPLC のシステムは下記の装置と条件で実施した。

HPLC 1

- ・ポンプ : Shimadzu LC - 10AD
- ・検出器 : Shimadzu SPD - M10A
- ・カラムオーブン : Shimadzu CTO - 10A
- ・カラム : ジーエルサイエンス株式会社 Inertsil ODS-4
(I.D. 6.0×150 mm)
- ・流速 : 1 ml/min
- ・注入量 : 10 μ l
- ・検出波長 : 530 nm (アントシアニン)
- ・分析溶媒 : リン酸 / 酢酸 / アセトニトリル / 水
(3 : 8 : 14 : 75, v/v)

HPLC 2

- ・ポンプ : Shimadzu LC - 20AD
- ・検出器 : Shimadzu SPD - M20A
- ・カラムオーブン : Shimadzu CTO - 20A
- ・カラム : ジーエルサイエンス株式会社 Inertsil ODS-4
(I.D. 6.0×150 mm)
- ・流速 : 1 ml/min
- ・注入量 : 10 μ l
- ・検出波長 : 530 nm
- ・分析溶媒 : リン酸 / 酢酸 / アセトニトリル / 水
(3 : 8 : 14 : 75, v/v)

⑥ 質量分析

化合物を同定する際の分子量を測定するために、液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC - MS) を用いて分析を行った。分析機器および分析条件は以下のとおりである。

- ・質量分析計 : LCMS - 2010EV
- ・ポンプ : Shimadzu LC - 10ADvp×2

- ・検出器 : Shimadzu SPD - M10Avp
- ・カラムオーブン : Shimadzu CTO - 10ACvp
- ・カラム : ジーエルサイエンス株式会社 Inertsil ODS-4
(I.D. 6.0×150 mm)
- ・流速 : 0.1 ml/min
- ・注入量 : 10 μl
- ・検出波長 : 530 nm
- ・分析溶媒 : ① 蟻酸 / アセトニトリル / 水
(5 : 20 : 75, v/v)
② 蟻酸 / アセトニトリル / 水
(5 : 15 : 80, v/v)

⑦核磁気共鳴スペクトル (NMR)

アントシアニンの構造決定のために, ^1H NMR, ^{13}C NMR を行った. アントシアニンは $\text{DMSO-}d_6 + \text{CF}_3\text{COOD}$ (3 : 1) に溶解し, ^1H NMR は 600 MHz で, ^{13}C NMR は 150 MHz で分析した.

第3節 実験結果

1. 長井系ハナショウブの形態的特性

長井系ハナショウブは, 前述のとおり長井市指定天然記念物 13 種, 長井古種 21 品種および長井系 24 品種に分類されているが, これらはいずれも極小輪～中輪の比較的小型の品種群である. また英数(花卉枚数)は 58 品種のうち, 六英花である‘長井鷹の爪’(Table 2-1, Fig. 2-1-19)と‘長井蛇の目傘’(Table 2-1, Fig. 2-1-41)を除いた 56 品種が三英花であった (Table 2-1).

‘長井鷹の爪’は, 六英花に分類されるが, 名のごとく鳥の爪の様に花被片が上向きに巻き込み, 先端が尖った形状をとる (Fig. 2-2-1). この花型は, ハナショウブの中でも非常に珍しいものである. 爪咲きの品種は, 日本花菖蒲協会より発表されている 2008 年版写真品種解説で紹介されている品種の中では, 唯一‘長井鷹の爪’のみである.

一方, ‘長井蛇の目傘’は, 内花被が外花被のように大きく発達した六英花で, 花被片と花被片の間に距離があり, 外花被が多少垂

Table 2-1. Morphological characteristics, somatic chromosome number and pollen fertility in Nagai line cultivars of *I. ensata*.

Cultivars	Perianth types	Flower colors	No. of somatic-chromosomes (2n)	Pollen fertility(%)		
Wild species type	San-ei	Reddish-purple	24	90.4		
'Kakkodori'	San-ei		24	91.0		
'Kozakura-hime'	San-ei		24	85.0		
'Jitsugetsu'	San-ei		24	87.9		
'Dewa-musume'	San-ei		24	94.0		
'Ranzuma'	San-ei		24	88.9		
'Reijin'	San-ei		24	60.8		
'U-no-hanahime'	San-ei		24	75.0		
'Kasuri-otome'	San-ei		24	84.4		
'Shiryu-no-tsuno'	San-ei		24	75.9		
'Tanabata'	San-ei		24	55.4		
'Dewa-no-minazuki'	San-ei		24	87.4		
'Nagai-kocho'	San-ei		24	95.8		
'Hagi-komachi'	San-ei		24	88.8		
'Beni-ranzuma'	San-ei		24	94.8		
'Mahoa'	San-ei		24	80.0		
'Ayahime'	San-ei		24	85.5		
'Usugoromo'	San-ei		24	96.5		
'Koto-no-yume'	San-ei		24	97.4		
'Shion'	San-ei		24	98.2		
'Dewa-no-akebono'	San-ei		24	-		
'Nagai-kasuri'	San-ei		24	-		
'Nagai-suzaku'	San-ei		24	94.7		
'Nagai-beni-senryo'	San-ei		24	90.5		
'Yukata-musume'	San-ei		24	98.2		
'Tsumabeni'	San-ei		Pink	24	93.2	
'Mifuchi-no-nagare'	San-ei			24	98.4	
'Mogami-no-nagare'	San-ei			24	96.4	
'Yuki-goromo'	San-ei			24	88.4	
'Nagai-ja-no-me-gasa'	Roku-ei			24	92.5	
'Murasaki-gozen'	San-ei			24	95.3	
'Nagai-komachi'	San-ei		Purple	24	-	
'Nagai-taka-no-tsume'	Roku-ei	24		93.6		
'Mifuchi-no-nami'	San-ei	-		76.9		
'Ryu-no-hige'	San-ei	24		-		
'Kifujin'	San-ei	24		92.1		
'Koi-murasaki'	San-ei	24		91.1		
'Komachi-no-mai'	San-ei	24		-		
'Tennyo-no-kanzashi'	San-ei	24		88.9		
'Nagai-yuki-komachi'	San-ei	24		94.7		

Table 2-1. - (Continued) -						
Cultivars	Perianth types	Flower	No. of somatic-		Pollen	
		colors	chromosomes (2n)		fertility(%)	
'Nagai-komurasaki'	San-ei		24		70.4	
'Nogawa-no-sagi'	San-ei		24		95.2	
'Tsumugi-musume'	San-ei		24		78.6	
'Nagai-furu-murasaki'	San-ei		24		87.6	
'Nogawa-no-atari'	San-ei		24		94.3	
'Fuji-no-kagayaki'	San-ei		24		92.2	
'Mai-komachi'	San-ei		24		85.0	
'Sazanami'	San-ei	Bluish-	24		92.5	
'Chigo-guruma'	San-ei	purple	24		-	
'Nagai-tsuru-no-mai'	San-ei		24		-	
'Nagai-maiko'	San-ei		24		80.7	
'Murasaki-suisho'	San-ei		24		92.5	
'Murasaki-no-shizuku'	San-ei		-		94.0	
'Murasaki-no-tsuru'	San-ei		24		94.2	
'Murasaki-hotaru'	San-ei		24		97.2	
'Murasaki-mimai'	San-ei		-		89.1	
'Asahi-no-mine'	San-ei	White	24		91.4	
'Hayama-no-yuki'	San-ei		24		4.0	
'Yachi-no-shirasagi'	San-ei		24		88.8	
			Mean±S.D.		87.0±14.7	



Fig. 2-2. Unique flowers in Nagai line cultivars of *I. ensata*.
 1: Type of tsumesaki (‘Nagai-taka-no-tsume’), 2: Type of roku-ei-ka in Nagai line(‘Nagai-ja-no-me-gasa’),
 3: Type of roku-ei-ka in Higo line(‘Chiyoda-jo’), 4: *I. ensata* var. *spontanea*, 5: Type of rengazaki(‘Mifuchi-no-nami’).

れ下がる特性を持ち (Fig. 2-2-2), ‘千代田城’ など肥後系の六英花でよく見られるような絢爛豪華な形態とは異なり, 素朴な六英花である (Fig. 2-2-3).

以上のことから, ほとんどの長井系ハナショウブは, ノハナショウブ (Fig. 2-2-4) と同様, 三英花に分類された. しかし, その中には花被片の縁が丸まり柄杓の様な形をとる蓮華咲きの品種 ‘三淵の波’ (Fig. 2-2-5) といった品種も存在する.

また, 長井系ハナショウブの花色は, 肉眼的に赤紫・桃色・紫・青紫および白に大別された (Table 2-1). 色の入り方は, 花被片全体に色が入るもの (‘長井小紫’, ‘紫竜の角’ など), ‘小桜姫’ のように白地に紅紫のぼかしで太く同色で縁取りが入るもの, ‘かすり乙女’, ‘七夕’, ‘長井緋’ のように吹き掛け絞りとなる品種, 白脈が入るもの (‘藤の輝’, ‘野川の辺’ など) や逆に白地に紫色等の色脈が入る ‘紬娘’ や ‘舞小町’ といった品種と様々なものがみられ (Table 2-1, Fig. 2-1), 長井系は他の品種群に比べると小さな品種群ではあるが, その花は多様性に富んでいることが明らかになった.

2. 長井系ハナショウブの体細胞染色体数

長井系ハナショウブ 58 品種中, 根端細胞の採取が可能であった 55 品種と野生種であるノハナショウブについて体細胞染色体数を調査したところ, すべての品種が $2n=24$ の染色体数であり, 伊勢系で報告されている $2n=25$ といった異数体は観察されなかった (Table 2-1, Fig. 2-3).

3. 長井系ハナショウブの花粉稔性

花粉稔性は, 51 品種とノハナショウブで調査した. その結果, 長井系品種の平均は 87.0%, ノハナショウブは 90.4% と高い花粉稔性を示した. しかし, 長井系は 4.0% (‘葉山の雪’) ~ 98.4% (‘三淵の流’) と品種間でばらつきが見られ, 長井市で天然記念物に指定されている品種および長井古種に分類されている比較的古い品種で, 花粉稔性が 80% を下回る品種が見られた (Table 2-1). なお, 長井系以外の品種では, 80% 以上の高いものから, 八重咲き, 多弁咲きおよび種間雑種品種を中心に不稔または低稔性が観察された (Table 2-2).

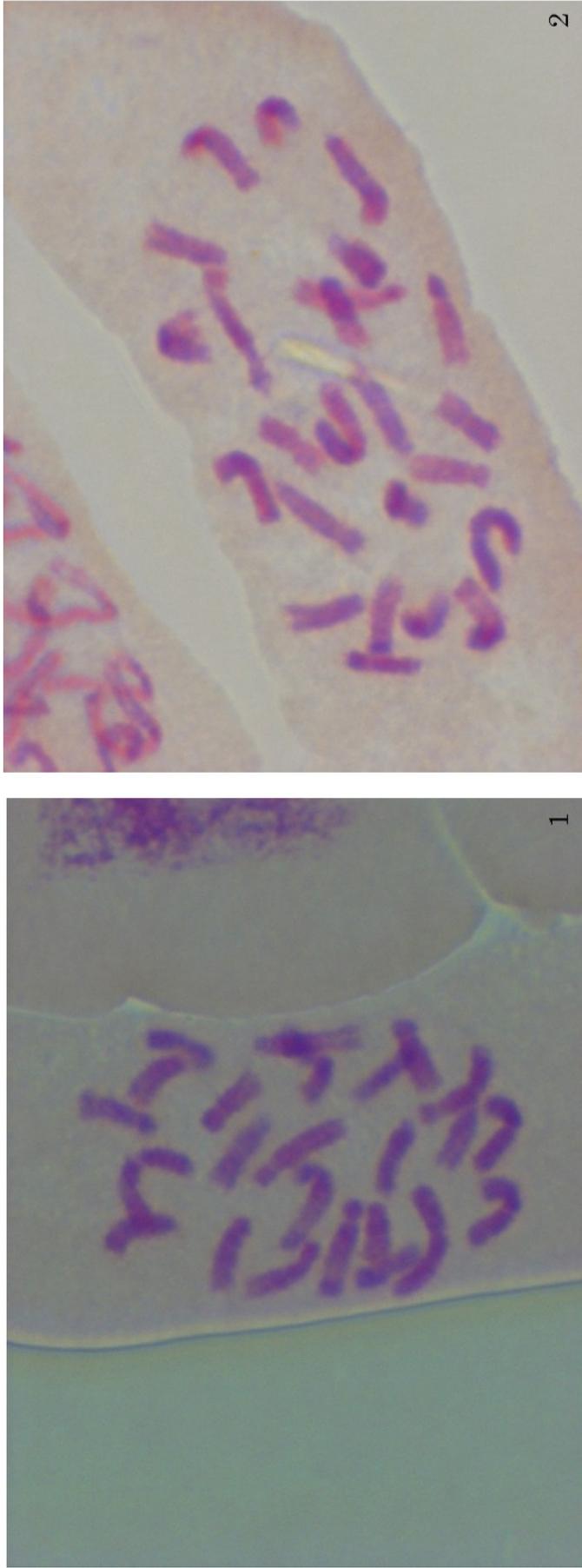


Fig. 2-3. Somatic chromosome number of two cultivars of Nagai line.

1: 'Tsumabeni', 2n=24, 2: 'Nagai-maiko', 2n=24.

Table 2-2. Pollen fertility of cultivars of Edo, Ise and Higo line of *I. ensata*.

Flower colors	Pollen	Cultivars
	fertility (%)	
Pink	$\geq 80\%$	Himekaidoh, Sakura-zutsumi, Otome, Sakura-gari, Haga-2, Pink-lady, Satsukibare, Zangetsu
	80%-50%	Beni-zakura, Kari-goromo
	$50\% \leq$	—
	0%	Kokonoe-no-sakura, Sakuragawa
	Mean 71.7%	
Mauve or light blue	$\geq 80\%$	Naminorifune, Nemuri-jishi, Aoyagi, Yayoi-kagami, Itako-no-yume, Seisyounagon, Izumigawa, Yama-no-sizuku
	80%-50%	—
	$50\% \leq$	—
	0%	—
	Mean 88.0%	
Reddish purple	$\geq 80\%$	Suwa-goryo, Gosanbina, Omurasaki, Haru-no-utage, Kasugano, Chouseiden, Narihira, Gion, Asahi-no-Sato, Benizaki, Syakkyo, Aoi-no-ue, Shiranui, Houohkan, Inazuma, Benzaiten, Tojaku [*] , Beniugi
	80%-50%	Kyoumai, Haga-1, Matsusaka-tsukasa, Syutyuka, Kotosuga
	$50\% \leq$	Hatsubeni
	0%	Hihoukan, Nihonkai, Tennyo-no-kanmuri, Botan-zakura
	Mean 71.4%	
Bluish purple	$\geq 80\%$	Hatsu-karasu, Toomi-zakura, Nanakomachi, Banri-no-hibiki, Zuihou, Aoeki, Tsukikage, Onarimon, Sukeroku-1, Shin-hamaoogi, Urayasu-no-mai, Kumamoto-murasaki, Utsunomiya C-2, Suitenissyoku, Suren
	80%-50%	Shiga-no-uranami, Kamiji-no-homare, Chiyo-no-homare, Shin-ike-no-sazanami, Sukeroku-2, Kamiyo-no-mukashi
	$50\% \leq$	—
	0%	Chiyoda-jo, Yoru-no-niji
	Mean 79.0%	
White	$\geq 80\%$	Gosan-no-yuki, Tsurugajou, Hakutyou, Gunzan-no-yuki, Tsuru-no-kegoromo, Takane-no-yuki
	80%-50%	Okitunami, Seisin
	$50\% \leq$	yuki-tsubame
	0%	—
	Mean 78.6%	
Yellow	$\geq 80\%$	—
	80%-50%	—
	$50\% \leq$	Minori-no-aki, Aichi-no-kagayaki, Michinoku-kogane
	0%	—
	Mean 0.5%	
Mean±S.D.	72.64±30.68	

4. 長井系ハナショウブの花被片の主要アントシアニンの分析と同定

長井系ハナショウブとノハナショウブを用いて花被片に含まれるアントシアニンの定性分析を行った。その結果、主要アントシアニンとして6種類（A1～A6）が検出された。そのうち、A1～A6の6成分は、いずれも完全同定することができた。以下に同定できたアントシアニンの詳細を記述する。

①完全同定できた主要アントシアニンについて

A1 : Petunidin

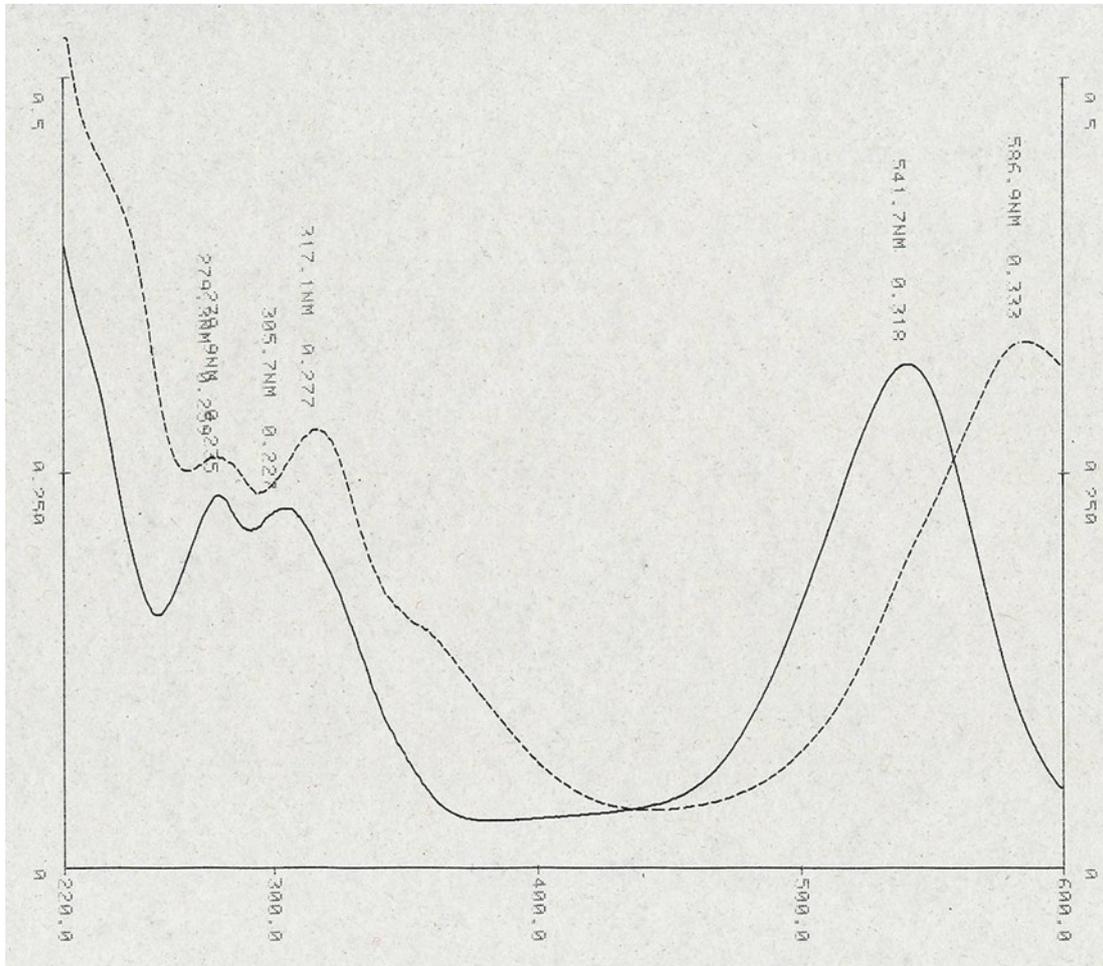
3-*O*-β-[(4'''-*Z*-*p*-coumaroyl-α-rhamnopyranosyl)-(1→6)-β-glucopyranoside]-5-*O*-β-glucopyranoside (*Z*-Petanin)

A1の0.01%塩酸性メタノール中での吸収スペクトルは、280, 306, 542 nmに極大を示し、 E_{440}/E_{max} 値が13%であることから5位に遊離水酸基が存在することが推定された。また E_{acid}/E_{max} 値が71%であることから、芳香属有機酸が1分子以上結合していることが推定された。AlCl₃を添加すると吸収極大は、279, 317および587 nmと深色移動を生じることから、B環に隣接する2つ以上の遊離水酸基が存在することも明らかとなった（Table 2-3, Fig. 2-4-1）。酸加水分解によって得られたアントシアニジンは、Petunidinと同定され、結合している糖としてTLCにより、グルコースとラムノースが検出された。また、アルカリケン化を行って得られた芳香属有機酸は、基準標品との比較により*p*-クマル酸と同定された。LC-MS分析を行ったところ、分子イオンピーク m/z 933 [M]⁺を示したので（Table 2-4）、A1はPetunidinにグルコース2分子と、ラムノースおよび*p*-クマル酸が1分子ずつ結合していると判明した。

¹H NMRよりPetunidin, 3分子の糖, 1分子の*p*-クマル酸の存在が認められた。それぞれの糖の結合位置はHMBCより、ラムノースのアノメリックプロトン (δ 4.68) のシグナルと3-グルコースのC-6 (δ 66.7) のシグナル, グルコースのアノメリックプロトン (δ 5.64) のシグナルとPetunidinのC-3 (δ 144.4) シグナルのそれぞれの間にクロスピークが見られ, 1分子のグルコースがPetunidinの3-位に,

Table 2-3. UV spectral properties of the anthocyanins (A1-A4) from the perianths of Nagai line cultivars.

Anthocyanins	λ_{\max} (nm)		$E_{\text{acid}}/E_{\text{max}}$ (%)	E_{440}/E_{max} (%)
	in 0.01% HCl-MeOH	AlCl_3		
A1	280, 306, 542	279, 317, 587	71	13
A2	281, 310, 544,	280, 317, 583	101	21
A3	280, 302, 541	278, 308, 541	84	14
A4	281, 305, 540	310, 355, 541	93	12



— : 0.01% HCl-MeOH
 : +AlCl₃

Fig. 2-4-1. UV spectral curves of anthocyanin A1.

Table 2-4. LC-MS data of the anthocyanins (A1-A7) from the perianths of Nagai line cutivars.		
Anthocyanins	Molecular	Calculated for
	ion peaks(<i>m/z</i>)	
A1	933 [M] ⁺	Petunidin + 2 mol glucose + 1 mol rhamnose + 1 mol <i>p</i> -coumaric acid
A2	933 [M] ⁺	Petunidin + 2 mol glucose + 1 mol rhamnose + 1 mol <i>p</i> -coumaric acid
A3	947 [M] ⁺	Malvidin + 2 mol glucose + 1 mol rhamnose + 1 mol <i>p</i> -coumaric acid
A4	947 [M] ⁺	Malvidin + 2 mol glucose + 1 mol rhamnose + 1 mol <i>p</i> -coumaric acid
A5	787 [M] ⁺	Petunidin + 2 mol glucose + 1 mol rhamnose
A6	801 [M] ⁺	Malvidin + 2 mol glucose + 1 mol rhamnose
A7	919 [M] ⁺	Delphinidin + 2 mol glucose + 1 mol rhamnose + 1 mol <i>p</i> -coumaric acid

ラムノースが 3-グルコースの 6-位に結合しており，もう 1 分子のグルコースは，Petunidin の 5-位に結合していることが判明した．また，糖と有機酸の結合は HMBC より，ラムノースの H-4 (δ 4.84) のシグナルと *p*-クマル酸の COOH (δ 166.3) のシグナルにクロスピークが見られた．また，*p*-クマル酸の H- α (δ 5.68) と H- β (δ 6.84) の結合定数はそれぞれ $J=12.8$ Hz と $J=13.0$ Hz を示し，*Z*-体の *p*-クマル酸であることを示した (Table 2-5, Table 2-6)．さらに，3つのアノメリックプロトンの結合定数よりグルコースはいずれも β -型，ラムノースは α -型であることも証明された．

これらの結果から A1 は，Petunidin 3-*O*- β -[(4'''-*Z*-*p*-coumaroyl- α -rhamnopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside]-5-*O*- β -glucopyranoside (*Z*-Petanin)と同定された (Fig. 2-5)．

A2 : Petunidin

3-*O*- β -[(4'''-*E*-*p*-coumaroyl- α -rhamnopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside]-5-*O*- β -glucopyranoside (*E*-Petanin)

A2 の 0.01% 塩酸性メタノール中での吸収スペクトルは，281，310，544 nm に極大を示し， E_{440}/E_{\max} 値が 21% であることから 5 位に遊離水酸基が存在することが推定された．また E_{acid}/E_{\max} 値が 101% であることから，芳香属有機酸が 1 分子以上結合していることが推定された． AlCl_3 を添加すると吸収極大は，280，317 および 583 nm と深色移動を生じることから，B 環に隣接する 2 つ以上の遊離水酸基が存在することも明らかとなった (Table 2-3, Fig. 2-4-2)．酸加水分解によって得られたアントシアニジンは，Petunidin と同定され，TLC により結合している糖は，グルコースおよびラムノースが検出された．また，アルカリケン化を行って得られた芳香属有機酸は，基準標品との比較により *p*-クマル酸と同定された．LC-MS 分析を行ったところ，分子イオンピークは A1 と同じ m/z 933 $[\text{M}]^+$ を示した (Table 2-4)．したがって A2 は，A1 と同様に Petunidin にグルコース 2 分子と，ラムノースおよび *p*-クマル酸が 1 分子ずつ結合していると判明した．

Table 2-5. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆/CF₃COOD = 3:1) data of the anthocyanins 1-4 from the flowers of *Iris ensata* Nagai line.

Position	1	2	3	4
Aglycone				
H-4	8.93 s	8.93 s	8.99 s	9.00 s
H-6	7.06 d (1.7)	7.06 d (1.4)	7.09 br s	7.08 br s
H-8	7.19 d (1.4)	7.18 d (1.0)	7.28 d (0.9)	7.26 br s
H-2'	7.98 d (2.1)	7.97 d (1.9)	8.07 s	8.07 s
H-6'	7.96 d (2.2)	7.96 d (2.1)	8.07 s	8.07 s
3'-OMe	4.00 s	4.00 s	4.00 s	4.01 s
5'-OMe			4.00 s	4.01 s
3-glucose				
H-1	5.64 d (7.7)	5.61 d (7.7)	5.64 d (7.7)	5.61 d (7.7)
H-2	3.56 m	3.59 m	3.59 m	3.58 m
H-3	3.94 br d (10.6)	3.90 m	3.89 d (11.7)	3.92 m
H-4	3.40 t (9.3)	3.39 t (9.4)	3.39 t (9.3)	3.38 t (9.8)
H-5	3.59 m	3.59 m	3.57 m	3.60 m
H-6a	3.72 m	3.72 m	3.67 m	3.71 m
H-6b	3.69 m	3.68 m	3.65 m	3.64 m
5-glucose				
H-1	5.17 d (7.6)	5.18 d (7.6)	5.18 d (7.6)	5.19 d (7.6)
H-2	3.57 m	3.58 m	3.57 m	3.61 m
H-3	3.48 m	3.51 m	3.49 m	3.53 m
H-4	3.50 m	3.50 t (7.3)	3.46 m	3.52 m
H-5	3.56 m	3.57 m	3.56 m	3.42 m
H-6a	3.84 m	3.83 m	3.86 m	3.85 m
H-6b	3.70 m	3.70 m	3.69 m	3.73 m
6"-rhamnose				
H-1	4.68 s	4.69 s	4.68 s	4.70 s
H-2	3.58 m	3.58 m	3.58 m	3.58 m
H-3	3.73 m	3.72 m	3.73 m	3.75 m
H-4	4.84 t (9.4)	4.91 t (9.7)	4.84 t (9.6)	4.90 t (9.7)
H-5	3.79 m	3.79 m	3.78 m	3.80 m
H-6	0.90 d (6.2)	1.00 d (6.2)	0.91 d (6.2)	1.00 d (6.2)
4"-<i>p</i>-coumaric acid				
H-2	7.69 d (8.8)	7.54 d (8.6)	7.68 d (10.7)	7.54 d (8.6)
H-3	6.81 d (8.8)	6.87 d (8.6)	6.81 d (8.8)	6.87 d (8.6)
H-5	6.81 d (8.8)	6.87 d (8.6)	6.81 d (8.8)	6.87 d (8.6)
H-6	7.69 d (8.8)	7.54 d (8.6)	7.68 d (10.7)	7.54 d (8.6)
H-α	5.68 d (12.8)	6.35 d (16.0)	5.69 d (12.8)	6.35 d (16.0)
H-β	6.84 d (13.0)	7.59 d (15.8)	6.84 d (12.9)	7.60 d (15.7)

Table 2-6. ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6/\text{CF}_3\text{COOD} = 3:1$) data of the anthocyanins 1-4 from the flowers of *Iris ensata* Nagai line.

Position	1	2	3	4
aglycone				
2	162.9	163.0	162.8	162.9
3	144.4	145.2	144.3	144.9
4	133.0	133.1	133.9	133.9
5	158.4	158.4	158.4	158.5
6	104.9	104.8	104.9	103.7
7	168.5	168.5	168.7	168.7
8	96.9	96.9	97.4	97.6
9	155.9	155.9	155.9	155.9
10	113.1	113.1	113.1	113.1
1'	118.8	118.8	118.8	118.8
2'	108.7	108.8	110.4	110.4
3'	149.3	149.3	149.1	149.1
4'	145.4	145.8	146.0	146.9
5'	147.0	147.6	149.1	149.1
6'	113.9	113.9	110.4	110.4
3'-OMe	56.8	56.8	56.9	56.4
5'-OMe			56.9	56.4
3-glucose				
1	101.2	101.5	101.5	101.8
2	73.8	73.9	73.8	73.9
3	76.8	76.8	76.8	76.7
4	70.3	70.5	70.3	70.0
5	78.1	78.1	78.1	78.1
6	66.7	67.0	66.7	66.9
5-glucose				
1	102.5	102.5	102.5	102.4
2	73.7	73.6	73.8	74.2
3	76.6	76.6	76.6	76.9
4	70.0	70.0	70.0	70.3
5	77.3	77.3	77.4	77.5
6	61.1	61.1	61.1	61.1
6"-rhamnose				
1	100.9	101.2	100.9	101.2
2	73.8	73.9	73.8	74.5
3	71.0	71.1	71.0	71.3
4	74.2	74.5	74.2	74.6
5	69.1	69.1	69.1	69.2
6	17.8	17.9	17.8	17.8
4"-p coumaric acid				
1	126.3	126.0	126.3	126.0
2	133.4	130.9	133.4	130.9
3	115.6	116.3	115.6	116.3
4	159.8	159.8	159.8	159.9
5	115.6	116.3	115.6	116.3
6	133.4	130.9	133.4	130.9
a	115.0	115.0	116.1	114.9
B	145.2	145.5	145.4	145.6
C=O	166.3	167.3	166.3	167.3

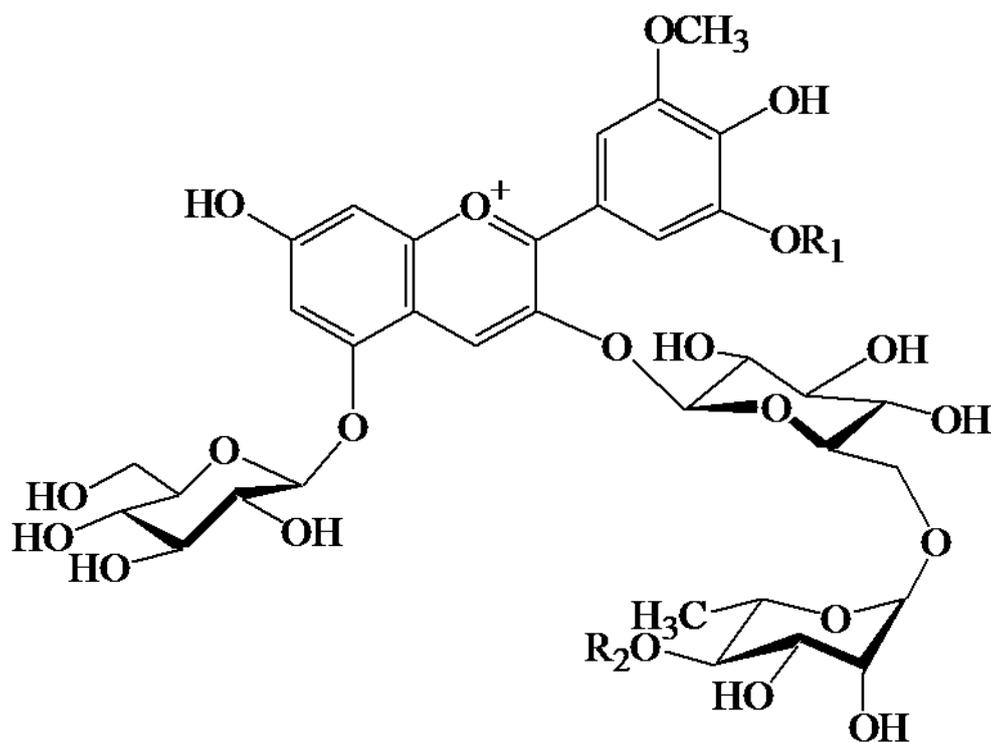
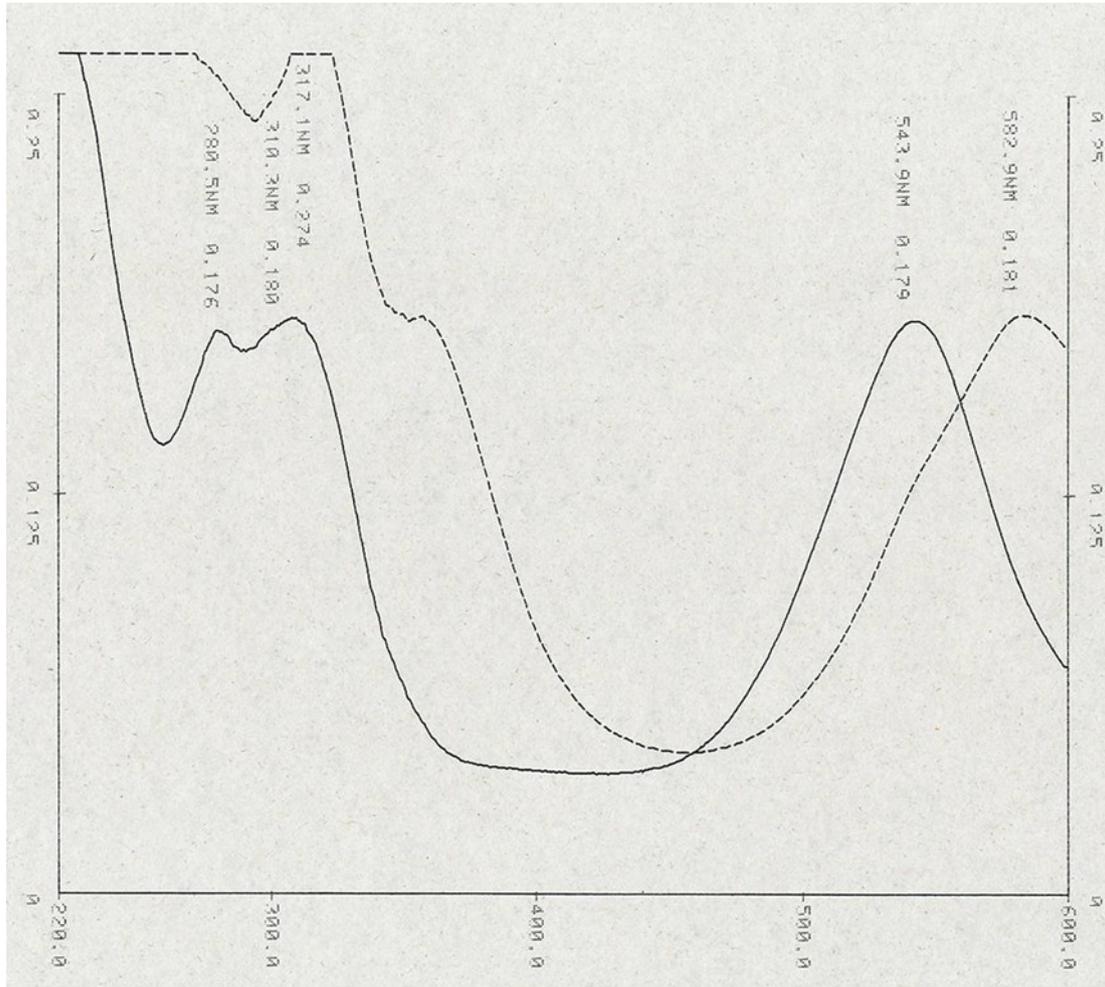


Fig. 2-5. Chemical structures of six anthocyanins from Nagai line.
 A1: $R_1 = H$, $R_2 = Z$ -*p*-coumaric acid, A2: $R_1 = H$, $R_2 = E$ -*p*-coumaric acid,
 A3: $R_1 = CH_3$, $R_2 = Z$ -*p*-coumaric acid, A4: $R_1 = CH_3$, $R_2 = E$ -*p*-coumaric acid,
 A5: $R_1 = H$, $R_2 = H$, A6: $R_1 = CH_3$, $R_2 = H$.



— : 0.01% HCl-MeOH
 : +AlCl₃

Fig. 2-4-2. UV spectral curves of anthocyanin A2.

$^1\text{H NMR}$ により A1 と同様にアントシアニジンとして Petunidin, そして, 3 分子の糖, 1 分子の *p*-クマル酸の存在が認められた. それぞれの糖の結合位置は HMBC より, ラムノースのアノメリックプロトン (δ 4.69) のシグナルと 3-グルコースの C-6 (δ 67.0) のシグナル, グルコースのアノメリックプロトン (δ 5.61) のシグナルと Petunidin の C-3 (δ 145.2) シグナルのそれぞれにクロスピークが見られ, 1 分子のグルコースが Petunidin の 3-位に, ラムノースが 3-グルコースの 6-位に結合しており, もう 1 分子のグルコースは, Petunidin の 5-位に結合していることが判明した. また, 糖と有機酸の結合は HMBC より, ラムノースの H-4 (δ 4.91) のシグナルと *p*-クマル酸の COOH (δ 167.3) のシグナルにクロスピークが見られた. また, *p*-クマル酸の H- α (δ 6.35) と H- β (δ 7.59) の結合定数はそれぞれ $J=16.0$ Hz と $J=15.8$ Hz を示し, *E*-体の *p*-クマル酸であることを示した (Table 2-5, Table 2-6). また, 糖は A1 と同様にグルコースは β -型, ラムノースは α -型であった.

以上の結果より, A2 は Petunidin 3-*O*- β -[(4'''-*E*-*p*-coumaroyl- α -rhamnopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside]-5-*O*- β -glucopyranoside (*E*-Petanin) と同定された (Fig. 2-5).

A3 : Malvidin

3-*O*- β -[(4'''-*Z*-*p*-coumaroyl- α -rhamnopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside]-5-*O*- β -glucopyranoside (*Z*-Ensatin)

A3 の 0.01% 塩酸性メタノール中での吸収スペクトルは, 280, 302, 541 nm に極大を示し, E_{440}/E_{\max} 値が 14% であることから 5 位に遊離水酸基が存在することが推定された. また E_{acid}/E_{\max} 値が 84% であることから, 芳香属有機酸が 1 分子以上結合していることが推定された. AlCl_3 を添加すると吸収極大は, 278, 308 および 541 nm と深色移動しなかった. よって, B 環に隣接する 2 個以上の遊離水酸基が存在しないことが示された (Table 2-3, Fig. 2-4-3). 酸加水分解によって得られたアントシアニジンは, Malvidin と同定され, 結合している糖は, TLC によりグルコースおよびラムノースと同定された. また, アルカリケン化を行って得られた芳香属有

機酸は，基準標品との TLC と HPLC の比較により *p*-クマル酸と同定された．LC-MS 分析を行ったところ，分子イオンピーク m/z 947 [M]⁺を示した．したがって A3 は，Malvidin にグルコース 2 分子とラムノースと *p*-クマル酸が各 1 分子ずつ結合していると判定された (Table 2-4)．

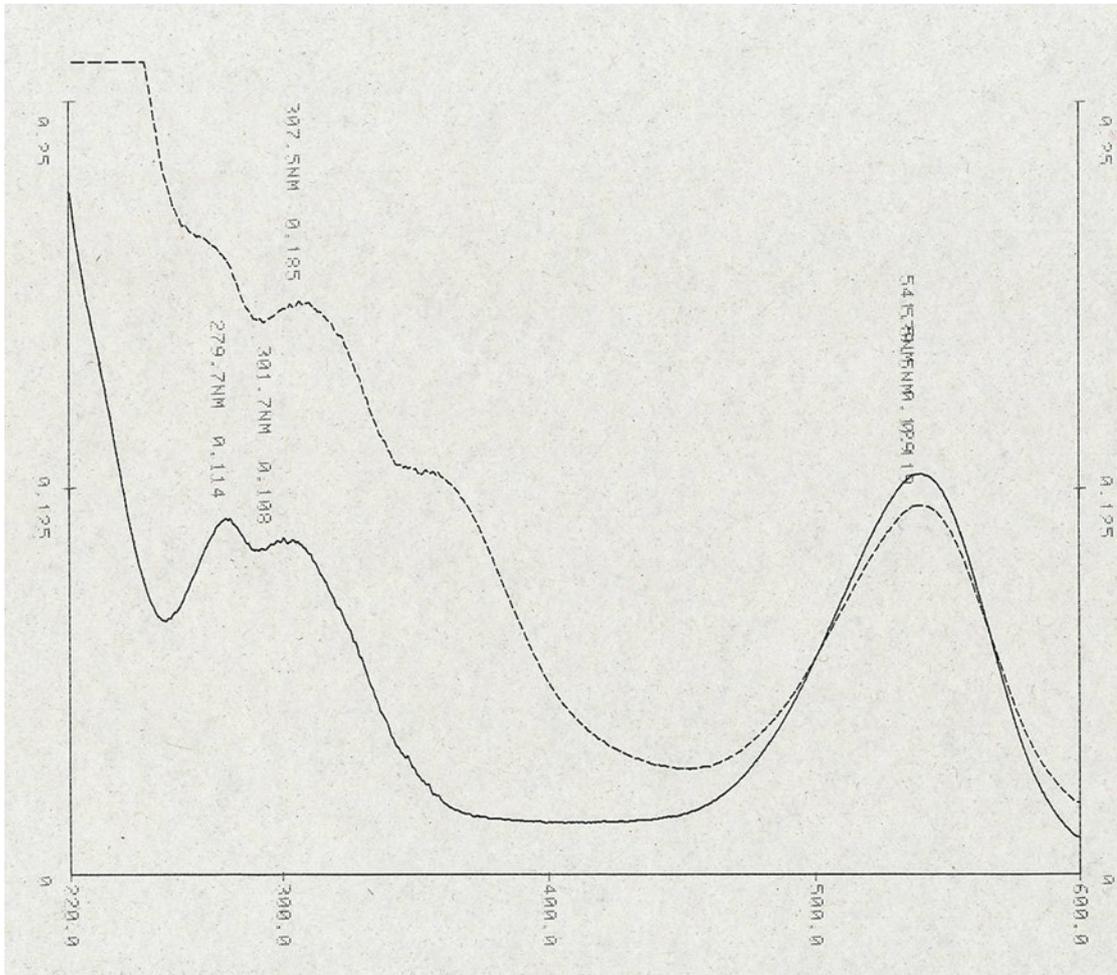
¹H NMR より Malvidin, 3 分子の糖, 1 分子の *p*-クマル酸の存在が認められた．それぞれの糖の結合位置は HMBC より, ラムノースのアノメリックプロトン (δ 4.68) のシグナルと 3-グルコースの C-6 (δ 66.7) のシグナル, グルコースのアノメリックプロトン (δ 5.64) のシグナルと Malvidin の C-3 (δ 144.3) シグナルのそれぞれにクロスピークが見られ, 1 分子のグルコースが Malvidin の 3-位に, ラムノースが 3-グルコースの 6-位に結合しており, もう 1 分子のグルコースは, Malvidin の 5-位に結合していることが判明した．また, 糖と有機酸の結合は HMBC より, ラムノースの H-4 (δ 4.84) のシグナルと *p*-クマル酸の COOH (δ 166.3) のシグナルにクロスピークが見られた．また, *p*-クマル酸の H- α (δ 5.69) と H- β (δ 6.84) の結合定数はそれぞれ $J=12.8$ Hz と $J=12.9$ Hz を示し, *Z*-体の *p*-クマル酸であることを示した (Table 2-5, Table 2-6)．なお, グルコースが β -型であり, ラムノースが α -型であることは A1 および A2 と同様である．

これらの結果から A3 は, Malvidin 3-*O*- β -[(4'''-*Z*-*p*-coumaroyl- α -rhamnopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside]-5-*O*- β -glucopyranoside (*Z*-Ensatin)と同定された (Fig. 2-5)．

A4 : Malvidin

3-*O*- β -[(4'''-*E*-*p*-coumaroyl- α -rhamnopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside]-5-*O*- β -glucopyranoside (*E*-Ensatin)

A4 の 0.01% 塩酸性メタノール中での吸収スペクトルは, 281, 305, 540 nm に極大を示し, E_{440}/E_{\max} 値が 12% であることから 5 位に遊離水酸基が存在することが推定された．また E_{acid}/E_{\max} 値が 93% であることから, 芳香属有機酸が 1 分子以上結合していることが推定された．AlCl₃ を添加すると吸収極大は, 310, 355 および



— : 0.01% HCl-MeOH
 : +AlCl₃

Fig. 2-4-3. UV spectral curves of anthocyanin A3.

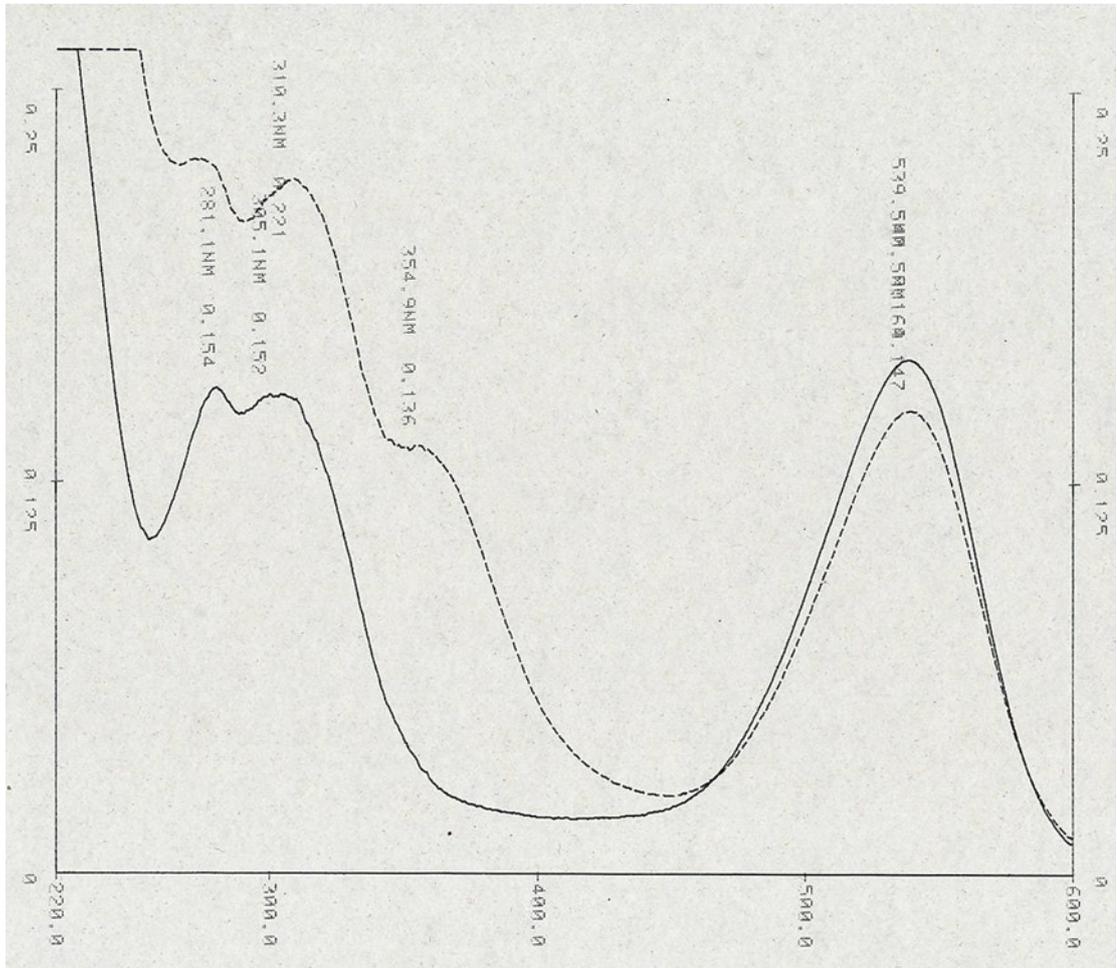
541 nm と深色移動が見られなかったため，B環に隣接する2個以上の遊離水酸基が存在しないことが示唆された (Table 2-3, Fig. 2-4-4). 酸加水分解によって得られたアントシアニジンは，Malvidin と同定され，結合している糖は，TLC によりグルコースとラムノースと同定された．また，アルカリケン化を行って得られた芳香属有機酸は，基準標品との比較により *p*-クマル酸と同定された．LC-MS 分析を行ったところ，A4 の分子イオンピークは，A3 と同じ m/z 947 [M]⁺を示した．したがって A4 は，A3 と同様に Malvidin にグルコース 2 分子とラムノースと *p*-クマル酸が 1 分子ずつ結合している配糖体と判明した (Table 2-4).

¹H NMR では A3 と同じく，アグリコンとして Malvidin,そして，3 分子の糖，1 分子の *p*-クマル酸の存在が認められた．それぞれの糖の結合位置は HMBC より，ラムノースのアノメリックプロトン (δ 4.70) のシグナルと 3-グルコースの C-6 (δ 66.9) のシグナル，グルコースのアノメリックプロトン (δ 5.61) のシグナルと Malvidin の C-3 (δ 144.9) シグナルのそれぞれにクロスピークが見られ，1 分子のグルコースが Malvidin の 3-位に，ラムノースが 3-グルコースの 6-位に結合しており，もう 1 分子のグルコースは，Malvidin の 5-位に結合していることが判明した．また，糖と有機酸の結合は HMBC より，ラムノースの H-4 (δ 4.90) のシグナルと *p*-クマル酸の COOH (δ 167.3) のシグナルにクロスピークが見られた．また，*p*-クマル酸の H- α (δ 6.35) と H- β (δ 7.60) の結合定数がそれぞれ $J=16.0$ Hz と $J=15.7$ Hz を示し，*E*-体の *p*-クマル酸であることが判明した (Table 2-5, Table 2-6). また，グルコースは β -型，ラムノースは α -型である．

以上の結果より A4 は，Malvidin 3-*O*- β -[(4''''-*E*-*p*-coumaroyl- α -rhamnopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside]-5-*O*- β -glucopyranoside (*E*-Ensatin)と同定された (Fig. 2-5).

A5 : Petunidin 3-*O*-rutinoside-5-*O*-glucoside

A5 を LC-MS 分析したところ，分子イオンピークは， m/z 787 [M]⁺を示した (Table 2-4). また，加水分解後に得られたアントシアニ



— : 0.01% HCl-MeOH
 : +AlCl₃

Fig. 2-4-4. UV spectral curves of anthocyanin A4.

ジンは Petunidin と同定された。最終的に，標品サンプルと HPLC によって直接比較を行ったところ，両者は一致した。

以上より A5 は Petunidin 3-*O*-rutinoside-5-*O*-glucoside と同定された (Fig. 2-5)。

A6 : Malvidin 3-*O*-rutinoside-5-*O*-glucoside

A6 の加水分解後に得られたアントシアニジンは Malvidin と同定され，LC-MS での分析の結果，分子イオンピークは m/z 801 [M]⁺を示した (Table 2-4)。これと，HPLC によって標品サンプルと比較した結果，両者は同一の物質であることが判明した。

以上より A6 は，Malvidin 3-*O*-rutinoside-5-*O*-glucoside と同定された (Fig. 2-5)。

② 同定された微量アントシアニンについて

A7 : Delphinidin

3-*O*-[*p*-coumaroylrhamnosyl-(1→6)-glucoside]-5-*O*-glucoside

A7 の加水分解後に得られたアントシアニジンは Delphinidin と同定され，LC-MS での分析の結果，分子イオンピークは m/z 919 [M]⁺に出現した (Table 2-4)。さらに，HPLC によって標品サンプルと直接比較した結果両者は一致した。

以上の結果より A7 は，Delphinidin 3-*O*-[*p*-coumaroylrhamnosyl-(1→6)-glucoside]-5-*O*-glucoside (Violanin) と同定された。

以上のように，長井系ハナショウブの花被片から 6 種類の主要アントシアニン (A1~A6) と 1 種類の微量アントシアニン (A7) を分離・同定することができた。また，6 種類の主要アントシアニンのうち，A1~A4 の 4 成分は，NMR 分析による構造決定を行い，A1 と A2 および，A3 と A4 はそれぞれ Petanin (A1, A2) と Ensatin (A3, A4) の *Z*-体，*E*-体という構造異性体であることが判明した。ハナショウブにおける Petanin と Ensatin の異性体の共存は本研究が初の報告となる (Kitahara *et al.* 2014)。

5. 長井系ハナショウブの花色と主要アントシアニン組成による品種の類別

花被片に含まれるアントシアニンの定性分析により、長井系ハナショウブは主要アントシアニン A1~A6 から構成されていることを明らかにした。ここでは、同定された主要アントシアニンの構成に基づいて長井系品種の類別を行った。

同定された主要アントシアニンの構成により、長井系ハナショウブとノハナショウブは以下の 4 つのアントシアニン構成パターンに分けることができた (Table 2-7, Fig. 2-6)。

- パターン 1 : Petunidin 3RGac5G (A1, A2) と Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を主要アントシアニンとするもの。
- パターン 2 : Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を主要アントシアニンとするもの。
- パターン 3 : Petunidin 3RG5G (A5) および Malvidin 3RG5G (A6) を主要アントシアニンとするもの。
- パターン 4 : アントシアニンを含まないもの。

パターン 1 には、長井系ハナショウブ 32 品種とノハナショウブが該当し、本構成パターンに該当する品種が最も多かった (Table 2-7)。既存の報告においても、ハナショウブにおいて Petunidin 3RGac5G と Malvidin 3RGac5G を主要アントシアニンとする品種が最も多く報告されており、本構成は、ハナショウブの基本的なアントシアニン構成とされている。なお、予備実験として実施した江戸系などの栽培品種の花被片の色素分析においても 92 品種中 69 の品種がこのパターンに該当した (Table 2-8)。

また、Malvidin 3RGac5G のみを主要アントシアニンとしたパターン 2 には、紅紫、桃色および青紫のような花色を呈する 14 品種が属した (Table 2-7)。

Table 2-7. Division based on major anthocyanin composition in Nagai line cultivars and its wild form.			
Patterns	Anthocyanin composition	Flower colors	Cultivars
1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G (32)	Reddish purple	Kakkodori*, Reijin, U-no-hanahime*, Shiryu-no-tsuno, Dewa-no-minazuki*, Nagai-kocho, Hagi-komachi, Beni-ranzuma*, Mahora, Ayahime*, Koto-no-yume*, Shion*, Nagai-suzaku, Nagai-beni-senryo*, Yukata-musume*, Wild form*
		Pink	Tsumabeni*
		Purple	Mifuchi-no-nami*, Nagai-taka-no-tsume*, Kifujin, Koi-murasaki*, Nagai-yuki-komachi, Tennyo-no-kanzashi*
		Bluish purple	Nagai-komurasaki*, Nogawa-no-atari*, Tsumugi-musume*, Nagai-furu-murasaki, Nagai-maiko, Murasaki-no-shizuku, Murasaki-no-tsuru, Murasaki-hotaru*, Murasaki-mimai*
2	Malvidin 3RGac5G (14)	Reddish purple	Kozakura-hime*, Jitsugetsu, Dewa-musume*, Ranzuma, Kasuri-otome*, Tanabata*, Usugoromo,
		Pink	Mogami-no-nagare, Yuki-goromo, Murasaki-gozen
		Bluish purple	Nogawa-no-sagi, Mai-komachi, Fuji-no-kagayaki*, Sazanami
3	Petunidin 3RG5G and Malvidin 3RG5G (3)	Pink	Mifuchi-no-nagare*, Nagai-ja-no-me-gasa*
		Bluish purple	Murasaki-suisho*
4	No anthocyanin (3)	White	Asahi-no-mine, Hayama-no-yuki, Yachi-no-shirasagi
() : Number of cultivars.			
* : The presence of violanin as minor anthocyanin.			

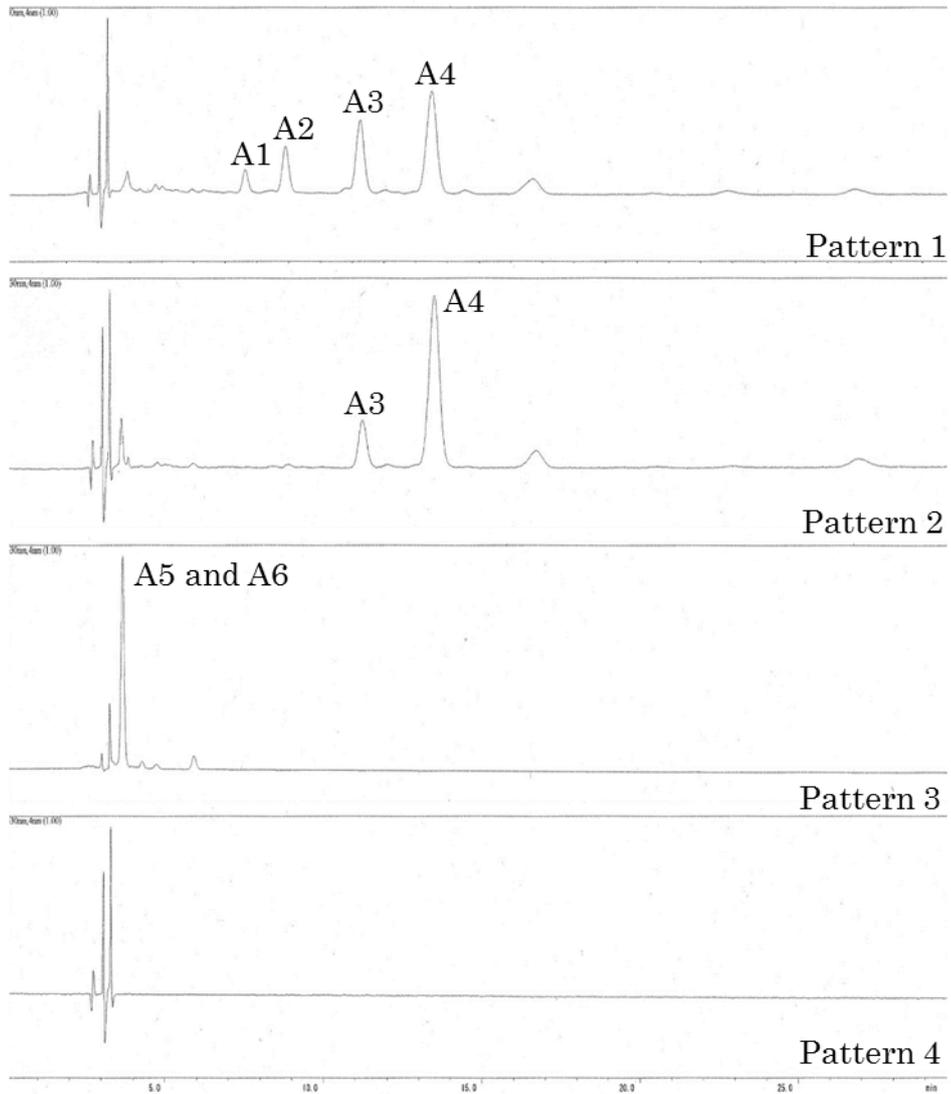


Fig. 2-6. HPLC chromatogram of anthocyanins in Nagai line. Pattern 1: Major anthocyanins is Petunidin 3RGac5G (A1 and A2) and Malvidin 3RGac5G (A3 and A4), Pattern 2: Malvidin 3RGac5G (A3 and A4), Pattern 3: Petunidin 3RG5G (A5) and Malvidin 3RG5G(A6), Pattern 4: No anthocyanin.

Table 2-8. Anthocyanin composition of Nagai line cultivars and the other line cultivars of Japanese garden iris.

Pattern	Anthocyanin composition	Applicable number of	
		Nagai line cultivars	Applicable number of other line cultivars
1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G	32	64
2	Malvidin 3RGac5G	14	4
3	Petunidin 3RG5G and Malvidin 3RG5G	3	1
4	No anthocyanin	3	10
5	Other pattern	0	10
	Total number of cultivars	52	89

パターン1の脱アシル化タイプである Petunidin 3RG5G および Malvidin 3RG5G を主要色素とするパターン3は‘三淵の流’，‘長井蛇の目傘’そして‘紫水晶’の3品種であった (Table 2-7). このパターンには，長井系以外の栽培品種では‘九重の桜’のみが該当した (Table 2-8).

花色が白色の3品種は，アントシアニンが検出されなかったため，全てパターン4に分類された (Table 2-7). 栽培品種では‘鶴ヶ城’のような白花品種，および黄色の‘愛知の輝’のようにアントシアニン以外の色素で花色を発現している品種が該当した (Table 2-8).

第4節 考察

1. 長井系ハナショウブの花の形態と体細胞染色体数および花粉稔性

長井系ハナショウブは，‘長井鷹の爪’と‘長井蛇の目傘’を除く全ての品種が三英花であった. ‘長井鷹の爪’や‘三淵の波’は，ハナショウブの中でも極めて珍しい爪咲きや蓮華咲きの花型をしている品種であり，ハナショウブの花型の多様化にとって有用な品種になると期待される. 実際に，清水 (2004) によって，‘三淵の波’と他の栽培品種との交配により‘鬼柄杓’という花被片の縁が巻き込む蓮華咲きの品種が作出されており，その後も‘三淵の波’の形態特性を有する後代植物が紹介されている (清水 2005).

また，長井系ハナショウブは，基本的に花被片と花被片の間に間隔がある形態をしており，原種のノハナショウブに近い形態を示す. そのため，他の品種群に比べ，素朴な印象を受け，この品種群としての形態特性が長井系ハナショウブの魅力と考えられる. 肥後系の品種のような華やかさには欠けるが，小輪であるが故に，頭 (花) が重くなく倒伏し難いため，生け花の素材としてや，群生させることで集団としての美しさも生まれるため，寄せ植えや花壇用品種として長井系はより適していると考えられる.

これまで，江戸系，伊勢系，および肥後系の品種を用いた体細胞染色体数の調査は，富野 (1963) によってなされ，伊勢系品種の中に $2n=25$ の染色体数を持つ 22 品種が認識されている. しかし，長井系ハナショウブにおける体細胞染色体数の調査はなされていない. そこで，体細胞染色体数の調査を長井系 55 品種とノハナショ

ウブで行った。その結果、これらの染色体数は、すべて $2n=24$ であり、異数体は認識されなかった。長井系ハナショウブの染色体構成は、ノハナショウブと一致しており、原種であるノハナショウブと同一の染色体数でありながら、多様な形態を示していることが分かった。これは、他の二倍体の栽培品種についても同じである（富野 1963）。

長井系ハナショウブ 51 品種とノハナショウブの花粉稔性は、平均 87.0%と高い値を示した。しかし、品種間で花粉稔性に差が見られ、‘葉山の雪’は 4.0%と最も低かった。伊勢系で見つかっている異数体品種 ($2n=25$) は二倍体品種 ($2n=24$) に比べ花粉稔性が低いことが知られている（富野 1963）。異数体品種における稔性の低下は、第一分裂中期での核板上における染色体の配列が正常に行われず、染色体行動に遅延が見られること、さらに後期ではほぼ全ての細胞に遅滞染色体が存在し、それぞれに染色体橋がみられることで、異常分裂を引き起こし大部分が不稔の花粉となることが要因とされている（富野 1963, Yabuya *et al.* 1989, 1992）。しかし、長井系品種では異数体は観察されていない。また、富野（1963）による調査においても、花粉稔性の低い二倍体品種の報告がされており、本研究で予備実験として行った、長井系以外の品種の花粉稔性の調査においても品種間で稔性に差が見られた（Table 2-2）。八重咲きおよび多弁咲き品種の低い花粉稔性は、葯が花弁化し花粉の形成が抑制されることによると推測されるが、葯が健全な状態である通常の二倍体品種における低稔性の要因は不明である。また、花卉園芸植物ではしばしば同様の現象が報告されている。花木ボケ（*Chaenomeles Lindley*）での報告（斎藤・金子 1975）では、同一の染色多数を示す品種間における花粉稔性の差異は、ボケ類において広い変異幅を持った配偶体致死や自家不和合現象の内在や、個々の園芸品種の成立過程に関連があるものと推測されている。今後、長井系を含めた花粉稔性の低いハナショウブ品種についてその要因を探る必要がある。

2. 長井系ハナショウブのアントシアニン

長井系ハナショウブの花被片に含まれる主要アントシアニンとして 6 種類のアントシアニン（A1～A6）が検出された（Fig. 2-4）。

同定された A1~A6 は, Petunidin または Malvidin をアントシアニンとし, アントシアニンの 5-位にグルコースが結合した構造であった (Fig. 2-6).

また, A1~A4 の 4 種類のアントシアニンについては, 以下のよう
に完全な構造決定をすることができた.

A1 : Petunidin

3-*O*-β-[(4'''-*Z*-*p*-coumaroyl-α-rhamnopyranosyl)-(1→6)-β-g
lucopyranoside]-5-*O*-β-glucopyranoside (*Z*-Petanin)

A2 : Petunidin

3-*O*-β-[(4'''-*E*-*p*-coumaroyl-α-rhamnopyranosyl)-(1→6)-
β-glucopyranoside]-5-*O*-β-glucopyranoside (*E*-Petanin)

A3 : Malvidin

3-*O*-β-[(4'''-*Z*-*p*-coumaroyl-α-rhamnopyranosyl)-(1→6)-β-g
lucopyranoside]-5-*O*-β-glucopyranoside (*Z*-Ensatin)

A4 : Malvidin

3-*O*-β-[(4'''-*E*-*p*-coumaroyl-α-rhamnopyranosyl)-(1→6)-β-
glucopyranoside]-5-*O*-β- glucopyranoside (*E*-Ensatin)

その結果, A1, A2, および A3, A4 は, それぞれ Petanin (A1, A2) と Ensatin (A3, A4) の構造異性体 (*Z*-体, *E*-体) であることが判明した.

これまでのハナショウブの園芸品種とノハナショウブでの花色素の分析において, Petanin と Ensatin は, ノハナショウブと多くの栽培品種で検出されることから, これらのアントシアニンによる色素型の組成は, ハナショウブの最も基本的な型とされている (Yabuya 1991). しかし, その 2 つの色素の異性体の決定はハナショウブを用いた分析ではこれまでなされていなかった.

Petunidin 3-*O*-[(4'''-*p*-coumaroylrhamnosyl)-(1→6)-glucoside]-5-*O*-glucoside の *E*-体は, ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) の塊茎から報告されている (Andersen *et al.* 1991). しかし, *Z*-体の報告は本研究が初めてとなる. さらに, ハナショウブでの Malvidin 3-*O*-[(4'''-*p*-coumaroylrhamnosyl)-(1→6)-β-glucopyranoside]-5-*O*-glucoside の *E*-体と *Z*-体の存在も今回が初めての報告

である。Ando *et al.* (1999) によるペチュニア (*Petunia* spp.) の花卉に含まれるアントシアニンの分析によって、Malvidin 3-*O*-[*p*-coumaroylrhamnosyl-(1→6)-glucoside]-5-*O*-glucoside の *E*-体と *Z*-体が報告されているが、これでは *p*-クマル酸とラムノース間の結合様式の決定はなされていない。

また、Petanin と Ensatin では Ensatin の方がより優先的に合成され、*Z*-体と *E*-体では *E*-体が優先的に合成される傾向にあることが定量分析での面積値より示唆された。

A1～A4 に加え主要アントシアニンとして同定された A5 (Petunidin 3-*O*-rutinoside-5-*O*-glucoside) と A6 (Malvidin 3-*O*-rutinoside-5-*O*-glucoside) は、A1, A2 および A3, A4 の *p*-クマル酸によるアシル化がなされていないアントシアニンであった (Fig. 2-6)。この2種類のアントシアニンは、主要アントシアニンとして、ハナショウブの栽培品種‘九重の桜’などから検出されている (Yabuya 1991b, Yabuya *et al.* 2001, Imayama and Yabuya 2003)。

微量アントシアニンとして同定された A7 (Delphinidin 3-*O*-[(4''')-*p*-coumaroylrhamnosyl)-(1→6)-glucoside]-5-*O*-glucoside, Violanin) は、青花品種の育成に有用とされる Delphinidin をアントシアニジンとする色素であり、今回、調査した長井系ハナショウブのうち、29 品種で検出された。Yabuya *et al.* (2001) や Imayama and Yabuya (2003) において、本アントシアニンを主要色素の1つとする園芸品種として‘磯辺’などが報告されているがその数は極めて少ない。

長井系ハナショウブのアントシアニンは、微量アントシアニンとして同定された A7 は Delphinidin をアントシアニジンとする色素であったが、主要アントシアニンのアントシアニジンは Petunidin または Malvidin であった。他の栽培品種における調査では、Petunidin, Malvidin の配糖体のほかに、Cyanidin, Peonidin および Delphinidin 配糖体を主要アントシアニンとする栽培品種が報告されている (Yabuya *et al.* 2001, Imayama and Yabuya 2003)。主要アントシアニンの特性の面からみると、長井系ハナショウブは主要アントシアニンの変異が少なく原種に近い特徴を色濃く残している品種群であると考えられる。これには、長井系ハナ

ショウブが育種されてきた歴史も他の品種群に比べて浅いことも関係していると考えられる。しかし、微量色素としてではあるが、Delphinidin をアントシアニンとする A7 が検出されていることから、今後、育種が進んでいく中で、Delphinidin をアントシアニンとする色素を主とする品種が長井系でも作出される可能性は大きいと考えられる。

3. 長井系ハナショウブの主要アントシアニンに基づく品種の類別

長井系ハナショウブは、主要アントシアニンを基本に4種類のアントシアニンパターンに類別できた。

長井系品種の大部分とノハナショウブが含まれたパターン1は、Petanin (A1, A2) と Ensatin (A3, A4) を主要アントシアニンとするものであり、ハナショウブの基本型と推測されている (Yabuya 1991b)。本研究の結果は、長井系の多くの品種も Yabuya (1991b) が報告しているハナショウブの基本型に含まれることを示している。

パターン2は、Ensatin (A1, A2) を主要色素とするものである。Ensatin は、アントシアニンとして Malvidin を基本とする色素であり、Malvidin 型の色素は他のフラボノイド (Isovitexin) とのコピグメント効率が高いとされているため (Iwashina *et al.* 1996)、パターン2に分類される品種は、ハナショウブの青色花育種にとって有用な遺伝資源となる可能性が高いと考えられた。

パターン3は、パターン1の主要アントシアニンである Petanin と Ensatin の脱アシル化アントシアニン (A5 と A6) を主要とする色素構成であった。これまでに長井系以外の栽培品種では15品種が、本パターンであることが報告されており、該当品種数が少なく、稀な色素パターンである (Yabuya 1991b, Yabuya *et al.* 2001, Imayama and Yabuya 2003)。長井系ではこの稀な色素構成を有する品種が‘三淵の流’、‘長井蛇の目傘’および‘紫水晶’の3品種も存在することが明らかとなった。また、長井系ハナショウブは赤紫や青紫といった花色の品種が多数を占めるが、パターン3に類別された3品種のうち、‘三淵の流’と‘長井蛇の目傘’の2つは、桃色 (ややくすんだ桃紫色) を呈しており、本パターンに類別されている肥後系品種‘九重の桜’も桃色の花色を示すことから、これ

ら2品種は桃色品種の作出に利用できる可能性がある。特に，‘長井蛇の目傘’は六英花であるため，長井系のみならず他の品種群においても，新たな花型と花色を持つ品種の作出が期待できる。

主要アントシアニンではないが，青色発現に有用とされる Delphinidin 型色素の **Violanin** が多くの長井系品種で検出された。今後，**Violanin** をより多量に蓄積する品種間での交配から、青色花品種の育成が可能となるだろう。

本研究の調査で，異なる花色を示す品種が同じ色素パターン内に類別された。既存の報告でも同様に色素構成型内での花色の差異が観察されている (Yabuya 1991b, Yabuya *et al.* 2001, Imayama and Yabuya 2003)。ハナショウブの花色発現には，アントシアニンだけでなくその他のフラボンとのコピグメンテーションが関与していることが知られている (Iwashina *et al.* 1996)。また，ハナショウブと同じアヤメ属に分類されるダッチアイリスにおいても同様の報告がなされている (Mizuno *et al.* 2013)。そのため，同じ構成パターン内での花色の違いは，おそらく，品種間のその他のフラボンの質的あるいは量的な違いによるものと推測される。今後，長井系ハナショウブの花色発現の詳しい特性を明らかとするために，その他のフラボンとの関係を明らかにする必要がある。

これらのことから，長井系ハナショウブは，計 58 品種と小さな品種群ではあるが，‘三淵の波’といった蓮華咲きの魅力的な三英花や，‘長井鷹の爪’という非常に珍しい爪咲きの品種，および‘長井蛇の目傘’といった六英花も存在し，その花型の多様性は大きく，今後，ハナショウブの花型の多様化に貢献する育種素材と考えられる。また，小輪で可憐な花型は生け花や寄せ植え等への利用に有効であると考えられる。

長井系ハナショウブの花被片から，主要アントシアニンとして 6 種類のアントシアニン (A1~A6) を同定した (Fig. 2-5)。A1, A2 および A3, A4 は，それぞれ **Petanin** と **Ensatin** の構造異性体 (*E*-, *Z*-体) であることが判明し，ハナショウブにおけるこれら 4 成分の完全な構造決定は最初の報告である。

長井系ハナショウブは，主要アントシアニンを基に，4つの色素構成パターンに大別できた (Table 2-7, Fig. 2-6)。アントシアニンを含まない白花品種が属するパターン 4 以外の色素パターンは，

Petunidin 配糖体と Malvidin 配糖体を主要アントシアニンとする品種からなる。ハナショウブでは Petunidin 配糖体の Petanin および、Malvidin 配糖体の Ensatin の 2 成分を主要とする色素組成が最も基本的なパターンとされている。長井系ハナショウブにおいてもこの 2 成分を主とするパターン 1 に類別される品種が最も多く、他のパターンもパターン 1 の変異型であることから、長井系は、花色素の面からも原種に近い野生的な品種群であることが示唆された。しかし、これまでに約 30 パターンもの色素組成がハナショウブでは報告されているが (Yabuya 1991b, Yabuya *et al.* 2001, Imayama and Yabuya 2003), 報告されている色素パターンの中でも、該当品種数が少なく希少な組成であるパターン 3 に該当する品種が長井系では 3 品種も存在すること、さらに、パターン 2 のようにその他のフラボンとのコピグメント効率が高いとされる Malvidin 配糖体の Ensatin を主要とする品種や、微量色素としてはあるが、青色発現に有用とされている Delphinidin 型の Violanin を含む品種が長井系ハナショウブから多数検出されたことから、長井系ハナショウブはハナショウブの多彩化育種の有用な遺伝資源になると考えられた。

第3章 長井系ハナショウブ3品種より得た後代植物の特性

第1節 緒言

ハナショウブの育種は，江戸時代，松平菖翁（1773～1856）によって積極的になされ江戸系として発展し，その後，三重県（伊勢）や熊本県（肥後）でも育種が進められ，伊勢系，肥後系として発展した．しかし，本種の育種は，無類のハナショウブ好きの人々によって行われていることや，野生種の自然突然変異個体や実生での変異個体を栄養繁殖で増殖させ，そのまま品種とすることがほとんどのため，育種過程が明確にされている品種は少ない．

ハナショウブの育種に関しては，ハナショウブ育種の始祖とも言うべき松平菖翁が嘉永6年に記した「花菖培養録」（現代語訳，加茂 1994）の中で，僅かに述べている．菖翁は，日本各地のハナショウブあるいは，花且美（はなかつみ），花あやめと呼ばれる植物を集め，3代，4代と実生を育成し，その中から業（芸，変化）のある花を選抜し，100品種以上もの優秀花を生んできたとある．100以上もの品種を作出する間には，各地のハナショウブ，花且美，花あやめによって，ノハナショウブと似た花のみを出現する実生や，親と異なる様々な形態を示す実生をもたらすものなどがあること，何世代も実生を育成していくと，八重咲き，爪咲き，縮緬花卉といった珍しい花型の個体が出現することが記されている．また，ハナショウブの桃色品種の育種は光田義男氏によって進められてきた（加茂 2001）．光田氏は，昭和35年から，平尾秀一氏が作出した‘桜獅子’を材料に，桃色系品種の育種に着手し，昭和43年に桃色系品種‘桃山の宴’と‘桃花扇’を作出し，その後，多くの桃色品種を生み出している．光田氏により作出された品種の育種過程はご本人により公開されている（光田 1996）．また，近年ではハナショウブの多彩化を目的として，キショウブやカキツバタ，ジャーマンアイリスなど他のアヤメ属植物との雑種の育成も進められており，雑種植物の特性に関する報告もなされている（富野・桜井 1972, Yabuya and Noda 1998, Shimizu *et al.* 1999, Tsukatani *et al.* 2002）．その中で，雑種は両親の中間の形質を示すことが多く，花色素に関しては，両親種の花色素を両方発現することがカキツバタとの雑種で報告されている（Yabuya and Noda 1998）．しかし，ハナショウブ内での花色や花色素の変異状況を，世代を重ねて観察した報告は少なく，特に長井系に関してはほと

んどない。

本章では、実験 1 として、長井系ハナショウブ ‘爪紅’，‘三淵の流’ および、長井系を親とし加茂花菖蒲園にて育成された ‘薄紅’ の 3 品種と、それらの自然交配より得た種子から展開した実生第一代植物 (Op_1) の形態調査、花粉稔性、種子稔性調査および花色素の分析を通して、次代での形態、主に花被片の特徴と花色素の変異状況を調査した。次に、実験 2 として、最も花被片の形態に変異が認められた ‘爪紅’ から得た Op_1 植物を自家受粉して得た種子から自殖次代植物 (Op_1S_1) を展開し、世代を重ねることでの花被片の形態の分離状況、および色素構成の変異の有無を調査した。さらに実験 3 として、 Op_1S_1 植物の中から出現した矮性個体の特性調査および、矮性個体を自殖して得た自殖第二代植物 (Op_1S_2) を展開し、その形態を調査した。これら、実験 1 ~ 3 を通し、長井系ハナショウブの育種学的な利用に関する知見を得ることを試みた。

第 2 節 材料および方法

1. 植物材料

本章の実験 1 で用いた Op_1 植物は、種子親である長井系ハナショウブ ‘爪紅’，‘三淵の流’ および長井系ハナショウブを親に用いて育成された栽培品種 ‘薄紅’ の 3 品種 (Fig. 3-1) の自然交配によって得られた集団である。‘爪紅’ からは 32 個体，‘三淵の流’ からは 8 個体，‘薄紅’ からは 25 個体の計 63 個体の Op_1 植物を用いた。

実験 2 で用いた Op_1S_1 植物は、実験 1 の結果から、最も花の形態に変異が見られ，‘爪紅’ の Op_1 植物の 8 系統 (Fig. 3-2) の自殖次代植物である。すなわち、各系統の特性をより反映している Op_1 植物 1 個体，計 8 個体の自殖種子を展開した計 738 個体を用いた。

実験 3 では、 Op_1S_2 植物で出現した矮性個体および、それら矮性個体の自殖によって得た自殖第二代植物 (Op_1S_2) を用いた。

2. 実験項目

【実験 1：長井系ハナショウブ 3 品種より得た Op_1 植物の特性の調査】

(1) 形態調査

花色の調査は、 Op_1 植物の開花期に一番花または二番花について、種子親の花色を肉眼的に調査した。

花高は、地際から内花被の先までの高さとし、外花被の縦の長さ と横幅を測定し花の大きさとした。



Fig. 3-1. Three cultivars used as pistillate parent.
a: 'Tsumabeni' b: 'Mifchi-no-nagare'
c: 'Usubeni'.



Fig. 3-2. Division of Op_1 progenies obtained from 'Tsumabeni' through natural hybridization.
 1: Kakkodori type, 2: Wild species type, 3: Nagai-komurasaki type, 4: Deep Nagai-komachi type,
 5: Nagai-komachi type, 6: Tsumabeni type, 7: Light blue type, 8: White type.

Op_1S_1 植物で出現した矮性個体の花色の調査は、開花期に一番花または二番花について、種子親の花色を基にして調査した。

花高は、通常の Op_1S_1 植物と同様に、地際から内花被の先までの高さとし、外花被の縦の長さと同幅を測定し花の大きさとした。

矮性個体の自殖第二代植物 (Op_1S_2) の形態調査は、ビニールポットに移植後約 2 か月後に行い、地際から葉の先までの長さ(草丈)と、葉の幅を調査した。

(2) 花粉稔性

矮性個体を用いて、第 2 章と同様の方法で行った。

(3) 種子稔性調査

各矮性個体を自家受粉し、交配花数/得られた充実種子数から、種子稔性を算出した。

(4) 斑入り個体の葉の細胞観察

矮性個体の自殖第二代植物 (Op_1S_2) の中から出現した葉に白く斑の入る個体 1 個体と、斑入り個体と同じ矮性個体を親とする葉が緑色の正常個体 (Op_1S_2) 1 個体の計 2 個体を用いて、それぞれの葉を薄く剃刀でスライスし、スライスした葉の切片を水で濡らしてスライドグラス上に乗せ、カバーグラスを被せ、光学顕微鏡下で葉の細胞を観察した。

第 3 節 実験結果

実験 1. 長井系ハナショウブ 3 品種より得た Op_1 植物の特性の調査

1. 形態学的調査

① ‘爪紅’ から得られた Op_1 植物の形態学的特性

‘爪紅’ の自然交配から得た 32 個体の Op_1 植物は、播種後 2 年目の春に全個体が開花した。その結果、内花被・外花被ともに純白のもの、内花被全体が紫に着色するもの、外花被に脈が入るものなど、‘爪紅’ (Fig. 3-1a) と異なる花色が観察された。

この花色の変異をもとにして、次のような 8 系統に類別した (Fig. 3-2)。

【系統 1 郭公鳥型】

長井古種 ‘郭公鳥’ のように紅紫の脈入りの個体。

【系統 2 ノハナショウブ型】

ノハナショウブに似る個体.

【系統3 小紫型】

長井古種‘長井小紫’のように紺紫色の三英花.

【系統4 濃い長井小町型】

白地に紫の脈が入る長井古種‘長井小町’より濃い脈が入る個体.

【系統5 長井小町型】

‘長井小町’に似た個体.

【系統6 爪紅型】

親の‘爪紅’に似る個体.

【系統7 水色型】

内花被・外花被ともに薄い水色を呈する個体.

【系統8 純白型】

内花被・外花被ともに純白の個体.

類別した‘爪紅’の8系統ごとに花高(草丈)・外花被の大きさの測定結果をTable 3-1に示した. ‘爪紅’自身の花高は76 cmであったが, 水色型では平均126 cmと最も高くなった. Op₁植物は, 親と比較すると全体的に花高が20 cmほど高くなる傾向があった. 外花被の大きさは郭公鳥型・濃い長井小町型・水色型では縦の大きさと横幅がほぼ同じで丸型の花弁となった. その他の系統は花弁が縦に長くなる形であった.

また, ‘爪紅’およびこれからのOp₁植物の花粉稔性をTable 3-1に示した. ‘爪紅’は95.7%と高い花粉稔性であった. 一方, ‘爪紅’から得たOp₁植物の平均花粉稔性は93.2%で, 親である‘爪紅’とほぼ同じ値となった.

② ‘三淵の流’から得られたOp₁植物の形態学的特性

‘三淵の流’の自然交配による個体は, 8個体のうち6個体で開花がみられた.

開花した6個体の中には, 純白のもの, 四英咲きのもの, 花弁が広がらず巻いているものといった親(Fig. 3-1b)と異なる花形がみられた.

この花色と花形の違いをもとにして, 3つの系統に類別した(Fig. 3-2).

Flower types	No. of plants observed	Flower colors	Plant height(cm)	Outer perianth		Pollen fertility(%)
				Length(cm)	Width(cm)	
1. Kakkodori type	3	Bluish purple	96.6	7.5	7.0	90.2
2. Wild species type	4	Reddish purple	112.5	7.5	4.5	96.6
3. Nagai-komurasaki type	1	Bluish purple	72.0	6.5	5.0	95.4
4. Deep nagai-komachi type	5	Purple	91.6	6.5	5.0	95.9
5. Nagai-komachi type	3	Purple	108.5	7.9	6.0	95.9
6. Tsumabeni type	8	Light pink	101.3	7.4	5.8	93.2
7. Light blue type	2	Light blue	126.0	8.3	7.3	99.1
8. White type	10	White	104.0	7.6	6.2	92.2
Female plant 'Tsumabeni'	1	Light pink	76.0	7.0	5.5	95.7
Total or mean±S.D.	37		102.7±16.0	7.5±1.0	6.1±1.4	93.21±6.36



**Fig. 3-3. Division of Op_1 progenies obtained from 'Mifuchi-no-nagare' through natural hybridization.
1: Mifuchi-no-nagare type, 2: White type, 3: Deformity type.**

【系統1 三淵の流型】

親である‘三淵の流’に似た個体.

【系統2 純白型】

内花被片・外花被片ともに純白の個体.

【系統3 奇形型】

花形に異常が見られた個体.

‘三淵の流’の系統ごとの形態調査の結果を Table 3-2 に示した. ‘爪紅’から得られた Op₁ 植物は親よりも花高が高くなったが, ‘三淵の流’から得られた Op₁ 植物は親との差がほとんどなかった. 外花被の大きさは, どの個体も縦長となる傾向があった. 外花被の大きさに個体間の差はほとんどなく, 純白型がやや小さかった. ‘三淵の流’とこれから得た Op₁ 植物の花粉稔性は, ‘三淵の流’は 93.7%そして Op₁ 植物の平均花粉稔性は 95.9%であった (Table 3-2). ‘爪紅’から得た Op₁ 植物と同様に, ‘三淵の流’から得た Op₁ 植物においても高い花粉稔性を示した.

③ ‘薄紅’から得られた Op₁ 植物の形態学的特性

‘薄紅’の自然交配から得た Op₁ 植物 25 個体のうち, 20 個体が開花した. これらの個体は, Fig. 3-4 で示したように, ノハナショウブに似るものや外花被に脈が入るといった親 (Fig. 3-1c) と異なる花色が観察された.

花色の違いをもとに, 以下の 8 系統に類別した (Fig.3-4).

【系統1 郭公鳥型】

長井古種‘郭公鳥’のように紅紫の脈入りの個体.

【系統2 ノハナショウブ型】

ノハナショウブに似る個体.

【系統3 濃い薄紅型】

親の‘薄紅’よりも濃い紅色を呈する個体.

【系統4 薄紅型】

‘薄紅’に似る個体.

【系統5 薄い薄紅型】

親である‘薄紅’よりも花色の薄い個体.

Flower types	No. of plants observed	Flower colors	Plant height(cm)	Outer perianth		Pollen fertility(%)
				Length(cm)	Width(cm)	
1. Mifuchi-nornagare type	2	Light pink	108.5	7.4	5.3	95.8
2. White type	2	White	117.0	6.0	4.5	96.1
3. Deformity type	3	Light pink	108.7	7.1	4.9	-
Female plant 'Mifuchi-no-nagare'	1	Light pink	115.0	7.2	4.0	93.7
Total or mean±S.D.	8		111.0±8.1	6.9±0.8	4.9±0.5	95.9±2.09



Fig. 3-4. Division of Op_1 progenies obtained from 'Usubeni' through natural hybridization.

- 1: Kakkodori type, 2: Wild species type, 3: Deep Usubeni type, 4: Usubeni type,
 5: Light Usubeni type, 6: Tsumabeni type. 7: White type, 8: Deformity type.

【系統6 爪紅型】

長井古種‘爪紅’に似た個体。

【系統7 純白型】

内花被片・外花被片ともに純白の個体。

【系統8 奇形型】

花形に異常が見られた個体。

類別した系統ごとの花高(草丈)・外花被の大きさの測定結果を Table 3-3 に示した。花高はノハナショウブ型が 145 cm と最も高かったが、爪紅型と奇形型は 73 cm と低くなり、その他の系統は 100 cm 前後となった。外花被の大きさは、爪紅型・純白型・奇形型が 4.5~5.0 cm と 8 系統全体の平均値よりも小型となった。外花被の縦の大きさと横幅に差はほとんどなく、全体的に丸型の花弁となった。

‘薄紅’およびこれからの Op_1 植物の花粉稔性を Table 3-3 に示した。‘薄紅’の花粉稔性は 92.0% であり、これの Op_1 植物は、86.9% であった。‘薄紅’から得た Op_1 植物の花粉稔性は、‘爪紅’および‘三淵の流’から得た Op_1 植物と比較するとやや下がるが、80% 以上の高い花粉稔性を有することがわかった。

2. Op_1 植物の交配結果

① ‘爪紅’から得られた Op_1 植物の自殖による種子稔性

Op_1 植物のタイプごとの自家受粉の結果を Table 3-4 に示した。結莢状況は交配花数 127 に対し、結莢数 122 であり、交配した花から莢がほぼ得られた。1 莢あたりの平均種子数は 78.4 粒、平均種子稔性は 75.3 粒であった。種子稔性を 8 つの系統ごとで見ると、ノハナショウブ型が 52.1 粒と低く、純白型と濃い長井小町型が 88.6 粒、84.2 粒と高い値となった。なお、3 つの自然交配の莢を得た。その種子稔性は 76.3 粒と自家受粉した結果とほぼ差はなかった。

② ‘三淵の流’から得られた Op_1 植物の交配結果

‘三淵の流’から得た Op_1 植物の交配結果を Table 3-5 に示した。交配に使用した個体数が 6 個体と、少ないだけでなく、花数自体が 1 個体あたり 1~3 花と少数であったため得られた交配花数が‘爪紅’と‘薄紅’から得た個体より少なかった。しかし、交配した花の全て

Flower types	No. of plants observed	Flower colors	Plant height(cm)	Outer perianth		Pollen fertility(%)
				Length(cm)	Width(cm)	
1. Kakkodori type	4	Bluish purple	96.0	7.3	5.4	90.4
2. Wild species type	1	Reddish purple	145.0	7.3	5.0	93.4
3. Deep Usubeni type	2	Reddish purple	88.0	6.4	5.0	88.8
4. Usubeni type	4	Pink	102.3	6.6	5.1	91.7
5. Light Usubeni type	9	Light pink	100.1	7.1	5.1	86.1
6. Tsumabeni type	2	Light pink	73.0	4.5	4.5	93.0
7. White type	5	White	110.0	5.7	4.7	77.7
8. Deformity type	1	Light purple	73.0	4.5	4.5	-
Female plant 'Usumabeni'	1	Light pink	70.0	5.3	4.2	92.0
Total or mean±S.D.	29		99.8±20.1	6.5±0.9	5.0±0.4	86.9±10.67

Table 3-4. Seed fertility of self-pollination in Op₁ progenies obtained from 'Tsumabeni' by natural hybridization.

Flower types	No. of		No. of		No. of		Seed fertility (B/A)
	plants observed	flowers pollinated (A)	pots obtained	seed harvested (B)			
1. Kakkodori type	2	12	12	944	78.7		
2. Wild species type	2	7	7	365	52.1		
3. Nagai-komurasaki type	1	5	5	351	70.2		
4. Deep Nagai-komachi type	5	16	16	1418	88.6		
5. Nagai-komachi type	6	20	19	1519	79.9		
6. Tsumabeni type	7	30	28	2129	76.0		
7. Light blue type	2	11	11	817	74.3		
8. White type	6	26	24	2021	84.2		
Total ±S.D.	31	127	122	9564	75.3±11.05		

Table 3-5. Seed fertility of self-pollination in Op_1 progenies obtained from 'Mifuchi-no-nagare' by natural hybridization.

Flower types	No. of		No. of		No. of		Seed fertility (B/A)
	plants observed	flowers pollinated (A)	pots obtained	seed harvested (B)	Seed		
1. Mifuchi-no-nagare type	1	1	1	21	21.0		
2. White type	2	5	5	445	89.0		
3. Deformity type	3	5	5	271	54.2		
Total \pm S.D.	6	11	11	737	67.0 \pm 34.0		

から莢が得られ，平均種子稔性は 67.0 粒であった．

③ ‘薄紅’から得られた Op₁ 植物の交配結果

自家受粉の結果を Table 3-6 に示した．交配花数 53 に対し，得られた莢の数は 49 と ‘爪紅’ から得られた Op₁ 植物の交配結果と同じく，交配した花から莢をほぼ得ることができた．平均種子稔性は 66.9 粒であった．薄紅型の種子稔性が 41.3 粒と最も低い値となったが，‘薄紅’より得た Op₁ 植物は，‘爪紅’より得た Op₁ 植物よりも平均種子稔性が低い．しかし，系統 1 「郭公鳥型」は 135.0 粒と，‘爪紅’，‘三淵の流’の Op₁ 植物を含め，Op₁ 植物全体で最も高い値であった．

3. Op₁ 植物の色素分析

① 主要アントシアニン組成に基づく類別

長井系 3 品種，およびこれらから得た Op₁ 植物の花被片に含まれるアントシアニンの定量分析を行った．その結果，主要アントシアニンとして検出された 6 種類のアントシアニンは，第 2 章第 3 節にて同定されたアントシアニン A1～A6 と同じものであった．

主要アントシアニンの構成をもとに，3 品種から得た Op₁ 植物を以下の 4 つのパターンに類別した (Fig. 3-5)．

- パターン 1 : Petunidin 3RGac5G (A1, A2) と Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を主要アントシアニンとするもの
- パターン 3 : Petunidin 3RG5G (A5) および Malvidin 3RG5G (A6) を主要アントシアニンとするもの
- パターン 4 : アントシアニンを含まないもの
- パターン 5 : Petunidin 3RGac5G (A1, A2) と Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を含まず，様々な微量色素で構成されるもの

パターン 1 は前章第 3 節と同様に，主要アントシアニンとして Petanin (A1, A2) Ensatin (A3, A4) を有する Op₁ 植物である．本パターンには ‘爪紅’ と ‘薄紅’ から得た Op₁ 植物が該当し (Table 3-7, Table 3-9)，‘三淵の流’ から得た Op₁ 植物からはパターン 1 に属する Op₁ 植物は見つからなかった (Table 3-8)．種子親である ‘爪

Table 3-6. Seed fertility of self-pollination in Op₁ progenies obtained from 'Usubeni' by natural hybridization.

Flower types	No. of		No. of		No. of		Seed fertility (B/A)
	plants observed	flowers pollinated (A)	pots obtained	seed harvested (B)	seed harvested (B)	fertility (B/A)	
1. Kakkodori type	2	4	4	540	135.0		
2. Wild species type	1	4	4	442	110.5		
3. Deep Usubeni type	2	4	4	250	62.5		
4. Usubeni type	4	17	15	702	41.3		
5. Light Usubeni type	7	16	14	854	53.3		
6. Tsumabeni type	1	1	1	50	50.0		
7. White type	3	6	6	392	65.3		
8. Deformity type	1	1	1	50	50.0		
Total ±S.D.	21	53	49	3280	61.9±33.5		

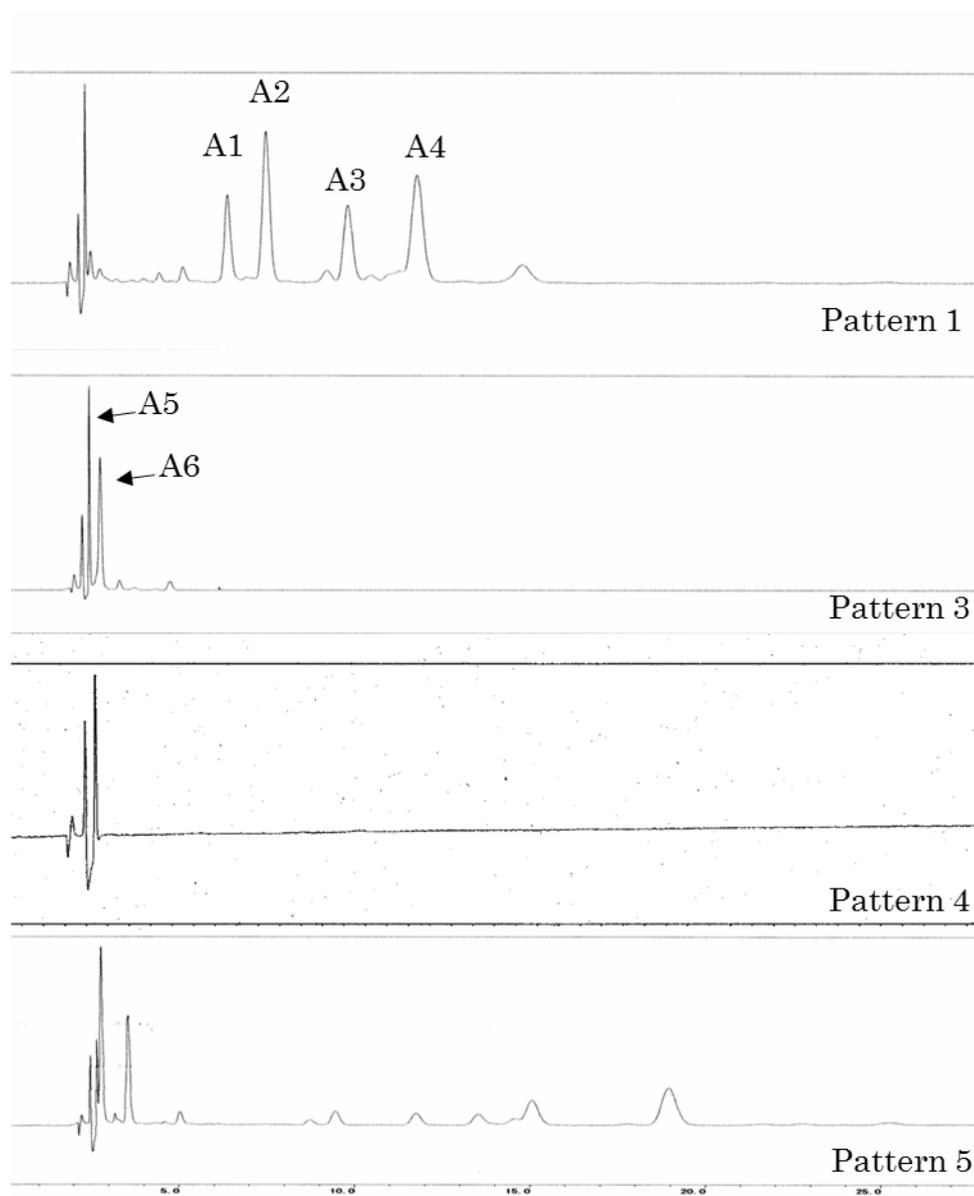


Fig. 3-5. Anthocyanin patterns of Op_1 plants obtained from 'Tsumabeni', 'Mifuchi-no-nagare' and 'Usubeni' of Nagai line through natural hybridization. Pattern 1: Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4), pattern 3: Petunidin 3RG5G(A5) and Malvidin 3RG5G(A6), pattern 4: No anthocyanin, pattern 5: Many anthocyanin without Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G.

Table 3-7. Division based on major anthocyanin composition in Op ₁ progenies obtained from 'Tsumabeni' by natural hybridization.				
Flower types	Flower colors	Pattern	Anthocyanin composition	
Female plant 'Tsumabeni'	Light pink	1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G	
1. Kakkodori type	Bluish purple	1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G	
2. Wild species type	Reddish purple	1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G	
3. Nagai-komurasaki type	Bluish purple	1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G	
4. Deep Nagai-komachi type	Purple	1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G	
		5	Many anthocyanin without Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G	
5. Nagai-komachi type	Purple	1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G	
6. Tsumabeni type	Light pink	1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac6G	
		5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G	
7. Light blue type	Light blue	1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G	
8. White type	White	4	No anthocyanin	

Table 3-8 Division based on major anthocyanin composition in Op ₁ progenies obtained from 'Mifuchi-no-nagare' by natural hybridization.			
Flower types	Flower colors	Pattern	Anthocyanin composition
Female plant 'Mifuchi-no-nagare'	Light pink	3	Petunidin 3RG5G and Malvidin 3RG5G
1. Mifuchi-no-nagare type	Light pink	3	Petunidin 3RG5G and Malvidin 3RG5G
2. White type	White	4	No anthocyanin
3. Deformity type	Light pink	3	Petunidin 3RG5G and Malvidin 3RG5G

Table 3-9. Division based on major anthocyanin composition in Op ₁ progenies obtained from 'Usubeni' by natural hybridization.			
Flower types	Flower colors	Pattern	Anthocyanin composition
'Usubeni'	Light pink	1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G
1. Kakkodori type	Bluish purple	1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G
2. Wild species type	Reddish purple	1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G
3. Deep Usubeni type	Reddish purple	1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G
4. Usubeni type	Pink	1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G
5. Light Usubeni type	Light pink	1	Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G
		5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G
		3	Petunidin 3RG5G and Malvidin 3RG5G
6. Tsumabeni type	Light pink	5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G
7. White type	White	4	No anthocyanin
8. Deformity type	Light purple	5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G

紅’ と ‘薄紅’ も本パターンに該当した。

パターン 3 は、前章第 3 節におけるパターン 3 と同じく **Petunidin 3RG5G (A5)** および **Malvidin 3RG5G (A6)** を主要アントシアニンとして含有したものであった。パターン 3 には、‘三淵の流’ とその **Op₁** 植物の全てが該当し (Table 3-8)、本パターンは、‘爪紅’ の **Op₁** 植物からは見られず (Table 3-7)、『薄紅’ の **Op₁** 植物では系統 5 「薄い薄紅型」 に属する個体の中で見られた (Table 3-9)。

パターン 4 は、アントシアニンを含まない白花個体がこれに相当する。

パターン 5 は、パターン 1 で主要アントシアニンであった **Petanin** と **Ensatin** がほとんど検出されず、多種類のアントシアニンで構成されるものであった。‘爪紅’ と ‘薄紅’ の **Op₁** 植物ではこのパターン 5 に含まれる個体が認められた (Table 3-7, Table 3-9)。このパターンは、長井系品種においても予備実験として調査した他の栽培品種においても該当する品種は見いだせなかった。

②微量色素としての **Violanin** の検出

今回の調査から、‘爪紅’ と ‘薄紅’ およびこれらの **Op₁** 植物から、青色花育種に重要とされる **Delphinidin** 型の色素 **Violanin** が微量成分として検出された。

このことから、長井系ハナショウブの、青花育種の材料としての利用と、次代での **Violanin** の発現が示されたことで、**Violanin** の蓄積育種が可能であることが示唆された。

一方、‘三淵の流’ とその **Op₁** 植物から **Violanin** は検出されなかった。しかし、‘三淵の流’ とその **Op₁** 植物は、600 品種以上分析されているハナショウブにおいて、現在までに 17 品種からしか報告がされていない重要な色素組成であることや、予備実験で同じ色素組成パターンに類別された ‘九重の桜’ や、既存の報告で本パターンに分類される品種が淡いピンク色の花色を呈するものが多いことから、桃色品種の育成にとって ‘三淵の流’ とその **Op₁** 植物は有用であると考えられる。

前記の実験1の結果より，長井系品種‘爪紅’および‘薄紅’から得た Op_1 植物は，親とは異なる花となり変異に富むことが示された．さらに，花色素の構成パターンにおいても変異が見られ，青色花品種に有効とされる Delphinidin 型のアントシアニンである Violanin が微量ではあるが検出されたことから，Violanin の後代への伝達が可能であることを示した．また，‘三淵の流’とその Op_1 植物は，ハナショウブでも珍しい色素構成であるパターン3であった．以上のことから，長井系ハナショウブとその後代植物はハナショウブの花型および花色を多様化させる遺伝資源として有用であると考えられた．

実験2．長井系ハナショウブ‘爪紅’の Op_1 植物の自殖後代 (S_1Op_1) の特性

長井系ハナショウブ‘爪紅’の Op_1 植物は，実験1において花の色や形に大きな変異がみられた．また，色素構成に関しても，3パターンの色素組成が示され，質的な変異も生ずることがわかった．実験2ではさらに，8つの系統に類別された‘爪紅’の Op_1 植物から得た自殖次代植物 (S_1Op_1) における諸特性の遺伝を調査するために計738個体を栽培した．そのうち開花した487個体の S_1Op_1 植物について形態調査および花被片に含まれるアントシアニンの分析を実施した．

1． S_1Op_1 植物の形態的特性の調査

形態調査の結果， S_1Op_1 植物においても花色や形態に変異がみられた．中には， Op_1 植物ではみられなかった花の模様や花弁構造を有する個体も出現した．実験2では，開花した各系統の S_1Op_1 植物の花色の特徴を基にして，Fig. 3-6～Fig. 3-13に示したように， S_1Op_1 植物を各系統内で2～7タイプに細分した．

①系統1「郭公鳥型」 Op_1 植物からの S_1Op_1 植物

この系統の S_1Op_1 植物は136個体得られたが，そのうち107個体が開花した．花の特徴から，次のようにタイプ分けする事が出来た (Table 3-10, Fig. 3-6)．

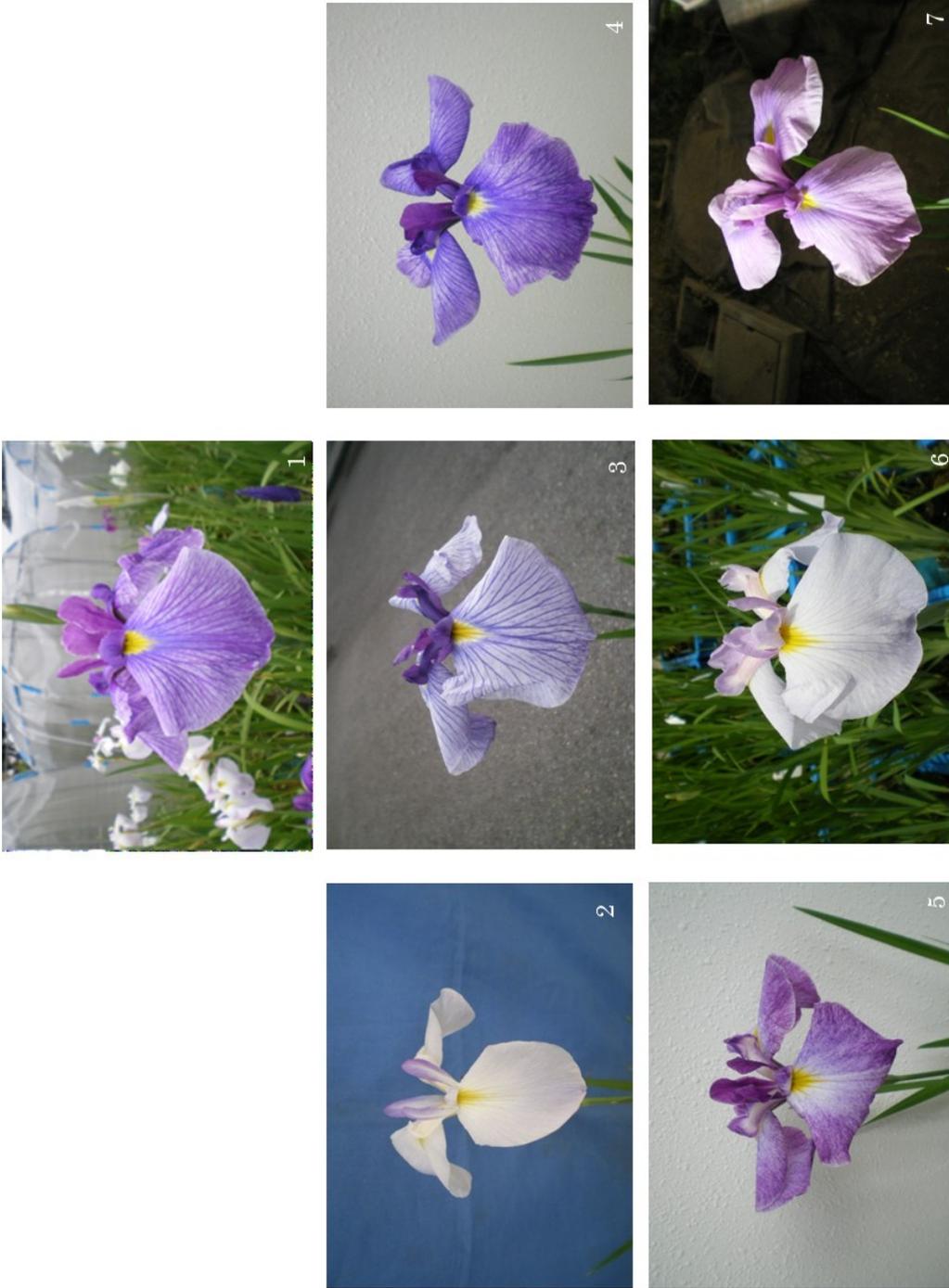
【タイプ1 ‘爪紅’に類似するもの】

このタイプは，46個体が得られ，長井系ハナショウブ‘爪紅’

Table 3-10. Morphological characters of S₁Op₁ progenies obtained from Kakkodori type (Op₁) by self-pollination.

Generation	Flower types	Flower colors	Plant		Outer perianth		Pollen fertility(%)
			height(cm)	Length(cm)	Width(cm)		
P	Female plant 'Tsumabeni'	Light pink	76.0	7.0	5.5	95.7	
Op ₁	Kakkodori type	Bluish purple	96.6	7.5	7.0	90.2	
S ₁ Op ₁	Tumabeni type	Light mauve (46)*	74.6±10.66	6.9±0.80	4.7±0.62	90.0±8.60	
	White type with purple stripe	Bluish purple (10)	77.3±9.30	7.7±0.80	6.7±0.62	86.6±14.37	
		Smoky purple (2)	63.8±8.34	7.0±0.35	6.0±0.63	84.5±6.71	
	Stripe on color type	Bluish purple (6)	76.4±6.72	7.6±0.53	6.9±1.23	76.8±27.06	
		Smoky purple (2)	72.6±13.06	8.0±0.84	7.2±1.04	84.5±5.01	
		Reddish purple (8)	72.2±6.36	7.7±0.98	6.0±0.49	92.1±50.60	
	Sunago type	Bluish purple (4)	80.7±3.39	7.3±1.32	6.7±1.40	89.3±4.53	
		Smoky purple (2)	63.1±6.64	7.5±0.70	6.4±1.20	92.5±1.48	
		Reddish purple (2)	63.4±17.60	7.8±1.76	6.9±1.13	97.8±3.81	
	White outer perianth type	White (6)	71.7±5.99	6.9±0.66	4.5±0.30	88.5±5.53	
	Pink type	Pink (19)	69.9±13.63	7.1±1.05	5.1±1.61	86.5±15.62	

*: No. of plants categorized



**Fig. 3-6. Morphological characters of S_1Op_1 progenies obtained from self pollination of Kakkodori type (Op_1) in 'Tsumabeni'.
 1: Op_1 plant of Kakkodori type obtained from 'Tsumabeni' through natural hybridization, 2: Tsumabeni type (S_1Op_1),
 3: White type with purple stripe (S_1Op_1), 4: Stripe on color type (S_1Op_1), 5: Sunago type (S_1Op_1), 6: White outer perianth type
 (S_1Op_1), 7: Pink type (S_1Op_1).**

とよく似た花の特徴を示す。すなわち，外花被は白または白に近い藤色，内花被の先端または先から中腹にかけて色づく (Table 3-10, Fig. 3-6-2)。

【タイプ 2 白地に脈が入るもの】

外花被が白地で，花被片に紫や青紫といった脈が入る個体をこのタイプとした。このタイプには 12 個体が該当し，それらの内花被は赤紫や青紫，桃色に着色する傾向にあった (Table 3-10, Fig. 3-6-3)。

【タイプ 3 濃い色地に脈が入るもの】

タイプ 3 は，外花被が紫，青紫，薄赤紫などの色地で，そこに紫，青紫および赤紫の脈が入る。内花被は赤紫や紫に色づき，色はほぼ全体に入る特徴をもつ 16 個体が該当した (Table 3-10, Fig. 3-6-4)。

【タイプ 4 砂子】

このタイプは，外花被に砂のような模様がある個体である。この特徴は Op_1 植物では見られなかったもので，8 個体が該当する (Table 3-10, Fig. 3-6-5)。

【タイプ 5 外花被が白または藤色のもの】

タイプ 5 は，内花被にやや色が入り，外花被は白または藤色で，時たま縁が薄紫に染まるものや，僅かに藤色の縞が入る 6 個体が該当した (Table 3-10, Fig. 3-6-6)。

【タイプ 6 桃色】

内花被・外花被ともに薄紅色から桃色の個体で，中には紫の脈が入るものもあった。このタイプの 19 個体は，他のタイプの個体に比べて，紫味（青味）が弱い (Table 3-10, Fig. 3-6-7)。

花粉稔性を，各系統の開花した個体で調査した。その結果，系統 1 「郭公鳥型」の S_1Op_1 植物の花粉稔性は 76.8～97.8%であった (Table 3-10)。各系統とも花型間で多少のばらつきが見られた。

②系統 2 「ノハナショウブ型」 Op_1 植物からの S_1Op_1 植物

この系統は、ハナショウブの野生種といわれるノハナショウブに似た Op_1 植物の自殖種子から発芽した S_1Op_1 植物である。32 個体中 22 個体が開花した。開花した個体を次のように分けた (Table 3-11, Fig. 3-7).

【タイプ 1 ノハナショウブ型】

ハナショウブの原種とされているノハナショウブに似た、内花被・外花被ともに紫色の 10 個体である (Table 3-11, Fig. 3-7-2).

【タイプ 2 くすんだ紫色】

タイプ 1 と花の形は似ているが、花被片の色がくすんだ薄紫色をしたものを指す。タイプ 2 には 5 個体が該当した (Table 3-11, Fig. 3-7-3).

【タイプ 3 白】

タイプ 3 は、内花被・外花被ともに純白で、1 個体だけが該当した (Table 3-11, Fig. 3-7-4).

【タイプ 4 青紫】

このタイプは、タイプ 1 と 2 に比べ青味の強い紫色を呈した個体を指し、1 個体だけ該当した (Table 3-11, Fig. 3-7-5).

【タイプ 5 その他】

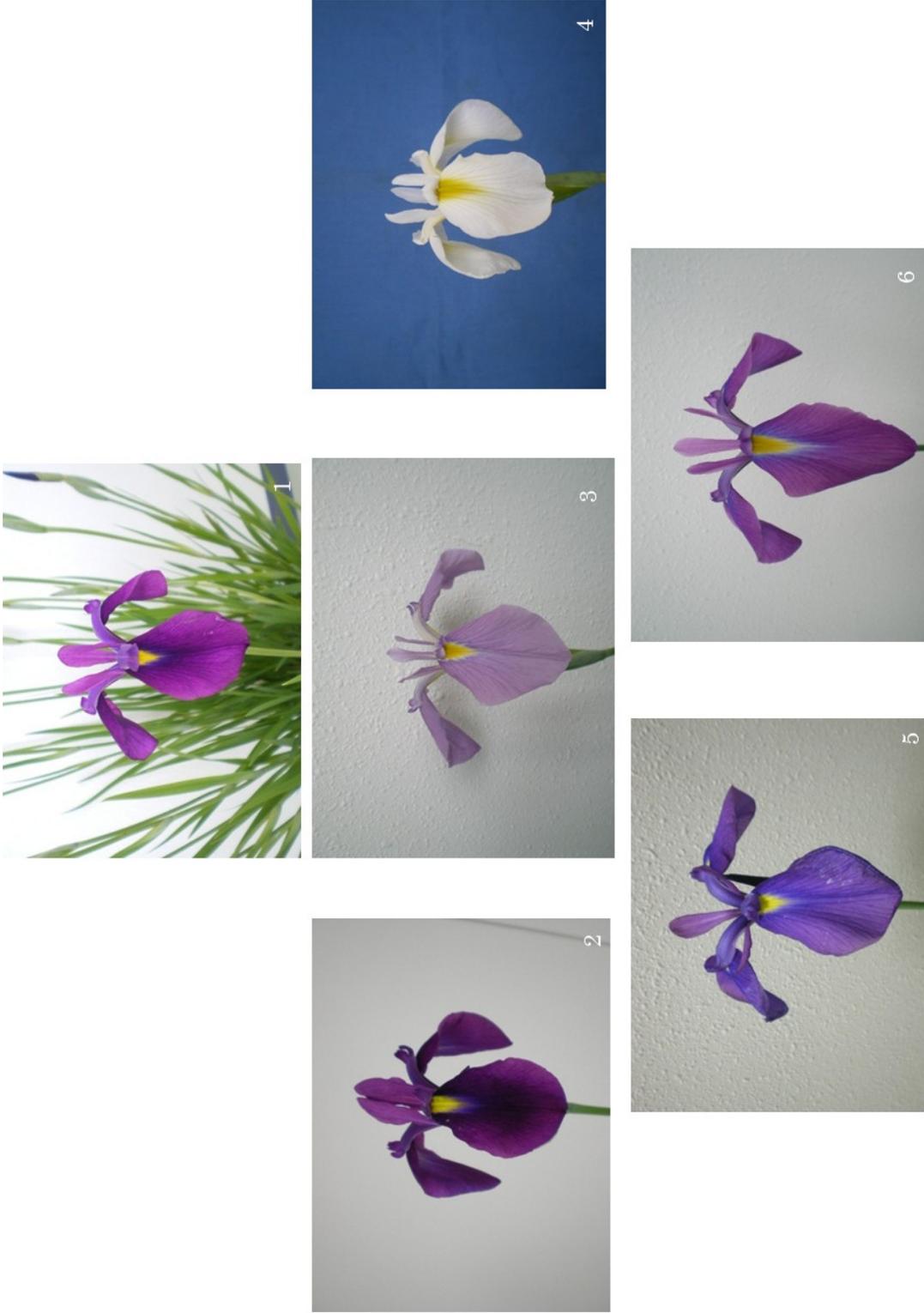
このタイプは、外花被、内花被ともに赤紫色を呈し、細長い外花被の 10 個体をこれとした。

系統 2 「ノハナショウブ型」の花粉稔性を、Table 3-11 に各系統の開花した個体で調査した。その結果、どのタイプも 90% を超える高い花粉稔性を示した (Table 3-11).

③系統 3 「長井小紫型」 Op_1 植物からの S_1Op_1 植物

この系統の S_1Op_1 植物は 107 個体が開花した。 S_1Op_1 植物の花色のタイプは以下のものであった (Table 3-12, Fig. 3-8).

Generation	Flower types	Flower colors	Plant		Outer perianth		Pollen fertility(%)
			height(cm)	Length(cm)	Width (cm)		
P	Female plant 'Tsumabeni'	Light pink	76.0	7.0	5.5	95.7	
Op ₁	Wild species type	Reddish purple	112.5	7.5	4.5	96.6	
S ₁ Op ₁	Wild species type	Reddish purple (10) *	80.8±9.01	6.6±0.68	4.2±0.47	95.4±3.58	
	Smoky purple type	Smoky purple (5)	85.6±5.02	7.6±0.99	5.1±0.77	94.8±2.17	
	White type	White (1)	75.7	6.3	4.0	96.0	
	Bluish purple type	Bluish purple (1)	76.9	6.4	4.8	92.6	
	Other type	Reddish purple (5)	77.8±13.38	6.4±0.49	4.5±0.50	97.0±1.13	
* No. of plants categorized							



**Fig. 3-7. Morphological characters of S_1Op_1 progenies obtained from self pollination of wild species type (Op_1) in 'Tsumabeni'.
 1: Op_1 plant of wild species type obtained from 'Tsumabeni' through natural hybridization, 2: Wild species type,
 3: Smoky purple type, 4: White type, 5: Bluish purple type, 6: Other type.**

【タイプ1 ノハナショウブ型】

「ノハナショウブ型」のタイプ1と同様、「長井小紫型」のタイプ1も、ノハナショウブに似た紫の花色で18個体が相当する (Table 3-12, Fig. 3-8-2).

【タイプ2 青紫型】

このタイプは、親に似た青味がかかった紫色を呈する。40個体がこれに該当した (Table 3-12, Fig. 3-8-3).

【タイプ3 白地に脈入り】

外花被が白地で、そこに紫や青紫の脈が入る特性を示す。内花被は紫、赤紫、青紫に色づくもので、16個体が相当する (Table 3-12, Fig. 3-8-4).

【タイプ4 白】

このタイプは、花色が純白のものまたは白に近い藤色の13個体が含まれる (Table 3-12, Fig. 3-8-5).

【タイプ5 緋入り】

タイプ5には、外花被に薄紅色または薄青紫の緋が入るものである。緋模様はOp₁植物では見られなかった形質である。2個体が該当した (Table 3-12, Fig. 3-8-6).

【タイプ6 矮性】

このタイプは、花色が内花被・外花被ともに紫または青紫を呈し、タイプ1および2に似ているが、草丈が他の個体に比べ低くなる傾向があったため、矮性個体として2個体を特別に分けた (Table 3-12, Fig. 3-8-7).

【タイプ7 その他】

タイプ7は、16個体が含まれ、内花被・外花被の全体に色が入る個体で、中には、外花被に白脈がやや入るものもある (Table 3-12, Fig. 3-8-8).

Table 3-12. Morphological characters of S₁Op₁ progenies obtained from Nagai-komurasaki type (Op₁) by self-pollination.

Generation	Flower types	Flower colors	Plant height(cm)	Outer perianth		Pollen fertility(%)
				Length(cm)	Width(cm)	
P	Female plant 'Tsumabeni'	Light pink	76.0	7.0	5.5	95.7
Op ₁	Nagai-komurasaki type	Bluish purple	72.0	6.5	5.0	95.4
S ₁ Op ₁	Wild species type	Reddish purple (18) *	77.6 ± 10.57	7.5 ± 0.60	5.6 ± 0.96	94.4 ± 4.11
	Bluish purple type	Bluish purple (40)	76.3 ± 12.73	7.3 ± 0.52	5.4 ± 0.67	93.9 ± 3.76
	Stripe on white type	Purple (15)	78.0 ± 12.66	6.6 ± 0.70	5.2 ± 0.68	94.0 ± 2.70
		Smoky purple (1)	76.4	6.7	5.9	93.5
	White type	White (13)	82.9 ± 8.24	7.3 ± 0.66	5.0 ± 0.81	93.8 ± 3.51
	Kasuri type	Reddish purple (2)	80.5 ± 3.25	7.5 ± 0.49	7.0 ± 0.98	90.0 ± 7.14
	Dwarf type	Smoky purple (1)	67.7	6.7	4.8	94.3
		White (1)	58.4	6.5	5.5	94.6
	Other type	Purple (11)	83.8 ± 11.54	7.3 ± 1.00	5.6 ± 0.65	94.3 ± 4.04
		Smoky purple (5)	74.1 ± 7.14	7.0 ± 0.62	4.9 ± 0.43	94.0 ± 1.22

* No. of plants categorized



Fig. 3-8. Morphological characters of S_1Op_1 progenies obtained from self pollination of Nagai-komurasaki type (Op_1) in 'Tsumabeni'. 1: Op_1 plant of Nagai-komurasaki type obtained from 'Tsumabeni' through natural hybridization, 2: Wilde species type, 3: Bluish purple type, 4: Stripe on white type, 5: White type, 6: Kasuri type, 7: Dwarf type, 8: Other type.

系統 3 「長井小紫型」の S_1Op_1 植物は、全タイプで 90%以上 (Table 3-12) の花粉稔性であった。各系統とも花型間で多少のばらつきが見られた。

④ 系統 4 「濃い長井小町型」 Op_1 植物からの S_1Op_1 植物

系統 4 は、40 個体が開花した。次のように 6 タイプに分けられた (Table 3-13, Fig. 3-9)。

【タイプ 1 白地に脈が入る】

タイプ 1 は、外花被が白地で紫や赤紫の脈が入る特徴を持つ。内花被は紫または赤紫に全体が色づき、12 個体が認められた (Table 3-13, Fig. 3-9-2)。

【タイプ 2 緋入り】

系統 4 のこのタイプは、赤紫の花色を呈する個体がほとんどで、外花被に紅色や桃色の緋が入る。5 個体が該当した (Table 3-13, Fig. 3-9-3)。

【タイプ 3 白】

タイプ 3 は、内花被・外花被がともに純白となるグループである。タイプ 3 には 7 個体が認められた (Table 3-13, Fig. 3-9-4)。

【タイプ 4 縮緬花卉】

このタイプには 1 個体が該当し、花被片が、縮緬のようにデコボコした構造をしているものを指す。このような特徴は、 S_1Op_1 植物で初めて認められ、 Op_1 植物では見られなかった形質である (Table 3-13, Fig. 3-9-5)。

【タイプ 5 矮性】

他の個体に比べ草丈の低い個体が、このタイプである。系統 4 の S_1Op_1 植物からは 4 個体が認められた (Table 3-13, Fig. 3-9-6)。

【タイプ 6 その他】

タイプ 1 ~ 5 には類別できなかった 12 個体をその他のタイプと

Table 3-13. Morphological characters of S₁Op₁ progenies obtained from Deep Nagai-komachi type (Op₁) by self-pollination.

Generation	Flower types	Flower colors	Plant height(cm)	Outer perianth		Pollen fertility(%)
				Length(cm)	Width(cm)	
P	Female plant 'Tsumabeni'	Light pink	76.0	7.0	5.5	95.7
Op ₁	Deep Nagai-komachi type	Purple	91.6	6.5	5.0	95.9
S ₁ Op ₁	Stripe on white type	Purple (6) *	91.6 ± 11.53	8.3 ± 0.29	7.1 ± 0.70	95.8 ± 4.40
		Smoky purple (6)	80.3 ± 16.04	7.6 ± 0.71	6.7 ± 0.55	94.0 ± 5.54
	Kasuri type	Reddish purple (5)	74.0 ± 14.34	7.4 ± 0.26	7.1 ± 0.17	94.5 ± 8.26
	White type	White (7)	75.6 ± 8.11	7.4 ± 0.45	6.4 ± 0.88	95.3 ± 3.69
	Crape type	Purple (1)	61.5	7.5	5.2	96.1
	Dwarf type	Reddish purple (3)	62.4 ± 6.20	6.8 ± 1.10	6.5 ± 1.56	94.4 ± 5.59
		Mauve (1)	64.9	6.2	5.2	99.3
	Other type	Pink (4)	76.9 ± 10.11	7.0 ± 0.42	5.6 ± 1.83	87.2 ± 16.11
		Reddish purple (3)	79.5 ± 13.08	8.3 ± 0.07	7.9 ± 0.84	87.3 ± 17.01
		Mauve (5)	80.0 ± 3.06	7.1 ± 0.29	5.1 ± 0.78	88.6 ± 7.09

* No. of plants categorized



Fig. 3-9. Morphological characters of S_1Op_1 progenies obtained from self pollination of Deep Nagai-komachi type (Op_1) in 'Tsumabeni'.
 1: Op_1 plant of Deep Nagai-komachi type obtained from 'Tsumabeni' through natural hybridization, 2: Stripe on white type,
 3: Kasuri type, 4: White type, 5: Grape perianth type, 6: Dwarf type, 7: Other type.

した．中には長井系ハナショウブ‘郭公鳥’のように，外花被に濃い紫の脈が入り，花被片の縁が白くなっている個体や，内花被も外花被も青紫となる個体もある (Table 3-13, Fig. 3-9-7).

系統 4 「濃い長井小町型」の S_1Op_1 植物の花粉稔性は 87.2～99.3% (Table 3-13) であった．最も高い花粉稔性を示したものは，タイプ 5 の矮性個体であった．

⑤ 系統 5 「長井小町型」 Op_1 植物からの S_1Op_1 植物

この系統は，内花被が紫色，外花被は白地で紫の脈が薄く入る Op_1 植物の自殖次代である．展開個体数は 219 個体，そのうち 159 個体が開花し，以下のように分けられた (Table 3-14, Fig. 3-10).

【タイプ 1 白地に脈が入る】

前述した系統 4 「濃い長井小町型」のタイプ 1 と同じく，内花被は全体に色が入り，外花被は白地で紫，赤紫，青紫等の脈が入る．中には，蕊片（芯）も内花被のように色づく個体も見られた．本タイプには 88 個体が該当した (Table 3-14, Fig. 3-10-2).

【タイプ 2 外花被が白】

このタイプは，内花被にのみ紫，赤紫，藤色といった色が入り，外花被は純白という二色花で構成される 14 個体が該当した (Table 3-14, Fig. 3-10-3).

【タイプ 3 緋入り】

タイプ 3 には，外花被に紫や薄紅の緋が入る 15 個体が含まれ，ほとんどの個体が，白地に緋が入るものであった．また，内花被は赤紫，紫と濃く色づくものと薄紅色や紫に薄く色づく特徴のものに分かれる (Table 3-14, Fig. 3-10-4).

【タイプ 4 白】

他の系統の S_1Op_1 植物と同様，内花被・外花被が両方とも純白の個体をこのタイプとした．系統 5 「長井小町型」の S_1Op_1 植物では 26 個体が観察された (Table 3-14, Fig. 3-10-5).

Generation	Flower types	Flower colors	Plant height(cm)	Outer perianth		Pollen fertility(%)
				Length(cm)	Width(cm)	
P	Female plant 'Tsumabeni'	Light pink	76.0	7.0	5.5	95.7
Op ₁	Nagai-komachi type	Purple	102.7	7.8	5.7	95.9
S ₁ Op ₁	Stripe on white type	Reddish purple (14) *	79.2±11.19	7.7±0.87	6.0±0.79	87.4±7.96
		Purple (74)	79.3±11.22	7.5±0.99	5.6±0.96	89.9±6.73
	White outer perianth type	White (14)	86.3±16.58	7.5±0.77	5.9±1.69	88.0±7.16
	Kasuri type	Reddish purple (8)	79.7±10.73	7.4±1.68	5.9±1.10	89.4±5.75
		Purple (7)	90.1±20.58	7.3±0.05	5.4±0.26	88.2±6.38
	White type	White (26)	77.4±10.44	6.8±0.92	5.5±0.86	86.0±10.11
	Dwarf type	Mauve (3)	56.2±6.01	6.7±0.42	3.9±1.91	98.6±20.98
	Other type	Purple (7)	76.0±8.06	6.7±0.47	5.4±0.94	85.6±7.17
		Mauve (6)	88.0±7.61	7.1±1.29	5.4±1.22	89.0±5.88
* No. of plants categorized						



**Fig. 3-10. Morphological characters of S_1Op_1 progenies obtained from self pollination of Nagai-komachi type (Op_1) in 'Tsumabeni'.
 1: Op_1 plant of Nagai-komachi type obtained from 'Tsumabeni' through natural hybridization, 2: Stripe on white type.
 3: White outer perianth type. 4: Kasuri type, 5: White type, 6: Dwarf type, 7: Other type.**

【タイプ 5 矮性】

系統 5 の S_1Op_1 植物においても草丈が低くなる矮性の個体がみられ、花色は藤色であった。3 個体が該当した (Table 3-14, Fig3-10-6)。

【タイプ 6 その他】

先述したタイプ 1～5 に分類できなかつた 13 個体をこれとした。ここには、内花被が赤紫で、外花被が藤色のものや、全体が薄紅色のものなど様々な個体がある (Table 3-14, Fig. 3-10-7)。

系統 5 「長井小町型」の花粉稔性は、85.6～98.6% (Table 3-14) であった。この系統の S_1Op_1 植物は、花粉稔性は 90% 未満のものが多く見られた。

⑥ 系統 6 「爪紅型」 Op_1 植物からの S_1Op_1 植物

系統 6 の S_1Op_1 植物は、長井系ハナショウブ「爪紅」のように、外花被は白、内花被の先端に薄く色がつく Op_1 個体の自殖種子から得た次代植物 (S_1Op_1) である。個体数は全部で 95 個体あり、そのうち 39 個体が開花した。以下のように分けられた (Table 3-15, Fig. 3-11)。

【タイプ 1 藤色】

タイプ 1 は、外花被が藤色を呈する 13 個体である。内花被については、赤紫、薄桃、紫と様々な色がある (Table 3-15, Fig. 3-11-2)。

【タイプ 2 桃色】

内花被が薄紅色～桃色で、外花被は白地で花被片の縁が薄く桃色に染まる 5 個体をタイプ 2 とした (Table 3-15, Fig. 3-11-3)。

【タイプ 3 白】

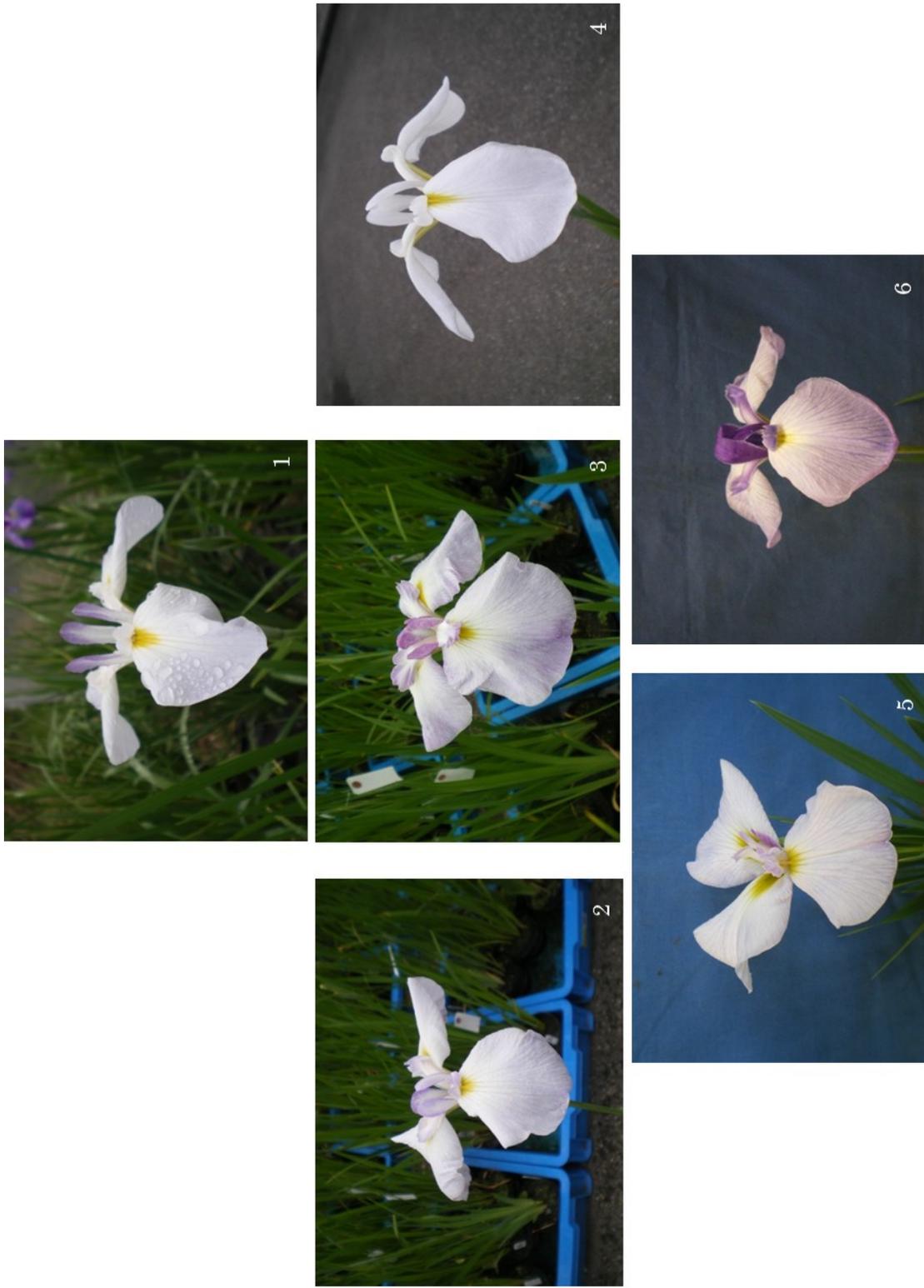
タイプ 3 は、花被片が純白の個体のものを指し、6 個体が本タイプに入れられた (Table 3-15, Fig. 3-11-4)。

【タイプ 4 矮性】

他の個体に比べて草丈の低い 13 個体がこれに該当する。このタ

Table 3-15. Morphological characters of S ₁ Op ₁ progenies obtained from Tsumabeni type (Op ₁) by self-pollination.						
Generation	Flower types	Flower colors	Plant height(cm)	Outer perianth		Pollen fertility(%)
				Length(cm)	Width(cm)	
P	Female plant 'Tsumabeni'	Light pink	76.0	7.0	5.5	95.7
Op ₁	Tsumabeni type	Light pink	108.0	8.1	6.7	93.2
S ₁ Op ₁	Mauvish type	Mauve (13) *	77.4±6.54	6.7±0.84	5.8±1.07	89.4±6.87
	Pink type	Pink (5)	63.0±13.67	5.4±0.43	3.9±0.29	88.4±8.32
	White type	White (6)	69.6±11.24	6.3±0.67	4.9±0.62	89.4±7.34
	Dwarf type	Mauve (9)	58.4±8.21	6.1±0.63	5.5±1.26	86.6±22.98
	Other type	Pink (4)	64.8±17.41	6.5±0.51	6.2±0.42	94.2±3.37
	Other type	Purple (2)	71.7±3.48	7.2±1.21	4.3±1.55	92.3±4.66

*No. of plants categorized



**Fig. 3-11. Morphological characters of S₁Op₁ progenies obtained from self pollination of Tsumabeni type (Op₁) in 'Tsumabeni'.
 1: Op₁ plant of Tsumabeni type obtained from 'Tsumabeni' through natural hybridization, 2: Mauvish type, 3: Pink type, 4: White type, 5: Dwarf type, 6: Other type.**

イプの花色は藤色を示すものが多かった (Table 3-15, Fig. 3-11-5).

【タイプ 5 その他】

これには内花被が紫で外花被が青紫の個体や, 外花被が赤紫のものといった 2 個体が含まれる (Table 3-15, Fig. 3-11-6).

系統 6 「爪紅型」の花粉稔性は Table 3-15 に示したとおりで, 86.6~94.2%であった.

⑦系統 7 「水色型」 Op_1 植物からの S_1Op_1 植物

本系統の S_1Op_1 植物は, 他の系統に比べ個体数が少なく, 6 個体しか得られなかった. しかし, そのうち 3 個体が開花した. 以下の 2 タイプに分けられた (Table 3-16, Fig. 3-12).

【タイプ 1 藤色】

タイプ 1 は親である Op_1 個体によく似ており, 内花被・外花被ともに水色や藤色を呈するという特徴を持つ. 2 個体が該当した (Table 3-16, Fig. 3-12-2).

【タイプ 2 白】

内花被・外花被ともに白色の 1 個体がこれに相当する (Table 3-16, Fig. 3-12-3).

系統 7 「水色型」の S_1Op_1 植物の花粉稔性は, 77.8~99.6%であった (Table 3-16). タイプ 2 の白花の個体の花粉稔性が 77.8%と, ‘爪紅’ および Op_1 植物の花粉稔性より低い値であった.

⑧系統 8 「純白型」 Op_1 植物からの S_1Op_1 植物

親である Op_1 植物は内花被・外花被ともに白色の個体である. その自殖次代植物 (S_1Op_1) として 22 個体が得られ, そのうち 10 個体が開花した. これらは以下のように分けられた (Table 3-17, Fig. 3-13).

【タイプ 1 藤色】

Table 3-16. Morphological characters of S₁Op₁ progenies obtained from Light blue type (Op₁) by self-pollination.

Generation	Flower types	Flower colors	Plant height(cm)	Outer perianth		Pollen fertility(%)
				Length(cm)	Width(cm)	
P	Female plant 'Tsumabeni'	Light pink	76	7.0	5.5	95.7
Op ₁	Light blue type	Light blue	126	8.3	7.3	99.1
S ₁ Op ₁	Mauvish type	Mauve (2) *	64.4 ± 14.28	7.3 ± 0.71	5.9 ± 0.21	96.6 ± 0.00
	White type	White (1)	72.7	7.6	5.4	77.8

*No. of plants categorized



**Fig. 3-12. Morphological characters of S_1Op_1 progenies obtained from self pollination of Light blue type (Op_1) in 'Tsumabeni'.
1: Op_1 plant of Light blue type obtained from 'Tsumabeni' through natural hybridization, 2: Mauvish type, 3: White type.**

Table 3-17. Morphological characters of S ₁ Op ₁ progenies obtained from White type (Op ₁) by self-pollination.						
Generation	Flower types	Flower colors	Plant height(cm)	Outer perianth		Pollen fertility(%)
				Length(cm)	Width(cm)	
P	Female plant 'Tsumabeni'	Light pink	76.0	7.0	5.5	95.7
Op ₁	White type	White	104.0	7.6	6.2	92.2
S ₁ Op ₁	Mauvish type	Mauve(1)*	62.1	6.6	5.7	90.3
	Sunago, Kasuri type	Pink(2)	71.8±6.85	6.8±0.14	6.5±0.56	88.1±1.57
	White type	White(4)	76.7±5.41	7.6±0.85	6.6±0.81	94.7±4.49
	Stripe type	Bluish purple(1)	70.2	8.3	8.5	67.9
	Dwarf type	Reddish purple(1)	60.4	8.3	5.6	88.0
	Crape typr	Pink(1)	67.6	7.5	7.3	76.9
* No. of plants categorized						



**Fig. 3-13. Morphological characters of S_1Op_1 progenies obtained from self pollination of White type (Op_1) in 'Tsumabeni'.
1: Op_1 plant of White type obtained from 'Tsumabeni' through natural hybridization, 2: Mauvish type, 3: Kasuri and Sunago type,
4: White type, 5: Stripe on white type, 6: Dwarf type, 7: Grape type.**

内花被・外花被が藤色を呈する 1 個体を，このタイプとした (Table 3-17, Fig. 3-13-2).

【タイプ 2 緋・砂子入り】

このタイプには，外花被に青紫または赤紫の緋や砂子が入る 2 個体が含まれた．内花被は赤紫または青紫，外花被が白地である (Table 3-17, Fig. 3-13-3).

【タイプ 3 白】

他の系統と同じく，花被片が純白の個体をこのタイプとした．4 個体が該当した (Table 3-17, Fig. 3-13-4).

【タイプ 4 脈入り】

このタイプは 1 個体のみだった．内花被は赤紫で，外花被には紫色の脈が入る (Table 3-17, Fig. 3-13-5).

【タイプ 5 矮性】

系統 8 での矮性個体は 1 個体のみであった．その花色は，内花被は赤紫で外花被は白地に紫の脈が入るものであった (Table 3-17, Fig. 3-13-6).

【タイプ 6 縮緬花弁】

花被片がボコボコとした縮緬様の構造をしている個体をこれとした．系統 8 では 1 個体のみが該当し，その花色は，内花被は白に近い藤色で，外花被は淡い紫色をしていた．また，この個体は外花被の縁が波打つという特徴もあった (Table 3-17, Fig. 3-13-7).

そして系統 8 「純白型」の S_1Op_1 植物では 67.9～94.7%の花粉稔性があった (Table 3-17)．タイプ 4 の脈入りの S_1Op_1 個体の花粉稔性が 67.9%と，本研究で得られた S_1Op_1 植物の中で最も低い値であった．

このように，各系統の S_1Op_1 植物においても，花色の分離が見られることがわかった．なお，予備実験として行った江戸系品種の‘五

月晴’の自殖後代の形態調査では、花被片に入る脈の色が親である‘五月晴’は淡い桃色なのに対し、その自殖後代は濃い赤紫色となるといった程度の変異にとどまった (Fig. 3-14). また、Op₁植物では観察されなかった緋や砂子模様の個体、縮緬状の花被片を有する個体がS₁Op₁植物の中から出現した.

2. S₁Op₁植物における矮性個体の出現

Op₁植物では、親よりも花高が高くなる傾向があったが (Table 3-1), S₁Op₁植物の花高は、どの系統のS₁Op₁植物も親であるOp₁植物よりも低く、むしろ‘爪紅’に近い値となった (Table 3-10 ~ Table 3-17). また、系統3「長井小紫型」、系統4「濃い長井小町型」、系統5「長井小町型」、系統6「爪紅型」および、系統8「純白型」の5系統のS₁Op₁植物から‘爪紅’よりもさらに花高が低くなる矮性個体が観察された (Table 3-12 ~ Table 3-15, Table 3-17). 特に、系統6「爪紅型」のS₁Op₁植物は、他系統のS₁Op₁植物と比較して全体的に草丈が低くなる傾向が見られた. さらに、いくつかある矮性個体の中でも、超矮性の個体がこの系統6「爪紅型」から出現した (Fig. 3-15). 矮性個体の花は、薄紫色または白に近い藤色の花色を呈するものが多く、その花の形は内花被が小さく外花被も詰まった印象を受けるような咲き姿であった.

S₁Op₁植物での緋や砂子模様の個体および矮性個体の出現は、おおもとの親である‘爪紅’自体が、遺伝的に固定されていない野生に近い品種であることを示唆する結果と考えられる.

また、矮性個体および半矮性個体を自殖し、後代植物 (S₂Op₁) の育成を試みた. 矮性・半矮性個体の後代に関しては実験3で述べることにする.

3. S₁Op₁植物の種子稔性

各系統よりランダムに選抜した矮性を除いた通常の花高のS₁Op₁個体の自家受粉の結果を Table 3-18 に示した. 各系統の種子稔性は15.5粒 (系統6「爪紅型」) ~ 65.2粒 (系統7「水色型」) であり、系統間で差が見られた. Op₁植物での全体平均種子稔性が75.3粒であるのに対し (Table 3-4), S₁Op₁植物の全体平均種子稔性は45.5粒と低下した. 最も低い種子稔性を示した系統6「爪紅



Fig. 8-14. Flowers of progenies (S_1) obtained from 'Satsukibare' by self pollination. 1: 'Satsukibare', 2: S_1 -No.13, 3: S_1 -No.37, 4: S_1 -No.63.



Fig. 3-15. The dwarf plants in S_1Op_1 progenies.
Left to right : **Normal, semi-dwarf, dwarf.**

Table 3-18. Seed fertility of self-pollination in S₁Op₁ progenies obtained from Op₁ plants 'Tsumabeni' through natural hybridization.

Flower types	No. of	No. of	No. of	No. of	Seed fertility (B/A)
	plants observed	flowers pollinated (A)	pots obtained	seed harvested (B)	
1. Kakkodori type	8	25	18	1267	50.7
2. Wild species type	10	79	63	4062	51.4
3. Nagai-komurasaki type	10	59	40	2740	46.4
4. Deep-Nagai-komachi type	11	41	29	1414	34.5
5. Nagai-komachi type	10	52	39	3139	60.4
6. Tsumabeni type	12	28	15	435	15.5
7. Light blue type	2	6	3	391	65.2
8. White type	6	21	11	689	32.8
Total ±S.D.	69	311	218	14137	45.5 ±16.3

型」の S_1Op_1 植物は，花粉稔性は 86.6~94.2% (Table 3-15) であり，最も種子稔性の高かった系統 7 「水色型」の値 77.8~96.6% (Table 3-16) とほぼ同じ値である．よって，これらの種子稔性の低下は，雌性稔性の差によるものや，ハナショウブの花粉は多湿に極端に弱く，降雨などで花粉が湿ると花粉の発芽能力が劇的に低下し，中には完全に発芽能力が失われる品種もあることが知られている (富野 1963)．そのため，降雨や多湿といった環境的な要因も低稔性の原因の 1 つと考えられる．また，ハナショウブは基本的に他殖性の植物であるが，自殖も他殖と同じく可能であることが富野 (1963) の調査によって認められているが，それは一世代目までの結果である．本研究における Op_1 植物を自殖一世代目と仮定したとき，その自家受粉での種子稔性は平均 75.3 粒と高い値であったが，自殖二世代目に相当する S_1Op_1 植物の種子稔性は 45.5 粒と低下した．このことより，自殖による近交弱勢による稔性の低下も考えられた．

4. S_1Op_1 植物の色素分析

S_1Op_1 植物の花被片に含まれるアントシアニンの分析を行った．その結果，第 2 章第 3 節で主要アントシアニンとして同定された A1~A6，および微量色素として同定された A7 が， S_1Op_1 植物では主要アントシアニンとして検出された．それらの構成をもとに， S_1Op_1 植物を以下の 8 パターンに分けた (Fig. 3-16)．

- パターン 1 : Petunidin 3RGac5G (A1, A2) と Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を主要アントシアニンとするもの
- パターン 2 : Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を主要とするもの
- パターン 3 : Petunidin 3RG5G (A5) および Malvidin 3RG5G (A6) を主要アントシアニンとするもの
- パターン 4 : アントシアニンを含まないもの
- パターン 5 : Petunidin 3RGac5G (A1, A2) と Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を含まず，様々な色素で構成されるもの
- パターン 6 : Petunidin 3RGac5G (A1, A2) を主要とするもの
- パターン 7 : Delphinidin 3RGac5G (A7), Petunidin 3RGac5G (A1, A2), および Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を

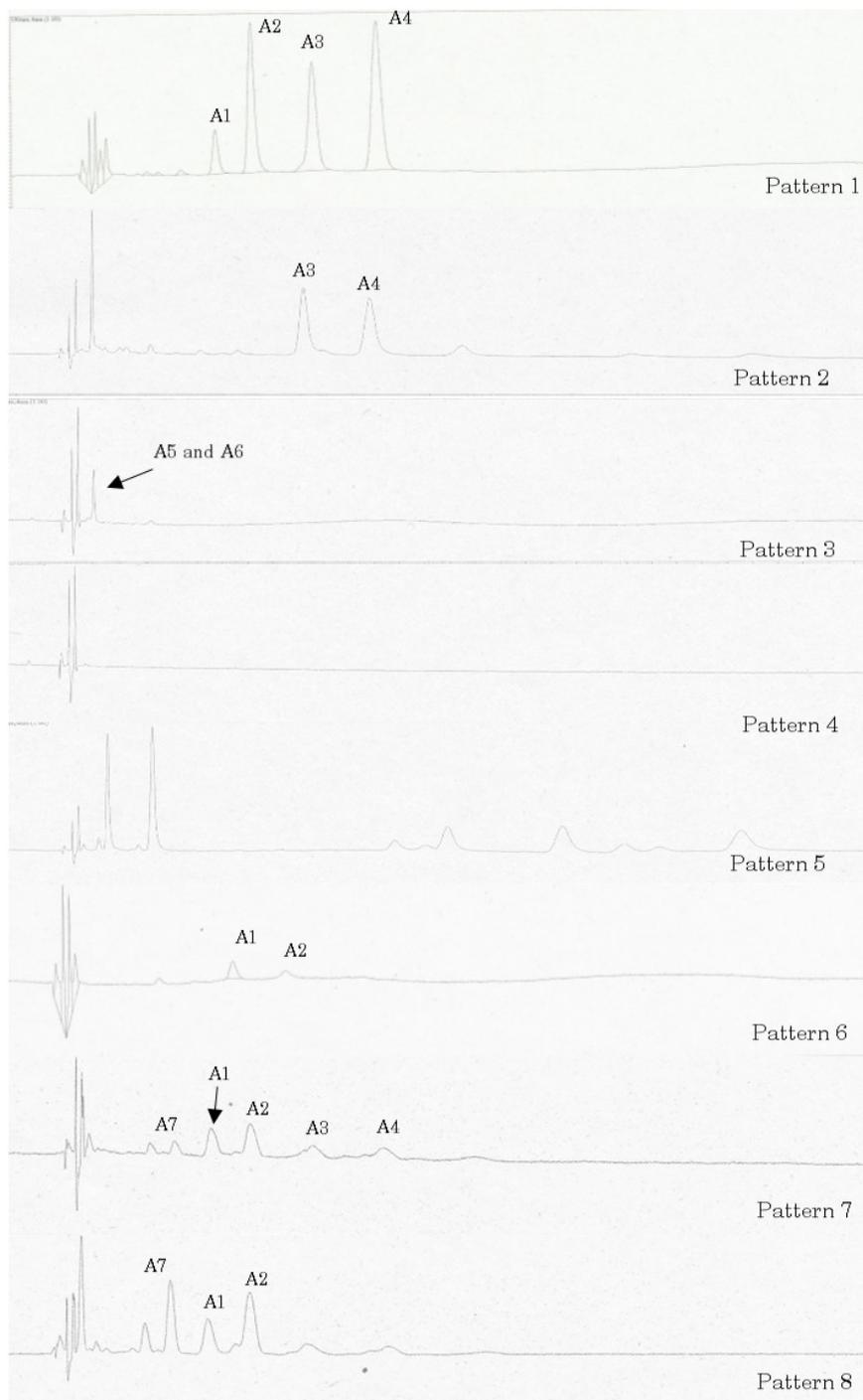


Fig. 8-16. Anthocyanin composition of S_1Op_1 progenies.
Pattern 1: Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4),
pattern 2: Malvidin 3RGac5G(A3, A4),
pattern 3: Petunidin 3RG5G(A5) and Malvidin 3RG5G(A6),
pattern 4: No anthocyanin, pattern 5: Many anthocyanins without
Petunidin 3RGac5G and Malvidin 3RGac5G,
pattern 6: Petunidin 3RGac5G(A1, A2),
pattern 7: Delphinidin 3RGac5G(A7), Petunidin 3RGac5G(A1, A2)
and Malvidin 3RGac5G(A3, A4),
pattern 8: Delphinidin 3RGac5G(A7) and Petunidin 3RGac5G(A3, A4).

主要とするもの
パターン 8 : Delphinidin 3RGac5G (A7) と Petunidin 3RGac5G
(A1, A2) を主要とするもの

パターン 1 は Petanin (A1, A2), Ensatin (A3, A4) を主要成分とし, 系統 1~8 の全 S₁Op₁ 植物でこれに該当する個体が出現した (Table 3-19~Table 3-26). また, 系統 4 「濃い長井小町型」の S₁Op₁ 植物は, 親の Op₁ 個体が, Petanin と Ensatin を含まないパターン 2 の色素構成にもかかわらず, Petanin, Ensatin を主要とするこのパターンの個体が出現した (Table 3-22).

パターン 2 は, Ensatin を主要色素とした構成である. 本パターンは, 4 系統 (「郭公鳥型」, 「ノハナショウブ型」, 「濃い長井小町型」および「爪紅型」) の S₁Op₁ 植物で見つかった (Table 3-19, Table 3-20, Table 3-22, Table 3-24).

パターン 3 は, Petunidin 3RG5G (A5) および Malvidin 3RG5G (A6) を主要アントシアニンに持つものである. これらは, 系統 1 「郭公鳥型」 (Table 3-19), 系統 3 「長井小紫型」 (Table 3-21) および, 系統 4 「濃い長井小町型」 (Table 3-22) の 3 つの系統で観察された.

パターン 4 には, Op₁ 植物および栽培品種での結果と同様に, アントシアニンを含まない白花個体が全系統に共通して存在した (Table 3-19~Table 3-26).

パターン 5 は, ハナショウブの基本色素とされる Petanin と Ensatin がほとんど検出されず, 多種類のアントシアニンで構成されるものであった. 実験 1 で「爪紅」と「薄紅」の Op₁ 植物でこれに含まれる個体が認められている. S₁Op₁ 植物では, 系統 6 「爪紅型」と系統 8 「純白型」以外の系統で本パターンに該当する個体が観察された (Table 3-19~Table 3-23, Table 3-25).

パターン 6 は, S₁Op₁ 植物で初めて出現した色素構成型である. 本

Table 3-20. Division based on major anthocyanin composition in S ₁ Op ₁ progenies from wild species type by self-pollination.				
Generation	Flower types	Flower colors	Patterns	Anthocyanin composition
P	Tsumabeni'	Light pink	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
Op ₁	Wild species type	Reddish purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
S ₁ Op ₁	Wild species type	Reddish purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			2	Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
	Smoky purple type	Smoky purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
	White type	White	4	No anthocyanin
	Bluish purple type	Bluish purple	5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
	Other type	Reddish purple	2	Malvidin 3RGac5G(A3, A4)

Table 3-21. Division based on major anthocyanin composition in S₁Op₁ progenies from Nagai-komurasaki type by self-pollination.

Generation	Flower types	Flower colors	Patterns	Anthocyanin composition
P	Tsumabeni'	Light pink	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
Op ₁	Nagai-komurasaki type	Bluish purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
S ₁ Op ₁	Wild species type	Reddish purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
	Bluish purple type	Bluish purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			6	Petunidin 3RGac5G(A1, A2)
	Stripe on white type	purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			3	Petunidin 3RG5G(A5) and Malvidin 3RG5G(A6)
			7	Delphinidin 3RGac5G(A7), Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
		Smoky purple	3	Petunidin 3RG5G(A5) and Malvidin 3RG5G(A6)
	White type	white	4	No anthocyanin
	Kasuri type	Reddish purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
	Dwarf type	Smoky purple	5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
		White	4	No anthocyanin
	Other type	Purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			8	Delphinidin 3RGac5G(A7) and Petunidin 3RGac5G(A3, A4)
		Smoky purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)

Table 3-22. Division based on major anthocyanin composition in S₁Op₁ progenies from Deep Nagai-komachi type by self-pollination.

Generation	Flower types	Flower colors	Patterns	Anthocyanin composition
P	Tsumabeni'	Light pink	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
Op ₁	Deep Nagai-komachi type	Purple	5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
S ₁ Op ₁	Stripe on white type	Purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			3	Petunidin 3RG5G(A5) and Malvidin 3RG5G(A6)
		Smoky purple	3	Petunidin 3RG5G(A5) and Malvidin 3RG5G(A6)
	Kasuri type	Reddish purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			3	Petunidin 3RG5G(A5) and Malvidin 3RG5G(A6)
			2	Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
	White type	White	4	No anthocyanin
	Crape type	Purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
	Dwarf type	Reddish purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			3	Petunidin 3RG5G(A5) and Malvidin 3RG5G(A6)
		Mauve	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
	Other type	Pink	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			3	Petunidin 3RG5G(A5) and Malvidin 3RG5G(A6)
		Reddish purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
		Mauve	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)

Table 3-23. Division based on major anthocyanin composition in S ₁ Op ₁ progenies from Nagai-komachi type by self-pollination.			
Generation	Flower types	Flower colors	Patterns
P	Tsumabeni'	Light pink	1
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
Op ₁	Nagai-komachi type	Purple	1
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
S ₁ Op ₁	Stripe on white type	Reddish purple	1
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			6
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2)
			7
			Delphinidin 3RGac5G(A7), Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			1
		Purple	1
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			5
			Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			6
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2)
			7
			Delphinidin 3RGac5G(A7), Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			8
			Delphinidin 3RGac5G(A7) and Petunidin 3RGac5G(A3, A4)
	White outer perianth type	White	1
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			4
			No anthocyanin
			6
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2)
			7
			Delphinidin 3RGac5G(A7), Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			8
			Delphinidin 3RGac5G(A7) and Petunidin 3RGac5G(A3, A4)
	Kasuri type	Reddish purple	1
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			6
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2)
			7
			Delphinidin 3RGac5G(A7), Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			8
			Delphinidin 3RGac5G(A7) and Petunidin 3RGac5G(A3, A4)
			1
		Purple	1
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			6
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2)
			8
			Delphinidin 3RGac5G(A7) and Petunidin 3RGac5G(A3, A4)
	White type	White	4
			No anthocyanin
	Dwarf type	mauve	1
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			6
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2)
	Other type	Purple	1
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			6
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2)
			1
		Mauve	1
			Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			7
			Delphinidin 3RGac5G(A7), Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)

Table 3-24. Division based on major anthocyanin composition in S₁Op₁ progenies from Tsumabeni type by self-pollination.

Generation	Flower types	Flower colors	Patterns	Anthocyanin composition	
				Flower types	Flower colors
P	Tsumabeni'	Light pink	1		Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
Op ₁	Tsumabeni type	Light pink	1		Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
S ₁ Op ₁	Mauvish type	Mauve	1		Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			6		Petunidin 3RGac5G(A1, A2)
			8		Delphinidin 3RGac5G(A7) and Petunidin 3RGac5G(A3, A4)
Pink type		Pink	6		Petunidin 3RGac5G(A1, A2)
			7		Delphinidin 3RGac5G(A7), Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
White type		White	4		No anthocyanin
Dwarf type		Mauve	1		Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			2		Malvidin 3RGac5G(A3,A4)
			6		Petunidin 3RGac5G(A1, A2)
			7		Delphinidin 3RGac5G(A7), Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
Pink		Pink	6		Petunidin 3RGac5G(A1, A2)
			8		Delphinidin 3RGac5G(A7) and Petunidin 3RGac5G(A3, A4)
Other type		Purple	6		Petunidin 3RGac5G(A1, A2)
			7		Delphinidin 3RGac5G(A7), Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			8		Delphinidin 3RGac5G(A7) and Petunidin 3RGac5G(A3, A4)

Table 3-25. Division based on major anthocyanin composition in S₁Op₁ progenies from Light blue type by self-pollination.

Generation	Flower types	Flower colors	Patterns	Anthocyanin composition
P	Tsumabeni'	light pink	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4),
Op ₁	Light blue type	light blue	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4),
S ₁ Op ₁	Mauvish type	mauve	5	Many anthocyanins without Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
			6	Petunidin 3RGac5G(A1, A2),
	White type	white	4	No anthocyanin

Table 3-26. Division based on major anthocyanin composition in S₁Op₁ progenies from White type by self-pollination.

Generation	Flower types	Flower colors	Patterns	Anthocyanin composition
P	Tsumabeni'	light pink	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
Op ₁	White type	white	4	No anthocyanin
S ₁ Op ₁	Mauvish type	mauze	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
	Sunago, Kasuri type	pink	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
	White type	white	4	No anthocyanin
	Stripe type	buluish purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
	Dwarf type	redish purple	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)
	Crape type	pink	1	Petunidin 3RGac5G(A1, A2) and Malvidin 3RGac5G(A3, A4)

パターンは Petanin を主要色素とするものであり、「ノハナショウブ型」, 「濃い長井小町型」および「純白型」以外の 5 系統の S_1Op_1 植物で見つかった (Table 3-19, Table 3-21, Table 3-23~Table 3-25).

パターン 7 は 3 種類のアントシアニン, Petanin, Ensatin そして Delphinidin をアグリコンとする Violanin を主要色素とする組成である. パターン 6 と同じく, S_1Op_1 植物で初めて出現した構成型であり, これまで微量成分であった Violanin を主要色素の 1 つとする点で注目すべき構成型といえる. パターン 7 は「長井小紫型」(Table 3-21), 「長井小町型」(Table 3-22) および「爪紅型」(Table 3-24) の S_1Op_1 植物で発見された.

パターン 8 は, パターン 7 と組成が類似しており, Ensatin を除く, Petanin と Violanin の 2 成分を主要とする. パターン 8 は, より赤味の強い Malvidin をアグリコンとする Ensatin の含有量が少なく, より青味の強い Delphinidin 型の Violanin を主要とする構成型のため, 本構成型の個体は青花育種に有用となる可能性がある. 個体数は少ないが「郭公鳥型」(Table 3-19), 「長井小紫型」(Table 3-21), 「長井小町型」(Table 3-22) および「爪紅型」(Table 3-24) の F_2 植物で観察された.

S_1Op_1 植物の色素分析から, 親世代 ('爪紅') と Op_1 植物では微量成分として検出された Delphinidin 型の色素 Violanin がパターン 7 および 8 において主要色素として検出された. このことから, Violanin の集積育種が可能であることが示された. また, S_1Op_1 植物にて Op_1 植物では認められなかった色素組成パターンが認められたことから, 世代を重ねることにより, 色素組成が多様化することもわかった.

実験 3. 矮性個体の特性の調査

'爪紅' より得た Op_1 植物の自殖次代植物 (S_1Op_1) のうち, 系統 3 「長井小紫型」, 系統 4 「濃い長井小町型」, 系統 5 「長井小町型」, 系統 6 「爪紅型」および系統 8 「純白型」の中から, 草丈の低くなる特徴を有する矮性タイプが計 25 個体出現した. 中でも, Fig. 3-15 に示す

極めて小さな超矮性個体は，系統6「爪紅型」の S_1Op_1 植物より1個体（系統6「爪紅型」の No.3）が出現した．

2008年版日本花菖蒲協会写真品種解説の中で，ハナショウブの草丈の評価を，矮性50 cm以下，低性50～60 cm，中性80 cm付近および，高性100 cm以上と定めているが，本研究における矮性個体は，草丈50 cm以下のものを矮性個体とし，50～70 cmの草丈の個体は半矮性とした．

実験3では，爪紅の自然受粉から得た Op_1 植物の自殖後代である S_1Op_1 植物にて出現した矮性，半矮性個体および，その自殖後代植物（ S_2Op_1 ）を用いて，それらの形態特性を調査した．

1. ‘爪紅’から得た Op_1 植物の自殖次代植物（ S_1Op_1 ）において出現した，矮性および半矮性個体の形態調査

ビニールポットから植木鉢に移植した矮性，半矮性個体の花高，花の大きさ（縦，横）を調査した．Table 3-27に示したように，草丈が矮性（Dwarf, 50 cm以下），半矮性（Low, 51～70 cm）およびその他（71 cm以上）の3型に分けられた．なお，花菖蒲協会写真品種解説（2008）にて高性とされる100 cmを超える個体は見られなかった．

花高が50 cm以下であった個体は，系統3「長井小紫型」の No.114（49.9 cm）および系統6「爪紅型」の No.3（27.4 cm）の2個体であり，半矮性は8個体，71 cm以上の草丈の個体は，15個体であった．

系統6「爪紅型」から出現した No.3 は，同じく矮性に分類された系統3「長井小紫型」の No.114 よりさらに22.5 cmも花高が低く，より確かな矮性形質を示し，有用な矮性形質の遺伝資源と期待された．

2. S_1Op_1 植物で出現した矮性，半矮性個体の種子稔性

矮性および半矮性とした25個体を用い，自家受粉による種子稔性を調査し，Table 3-28に示した．矮性，半矮性個体では，種子稔性が50粒を超える個体はなく，系統4「濃い長井小町型」の No.50，系統6「爪紅型」の No.3，No.30，No.39においては，結莢もしなかった．

Table 3-27. Morphological characters of dwarf plants were appearance in S₁Op₁ progenies.

Line	Individuals	Plant	Outer perianth	
		height(cm)	Length(cm)	Range(cm)
3. Nagai-komurasaki type	No.114	49.9 ^{d1)}	7.8	5.4
	Control ²⁾	69.9±8.0 ³⁾	7.2±1.0	5.4±1.0
4. Deep-Nagai-komachi type	No.27	78.1 ^o	6.0	6.1
	No.50	97.3 ^o	7.4	6.3
	No.51	60.7 ^s	7.8	7.6
	No.63	90.5 ^o	8.1	7.1
	Control	57.2±11.2	7.4±0.5	6.7±0.6
5. Nagai-komachi type	No.36	73.0 ^o	8.1	6.0
	No.138	94.9 ^o	9.8	8.0
	Control	65.8±5.3	8.0±0.9	6.3±0.7
6. Tsumabeni type	No.3	27.4 ^d	5.1	4.8
	No.4	86.9 ^o	6.0	6.5
	No.25	76.3 ^o	6.0	6.5
	No.28	73.0 ^o	7.3	7.1
	No.29	75.2 ^o	6.6	5.8
	No.30	56.1 ^s	6.9	6.8
	No.32	72.8 ^o	6.9	6.7
	No.36	71.2 ^o	6.2	6.7
	No.39	71.9 ^o	6.8	6.2
	No.42	71.3 ^o	5.9	5.5
	No.54	63.3 ^s	6.4	6.7
	No.74	61.5 ^s	5.3	4.4
	No.76	72.5 ^o	7.1	5.7
	No.83	75.3 ^o	5.9	7.0
	No.84	67.0 ^s	5.9	6.2
No.85	67.5 ^s	7.0	5.9	
No.89	68.4 ^s	6.9	6.9	
Control	57.3±12.8	6.5±0.7	5.8±1.4	
8. White type	No.12	54.9 ^s	7.2	6.0
	Control	71.9±6.95	7.3±0.71	6.5±0.73
1) d: dwarf, < 50 cm, s: semi dwarf, 51-70 cm, other: > 71 cm.				
2): Nomal plants				
3): Mean ± S.D.				

Table 3-28. Seed fertility of self pollination in dwarf plants (S ₁ Op ₁) appeared from Op ₁ generation through natural hybridization.							
Line	Individuals	No. of flowers pollinated (A)	No. of pods obtained (B)	pod set percentage (B/A)	No. of seed harvested (C)	Seed fertility (C/A)	
3. Nagai-komurasaki type	No.114	13	11	84.6	604	46.5	
4. Deep-Nagai-komachi type	No.27	11	5	45.5	342	31.1	
	No.50	1	0	0	-	-	
	No.51	3	1	33.3	5	11.7	
	No.63	5	2	40	111	22.2	
5. Nagai-komachi type	No.36	9	5	55.6	487	54.1	
	No.138	16	10	62.5	715	44.7	
6. Tsumabeni type	No.3 ^a	3	0	0	-	-	
	No.3 ^b	11	8	72.2	395	35.9	
	No.4	7	1	14.3	12	1.7	
	No.25	13	5	38.5	117	9.0	
	No.28	5	1	20	24	4.8	
	No.29	9	1	11.1	36	4.0	
	No.30	1	0	0	-	-	
	No.32	24	8	33.3	201	8.4	
	No.36	13	5	38.5	190	14.6	
	No.39	12	0	0	-	-	
	No.42	19	3	15.8	175	9.2	
	No.54	14	3	21.4	108	7.7	
	No.74	12	4	33.3	324	27.0	
	No.76	11	2	18.2	26	2.4	
	No.83	25	5	20	211	8.4	
	No.84	16	4	25	88	5.5	
	No.85	10	1	10	43	4.3	
	No.89	17	2	11.8	43	2.5	
8. White type	No.12	7	5	71.4	255	36.4	
a: Date pollination in 2012							
b: Date pollination in 2013							

S_1Op_1 植物の矮性でない通常個体の種子稔性を Table 3-18 に示したが、通常個体の種子稔性は 15.5~60.4 粒と系統により差がみられたが、平均では 45.5 粒である。一方、矮性、半矮性個体では平均の種子稔性が 16.9 粒と通常個体の半分以下であり、矮性および半矮性個体は、通常個体よりも種子稔性が低下することが判明した。

なお、系統 6 「爪紅型」の No.3 は有用な矮性個体と考えられたため、翌年に再度自殖を行ったところ、11 花の交配の結果、8 つの莢から種子が得られ、種子稔性が 35.9 粒と向上した。

3. 矮性、半矮性個体の自殖後代 (S_2Op_1) の形態調査

矮性形質が後代に伝達されるのかを調査するために、矮性、半矮性個体の自家受粉から得た種子を播種し、 S_1Op_1 植物 9 個体の種子から全 512 個体の S_2Op_1 植物を得た。得られた S_2Op_1 植物をビニールポットに移植し約 2 か月後に形態調査を実施した (Table 3-29)。

その結果、各 S_2Op_1 植物間で草丈に差が見られ、最も草丈が高くなった S_2Op_1 植物は、系統 3 「長井小紫型」の No.114 を親とするものであった。一方、最も低い草丈を示したものは系統 6 「爪紅型」の No.84 からの S_2Op_1 植物であった。

葉幅は、系統 4 「濃い長井小町型」の No.51 由来の S_2Op_1 植物が 1.5 cm と最も広く、また最も細い葉幅は系統 6 「爪紅型」の No.84 の 0.8 cm であった。このことから、No.84 より得た S_2Op_1 植物は葉が細く草丈の低い集団と考えられた。また、形態調査の結果から、系統 3 「長井小紫型」の No.114、系統 4 「濃い長井小町型」の No.51 および、系統 5 「長井小町型」の No.138 は草丈が高く葉幅の広い集団、その他の 5 つの S_2Op_1 植物は、草丈が低く葉幅の広い集団と考えられた。しかし、草丈から矮性かどうかを判断することは困難なため、開花期に花高を測定し、矮性形質の遺伝性をより詳細に調査する必要がある。

4. 斑入り個体の葉の細胞学的観察

系統 3 「長井小紫型」の No.114 より得た S_2Op_1 植物の中には、斑入りの葉となったものが 1 個体出現した (Fig. 3-17)。斑入り個体の出現は、 Op_1 および S_1Op_1 植物では見られず、 S_2Op_1 植物で初

Table 3-29. Morphological characters of S ₂ Op ₁ plants obtained from dwarf plants (S ₁ Op ₁) through self-pollination.				
Line	Individuals	No. of plants examined	Leaf	Leaf
			length(cm)	width(cm)
3. Nagai-komurasaki type	No.114	148	32.7±4.1 ^a	1.1±0.2 ^a
4. Deep-Nagai-komachi type	No.51	20	29.6±2.9	1.5±0.1
	No.63	10	25.4±3.2	1.0±0.1
5. Nagai-komachi type	No.138	166	31.9±3.7	1.1±0.2
6. Tsumabeni type	No.25	41	27.0±3.2	1.2±0.2
	No.36	8	24.2±1.6	1.0±0.2
	No.42	66	25.2±2.4	1.2±0.2
	No.54	41	25.4±2.5	1.2±0.2
	No.84	12	18.4±3.1	0.8±0.3
	No.3	198 ^b		
a: Mean±S.D.				
b: No. of S₂Op₁ plants obtained from embryo culture.				

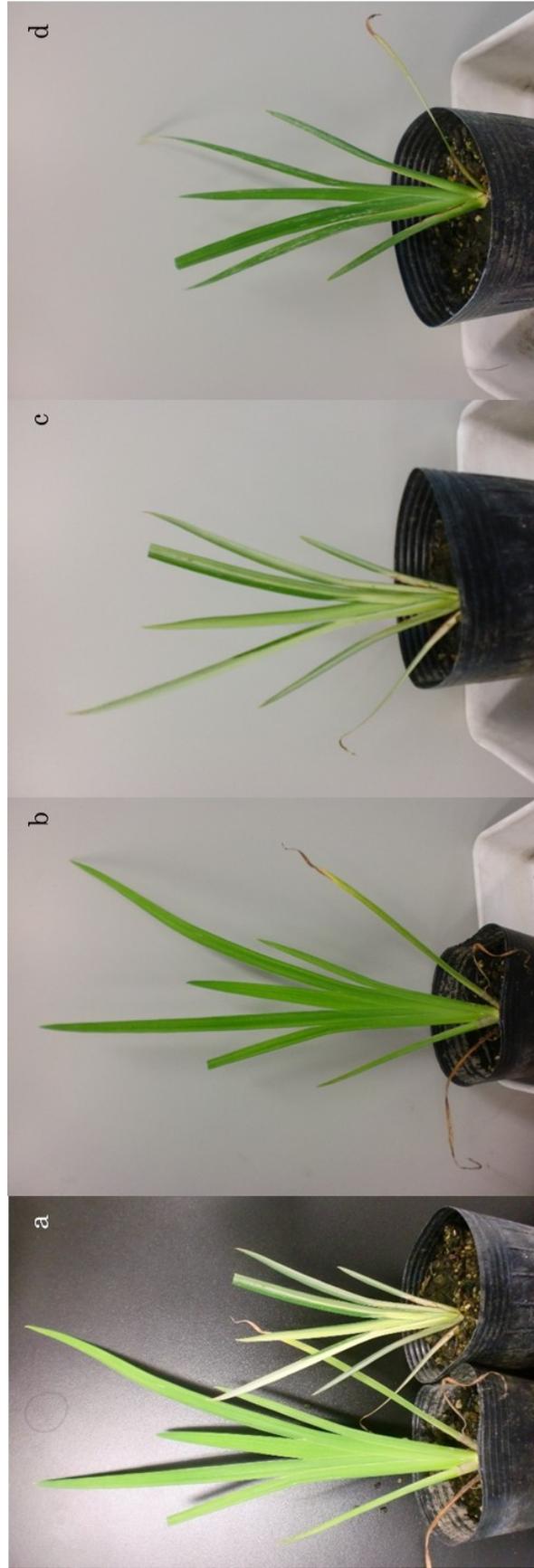


Fig. 3-17. Variegation plants in S_2Op_1 progenies.
a: normal plant (left), variegation plant (right), b: normal plant, c: white leaf of variegation plant, d: green leaf of variegation plant.

めて認められた。

斑入り個体は、Fig. 3-17 に示すように、葉の片面に斑が入り、もう片面は正常な個体と同様に緑色であった。

斑入り個体の葉を剃刀で薄くスライスし、葉の断面細胞の観察を行った結果、正常な葉の細胞は、表皮細胞の直下の細胞も緑色を呈し、葉緑体の存在が認められたが (Fig. 3-18c, f)、斑入り個体の葉は、斑の入る面の表皮直下の細胞は白く透明になっており、葉緑体の存在が認められなかった (Fig. 3-18d, e)。一方、斑入り個体の緑色の葉面では、表皮細胞直下の細胞が、正常個体と同じく緑色を呈し、葉緑体の存在が観察出来た (Fig. 3-18d, e)。このことから、 S_2Op_1 植物で出現した斑入り個体の‘斑’は、表皮細胞直下の細胞の葉緑体の欠失によるものと示唆された。

日本花菖蒲協会写真品種解説 (2008) に記載されている約 1100 品種の中で、斑入りの葉を有するものは、ノハナショウブに似た赤紫の花をつける‘縞菖蒲’のみである。本研究で得られた斑入り個体は、‘縞菖蒲’とは異なる紫の花色を呈する個体の後代であることから、新たな斑入り品種作出のための遺伝資源としての利用および、本個体自体が、新たな花色を呈した斑入り品種となる可能性は大きいと期待された。

5. 後代植物の獲得のための胚培養について

なお、系統 6「爪紅型」の No.3 は、通常用の土に種子をそのまま播種する方法では後代が得られなかった。そのため、得られた種子から胚を取り出す、胚培養を用いて後代を獲得した。その結果、198 個体の S_2Op_1 植物の獲得に成功した (河内 未発表)。アヤメ属植物における培養を用いた後代の獲得例は、カキツバタとハナショウブの種間雑種 (Yabuya and Yamagata 1980)、チャショウブとカキツバタの種間雑種 (Inoue *et al.* 2006) などで報告されている。これらの植物同様、ハナショウブにおいても胚培養が後代植物の効率的な獲得法として有効な手段であることを支持する結果が得られた。

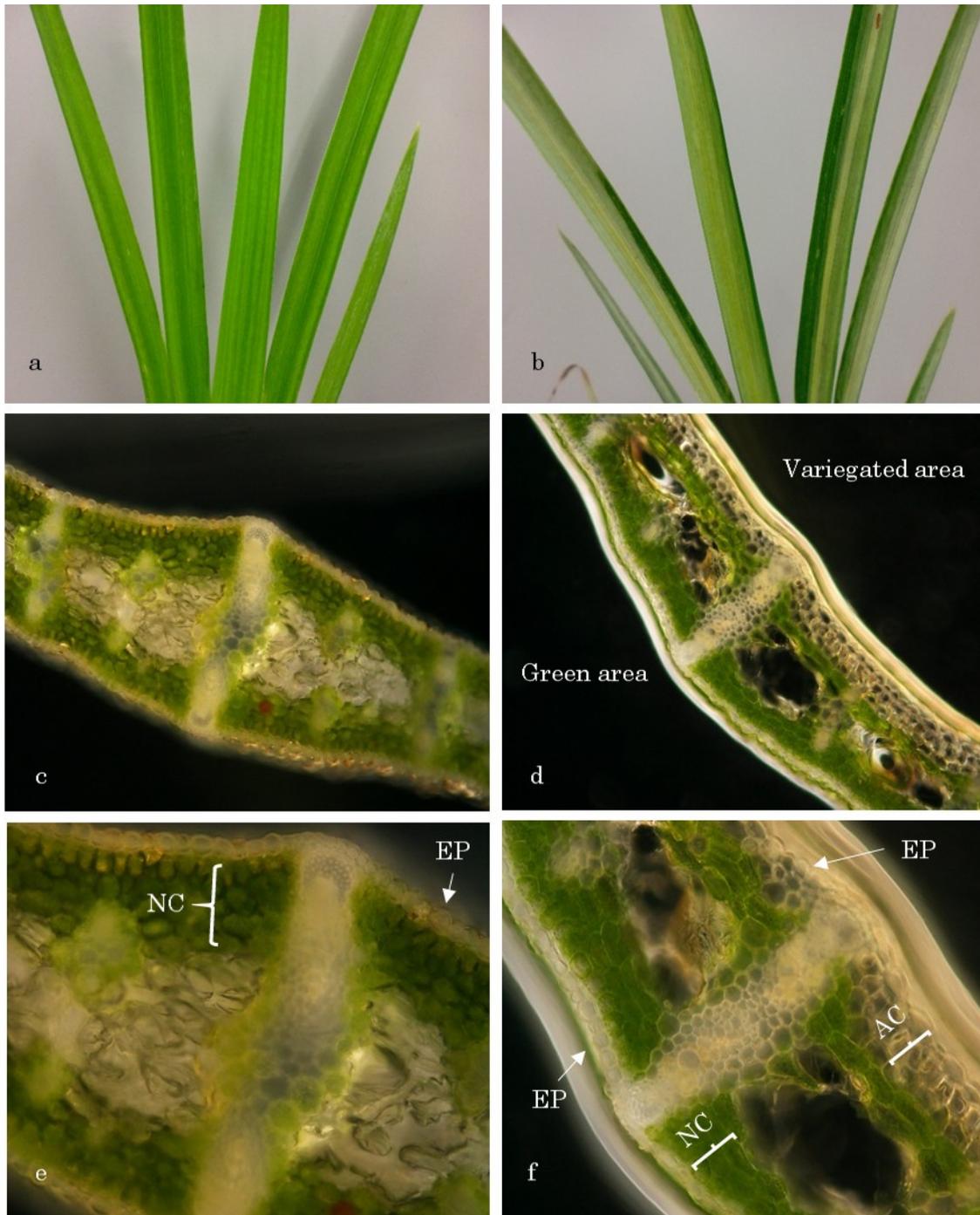


Fig. 3-18. Anatomical observation of the leaf in normal and variegation plants.
 a,c,f : normal plants, b,e,g : variegation plants.
 EP: epidermal cell, AC: abnormal cell, NC: normal cell.

第4節 考察

1. 後代植物の形態的特性に関して

長井系ハナショウブの後代植物を用いた特性調査および、花色素の分析により、後代植物では親とは異なる様々な形質が現れることが観察された。

自然交配から得た実生第一代植物 (O_{p1}) では、親より草丈の高くなる傾向が見られ、花も親とは異なる様々な形態が観察された (Fig. 3-2~Fig. 3-4)。最も多彩な形態的変異が認められた‘爪紅’から得た O_{p1} 植物の自殖次代である S_1O_{p1} 植物においては、 O_{p1} 植物と同様に花の形態に変異が見られ、その中には、 O_{p1} 植物では観察されなかった砂子、緋、縮緬花卉といった特徴を持つ個体や (Fig. 3-6~Fig. 3-13)、花高の非常に低い矮性形質を有する個体が出現した (Fig. 3-15)。

江戸系品種‘五月晴’の自殖後代の形態調査では、‘五月晴’は花被片に入る脈の色が淡い桃色であるのに対し、その自殖後代は濃い赤紫色となる変異にとどまった (Fig. 3-14)。このことから、江戸時代より品種改良がなされ形質が固定されてきている江戸系品種に比べ、長井系ハナショウブは、形質が未固定の野生に近い特性を持っていると推測された。

なお、白花は劣性遺伝子をホモで有するときに発現するものと一般に言われるが、本研究の結果では、 O_{p1} 植物で花色が白であった個体の自殖次代植物 (S_1O_{p1}) において、藤色、桃色、青紫、赤紫と白色以外の花色を呈する個体が観察された。このことから、ハナショウブの花色に関与する遺伝子の発現は複雑であることが示唆された。

また、草丈が低性 (50~60 cm) とされている品種は日本花菖蒲協会写真品種解説 (2008) の中で約 70 品種と少数である。本研究では草丈が 27.4 cm の低性とされる品種の約半分の草丈で、開花に至る超矮性の個体を得られた。現在、草丈が 30 cm 程度にとどまる超矮性のハナショウブ品種の存在は知られていない (日本花菖蒲協会 2008)。

矮性形質を有する個体は、種子稔性が通常個体よりも下がる傾向にあったが、後代の育成は可能である。また、発芽が悪く、後代を得にくい個体であっても、胚培養を用いることで、より多数の後代植物を獲得することができ、効率的な後代の獲得には胚救済法が有効である

ことが示唆された。

矮性形質は、鉢植えや栽植での利用が多いハナショウブにとって、盆栽仕立てや切り花といった、新たな利用に適した形質と考えられる。このことから、矮性個体の育成は長井系ハナショウブを含め、ハナショウブや他のアヤメ属植物の園芸品種の多彩化に寄与すると期待される。

さらに、矮性個体の自殖後代植物 (S_2Op_1) の中から斑入りの葉を有する個体が 1 個体出現した。斑入り個体の葉の組織を観察すると、斑入り部分の細胞は無色透明であり、葉緑体の欠失により、‘斑入り’となることが明らかとなった。こうした突然変異により斑入りの個体が出現する例は、ペチュニア (Aoki *et al.* 1995) やトウモロコシ、タバコ等でも報告がある (武智・坂本 2002)。

既存の栽培品種の中で、斑入りの葉を有するものは、ノハナショウブに似た赤紫の花をつける‘縞菖蒲’のみである (日本花菖蒲協会 2008)。本研究で得られた斑入り個体は、紫の花色を呈する個体の後代であることから、本個体が‘縞菖蒲’に次ぐ斑入り品種となる可能性、および‘縞菖蒲’とは異なる花色を呈する新たな斑入り品種作出のための遺伝資源としての利用が期待された。

2. 長井系ハナショウブ‘爪紅’から得た Op_1 植物とその自殖次代植物 (S_1Op_1) の花色素特性に関して

Op_1 および S_1Op_1 植物における花色素の分析から、色素構成においても変異があることが明らかとなった。

‘爪紅’は、Petanin (A1, A2) と Ensatin (A3, A4) を主要アントシアニンとするパターン 1 の組成であった。‘爪紅’から得た Op_1 植物における色素組成パターンは 4 パターンに分類でき、 Op_1 植物の自殖次代である S_1Op_1 植物では 8 パターンが認められた。

ハナショウブにおいて最も基本の色素組成型とされる Petanin (A1, A2) と Ensatin (A3, A4) を主要アントシアニンとするパターン 1 に含まれる個体が Op_1 , S_1Op_1 植物においても最も多く、既存の報告 (Yabuya 1991) 同様、本色素組成は、ハナショウブの最も基本の構成と考えられる。

S_1Op_1 植物では、 Op_1 植物で見られなかった色素組成 (パターン 5 ~ 8) の個体も出現した。

Ensatin のみを主要アントシアニンとする色素組成のパターン 2 は、長井系ハナショウブの 14 品種，その他の栽培品種では 6 品種がこれに含まれる．ハナショウブの原種とされるノハナショウブの色素組成がパターン 1 であることを踏まえ，本研究でパターン 1 の色素組成である‘爪紅’の後代植物 (Op_1 , S_1Op_1) から既存の栽培品種と同一の色素組成の個体が出現したことから，Ensatin のみを主要とする色素組成は，ハナショウブの基本型とされるパターン 1 の変異型であると考えられ，それは，Petanin の合成が何らかの要因で抑制され Ensatin の合成が中心に行われることによるものと推測される．

なお，Petanin を主要アントシアニンとするパターン 6 の場合は，Ensatin の合成が抑制され Petanin の合成が優先されるパターン 1 の変異型と考えられる．

また，親および Op_1 植物では微量色素であり，青色発現に有用とされる Delphinidin 型の色素の Violanin (A7) を主要アントシアニンの 1 つとするパターン 7 と 8 の個体の出現は，自殖により Violanin の合成に関与する遺伝子のホモ化が進み，その発現が強化されたことによると考えられる．Violanin を主要色素とする個体の出現は，同時に，世代を重ねることでの Violanin の蓄積が可能であることを意味しており，長井系品種内での Violanin を主要色素とする青色花品種の育成も夢ではない．例えば，非常に貴重な爪咲きの花型である‘長井鷹の爪’も Violanin を微量色素として含む品種である．これの自殖，または他の Violanin を有する品種または個体との交雑によって，後代植物の中から‘長井鷹の爪’由来の爪咲きの花型と両親由来の Violanin を主要アントシアニンとして有する個体の出現が予想され，そのような形質を持つ個体は，花型においても，色素組成においてもハナショウブの発展に貢献する素材になると考えられる．

さらに，長井系ハナショウブには，Petanin, Ensatin, これらの脱アシル化アントシアニン (A5, A6), そして Violanin と同定されたアントシアニンの他にも，未同定の様々なアントシアニンが含まれているため，今後、新たな色素構成パターン of 個体が出現する可能性は極めて高い．

最後に，同じパターンに類別される個体間で，花色に違いが見られた．ハナショウブでは，アントシアニンとその他のフラボンとのコピグメンテーションによって花色に違いがもたらされていることが

Yabuya *et al.* (1997) によって報告されている。また, Mizuno *et al.* (2013) によってダッチアイリスの青色花品種の花被片においても同様の報告がなされている。そのため, 長井系ハナショウブの後代植物における同一の色素組成パターンに含まれる個体間の花色の差異も, フラボンによるコピグメンテーションによるものと考えられ, 今後, フラボンとの関係を明らかにする必要がある。

第4章 総合考察

長井系ハナショウブは、山形県の長井市あやめ公園にて保存されている品種群であり、江戸中期頃のハナショウブや原種であるノハナショウブに似た形質を持つ小輪花が多い。昭和37年に‘野川の鷺’を含めた約30品種が選抜、命名されたことをきっかけに、「長井古種」として広く認知され、現在では58品種が存在する。しかし、昭和37年以前の文献記録が残っておらず、江戸中期からの品種がそのまま伝わっているかは不明であり、現在、ハナショウブの代表的な古種として親しまれている長井古種でさえ、体細胞染色体数や生理学的、形態学的特性の遺伝的解析についてはほとんど行われておらず、有用な遺伝資源となる可能性がある。

一方、ハナショウブの花色は紫、青紫、白、赤紫などがあり、覆輪、絞り、砂子などの模様も様々である。しかし、多様性に富んでいるにもかかわらず、ハナショウブの花色には青、赤、黄色、橙などが欠けており、さらなる多彩化が望まれている。ハナショウブの花色素の特性調査は江戸系、伊勢系、肥後系の品種群を中心にこれまでに行われてきた(林ら 1978, Ishikura and Yamamoto 1978, Yabuya 1991b, Yabuya *et al.* 2001, Imayama and Yabuya 2003, Yabuya *et al.* 2006)。しかし、長井系ハナショウブに関する知見はほとんどないのが現状である。

そこで、長井系ハナショウブの花色素などの特性を明らかにするとともに、長井系の育種的な利用を図るための基礎的知見を得ることを目的として本研究を実施した。このため、長井系ハナショウブの体細胞染色体数の調査および花被片に含まれるアントシアニン組成を明らかにするとともに、主要アントシアニンの同定を行った。また、長井系品種‘爪紅’、‘三淵の流’および‘薄紅’から自然交配で得られた Op_1 植物の花色の変異状況と、HPLCを用いて、花色の質的変異の解明を試みた。さらに、後代での形態や花色素の変異をみるために、‘爪紅’ Op_1 植物の自殖後代 (S_1Op_1 および S_2Op_1) における分離状況を調査した。本章では、本研究にて得られた成果を基に、長井系ハナショウブの育種的利用について総合的に考察した。

はじめに長井系ハナショウブの花形を含めた形態の調査を行ったところ、六英花である‘長井鷹の爪’と‘長井蛇の目傘’を除いた56品種が三英花の品種であった。また、花の特性も長さに比べ幅が狭く、ノ

ハナショウブを思わせるようであり、野性的特性を色濃く残している品種群であることが明らかになった (Table 2-1). しかし、中には‘三淵の波’や‘長井鷹の爪’といったハナショウブの中でも極めて珍しい花型の品種も見られた (Fig. 2-2). これらは、他のハナショウブ品種群には見られないものである. このことは、ハナショウブの花型の多様化にとって有用な育種素材になると期待される. 実際に、‘三淵の波’を育種素材として‘鬼柄杓’という蓮華咲きの品種が作出されている (清水 2004).

ハナショウブの体細胞染色体数は、富野 (1963) によって江戸系、伊勢系、および肥後系品種で報告されているが、長井系品種の体細胞染色体数の知見はなかった. そこで、長井系 55 品種とノハナショウブを用いて体細胞染色体数の調査を行った結果、それらの染色体数は、すべて $2n=24$ であることが判明した. 江戸系や肥後系においても、数百という多くの品種が育成されているが、そのほとんどが二倍体品種であり (日本花菖蒲協会 2008)、四倍体品種はごく一部である (光田 1998). 伊勢系品種の中には $2n=25$ の染色体数を持つ 22 品種が認められているが (富野 1963)、長井系品種では認められなかった (Table 2-1). 長井系ハナショウブは染色体数レベルでは、ノハナショウブと一致しており、野生の特徴を保ち、染色体の構造的な大きな変異は少ないと考えられる. また、二倍体であることにより、伊勢系品種で観察されている異数体で見られるような染色体の異常分裂が起こる可能性の低いことから、長井系以外の品種との交雑においても後代植物を獲得しやすいと考えられる.

長井系ハナショウブ 51 品種とノハナショウブの花粉稔性は、品種間で花粉稔性に差が見られ、‘葉山の雪’は 4.0% と最も低かった (Table 2-1). しかし、平均 87.0% と高い花粉稔性を示した. 伊勢系で見ついている異数体品種 ($2n=25$) の花粉稔性の低下要因は、染色体の異常分裂によることが知られている. (富野 1963, Yabuya *et al.* 1989, 1992). また、八重咲きおよび多弁咲き品種の低い花粉稔性は、葯の花弁化によるものと推測されるが、長井系品種では異数体および八重咲き、多弁咲きの品種も認められていない. そのため、ボケ類において考察されているような広い変異幅を持った配偶体致死や自家不和合現象の内在、個々の園芸品種の成立過程との関連 (斎藤・金子 1975) がハナショウブの低稔性の要因の一つとして推測される. 今後、花粉稔性の低

い品種についてその要因を探る必要がある。

次に、長井系ハナショウブの花被片に含まれるアントシアニンとして7種類のアントシアニン (A1~A7) が同定され、そのうち6種類 (A1~A6) のアントシアニンは、Petunidin または Malvidin をアントシアニジンとし、アントシアニジンの5-位にグルコースが、3-位にラムノースとグルコースが結合した色素であった (Fig. 2-5)。A1~A4 の4種類のアントシアニンについては、NMR 分析などを用いて以下のように完全な構造決定をすることができた。

- A1 : Petunidin
3-*O*-β-[(4'''-*Z*-*p*-coumaroyl-α-rhamnopyranosyl)-(1→6)-β-glucopyranoside]-5-*O*-β-glucopyranoside (*Z*-Petanin)
- A2 : Petunidin
3-*O*-β-[(4'''-*E*-*p*-coumaroyl-α-rhamnopyranosyl)-(1→6)-β-glucopyranoside]-5-*O*-β-glucopyranoside (*E*-Petanin)
- A3 : Malvidin
3-*O*-β-[(4'''-*Z*-*p*-coumaroyl-α-rhamnopyranosyl)-(1→6)-β-glucopyranoside]-5-*O*-β-glucopyranoside (*Z*-Ensatin)
- A4 : Malvidin
3-*O*-β-[(4'''-*E*-*p*-coumaroyl-α-rhamnopyranosyl)-(1→6)-β-glucopyranoside]-5-*O*-β-glucopyranoside (*E*-Ensatin)

同定の結果、A1, A2, および A3, A4 は、それぞれ Petanin (A1, A2) と Ensatin (A3, A4) の構造異性体 (*Z*-体, *E*-体) であることが判明した。中でも、*Z*-petanin および *Z*-Ensatin, *E*-Ensatin の完全な構造決定は今回が初めてである。

A5 (Petunidin 3-*O*-rutinoside-5-*O*-glucoside) と A6 (Malvidin 3-*O*-rutinoside-5-*O*-glucoside) は、A1, A2 および A3, A4 の脱アシル化アントシアニンであった (Fig. 2-5)。この2種類のアントシアニンを主要成分とする色素組成の品種は‘九重の桜’などで報告されている (Yabuya 1991b, Yabuya *et al.* 2001, Imayama and Yabuya 2003)。

A7 (Delphinidin 3-*O*-[(4'''-*p*-coumaroylrhamnosyl)-(1→6)-glucoside]-5-*O*-glucoside, Violanin) は、青色花品種の育成に有用とされる Delphinidin をアントシアニジンとする色素であり、長井系品種では

微量色素として検出された。A7 の検出は，長井系以外の品種においても報告されている (Yabuya 1991b, Yabuya *et al.* 1994a, Yabuya *et al.* 1997)。なお，A7 を主要色素の 1 つとする品種 (‘磯辺’ など) の報告はなされているが，その数は極めて少ない (Yabuya *et al.* 2001, Imayama and Yabuya, 2003)。

同定された主要アントシアニンの構成により，長井系品種とノハナショウブは以下の 4 つの色素パターンに類別できた (Table 2-7, Fig.2-6)。

- パターン 1 : Petunidin 3RGac5G (A1, A2) と Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を主要アントシアニンとするもの。
- パターン 2 : Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を主要アントシアニンとするもの。
- パターン 3 : Petunidin 3RG5G (A5) および Malvidin 3RG5G (A6) を主要アントシアニンとするもの。
- パターン 4 : アントシアニンを含まないもの。

パターン 1 は，ハナショウブの基本のアントシアニン構成とされているおり，長井系品種においても該当する品種が最多であり，既存の報告 (Yabuya 1991b, Yabuya *et al.* 2001, Imayama and Yabuya 2003) と同様の結果であった。また，Malvidin 3RGac5G を主要アントシアニンとするパターン 2 は，コピグメント効率が高いとされているため (Iwashina *et al.*, 1996)，この組成型の品種は青色花育種の有用な遺伝資源となると推測される。パターン 3 は，パターン 1 の 4 つの主要アントシアニンの脱アシル化アントシアニン (A5 と A6) による構成である。このパターンを有する長井系以外の栽培品種は十数品種と少数であるが，長井系品種では 52 品種中 3 品種で発見できた。これらの長井系品種を育種素材とすることで，新たな花色を呈する品種の育成および，本色素構成を有する品種の拡大が考えられた。

本研究で，異なる花色を示す品種が同じ色素パターンであった。既存の報告でもこのような例が示されているが (Yabuya 1991b, Yabuya *et al.* 2001, Imayama and Yabuya 2003)，ハナショウブおよび同じ *Iris* 属に所属するダッチアイリスの花色発現には，アントシアニンだけでなくその他のフラボンとのコピグメンテーション

が関与していることが知られている (Iwashina *et al.* 1996, Mizuno *et al.* 2013). 長井系品種での花色の違いも, おそらく, 品種間のフラボンの質と量の変異によると推測される. 今後, 長井系ハナショウブの花色素発現の詳しい特性を明らかにするために, これらのフラボンとの関係を明らかにする必要がある.

これらのことから, 長井系ハナショウブは, 計 58 品種と小規模な品種群ではあるが, ‘三淵の波’ といった蓮華咲きの魅力的な三英花や, ‘長井鷹の爪’ という非常に珍しい爪咲きの品種, および ‘長井蛇の目傘’ といった六英花も存在し, その花型の多様性は大きく, 今後, ハナショウブの花型の多様化に貢献する育種素材と考えられる.

長井系品種の花の主要アントシアニンは, Petunidin 配糖体または Malvidin 配糖体で構成されていた. 一方, 長井系以外の栽培品種における花色素の調査では, Petunidin, Malvidin 配糖体のほかに, Cyanidin, Peonidin および Delphinidin 配糖体を主要アントシアニンとする品種が報告されている (Yabuya *et al.* 2001, Imayama and Yabuya 2003). 長井系品種について主要アントシアニンの特性面からみると, 主要アントシアニンの変異が少なく原種に近い特徴を色濃く残す品種群であると考えられ, これには, 長井系ハナショウブの育種の歴史が他の品種群に比べて浅いことや, 育種的背景が野生種の変異個体をそのまま利用してきたか, 長井系品種内あるいは長井あやめ公園内で栽培されている品種内での育種という限られた範囲で行われたことが関係していると考えられる. しかし, 微量色素としてではあるが, Delphinidin をアントシアニンとする A7 が検出されていることや, A5 と A6 を主要とする希少な色素構成 (パターン 3) の品種が存在することから, 今後, これらの色素を主とする品種の作出に長井系ハナショウブは貢献する品種群であると考えられた.

後代植物における形態および色素の変異状況の調査により, 長井系ハナショウブは後代植物において, 多様な花色および色素の変異をもたらすことがわかった.

Op₁ 植物では, 花高は親よりも高くなる傾向にあったが (Table 3-1 ~ Table 3-3), S₁Op₁ 植物では親と同じまたはそれより花高が低くなる矮性個体が出現した (Table 3-10 ~ Table 3-17). 矮性品種の乏しいハナショウブにおいて, 矮性形質を有する S₁Op₁ 植物 (系統-6「爪紅型」No.3, Fig. 3-15) は, 倒伏耐性の向上や盆栽仕立て, 生け花

といったハナショウブの新たな利用性を見出す遺伝資源として利用できると考えられる。

さらに、 S_1Op_1 植物では、矮性個体の他にも、砂子、緋、縮緬花卉といった Op_1 植物では見られなかった模様や特殊な花被片形態をとる個体が出現し、さらなる多様性がもたらされた (Fig. 3-6~Fig. 3-13)。予備実験として行った江戸系品種の‘五月晴’の自殖後代では、親(‘五月晴’)と後代植物との形態的な違いは色の濃淡といった程度の変異にとどまった (Fig. 3-14)。このことから、長井系ハナショウブは、江戸系、肥後系および伊勢系といった品種改良が積極的になされてきた品種群に比べ、形質が未固定の野生に近い特性を持っていると推測された。また、本研究の結果では、 Op_1 植物で白花であった個体の自殖後代において、藤、桃、青紫、赤紫と白色以外の花色を呈する個体が観察された。一般に白花は、劣性遺伝子をホモで有するときに発現すると言われているが、ハナショウブの花色に関わる遺伝子の発現は複雑であることが示唆された。しかし、このような花色の発現機構を持つが故に、ハナショウブは品種間交雑による育種を基本とした、狭い遺伝資源の中でも、2000 を超える多くの優秀な品種を作り出すことができたのだと考察される。

よって、江戸系、伊勢系、肥後系といった品種改良が進んできた品種に比べ、遺伝的にある意味雑多といえる長井系は、新たな有用変異を生み出す遺伝資源としての可能性が大きいと考えられた。

さらに、 S_1Op_1 植物で出現した矮性個体の自殖第二代植物 (S_2Op_1) の中から、斑入りの葉を持つ突然変異体が 1 個体発見された。葉の断面の細胞観察により、斑入り部分の葉緑体が欠損するクロロシスによって、“斑入り”となっていることが明らかとなった。ハナショウブにおける斑入り品種は‘縞菖蒲’のみであり(日本花菖蒲協会 2008)、極めて珍しい形質であることから、今後、この斑入り個体は、新たな斑入り品種として、または、斑入り品種の育種素材として活用できるものと考えられる。

また、‘爪紅’から得た Op_1 植物および、その自殖次代植物 (S_1Op_1) における花色素の分析から、 Op_1 植物では 6 種類の主要アントシアニン (A1~A6)、 S_1Op_1 植物では、 Op_1 植物において微量色素であった A7 を含む 7 つのアントシアニン (A1~A7) が主要色素として検出され、これら主要アントシアニンの構成に基づいて Op_1 植物を 4 パター

ン, S₁Op₁ 植物を 8 パターンに以下のように類別できた.

Op₁ 植物の色素組成パターン

- パターン 1 : Petunidin 3RGac5G (A1, A2) と Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を主要アントシアニンとするもの
- パターン 3 : Petunidin 3RG5G (A5) および Malvidin 3RG5G (A6) を主要アントシアニンとするもの
- パターン 4 : アントシアニンを含まないもの
- パターン 5 : Petunidin 3RGac5G (A1, A2) と Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を含まず, 様々な微量色素で構成されるもの

S₁Op₁ 植物の色素組成パターン

- パターン 1 : Petunidin 3RGac5G (A1, A2) と Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を主要アントシアニンとするもの
- パターン 2 : Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を主要とするもの
- パターン 3 : Petunidin 3RG5G (A5) および Malvidin 3RG5G (A6) を主要アントシアニンとするもの
- パターン 4 : アントシアニンを含まないもの
- パターン 5 : Petunidin 3RGac5G (A1, A2) と Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を含まず, 様々な色素で構成されるもの
- パターン 6 : Petunidin 3RGac5G (A1, A2) を主要とするもの
- パターン 7 : Delphinidin 3RGac5G (A7), Petunidin 3RGac5G (A1, A2), および Malvidin 3RGac5G (A3, A4) を主要とするもの
- パターン 8 : Delphinidin 3RGac5G (A7) と Petunidin 3RGac5G (A1, A2) を主要アントシアニンとするもの

各世代に共通することは, ハナショウブの基本型とされているパターン 1 の色素組成を示す個体の出現数が最多となることである. すなわち, パターン 1 は後代に最も伝達されやすい色素組成であると考えられ, このことは, 江戸時代から現在に至るまでのハナショウブの長い育種の中で, この色素組成が多くの品種で脈々と受け継がれ, 現在最も多くの品種でみられる色素組成となっていることから明らか

である。また、特定の色素組成がそのまま後代に受け継がれるだけでなく、世代を重ねることで、色素組成に変異が生じ、新たな色素組成パターンが出現することが本研究から明らかとなった。この結果は、パターン1を基本とし、その他のパターンがパターン1の変異型であるという既存の報告を支持するものである (Yabuya 1991b, Yabuya *et al.* 2001, Imayama and Yabuya 2003)。さらに、S₁Op₁植物におけるパターン7と8の色素組成を有する個体の発見は、親(‘爪紅’)とOp₁植物では微量色素であったA7が、S₁Op₁植物では主要色素として検出されるまでに合成量が増加したことを示している。これは、次代への有用色素の伝達が可能であること、および、目的とする色素の蓄積育種も十分に可能であることを示している。

このことから、本来、長井系品種は微量色素として青色発現に有用とされる Delphinidin 型の Violanin (A7) を有しているため、長井系品種内での交配による Violanin を主要色素とする新品種の作出も実現できると考察される。また、Violanin に限らず、その他の微量色素の蓄積も可能であると推測されるため、今後、新たな色素構成が出現する可能性も、長井系ハナショウブを用いた実験から示された。

これら長井系ハナショウブおよび、その後代植物を用いた実験から得られた結果から、長井系ハナショウブは、他の品種群(江戸系・肥後系・伊勢系)と比較すると野生的な品種群ではあるが、花色素や花型に有用な形質を持つため、染色体数はノハナショウブや他の栽培品種と同一であっても、遺伝子レベルではかなりの潜在的な変異を有していると考えられ、今後、花型や花色にさらなる広がりを見せる可能性がある。しかし、長井系ハナショウブが、このような潜在的変異性を持っていながらも、野生種であるノハナショウブに似た形質、すなわち、基本的に花卉の英数が三英であり、花色素については Petanin と Ensatin を主要とするアントシアニン組成の品種で大半が占められていることの由縁は、おそらく、長井系ハナショウブの発祥地である長井市の人々が、多様な花型や花色を呈する変異個体の中から、形態的にノハナショウブに似たものを好み、選抜・維持してきたために、現在のような花型と色素組成を有したグループとなったものと推察される。

また、得られた個体は、ハナショウブの育種素材として有用なだけでなく、長井系ハナショウブの変異拡大にも寄与するものと考えられ、

本研究の成果は，長井系ハナショウブの発展はもとより，長井市や山形県の園芸文化に大いに貢献できるものと考えられる。

今後，さらなる形態分離の調査や，アントシアニンおよびその他のフラボンの分析を進めることは，ハナショウブを含めたアヤメ属植物の育種にとってますます重要となるだろう。

要約

江戸時代より品種改良が積極的になされてきた日本の伝統園芸植物のハナショウブは、江戸系、伊勢系、肥後系および長井系の4つの品種群に大別される。

中でも、山形県長井市あやめ公園にて保存されている長井系品種群は、昭和37年の日本花菖蒲協会の鑑賞会にて‘野川の鷺’をはじめとする約30品種が選抜、命名され、以来、58品種が存在する。このように長井系は、日本のハナショウブを代表する古種であるにもかかわらず、染色体数をはじめその特性に関する知見はほとんどない。

ハナショウブの花色にはアントシアニンが関与することが知られている。長井系以外の栽培品種では、その花被片に含まれるアントシアニンの分析が進んでおり、PetaninとEnsatinを主要色素とするものが、ハナショウブの最も基本的なアントシアニン組成型であるとされている。これまでにハナショウブの主要アントシアニンの組成は、約30パターンが報告されている。しかし、長井系ハナショウブにおける花色素に関する知見も極めて少なく、長井系ハナショウブの特性を解明するためにも、また、花色の多彩化育種の促進のためにも花色素に関する知見の蓄積は重要である。

そこで、本研究では、長井系品種の特性調査および花色素分析、そして長井系ハナショウブの後代植物 ($Op_1 \sim S_2Op_1$) の特性調査、特に花色の分離および花色素の変異状況の調査を行い、長井系ハナショウブの育種素材としての有用性を考察した。

1. 長井系品種は、大部分が三英花の品種であるが、蓮華咲きの‘三淵の波’や、六英花で爪咲きの‘長井鷹の爪’といった非常に珍しい花型の品種が存在し、小さな品種群ではあるが、多様性に富み、新たな花型の品種の作出に有用となると期待された。

長井系品種の体細胞染色体数は、 $2n=24$ であり、伊勢系品種で見られる異数体品種 ($2n=25$) は認められなかった。また、長井市あやめ公園内に保存されていたノハナショウブの体細胞染色体数も $2n=24$ であった。長井系品種の染色体数の報告は、本研究が最初となる。長井系品種の花粉稔性は、4.0% (‘葉山の雪’) ~ 98.4% (‘三淵の流’) 品種間でばらつきが見られるが、平均 87.0 ± 14.7 と高い値であった。

花被片に含まれるアントシアニンの分析により，6種類（A1～A6）の主要アントシアニンと1種類（A7）の微量アントシアニンが同定された．同定できた主要アントシアニンのうちA1～A4は完全同定ができた．その結果，A1とA2はPetaninの，A3とA4はEnsatinのそれぞれZ-体，E-体という構造異性体であることが判明した．ハナショウブにおけるPetaninとEnsatinの異性体の存在は今回が初めての報告である．

アントシアニン組成に基づく類別で，長井系品種とノハナショウブは，パターン1：Petunidin 3RGac5G（A1，A2），Malvidin 3RGac5G（A3，A4）型．パターン2：Malvidin 3RGac5G（A3，A4）型．パターン3：Petunidin 3RG5G（A5），Malvidin 3RG5G（A6）型．そして，パターン4：アントシアニンを含まない型の4つの色素パターンに分けることができ，長井系品種はPetunidin配糖体とMalvidin配糖体を中心とする花色素特性を持つことが明らかにされた．また，微量色素として29品種でDelphinidin型のViolanin（A7）が検出され，長井系品種が青色花品種の育成に有用な素材となる可能性も期待された．

2．長井系ハナショウブの後代植物における特性調査と色素分析から，後代植物において，長井系ハナショウブは，多様な花色および色素変異をもたらすことがわかった．特にS₁Op₁植物ではOp₁植物では見られなかった縞，砂子といった花模様を呈する個体や，極端に花高が低くなる矮性個体が出現した．また，矮性個体の自殖後代（S₂Op₁）の中からは，Op₁，S₁Op₁植物では現れなかった葉に斑が入る突然変異個体が出現した．このことから，長井系ハナショウブは，形質が未固定の原種に近い品種群であることが示唆され，この特徴は，ハナショウブにさらなる多様性をもたらす源となると考えられた．また，矮性および斑入り個体は，それらの形質を有する既存の品種がハナショウブではほとんど存在していないことから，矮性品種および斑入り品種の作出のための有用な遺伝資源として，ハナショウブの育種に貢献すると期待できる．

また，花色素に関しては，親とOp₁植物では微量色素であったViolanin（A7）を，S₁Op₁植物では主要アントシアニンの1つとして含む個体が出現することから，微量色素の蓄積が可能であることが判明した．今後，長井系ハナショウブを用いることによって，新たな色素構成が出現する可能性も示された．

最後に，本研究で得られた知見および，個体は，長井系のみならず，ハナショウブにとって有用な遺伝資源になると考えられる．また，本研究における成果は，長井系ハナショウブの自生地である長井市の地域振興に役立つものと期待される．そして，今後，長井系ハナショウブのさらなる研究と，アントシアニンおよびその他のフラボンの分析は，ハナショウブを含めアヤメ属植物の育種にとってますます重要と考えられる．

Summary

The Japanese garden iris (*Iris ensata* Thunb.) has been developed by mutation and intraspecific crossing since Edo era. Its cultivars were divided into four lines, i.e., Nagai, Edo, Ise and Higo, and consist of more than 2000 cultivars. The Nagai line has been bred from the wild form growing in Iide Mountain and kept in Nagai City, Yamagata Prefecture, northern Japan for a long time. To date, 58 cultivars have been known as Nagai line. In 1962, the Japanese iris society selected 30 cultivars as the Nagai line, and gave the name, such as 'Nogawa-no-sagi' to them. Although the Nagai line is one of traditional Japanese garden iris, researchers hardly know about their historical backgrounds and specific characteristics.

The flower pigments in *I. ensata* have been reported as anthocyanins. The arrangement of Japanese garden iris cultivars based anthocyanin composition has been performed. Anthocyanin and other flavonoids in the flowers of *I. ensata* have been reported by some authors. Ensatin and Petanin have been isolated and characterized as major anthocyanins by Hayashi *et al.* (1978). However, although there are many reports on Edo, Ise and Higo lines, the Nagai line has few. About 30 patterns of major anthocyanin composition have already been reported in *I. ensata* cultivars. However, the flower pigments in the Nagai line are hardly known. Accumulation of their knowledge are important to analyze the characteristics of the Nagai line.

In this paper, genetical and physiological analyses of favorable traits, especially relationship between flower color variations and the flower color changes in the Nagai line as potentiality for breeding.

1. Most of the Nagai line cultivars have three perianths, 'Mifuchi-no-nami' with eight perianths and 'Nagai-taka-no-tsume' with six perianths. The Nagai line is a small cultivar group but has diversity, so we expect their usability as a breeding material.

Cultivars of the Nagai line were $2n=24$ in somatic chromosome number. Pollen fertility of those of the Nagai line was 4.0% ('Hayama-no-yuki') to 98.4% ('Mifuchi-no-nagare'), and the average was $87\pm 14.7\%$. This is the first report of somatic chromosome number and pollen fertility of the

Nagai line.

By analysis of the anthocyanins in outer perianth from 52 cultivars of the Nagai line and a wild form, seven anthocyanins were found. Six anthocyanins (A1~A6) were recognized as major pigments and another one (A7) was minor compound. Of their anthocyanins A1-A4 was identified as *Z*-Petanin, *E*-Petanin, *Z*-Ensatin, and *E*-Ensatin, respectively. The presence of isomers of Petanin and Ensatin was reported in the Japanese garden iris for the first time.

Based on the anthocyanin composition, the Nagai line and wild form were divided into four anthocyanin patterns: 1) Petunidin 3-*O*-β-[4'''-*Z*-*p*-coumaroyl-α-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-glucopyranoside]-5-*O*-β-glucopyranoside (A1 and A2) and Malvidin 3-*O*-β-[4'''-*Z*-*p*-coumaroyl-α-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-glucopyranoside]-5-*O*-β-glucopyranoside (A3 and A4), 2) A3 and A4 alone, 3) Petunidin 3-*O*-rutinoside-5-*O*-glucoside (A5) and Malvidin 3-*O*-rutinoside-5-*O*-glucoside (A6) and 4) No anthocyanin. It was first found that Petunidin and Malvidin glycoside are major pigments in the Nagai line. In addition, Delphinidin (Violanin), which is the most bluish among the anthocyanidins, was detected in 29 cultivars as a minor pigment. Despite being a minor pigment, those cultivars might be useful for development a new flower color in *I. ensata*.

2. From the results of characteristics and chromogenic analysis in progenies (Op₁ and S₁Op₁) of the Nagai line, they have a possibility to change them many kinds of flower color and pigment. In S₁Op₁ progenies, pigment patterns, which appeared in Op₁, did not occur, i.e. the appearance of Kasuri or Sunago in outer perianth and their dwarf individuals. The plant heights was extremely short. Their properties of Nagai line bring the diversity to Japanese garden iris.

Violanin (A7) was detected as a minor pigment in parents and their Op₁. However, Violanin appeared as one of major pigment.

In conclusion, it was shown by this study that the Nagai line is useful genetic resource. These results are expected to contribute the development to Nagai city where the Nagai line is growing in natural.

As the next stage of this study, other flavonoids must be analyzed for clarification of the mechanism of their flower colors, because the bluish

flowers of *I. ensata* is expressed by co-pigmentation between Ensatin and *C*-glycosylflavone, Isovitexin. The analysis of anthocyanins and other flavonoids is important as basical information of the breeding of *I. ensata*.

謝辞

本研究を行うにあたり，指導教官であります金子幸雄教授には，研究方針および，実験計画などあらゆる面で多大なるご指導を賜り，深く感謝の意を表するとともに，厚く御礼申し上げます．また，研究活動などでの的確なご指導を賜りました第1副指導教員の房相佑准教授，第2副指導教員として実験指導および論文作成でご指導いただきました茨城大学連携大学院の岩科司教授に深く感謝の意を表しますとともに，厚く御礼申し上げます．

また，実験手法に関する多大なるご助言とご指導をいただきました国立科学博物館植物研究部の村井良徳研究員，NMR分析をお願い致しました昭和薬科大学の北島潤一教授，アントシアニンの標品をご提供いただきました宮崎大学の藪谷勤教授，長井系ハナショウブの苗の分譲およびサンプル採取にご協力いただきました長井市観光振興課の今野一彦氏はじめ長井市あやめ公園の皆様，ハナショウブに関する文献資料のご提供と研究活動へのご助言をいただきました日本花菖蒲協会の清水弘理事長，色素分析および論文作成につきまして多大なるご協力いただきました慶應義塾大学の上原歩助教，東京農工大学大学院の水野貴行さん，雨宮虎太郎さん，茨城大学大学院の下田和秀さん，伊東拓朗さんに深く感謝の意を表するとともに，厚く御礼申し上げます．

最後に，あらゆる面でご協力いただきました宇都宮大学大学院農学研究科、および宇都宮大学農学部植物育種学研究室の皆様に，ここに改めて感謝の意を表します．また，研究活動を陰ながら見守り，支えてくれた友人の沼澤美幸さんと家族に感謝いたします．

Ⅶ. 参考文献

- Akiyama S. and T. Iwashina (2009) *Tobata - ayame* : A new variety of *Iris sanguinea* Hornem. from northern Kyushu, Japan. Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B, 35 : 205-209.
- Andersen M. Ø., S. Opheim, D. W. Aksnes and N. A. Froystein (1991) Structure of petanin, an acylated anthocyanin isolated from *Solanum tuberosum*, using homo- and hetero- nuclear two-dimensional nuclear magnetic resonance techniques. Phytochem. Anal. 2 : 230-236.
- Ando T., N. Saito, F. Tatsuzawa, T. Kakefuda, K. Yamakage, E. Ohtani, M. Koshi-ishi, Y. Matsusake, H. Kokubun, H. Watanabe, T. Tsukamoto, Y. Ueda, G. Hashimoto, E. Marchesi, K. Asakura, R. Hara and H. Seki (2004) Floral anthocyanins in wild taxa of *Petunia* (Solanaceae). Biochem. Syst. Ecol. 27 : 623-650.
- Aoki C., T. Wada, T. Nishimura and K. Hattori (1995) Characterization and inheritance of 'Variegated-leaf' mutant in *Petunia* hybrid. Breed. Sci. 45 : 31-35.
- Harborne J. B. (1958) Spectral methods of characterizing anthocyanins. Biochem. J. 70 : 22-28.
- Hayashi, K. (1940) Isolation of ensatin, an acylated anthocyanin from the flowers of Japanese Iris. Proc. Imp. Acad. Tokyo 16 : 478-481.
- 林 孝三, 大谷 俊二, 佐藤 克二, 津山 尚, 石倉 成行 (1978) 花色構成物質による日本産 *Iris* の類縁と系統. (財)進化生物学研究所研究報告 1 : 1-16.

林 孝三 (1980) アントシアニン・ロイコアントシアニン・カテキン, “植物色素実験・研究の手引”. 養賢堂, 東京, pp. 14-16.

Hida A., K. Shimizu, R. Nagata, T. Yabuya and T. Adachi (1999) Plant regeneration from protoplasts of *Iris hollandica* Hort. Euphytica 105 : 99-102.

Imayama T. and T. Yabuya (2003) Characterization of anthocyanin in flowers of Japanese garden iris, *Iris ensata* Thunb. Cytologia 68 : 205-210.

Inoue K., T. Kato, A. Nobukuni, H. Kunitake and T. Yabuya (2006) Characterization of tetraploid plants regenerated *via* protoplast culture of *Iris fulva* and their crossability with Japanese irises. Scientia Horticulturae 110 : 334-339.

Inoue K., T. Tomita, N. Yoshihara and T. Yabuya (2008) Interspecific hybrids between *Iris setosa* var. *setosa* and *I. laevigata* and their relationships to *I. setosa* var. *hondoensis* or *I. setosa* var. *nasuensis*. Cytologia 73 : 401-410.

Ishikura N. and E. Yamamoto (1978) Anthocyanin in the flowers of Japanese garden iris belonging to ‘Higo’ line. Kumamoto J. Sci., Biol., 14 : 9-15.

岩科 司 (2005) イリス属の分類とその分布. “世界のアイリス”, 日本花菖蒲協会編, 誠文堂新光社, 東京, pp. 138-139.

岩科 司, 大谷 俊二 (1998) アヤメ属植物のフラボノイド: その構造, 分布, 機能 (総説). 筑波実験植物園研報 17 : 147-183.

Iwashina T., K. Kamenosono and T. Yabuya (1996) Isolation and identification of flavonoid and related compounds as co-pigments from the flowers of *Iris ensata*. Jap. J. Bot. 71 : 281-287.

柿間 俊平 (1997) 長井古種の由来. “日本花菖蒲協会会報”, 第 25 号.

加茂 元照 (1994) 松平菖翁著「花菖培養録」現代語訳. “日本花菖蒲協会会報”, 第 22 号.

加茂 元照 (2001) 光田義男さんの思い出. “日本花菖蒲協会会報”, 第 29 号. pp. 8-11.

Kitahara K, Y. Murai, S. W. Bang, J. Kitajima, T. Iwashina and Y. Kaneko (2014) Anthocyanins from the flowers of Nagai line of Japanese garden iris (*Iris ensata*). Natural Product Communications. 9 (2): 201-204.

小林 祥子, 本城 正憲, 大澤 良 (2006) 葉緑体 DNA 変異に基づくハナショウブ品種群の系統関係. 育種学研究 8 (別冊 2): 246.

光田 義男 (1996) 熊本花菖蒲の栽培と育種五十年の歩み. “日本花菖蒲協会会報”, 第 24 号.

光田 義男 (1998) 四倍体花菖蒲の育成. “日本花菖蒲協会会報”, 第 26 号.

Mizuno T., T. Yabuya, J. Kitajima and T. Iwashina (2013) Identification of novel C-glycosylflavones and their contribution to flower color of the Dutch iris cultivars. Plant Physiol. Biochem. 72 : 116-124.

永田 敏弘 (2007) “色分け花図鑑 花菖蒲”. 学習研究社, 東京, pp. 6-142.

日本花菖蒲協会 (2008) “写真品種解説”. 日本花菖蒲協会, pp.1-33.

斎藤 清, 金子幸雄 (1975) 花木ボケ類の不稔に関する細胞学的観察. Jap. J. Bot. 25 : 101-108.

酒井 かおり (2008) 長井系ハナショウブの特性調査と育種学的利用に関する研究. 宇都宮大学卒業論文.

酒井 かおり (2011) 長井系ハナショウブの後代植物における形態特性と花色素変異に関する研究. 宇都宮大学大学院修士論文.

清水 弘 (2000) キハナショウブの新時代. “日本花菖蒲協会会報”, 第28号. pp. 16-19.

清水 弘 (2004) 実生新花と花の謎. その6 「鬼柄杓」. “日本花菖蒲協会会報”, 第32号. pp. 11.

清水 弘 (2005) 実生新花と花の謎. その7 「花菖蒲のニューフェイス達」. “日本花菖蒲協会会報”, 第33号. pp. 21-22.

Shimizu K., Y. Miyabe, H. Nagaike, T. Yabuya and T. Adachi (1999) Production of somatic hybrid plants between *Iris ensata* Thunb. and *I. germanica* L. *Euphytica* 107 : 105-113.

武智 克彰, 坂本 亘 (2002) 「斑入り」葉緑素突然変異体を用いた原因遺伝子の研究と最近の知見. 育種学研究 4 : 5-11.

Tsukatani N., J. Aii, Y. Miyabe, K. Shimizu, T. Adachi and T. Yabuya (2002) Identification of somatic hybrids between *Iris ensata* Thunb. *I. germanica* L. by designing species-specific primers of ITS regions of nuclear rDNA. *Cytologia* 67 : 361-366.

富野 耕治 (1963) 本邦産アヤメ属植物とくにハナショウブに関する育種学的基礎研究. 三重大学学芸学部研究紀要 28 : 1-60.

富野 耕治 (1972) キショウブとハナショウブとの交雑について. 三重大学学芸学部研究紀要 23 : 17-26.

- Yabuya T. (1984) Chromosome association and fertility in hybrids of *Iris laevigata* Fisch. × *I. ensata* Thunb. *Euphytica* 33 : 369-376.
- Yabuya T. (1985) Amphidiploids between *Iris laevigata* Fisch. and *I. ensata* Thunb. induced through in vitro culture of embryos treated with colchicines. *Japan. J. Breed.* 35 : 136-144.
- Yabuya T. (1987) High-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in induced amphidiploids of *Iris laevigata* Fisch. × *I. ensata* Thunb. *Euphytica* 36 : 381-387.
- Yabuya T. (1991a) Chromosome associations and crossability with *Iris ensata* Thunb. in induced amphidiploids of *I. laevigata* Fisch. × *I. ensata*. *Euphytica* 55 : 85-90.
- Yabuya T. (1991b) High-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in Japanese garden iris and its wild forms. *Euphytica* 52 : 215-219.
- Yabuya T., T. Imayama, T. Shimomura, R. Urushihara and M. Yamaguchi (2001) New types of major anthocyanins detected in Japanese garden iris and its wild forms. *Euphytica* 118 : 253-256.
- Yabuya T., H. Kikugawa and T. Adachi (1989) Karyotypes and chromosome association in aneuploid varieties of Japanese garden iris, *Iris ensata* Thunb. *Euphytica* 42 : 117-125.
- Yabuya T., H. Kikugawa, I. Aiko and T. Adachi (1992) Cytological studies of hybrids between aneuploid and eu-diploid Japanese garden iris (*Iris ensata* Thunb.). *Cytologia* 57 : 253-257.
- Yabuya T., M. Nakamura and A. Yamasaki (1994a) *p*-Coumaroyl glycosides of cyanidin and peonidin in the flowers of Japanese garden iris, *Iris ensata* Thunb. *Euphytica* 74 : 47-50.

Yabuya T., M. Nakamura and A. Yamasaki (1994b) Flower color variations due to copigments in Japanese garden iris, *Iris ensata* Thunb. Proc. IPBA, Rogla December, 5-7 : 239-250.

Yabuya T., M. Nakamura, T. Iwashina, M. Yamaguchi and T. Takehara (1997) Anthocyanin-flavone copigmentation in bluish purple flowers of Japanese garden iris (*Iris ensata* Thunb.). Euphytica 98 : 163-167.

Yabuya T. and T. Noda (1998) The characterization of autoallotetraploid hybrids between *Iris ensata* Thunb. and *I. laevigata* Fisch. Euphytica, 103 : 325-328.

Yabuya T., M. Saito, T. Iwashina and M. Yamaguchi (2000) Stability of flower colors due to anthocyanin-flavone copigmentation in Japanese garden iris, *Iris ensata* Thunb. Euphytica 115 : 1-5.

Yabuya T. and H. Yamagata (1980) Elucidation of failure and breeding of F₁ hybrid in reciprocal crosses between *Iris ensata* Thunb. and *I. laevigata* Fisch. Japan. J. Breed. 30 : 139-150.

Yabuya T. and H. Yamagata (1981) Embryo growth and cultural condition in *Iris ensata* Thunb. Japan. J. Breed., 31 : 377-382.

Yabuya T. N. Yoshihara, K. Inoue and H. Ashimizu (2006) Advances in breeding of Japanese garden iris. In: Jaime A. Teixeira da Silva (Ed.). Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. Global Science Books. UK. Vol. I , pp. 556-563.

山形県長井市商工観光課(1999)長井のあやめ.“日本花菖蒲協会会報”, 第 27 号.

山形県長井市商工観光課 (2010a) 長井系新品種登録, 長井あやめ公園 100 周年に寄せて長井系花菖蒲の登録, 新品種登録一覧表. “日本花菖

蒲協会会報”，第 38 号 . pp.54-55.

山形県長井市商工観光課（2010b）58 品種一覽表．“長井古種花菖蒲図録”，pp. 5.

Yoong L. K., R. Matyasek, A. Kovarik and A. Leitch (2007) Parental origin and genome evolution in the allopolyploid *Iris versicolor*. *Ann. Bot.* 100 : 219-224.