

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた  
実証的研究（H24-創薬総合-一般-007）  
分担研究報告書

分担研究課題：人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の  
実用化に向けた実証的研究

—新規ウラルカンゾウ優良株の育成及び種々栽培環境条件下で養液栽培した  
ウラルカンゾウ優良株の形質と大量増殖法の開発に関する研究—

研究分担者 吉松嘉代 （独）医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター  
筑波研究部 育種生理研究室長

要旨 グリチルリチン酸合成酵素遺伝子である CYP88D6 の配列を利用したウラルカンゾウ優良株選抜法を考案し、5 種の新規ウラルカンゾウ優良株 Gu#11、Gu71#1、Gu71#12、Gu71#22、Gu71#31 を育成した。このうち Gu#11 は、1 年間養液栽培した根のグリチルリチン酸含量が 2.5%以上であることを確認した。これまでに育成した 4 種のウラルカンゾウ優良株、Gu2-2-1、Gu2-3-2、GuTS71-08IV1（以下、GuIV1）及び GuTS71-08IV2（以下、GuIV2）及び Gu#11 の DNA 配列情報を利用した識別法を開発した。GuIV1 及び GuIV2 を種々人工栽培環境条件下で養液栽培してその形質を調査した結果、1 年間養液栽培した根のグリチルリチン酸含量が 2.5%以上である GuIV1 及び GuIV2 は、白色蛍光管あるいは白色 LED を光源とする植物インキュベーター内での養液栽培でも高い二次代謝物生産性を示し、セラミックメタルハイドランプ及び白色蛍光管と光特性が異なる白色 LED の使用により、生育促進、二次代謝物含量増加が可能であることを明らかにした。ウラルカンゾウ優良株の大量栽培・大量生産実用化推進のため、植物組織培養やストロン挿しよりもさらに高効率な地上茎挿し木による効率的増殖法を開発し、1 本の優良株から理論値で年間 16,000-940,000 本の増殖に成功した。また、炭酸ガス濃度と光強度条件が発根に及ぼす影響を調べた結果、炭酸ガス濃度 1,000 ppm、光強度 10,000 lux において 60%以上の高い発根率を達成した。さらに、支持体、頻繁な水位変動を必要としない簡便な新規水耕栽培装置を考案し、ウラルカンゾウ優良株を栽培した結果、新規水耕栽培装置は、根の肥大とグリチルリチン酸をはじめとする二次代謝物生産に適していることを確認した。

研究協力者	新穂大介 同 甘草研究課 主任
河野徳昭 （独）医薬基盤研究所	根岸直希 日本製紙株式会社
薬用植物資源研究センター	アグリ・バイオ研究所 主査
筑波研究部 主任研究員	

乾 貴幸 同 特任研究員	A. 研究目的
田村幸吉 丸善製薬株式会社研究開発本部	超高齢社会の日本では漢方薬を処方される例が増え漢方薬市場は急成長している。生
甘草研究所 所長	

薬「甘草」は、漢方処方70%以上に配合され、漢方薬原料として最も重要であり、また、食品及び食品添加物としても重要である。しかし、その供給はほぼ100%海外に依存し、主生産国の中国の物価・人件費上昇、需要増加、採取・輸出規制、生物多様性条約の「遺伝子資源へのアクセスと利益配分」のルールづくり等により、レアアースと同様に、今後益々その確保が困難になると予想されている。また、他の多くの生薬も同様に安定供給が危惧されている。

我々はこれまでに、最も汎用され重要な漢方薬原料生薬である甘草について、人工水耕栽培環境下で、短期間で安定的に生薬を生産するシステムを世界で初めて開発した。

本研究では、人工水耕栽培により生産した甘草等の生薬の確実な実用化の推進のため、経済性・汎用性の高い栽培システムの構築を行う。

## B. 研究方法

### 1) 新規ウラルカンゾウ優良株の育成

ウラルカンゾウ種子 (GuTS71-08 系統及び Gu2 系統) を常法により殺菌後、2%ショ糖含有、主要無機塩類濃度が 1/2 濃度の Murashige and Skoog (MS) 固形培地[(2)/2MS] に播種し、23°C、14 時間照明下で培養し培養植物体を得た。本植物体より 2 節を含むシュート切片又は茎切片を調製し、3 種の培地、A: ショ糖 3%、グルタミン 10 mg/L 含有 Woody Plant 固形培地 (WPG)、B: ショ糖 1%、0.5 g/L MES、インドール酪酸 (IBA) 0.1 mg/L 含有 MS 固形培地[MES(1)IB0.1]、C: ショ糖 1%、0.5 g/L MES、インドール酪酸 (IBA) 0.01 mg/L、ベンジルアデニン (BA) 0.1 mg/L 含有 MS 固形培地[MES(1)IB0.01B0.1]のいずれかに移植した。培地はいずれも 0.25%ゲルライト (三栄源 FFI) で固化させ、得られたウラルカンゾウ実生クローン株は、1-2 ヶ月毎に同培地、同条件にて継代培養を行った。

### 2) ウラルカンゾウの養液栽培

ウラルカンゾウ優良株[Gu2-2-1、Gu2-3-2、

GuTS71-08IV1 (以後 GuIV1)、GuTS71-08IV2 (同 GuIV2)]及び GuTS71-08 系統の実生クローン株及び Gu2-2-1 及び Gu2-3-2 の自殖後代実生クローン株の培養苗、ストロン挿し苗及び地上茎挿し木苗を種々栽培環境条件下 (詳細条件は、図に記載) で養液栽培した。一定期間栽培後、生育、収量及び根の二次代謝物含量を調査した。

### 3) DNA の抽出

ウラルカンゾウ葉 1 枚及びステンスピーズ (φ4.8 mm) 2 個を 2.0 mL 容滅菌凍結保存チューブ (アシスト) に取り、ビーズ破碎装置 Micro Smash MS-100 (トミー精工) を用いて破碎し、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を調製した。得られたゲノム DNA 溶液に DNase free 水を加え、10 ng/μL になるように希釈し、PCR の鋳型として用いた。

### 4) スクワレン合成酵素 (SQS) 遺伝子の解析

カンゾウ属植物のグリチルリチン酸生合成経路上の酵素の一つとして、スクワレン合成酵素 (SQS) が知られている。一般的に、相同酵素をコードする遺伝子のゲノム上におけるエキソン・イントロン構造は植物種間を超えて保存されている傾向がある。そこで、シロイヌナズナの SQS1 遺伝子及び SQS2 遺伝子のゲノムから、ウラルカンゾウにおける構造を予測し、その配列情報に基づき、ウラルカンゾウの SQS1 遺伝子又は SQS2 遺伝子のエキソン 1~エキソン 3 を増幅しうるプライマーを設計した。

ウラルカンゾウ優良株 Gu2-3-2 及び GuIV2 より調製した DNA を鋳型として、設計プライマーを用いて、PCR 法により、SQS1 遺伝子又は SQS2 遺伝子のエキソン 1~エキソン 3 の領域を増幅した。その増幅産物を、それぞれ、シーケンスベクターにクローニングし、塩基配列を解析した。

### 5) β-アミリン 11 位酸化酵素 (CYP88D6) 遺伝子の解析

CYP88D サブファミリー遺伝子に関し、ゲノム情報が公開されているタルウマゴヤシ、ミヤコグサの CYP88D 遺伝子を調べた結果、そのエクソン・イントロン構造は広く保存されていた。そこで、これらのゲノム情報から、ウラルカンゾウにおける CYP88D6 遺伝子の配列を予測し、その配列情報に基づき、その配列中のエクソン 6~エクソン 8 を増幅しうるプライマーを設計した。

ウラルカンゾウ優良株 Gu2-3-2 及び GuIV2 より調製した DNA を鋳型として、設計プライマーを用いて、PCR 法により、CYP88D6 遺伝子のエクソン 6~エクソン 8 の領域を増幅した。その増幅産物を、それぞれ、シーケンスベクターにクローニングし、塩基配列を解析した。

#### 6) 11-オキソ-β-アミリン酸化酵素 (CYP72A154) 遺伝子ゲノム配列の解析

グリチルリチン酸生合成経路上で、11-オキソ-β-アミリンの 30 位の炭素の酸化反応に関わる CYP72A154 遺伝子に関し、ゲノム情報が公開されているタルウマゴヤシ、ダイズ等の CYP72A 相同遺伝子を調べた結果、そのエクソン・イントロン構造は広く保存されていた。そこで、これらのゲノム情報から、5つのエクソン及び4つのイントロンからなるウラルカンゾウ CYP72A154 遺伝子のゲノム DNA 構造を予測し、4つのイントロン配列それぞれを増幅しうるプライマーを設計した。

設計プライマーを用いて、PCR 法により、CYP72A154 遺伝子の各イントロンを含む配列を増幅した。その増幅産物を、それぞれ、シーケンスベクターにクローニングし、塩基配列を解析した。

#### 7) SQS2 遺伝子イントロン 1~イントロン 2 部分配列の PCR

ウラルカンゾウ優良株 [Gu2-3-2、GuIV2 及び Gu#11 (GuTS71-08 実生クローンより選抜した新規優良株)] を鋳型に GoTaq Green Master Mix (Promega 製) を用いて、SQS2 遺伝子のエクソン 2 を含むイントロン 1~イ

ントロン 2 の部分配列を増幅した。増幅により得られた PCR 増幅産物は、1%アガロースゲルで電気泳動し、増幅バンドのパターンを比較した。

プライマーには、GuIV2 に特異的な部分配列を増幅しうるプライマーセットを用いた。

#### (PCR 条件)

反応液組成: GoTaq Green Master Mix 3 μL、forward primer (10 μM) 1 μL、reverse primer (10 μM) 1 μL、genome DNA (10 ng/μL) 1 μL (total 6 μL)

PCR 機器: iCycler (Bio-Rad 社製、米国)

反応条件: 94°C 5 min → (94°C 30 sec、58°C 30 sec、72°C 1 min) × 30 cycle → 72°C 10 min → 4°C ∞

#### (プライマー配列)

GuSQS2-S1 : 5' -taactgcttataaaggcttgatg-3'

GuSQS2-A1 : 5' -ctaaaaccaatcatcatggtcac-3'

#### 8) CYP88D6 イントロン 7 部分配列の PCR

ウラルカンゾウ株 (GuTS71-08 及び Gu2-3-2 実生クローン) を鋳型に ExTaq (TAKARA BIO) を用いて CYP88D6 遺伝子の 7 番目のイントロン (イントロン 7) の部分配列を増幅した。得られた PCR 増幅産物は、1%アガロースゲルで電気泳動し、増幅バンドのパターンを比較した。

プライマーには、イントロン 7 配列のうち、カンゾウ属植物に比較的好く保存された領域に対するプライマー (CYP88D6intron7Fw、CYP88D6intron7Rv2) 及び GuTS71-08 系統に特徴的な配列に対するプライマー (CYP88D6intron7Rv) を用いた。

#### (PCR 条件)

反応液組成: ExTaq 0.1 μL、10 x ExTaq buffer 2 μL、dNTPs 1.6 μL、forward primer (10 μM) 1 μL、reverse primer (10 μM) 1 μL、ddH<sub>2</sub>O 12.3 μL、genome DNA (10 ng/μL) 2 μL (total 20 μL)

PCR 機器: 2720 Thermal Cycler (ABI 社製)

反応条件: 94°C 2 min → (94°C 30 sec、60°C 30 sec、72°C 45 sec) × 30 cycle → 72°C 5 min

→ 4°C∞

(プライマー配列)

CYP88D6intron7Fw: 5'-tagtgcctttaagcacatgg-3'  
CYP88D6intron7Rv:5'-tcatcgggtataattgtgactc-3'  
CYP88D6intron7Rv2: 5'-agagatcaatcaggtagctag  
agag-3'

9) CYP72A154 遺伝子のイントロン1-イントロン2及びエキソン3-イントロン4の部分配列のPCR

ウラルカンゾウ株 (Gu2-3-2, GuIV1, GuIV2 及び Gu#11) を鋳型に GoTaq Green Master Mix (Promega 製) を用いて CYP72A154 遺伝子のイントロン1-イントロン2及びエキソン3-イントロン4の部分配列を増幅した。得られたPCR増幅産物は、1%アガロースゲルで電気泳動し、増幅バンドのパターンを比較した。

イントロン1-イントロン2部分配列増幅のためのプライマーには、イントロン1共通配列に対するフォワードプライマー [72A154i1S(Gu)]と Gu2-3-2 及び Gu#11 に特異的なイントロン2配列に対するリバースプライマー [72A154i2A(Gu-#11, Gu2)] 又は GuIV1 及び GuIV2 に特異的なイントロン2配列に対するリバースプライマー [72A154i2A(Gu-IV1, IV2)]を用いた。

また、エキソン3-イントロン4部分配列増幅のためのプライマーには、エキソン3配列に対するフォワードプライマー (CYP72A154S759) と GuIV1、GuIV2 及び Gu#11 に特異的なイントロン4配列に対するリバースプライマー [CYP72A154i4A(71)]を用いた。

(PCR 条件: イントロン1-イントロン2)

反応液組成: GoTaq Green Master Mix 3.0 µL、forward primer (10 µM) 1 µL、reverse primer (10 µM) 1 µL、genome DNA (10 ng/µL) 1 µL (total 6 µL)

PCR 機器: 2720 Thermal Cycler (ABI 社製)

反応条件: 94°C 2 min → (94°C 30 sec、62°C 30 sec、72°C 45 sec) × 30 cycle → 72°C 5

min → 4°C∞

(プライマー配列)

72A154i1S(Gu) : 5'-gaatccgtgatacactgatgtgttc  
-3'  
72A154i2A(Gu-#11, Gu2) : 5'-tgctggcagcatacc  
ctgt-3'  
72A154i2A(Gu-IV1, IV2) : 5'-gctggcagcataccc  
tgc-3'

(PCR 条件: エキソン3-イントロン4)

反応液組成: GoTaq Green Master Mix 7.5 µL、forward primer (10 µM) 1 µL、reverse primer (10 µM) 1 µL、ddH<sub>2</sub>O 4.5 µL、genome DNA (10 ng/µL) 1 µL (total 15 µL)

PCR 機器: 2720 Thermal Cycler (ABI 社製)

反応条件: 94°C 2 min → (94°C 30 sec、60°C 30 sec、72°C 1 min) × 30 cycle → 72°C 5 min → 4°C∞

(プライマー配列)

CYP72A154S759 : 5'-gctctaccatcaactacccaaaagg-3'  
CYP72A154i4A(71) : 5'-gttaagccagcagcagttagtagc  
-3'

10) 地上茎の挿し木

養液栽培で得られたウラルカンゾウ地上茎を材料に、挿し木のための条件 (挿し穂部位、挿し穂調製・前処理方法、挿し穂栽培条件) を検討した。

11) ウラルカンゾウ二次代謝物の HPLC 分析

植物体を収穫して各部位 [茎、根 (径 1 mm 又は 2 mm 以上)、細根、ストロン] に分割し 50°C で数日間温風乾燥した。乾燥した植物試料を粉末にし、その約 50 mg を精密に秤量後、50%エタノール 7 mL を正確に加え、超音波洗浄機で 30 分間、ボルテックスミキサーで 1 分間抽出した。抽出液を遠心分離 (4,500 rpm、3 分間) 後、上清 300 µL をウルトラフリーMCに入れ、15,000 rpm、20°C で 1 分間遠心濾過し、上清 5-20 µL を HPLC に注入した。以下の HPLC 条件で、グリチルリチン酸、リクイリチン、リキリチゲニン、

イソリクイリチン、イソリキリチゲニン、グリシクマリリン及びグラブリジンの化合物 7 種の同時分析を行った。

#### HPLC 条件

装置：ALLIANCE HT (Waters)

カラム：TSKgel ODS-100V (TOSOH, 径 4.6 mm×250 mm, 5 μm)

移動相：アセトニトリル (溶媒 A) -1%酢酸 (溶媒 B), 0-21 min 20-76% B, 21-22 min 76-100% B, 22-24 min 100% B, 24-25 min 100-20%B

流速：1.0 mL/min

カラム温度：40°C

検出：UV 254 nm (定量)、200-400 nm (検出ピークの同定)

#### 12) ウラルカンゾウ二次代謝物の UPLC 分析 (標準サンプル)

R21 二次基準品(Lot.050902)

外原規グリチルリチン酸ジカリウム(LOT 03908N292)

グリシクマリリン (Lab.No. AC-1627)

#### i) グリチルリチン酸、リクイリチン、イソリクイリチンの定量分析

植物試料の粉碎を行い、粉碎物を得た。粉碎物 200 mg を 50% エタノール 5 mL で抽出した。各 50%エタノール抽出液をメンブランフィルター (0.2 μm) でろ過したものを分析試料溶液とした。水溶性フラボノイド 6 種の標準溶液として、R21 の 1.0 mg/mL 溶液を調製した。グリチルリチンの標準溶液として、1.0 mg/mL、0.1 mg/mL、0.01 mg/mL 溶液を調製した。

#### ii) グリシクマリリンの定量分析

植物試料の粉碎を行い、粉碎物を得た。粉碎物 200 mg をエタノール 5 mL で抽出した。各エタノール抽出液をメンブランフィルター (0.2 μm) でろ過したものを分析試料溶液とした。グリシクマリリンの標準溶液として、0.1 mg/mL 溶液を調製した。

〈UPLC 分析条件 (i, ii 共通)〉

装置：ACQUITY UPLC (Waters)

カラム：ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μm, 50 mm×2.0 mm i.d.)

移動相：A) 0.1% ギ酸 aq; B) MeCN, 0-0.45 min A:B=80:20, 0.45-6.5 min A:B=80:20 → 30:70, 6.5-6.75 min A:B=30:70 → 0:100, 6.75-7 min A:B=80:20

流速：0.8 mL/min

検出：PDA eλ (254 nm：グリチルリチン酸、316 nm：リクイリチン、イソリクイリチン、350 nm：グリシクマリリン)

カラム温度：40°C

サンプル管理温度：25°C

分析サンプル注入量：2.0 μL

### C. 研究結果

#### 1) CYP88D6遺伝子イントロン7部分配列のタイプと二次代謝物含量の相関

文献1で特許出願したウラルカンゾウ優良株GuIV1及びGuIV2は同時に特許出願したウラルカンゾウ優良株Gu2-2-1及びGu2-3-2に比べて、より安定して高含量のグリチルリチン酸を生産する。カンゾウ属植物について、グリチルリチン酸生合成経路 (図1) の後期段階のチトクロム酸化酵素 (P450酵素) であるCYP88D6遺伝子のイントロン7の配列を精査した結果、GuIV1及びGuIV2それぞれに特徴的な配列が見出され、これらの配列のカンゾウ属植物のゲノム中における出現頻度が甘草市場流通品のグリチルリチン酸含量と高い相関性をもつことを発見した (図2)。そこで、新たなウラルカンゾウ優良株育成のため、新たに種子より植物体を育成して養液栽培[25°C、明期16時間、光合成有効放射 450-650 μmol/m<sup>2</sup>S、相対湿度 (RH) 60%、支持体：パミスサンド® (大江化学工業、細粒)、養液：大塚ハウス1号3.0 g+大塚ハウス2号2.0 g/8L純水 (イオン交換水) (標準濃度の1/4)]を行うとともに、各植物体の葉よりDNAを抽出し、PCR法によりIV1及びIV2タイプの配列の存否を調べた (図3)。その結果、IV1及びIV2タイプの配

列を持つ植物の根はいずれも持たないタイプのウラルカンゾウ (Gu2: Gu2-2-1及びGu2-3-2タイプ) に比べて有意にグリチルリチン酸含量が高く、特にIV1とIV2の両方の配列をもつ植物はグリチルリチン酸だけでなく他の二次代謝物含量も高いことが判明した (図4)。

## 2) 新規ウラルカンゾウ優良株Gu#11の育成

GuTS71-08系統実生クローン株の培養植物体を、10 cm角のロックウールに移植し、グロースチャンバー室内 (GC室: 25°C/18時間明、15°C/6時間暗、60%RH) で73日間養液栽培 (マツザキ1号及びマツザキ2号、標準濃度はマツザキ1号6g+マツザキ2号4g/8L、栽培29日後までは標準濃度の25%、その後標準濃度の50%) 後、植物体を収穫し、根の収量及び二次代謝物含量を測定した。同様にGu2-3-2培養植物体を養液栽培し、根の収量及び二次代謝物含量を測定した。

その結果、組織培養での増殖が可能 (図5) で、グリチルリチン酸収量、グリチルリチン酸含量、リクイリチン含量、イソリクイリチン含量が高いGu#11が得られた (図6)。本Gu#11は、SQS及びCYP88D6遺伝子解析の結果、GuIV1及びGuIV2タイプのSQS2遺伝子配列をもち、GuIV1及びGuIV2に特異的なSQS2遺伝子のプライマーを用いたPCRにより、Gu2-3-2との識別が可能であった (図7)。また、CYP88D6遺伝子イントロン7の配列はGuIV1タイプであった。さらに、CYP72A154遺伝子イントロン2の配列は、Gu2-3-2タイプであり (図8)、同遺伝子イントロン4の配列はGuIV1及びGuIV2タイプであった (図9)。

本Gu#11培養苗をジフィーセブン水でふくらむタネまき土ポット (サカタのタネ、径3 cm) に植出し、培養庫 (25°C、14時間照明、40%RH) で29日間馴化後、ハイドロボールを支持体とする養液栽培装置に移植し、GC室 (25°C/16時間明、25°C/8時間暗、60%RH) で200日間、さらに閉鎖温室 (25°C、明期14時間、55%RH) で162日間 (通算362日間) 養液栽培 (マツザキ1号及びマツザキ2号、栽培206日までは標準濃度の25%、そ

の後は標準濃度の50%) 後、植物体を収穫し、径1 mm以上の根の収量及び二次代謝物含量を測定した。その結果、乾燥根の二次代謝物含量はグリチルリチン酸: 2.68%、リクイリチン: 1.70%、イソリクイリチン: 0.15%、グリシクマリニン: 0.11%であり、高二次代謝物生産能を有することを確認した (図10)。

## 3) 新規ウラルカンゾウ優良株Gu71#1、Gu71#12、Gu71#22、Gu71#31の育成

さらにウラルカンゾウ優良株を新規育成するため、新たに誘導したウラルカンゾウGuTS71-08系統実生クローン株をGC室 (25°C/16時間明、25°C/8時間暗、60%RH) でパミス® (細粒、大江化学工業) を支持体として、84-96日間養液栽培 (大塚ハウス1号3 g+大塚ハウス2号2 g/8L、標準濃度の25%) 後、植物体を収穫し、根の収量及び二次代謝物含量を測定した。また、植物体葉よりDNAを抽出し、CYP88D6遺伝子イントロン7中のIV1及びIV2配列タイプの存否を調べた。その結果、根のグリチルリチン酸含量が1.0%以上を示し、他の二次代謝物も高含量で、かつ植物組織培養での増殖も可能なウラルカンゾウ優良株3種、Gu71#1 (IV2タイプ)、Gu71#12 (IV1タイプ)、Gu71#31 (IV1+IV2タイプ) 及び植物組織培養での維持は困難であるが、グリチルリチン酸含量及び収量が高く、他の二次代謝物含量も高いGu71#22を得た (図5、11)。

## 4) 種々栽培環境条件下で養液栽培したウラルカンゾウ優良株の形質

文献1において、ストロン挿し (図12) で増殖したウラルカンゾウ優良株苗も優良株育成時の実生苗や培養苗と同様に、人工栽培環境下での養液栽培で良好な生育を示し (図13)、栽培1年後の根のグリチルリチン酸含量が2.5%以上を示す (図14) ことを確認した。さらに、生薬の生産に最適な栽培条件を明らかにするため、優良株GuIV1及びGuIV2を種々条件で養液栽培し、その形質を調査した。

GuIV1及びGuIV2を種々光条件に設定した植物インキュベーター内で養液栽培し、生育と二次代謝物生産に及ぼす影響を調べた。白色蛍光管（FL：セラミックメタルハライドランプとほぼ同じ特性）を光源に、種々明期条件で地上部の生育を比較した結果、明期16時間が最も良好な傾向を示した（図15、16）。根の無い培養シュートを植物インキュベーター内で養液栽培したところ、発根が認められ、明期16時間では発根率が100%であった（図16）。

次に明期16時間とし、2種類の光源[FLと白色LED管(LED)]を用いて比較した結果、草丈の増加はFLの方が大きく、葉数及び腋芽数の増加はLEDの方が多い傾向があった（図17）。光源処理124日後に植物体を収穫し、径1 mm以上の根の乾燥重量を測定したところ、LEDでの値はFLに比べてGuIV1（養液栽培移植後280日）では1.26倍、GuIV2（養液栽培移植後141日）では1.20倍であった。同根試料中の二次代謝物含量を測定したところ、グリチルリチン酸含量は、GuIV1ではFL:2.36%、LED:2.58%、GuIV2ではFL:1.18%、LED:1.17%と同程度の値を示した。また、蛍光管での栽培を362日間継続したGuIV2の根（径2 mm以上）には、高含量の二次代謝物が認められた（グリチルリチン酸:2.77%、リクイリチン:0.49%、イソリクイリチン:0.05%、グリシクマリニン:0.31%）（図18）。

#### 5) 地上茎挿し木による大量増殖法の開発

文献1のウラルカンゾウ優良株GuIV1及びGuIV2は、Gu2-2-1及びGu2-3-2に比べて難増殖性である（図19）。そこで、文献1では、ストロン挿しによる増殖方法を発明した（図12）。しかし、ストロンを得るためには、植物体地下部を収穫する必要があり、煩雑である。一方、ウラルカンゾウの養液栽培では地上部の生育が旺盛なため、地上茎挿し木による増殖は、増殖効率を飛躍的に高め、ウラルカンゾウ優良苗の生産コストの大幅な低減が期待できる。

これまでにウラルカンゾウの有効な地上茎挿し木方法は確立されていないため、イ

ンターネットのHP上で紹介されている一般的な挿し木方法を参考に、養液栽培で得られたウラルカンゾウ優良株の地上茎を材料に種々条件を検討した（図20）。

予試験を重ねた結果、地上茎挿し木に有効な条件として以下が判明した。

#### 地上茎挿し木に有効な条件

挿し穂材料：植物インキュベーター内の小株よりGC室で育成した大株の腋芽が伸びていない2節茎

前処理：全葉の切除と挿し穂の流水処理

挿し床：培養土（赤玉土：クレハ培養土：堆肥=3：1：1）、オアシス又はバーミキュライト（粒径1-3 mm）

栽培条件：25℃、明期16時間、照度10,000-30,000 lux、光合成有効放射200-550  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{S}$ 、40-60%RH、毎日の灌水（水の交換）、遮光・加湿・肥料不要（但し、発根後又はカルス形成後は追肥が望ましい）

以下に挿し木試験の結果を記す。

図21にGC室で養液栽培したウラルカンゾウ優良株（GuIV1、GuIV2及びGu#11）より調製した種々挿し穂（腋芽が未成長の2節茎：2N1、腋芽成長済みの2節茎：2N2、腋芽が3 cm程度伸長した1節茎：Nst）を1-2日間イオン交換水で流水処理後、オアシスミニベッド（株式会社ニッソーグリーン）に挿し木した結果を示した。2N1を挿し穂とし、栽培期間が長い大株を挿し穂採取材料とした方が、高い発根率が得られることが判明した。挿し穂2N1は1株から37-78本採取可能であるため、増殖効率の上でも適している。

図22に挿し穂の種類、流水処理条件、挿し床種類を検討した結果を示した。調製後の挿し穂を溜水で1日間処理すると著しく発根率が低下した。一方、挿し穂の流水処理時間は1時間でも効果があり、高い発根率が得られた。また、挿し床種類はバーミキュライトでもオアシスと同じ高い発根率が得られた。

図23に挿し穂材料、流水処理条件、挿し床種類と挿し木時の栽培環境を検討した結

果を示した。地上茎を株の根元から切除後、茎の根元を純水中に浸け、室温（25℃程度）で6-7日間静置（2-3日毎に純水を交換）した後、調製した挿し穂を用いると発根率は著しく低下（発根率22-27%）したが、発根苗を得ることが可能であった。また、地上茎は、生育日数が短いもの（全地上茎剪定後40日）の方が、長いもの（同75日）よりも発根率が高く、また、挿し木時の栽培環境は、25℃、16時間明期（20,000 lux、380  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{S}$ ）が最適であり、挿し床はパーミキュライトでも培養土（赤玉土-クレハ培養土-堆肥=3:1:1）でも高い発根率（80-100%）が得られた。採取直後に流水処理した挿し穂は、その後、純水中に浸けて1日間保管後に挿し木をしても高い発根率が得られた。

図24に228-237日間養液栽培したウラルカンゾウ優良株GuIV1、GuIV2及びGu#11の地上茎（全地上茎剪定からの生育期間24-47日）より挿し穂（2N1）を調製し、パーミキュライトを挿し床にGC室（25℃、相対湿度60%、16時間明期、20,000 lux、380  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{S}$ ）で挿し木を行った結果を示した。その結果、挿し木開始約3週間後から発根が活発になり、38日後の発根率55%以上が得られた（図24、25）。

養液栽培したウラルカンゾウ優良株は、図25に示したように、全地上部を剪定（但し、根元の2節茎は残す）しても速やかに生育が回復する。従って、理論値では、1年間で1株の親株から109-384本の苗が増殖可能であり、増殖した苗も70日毎に増殖に使用可能な大きさにまで生育すると仮定すると1年間で16,209-945,784本の苗が増殖可能と試算された。

ウラルカンゾウ優良株の地上茎挿し木苗は、後述の新規水耕栽培装置で栽培すると旺盛に生育し、栽培開始1ヶ月後には挿し穂の採取が可能な大きさまで生育した（図25）。

#### 6) 光独立栄養培養によるウラルカンゾウ優良株の挿木

養液栽培した各ウラルカンゾウ優良株の根のグリチルリチン酸含量は多い順に

GuIV2、GuIV1、Gu2-2-1、Gu2-3-2である。水耕栽培もしくは土耕栽培で育てたこれら4種のウラルカンゾウ優良株より、枝を一節に切り分け、挿し木試験用の挿し穂とした。発根床は、IBA 2 mg/lを添加し、5倍希釈B5培地を湿潤させた発泡フェノール樹脂形成品（オアシス）を使用した。挿し穂をこの発根床に挿付け、炭酸ガス濃度と光強度条件が発根に及ぼす影響について調査した。すなわち、温度25℃、各培養容器内の炭酸ガス濃度が380ppm（通常の大気中濃度）もしくは1,000ppmとなるように制御し、光強度350 luxもしくは、10,000 lux（明期16時間、暗期8時間）で培養した。3週間後、発根の有無を調査した（図26）。

炭酸ガス濃度1000ppm、光強度350 luxの条件における挿し木試験の結果、発根率はGuIV2（0%）、GuIV1（13.8%）、Gu2-2-1（75.3%）、Gu2-3-2（93.3%）となり、特にグリチルリチン含量が高いGuIV2とGuIV1で発根率が低かった。そこで、炭酸ガス濃度1,000ppm、光強度10,000 luxの条件において、これら2種の挿し木試験を行った結果、発根率がGuIV2（80%）、GuIV1（61%）となり、大幅な発根率の向上が認められた。

#### 7) 新規水耕栽培装置・方法の開発

我々はこれまでに、約1年間の養液栽培で日本薬局方規格値グリチルリチン酸含量2.5%以上の根が得られる養液栽培装置・方法（文献2、図27）及び肥大した根が得られる養液栽培装置・方法（文献3）を開発し特許出願した。

しかしながら（文献2）の方法はパミスサンド等の支持体を使用するため煩雑で栽培コストがかかり、鹿島建設と共同出願した支持体を使用しない養液栽培方法（文献3）は頻繁な水位変動を行うための装置の設置及び管理が必要である。

そこで、支持体を用いずかつ頻繁な水位変動を必要としない安価で簡便な新規水耕栽培装置・栽培方法の開発を行った。

文献2の装置・方法を考案する過程で、1) 装置への移植直後は、養液水位を高くする



か、あるいは苗の地上部を透明カバーで覆い、高湿度に保つと苗の活着率が高い、2) 地上部の生育が活発になってからは養液水位を低くしても生育への影響はない、3) 遮光（完全暗ではない）され、養液水位より上部（気相）の植物組織（根、地上茎など）は肥大化する、ことが判明したため、新規水耕栽培装置として図28を考案した。

図28の装置・栽培方法を浅型の養液槽の装置と深型の養液槽の装置を用いて再現した結果を以下に示す。

ストロン挿しにより増殖させたGuIV1株のストロン部、及び、地上茎挿し木により増殖させたGuIV2株、Gu#11株の茎の基部を、予め水で湿らせたアクアサプライヤfマットSR180（幅3 cm×長さ17.5 cm）で包み、予め水で湿らせたフロートミニ用苗床スポンジ（径5.1 cm）に挟み、水耕栽培装置（養液槽の外寸cm：縦68.4×横42.3×高さ16、養液面が高い状態に相当、浅型）上面の径4 cmの穴に設置した。また、同苗の基部を予め水で湿らせたフロートミニ用苗床スポンジ（径5.1 cm）に挟み、その周りを予め水で湿らせたアクアサプライヤfマットSR180（幅12.5 cm×17.5 cmで円筒型に成型）で包み、同様に設置した。肥料養液（大塚ハウス1号6 g+大塚ハウス2号4 g/8L：標準濃度の50%）をタンクに入れ、水面の高さを苗床スポンジがある水耕栽培装置の上面から約5 cm下（または、苗の基部から約10 cm下）に保ちながら水耕栽培を行った。

図29に示したように、ウラルカンゾウ優良株は支持体を使用していない新規水耕栽培装置（浅型）で旺盛に生育した。本装置での栽培71日後に、GuIV2及びGu#11の地上茎を切除して穴から抜き取り、苗床スポンジとアクアサプライヤfマットSR180を取り除いて根の最大根幅を計測した結果、気相部分の根では肥大が、液相（養液）部分では細根の発達認められ、それぞれの根の最大根幅はGuIV2：0.59 cm、Gu#11：0.85 cmであった（図29）。

浅型装置での栽培71-78日後に各株の細根を切除して、再び苗の基部を予め水で湿

らせたフロートミニ用苗床スポンジ（径5.1 cm）に挟み、その周りを予め水で湿らせたアクアサプライヤfマットSR180（幅12.5 cm×30 cmの上下2ヶ所をホッチキスでとめ、円筒型に成型）で包み、水耕栽培装置（養液槽の外寸cm：縦55.1×横39.9×高さ30.7、養液面が低い状態に相当、深型）の上部の径4 cmの穴に設置した。養液槽の水面の高さを、水耕栽培装置の下面から5～15 cm（または、苗の基部から15～25 cm）を維持するように肥料養液（大塚ハウス1号6 g+大塚ハウス2号4 g/8L：標準濃度の50%）を供給しながら、GC室（25℃、16時間明期、60%RH）で、さらに水耕栽培を行った。水耕栽培64～66日（通算137～142日）に植物体の地下部を収穫し、生育、根の収量及び二次代謝物含量の調査を行った。

図29に示したように、供試したすべての株で根の肥大が認められ、特にGu#11株は、最大根幅が1.01 cmであり、測定した全ての項目（最大根幅、根長、草丈、葉数）において最大値を示した。

図30にGuIV1、GuIV2及びGu#11の根（径2 mm以上）の収量、グリチルリチン酸収量と二次代謝物含量を示した。乾燥重量あたりのグリチルリチン酸含量は、日本薬局方が定める値2.5%には至らないものの、わずかに137-142日（全地上部及び細根を切除してから64-66日）で、GuIV1：1.26%、GuIV2：1.05%、Gu#11：0.83%と高い値を示した。また、他の二次代謝物含量も高かった。

#### D. 考察

人工水耕栽培実用化推進のためには、生薬までの生産を一貫して水耕で行う完全人工水耕栽培システム構築のみならず、栽培の初期段階あるいは苗生産までの工程を水耕栽培で行い、得られた苗を圃場に移植栽培して低コストでの収量増加を図り、生薬の生産を行う人工水耕-圃場ハイブリッド栽培システムの構築も重要であり、このようなシステムは一貫した水耕栽培よりも甘草の生産コストを飛躍的に下げる効果があると期待できる。本目的のためには水耕栽培

培のみならず、種々栽培環境に適した優良株の育成が必要であり、そのためには多系統の優良株の育成が望ましい。

そこで既出のウラルカンゾウ優良株のDNA配列情報を活用した新規優良株育成方法を考案し、新たに5種の新規優良株を育成した。これらの株は、短期間の人工水耕栽培システムでは良好な生育を示し、グリチルリチン産を含む二次代謝物の生産性が高いことを確認した。次年度は、これらの株の種々形質を調査するとともに、人工水耕圃場ハイブリッド栽培も含めた種々栽培条件下での生産性を調査する予定である。

植物組織培養による大量増殖が困難なGuIV2の地上茎挿し木による効率的増殖法を開発し、実用化に向けた実証栽培用の苗の大量生産が可能となった。本法は、他の難増殖性株GuIV1及び新規優良株Gu#11の効率的増殖も可能であるだけでなく、育成途中の新規優良株候補の植物体クローンを簡便かつ大量に増殖させることができるため、種々優良形質を有するウラルカンゾウ優良株の育成にも有効である。

今回光独立栄養培養での挿し木試験を行った4種のウラルカンゾウ優良株では、グリチルリチン酸含有量と発根率に負の相関が認められた。すなわち、特にグリチルリチン酸含量が高い系統では発根率が低かった。これは、ウラルカンゾウに含まれるグリチルリチン酸等の二次代謝産物が、挿し穂基部からの発根を阻害している可能性がある。しかし、グリチルリチン酸含量の高い系統（GuIV2、GuIV1）においても光強度を強くすることで発根率が大幅に向上することが見出された。発根には光合成活性の増加が重要であることが、日本製紙での研究により明らかとなっている。従って、光強度を強くすることによって、ウラルカンゾウの光合成能力が増加した可能性が示された。この点については、今後、検証が必要である。

#### 参考文献

- 1) 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、千田浩隆、特願2011-245757、「カンゾウ属植物株及び

カンゾウ属植物増殖方法」(2011)

- 2) 吉松嘉代、特願2009-131442「栽培装置、及び、栽培方法」(2009)
- 3) 澤田裕樹、斎藤俊哉、工藤 善、大野貴子、吉松嘉代、特願2010-250701「養液栽培システム及び養液栽培方法」(2010)

#### E. 結論

既出のウラルカンゾウ優良株のDNA配列情報を活用した新規優良株育成方法を考案し、新たに5種のウラルカンゾウ優良株を育成した。本新規優良株は、人工水耕栽培で良好に生育し、グリチルリチン酸を含む二次代謝物の生産性が高いことを確認した。種々人工水耕栽培条件を検討し、白色LEDでの栽培が、生育促進と二次代謝物含量増加に効果的であることを発見した。地上茎を挿し穂とする高効率なウラルカンゾウ優良株の大量増殖法を開発した。また、グリチルリチン酸含量の割合が高いウラルカンゾウ優良株の光独立栄養培養による挿し木増殖に取り組んだ結果、炭酸ガス濃度1,000ppmと光強度10,000 luxが挿し木増殖の条件に適している事を見出した。簡便で安価な新規水耕栽培装置及び栽培方法を開発し、ウラルカンゾウ優良株の栽培に適していることを確認した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

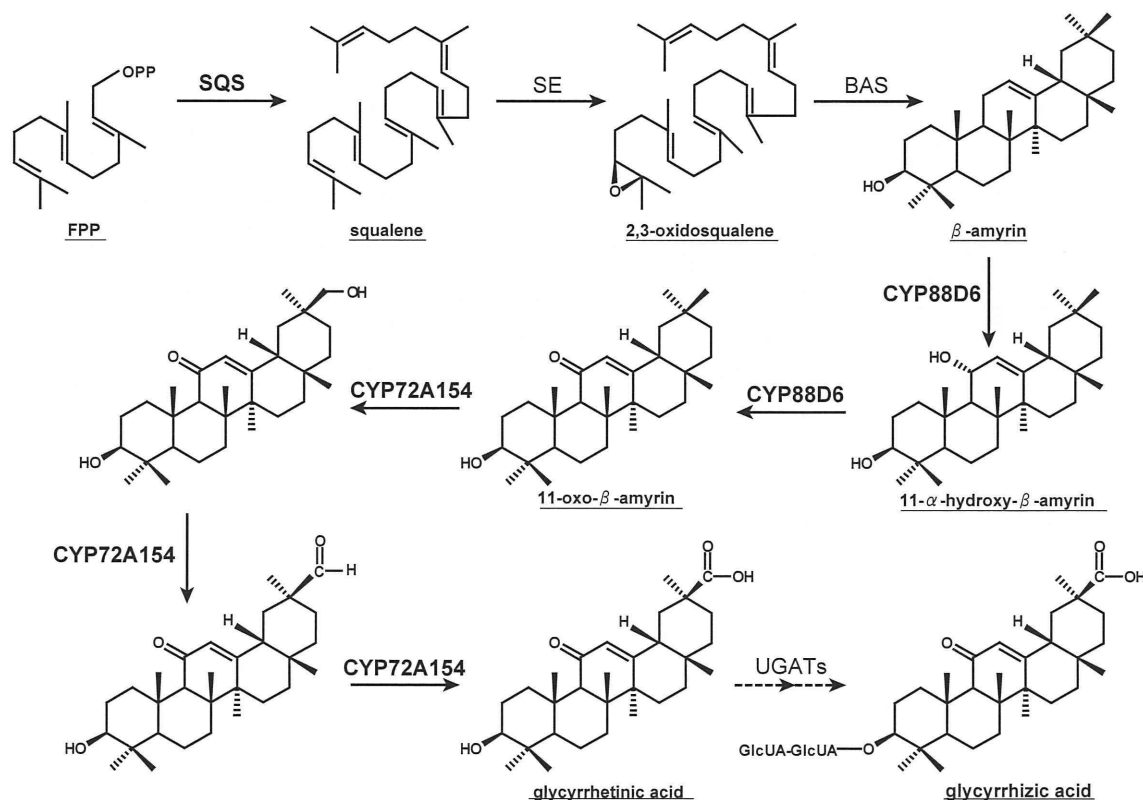
- 1) 吉松嘉代：薬用植物組織培養物コレクションについて. 日経バイオテクオンラインGreenInnovation, 219, (2012).
- 2) 吉松嘉代、河野徳昭、乾 貴幸：植物工場での甘草生産に適したウラルカンゾウの選抜と育成. ブレインテクノニュース、149、1-9 (2012)
- 3) 吉松嘉代：甘草の水耕栽培 薬用植物資源の保護と確保. ファルマシア、49、141-146 (2013).
- 4) 吉松嘉代：植物工場における薬用植物優良苗の育成と生産. SHITA REPORT No.30, 日本生物環境工学会、京都、2013、pp.13-21.

## 2. 学会発表

- 1) 吉松嘉代：「植物工場に適した薬用植物の分子育種」、日本学術振興会植物バイオ第160委員会第4期第4回研究会「植物工場と植物バイオの接点」（2012. 6. 29、大阪）
- 2) 吉松嘉代：「植物工場における薬用植物優良苗の育成と生産」。第23回SHITAシンポジウム（2013. 1. 18、東京）
- 3) 吉松嘉代、松本敏一、岩本嗣、乾貴幸、河野徳昭、川原信夫：漢方薬に使用される薬用植物の組織培養及び効率的増殖法に関する情報整備 (2)。第30回日本植物細胞分子生物学会（生駒）大会・シンポジウム（2012. 8. 6-8、奈良）
- 4) 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、川原信夫：種々栽培環境条件下で養液栽培したウルカンゾウ優良株の形質。日本生薬学会第59回年会（2012. 9. 17-18、千葉）
- 5) 吉松嘉代、河野徳昭、飯田修、根岸直希、中浜克彦、河岡明義、御影雅幸、川原信夫：人工環境制御下でのマオウ属種苗の保存と効率的増殖に関する研究。日本薬学会第133年会（2013. 3. 28-30、横浜）

## G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 出願番号 特願2013-049279  
発明者 吉松嘉代、河野徳昭、乾 貴幸  
特許出願人、識別番号（団体名及び弁理士事務所）独立行政法人医薬基盤研究所（505314022） 代理人：木村 満（100095407）  
発明の名称 カンゾウ属植物株、識別マーカー、増殖方法、及び、水耕栽培装置 出願日 平成25年3月12日



FPP, farnesyl diphosphate; SQS, squalene synthase; SE, squalene epoxidase; BAS,  $\beta$ -amyrin synthase; CYP, cytochrome P450; UGATs, UDP-glucuronosyltransferases.

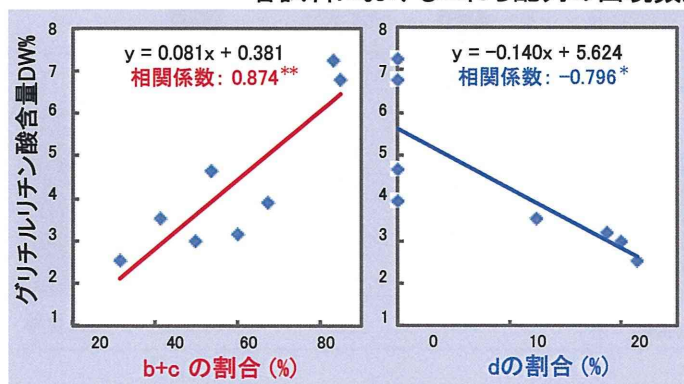
図 1. カンゾウ属植物におけるグリチルリチン酸合成経路

甘草市場品生薬試料のCYP88D6遺伝子イントロン7領域の配列情報を収集  
(優良系統を含むカンゾウ属植物の識別に有用な多型を含む領域)

大きく分けて4種の配列 (a, b, c, d) を取得

- a. ウラルカンゾウに広く認められた配列
- b, c. それぞれ、優良系統 GuTS 71-08 IV2, IV1 に特徴的に認められた配列
- d. スペインカンゾウと相同性の高い配列

各試料におけるこれら配列の出現頻度と成分含量の関係は？



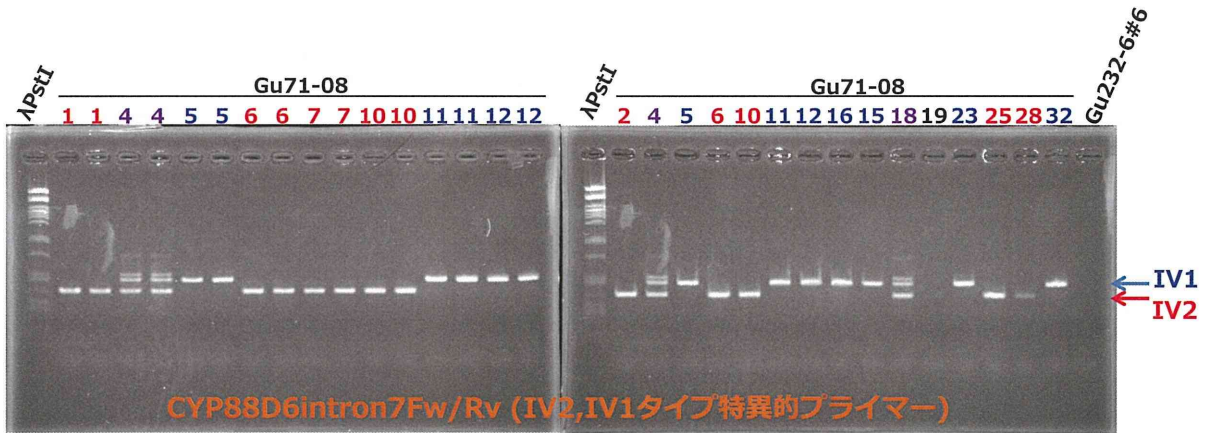
グリチルリチン酸含量とbとcを合わせた配列出現頻度の間には正の強い相関性

グリチルリチン酸含量とdの配列出現頻度との間には負の強い相関性

\*\* 1%の有意水準で相関あり  
\* 5%の有意水準で相関あり (t検定)

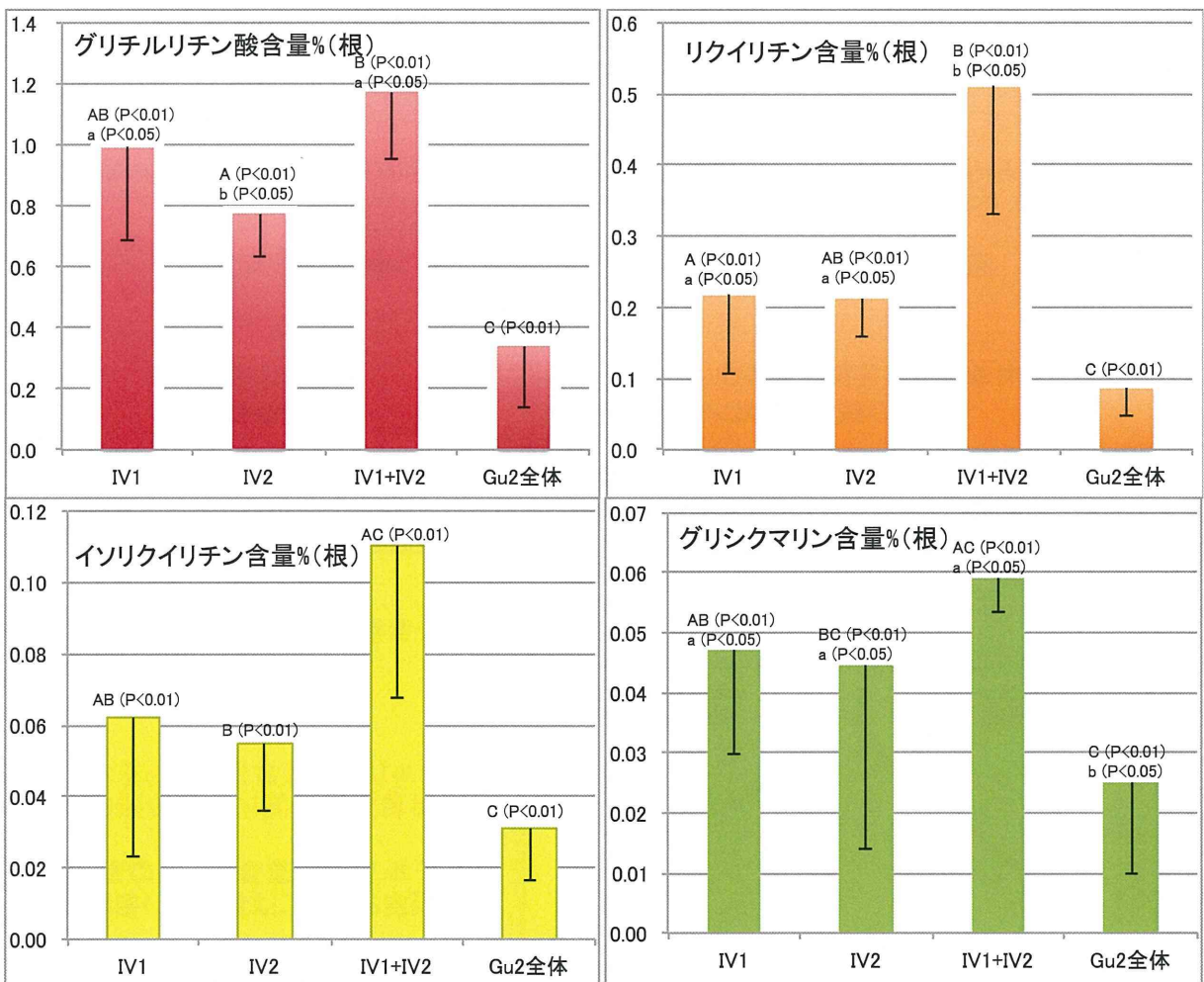
高グリチルリチン酸含量株選抜のための遺伝子マーカーとしての応用が期待される

図 2. 甘草市場品中の CYP88D6 遺伝子イントロン7中の IV1 及び IV2 タイプ配列の出現頻度とグリチルリチン酸含量



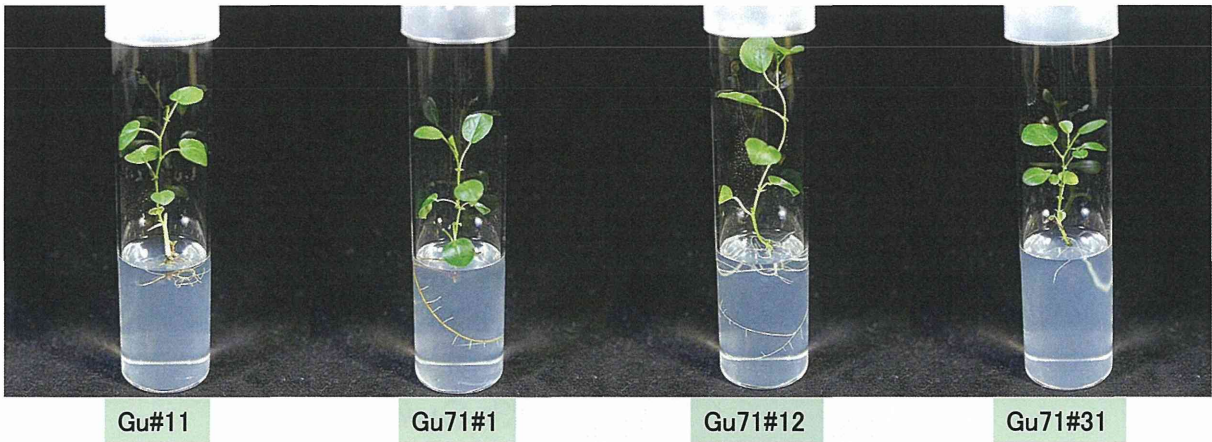
#19 以外の GuTS71-08 系統実生クローンは IV1、IV2 又は IV1+IV2 タイプ配列のいずれかを持ち、Gu2-3-2 実生は IV1、IV2 タイプ配列を持たない

図 3. PCR によるウラルカンゾウ実生株クローンの CYP88D6 遺伝子イントロン 7 中の IV1 及び IV2 タイプ配列の検出



異なった文字間には有意差有り(t検定)

図 4. ウラルカンゾウ実生株クローンの CYP88D6 遺伝子イントロン 7 配列タイプと二次代謝物含量 (栽培 84-96 日後の根)



0.5 g/L MES, 1%シヨ糖, IBA 0.1 mg/L含有Murashige and Skoog固形培地, 継代41-44日後

図 5. ウラルカンゾウ新規優良株培養植物体

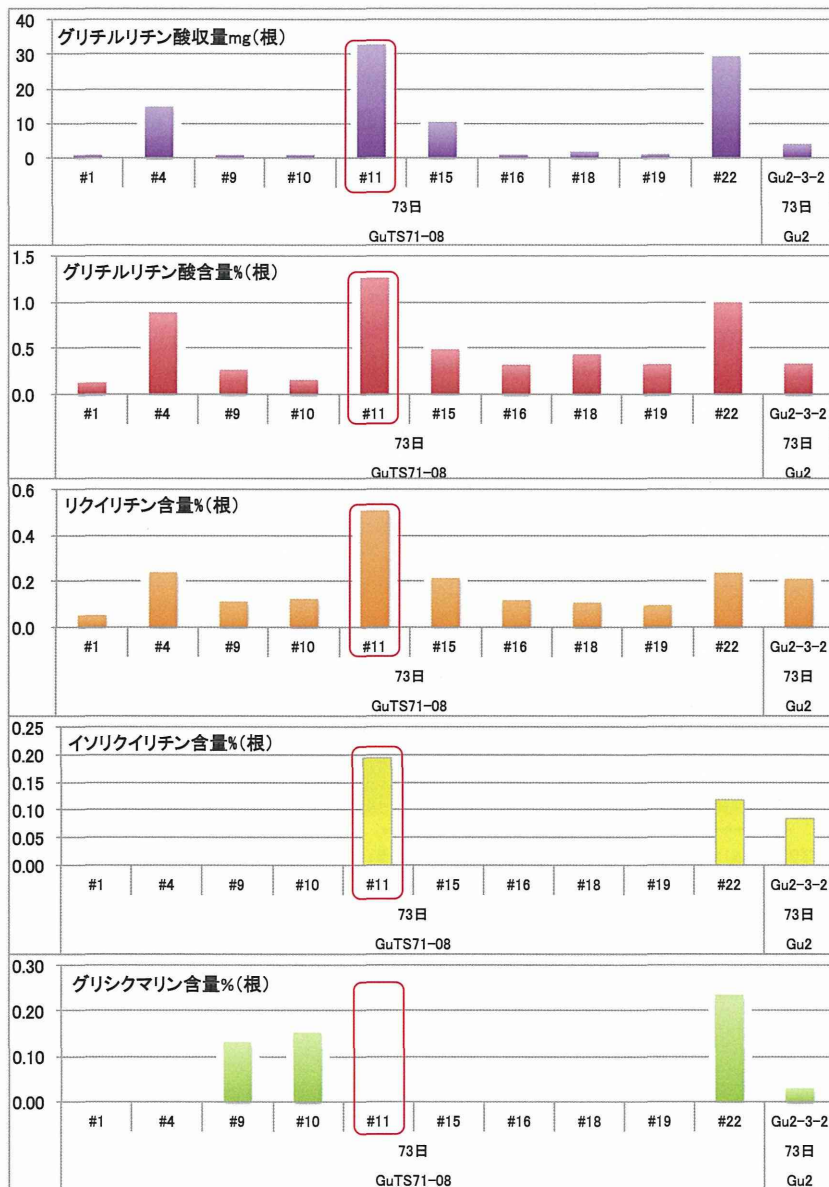
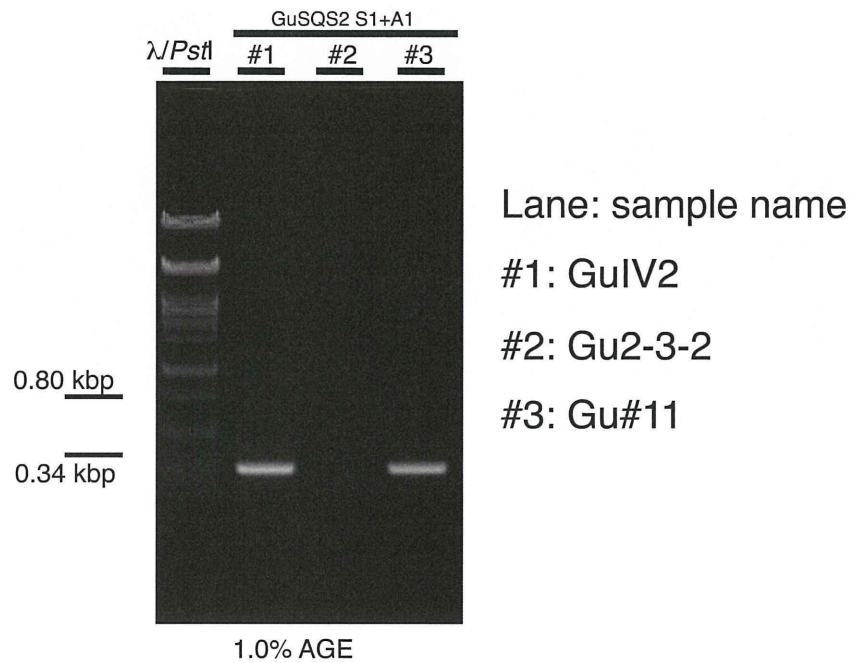
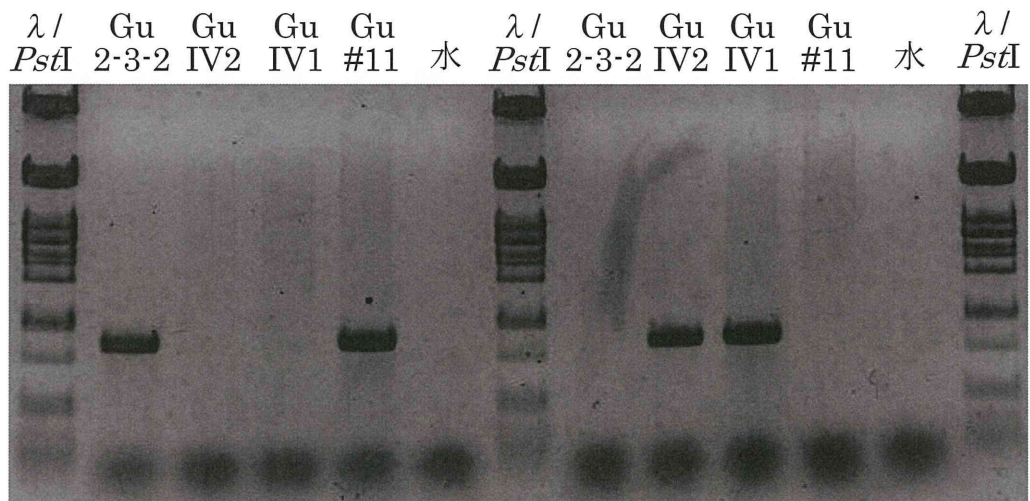


図 6. 73日間養液栽培したウラルカンゾウ GuTS71-08 実生由来株及び Gu2-3-2 培養苗のグリチルリチン酸収量及び二次代謝物含量



Gu#11はGuIV2タイプのSQS2遺伝子配列をもち、Gu2-3-2と識別できる  
GuIV2に特異的なSQS2遺伝子配列は、GuIV1にも存在する

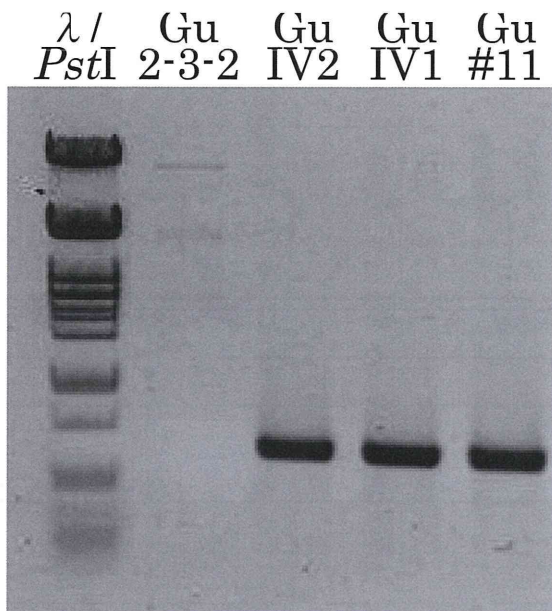
図 7. GuIV2 に特異的な SQS2 遺伝子用プライマーセットを用いた PCR



使用プライマー: 72A154i1S(Gu)/72A154i2A(Gu#11, Gu2)    72A154i1S(Gu)/72A154i2A(GuIV1, GuIV2)

Gu#11はGu2-3-2タイプのCYP72A154遺伝子イントロン2配列を持つ

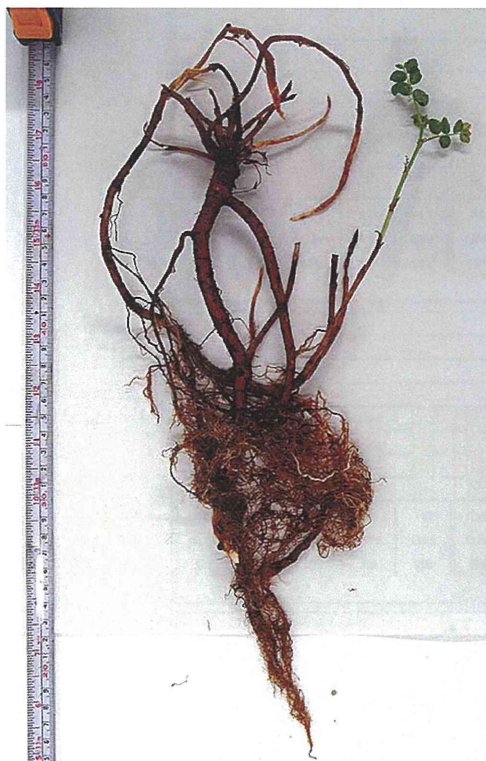
図 8. CYP72A154 遺伝子イントロン 2 配列の多型を利用した PCR による識別



使用プライマー:CYP72A154S759/CYP72A154i4A(71)

Gu#11はGuIV1及びGuIV2タイプのCYP72A154遺伝子イントロン4配列を持つ

図 9. CYP72A154 遺伝子イントロン 4 配列の多型を利用した PCR による識別



植物名	Gu#11
根の収量(乾燥重量)	4.82 g
グリチルリチン酸収量(根)	129.2 mg
グリチルリチン酸含量(根)	2.68%
リクイリチン含量(根)	1.70%
イソリクイリチン含量(根)	0.15%
グリシクマリン含量(根)	0.11%

図 10. 養液栽培 362 日の Gu#11 (写真) の根の収量 (径 1 mm 以上の乾燥重量 g)、グリチルリチン酸収量と二次代謝物含量 (%乾燥重量)



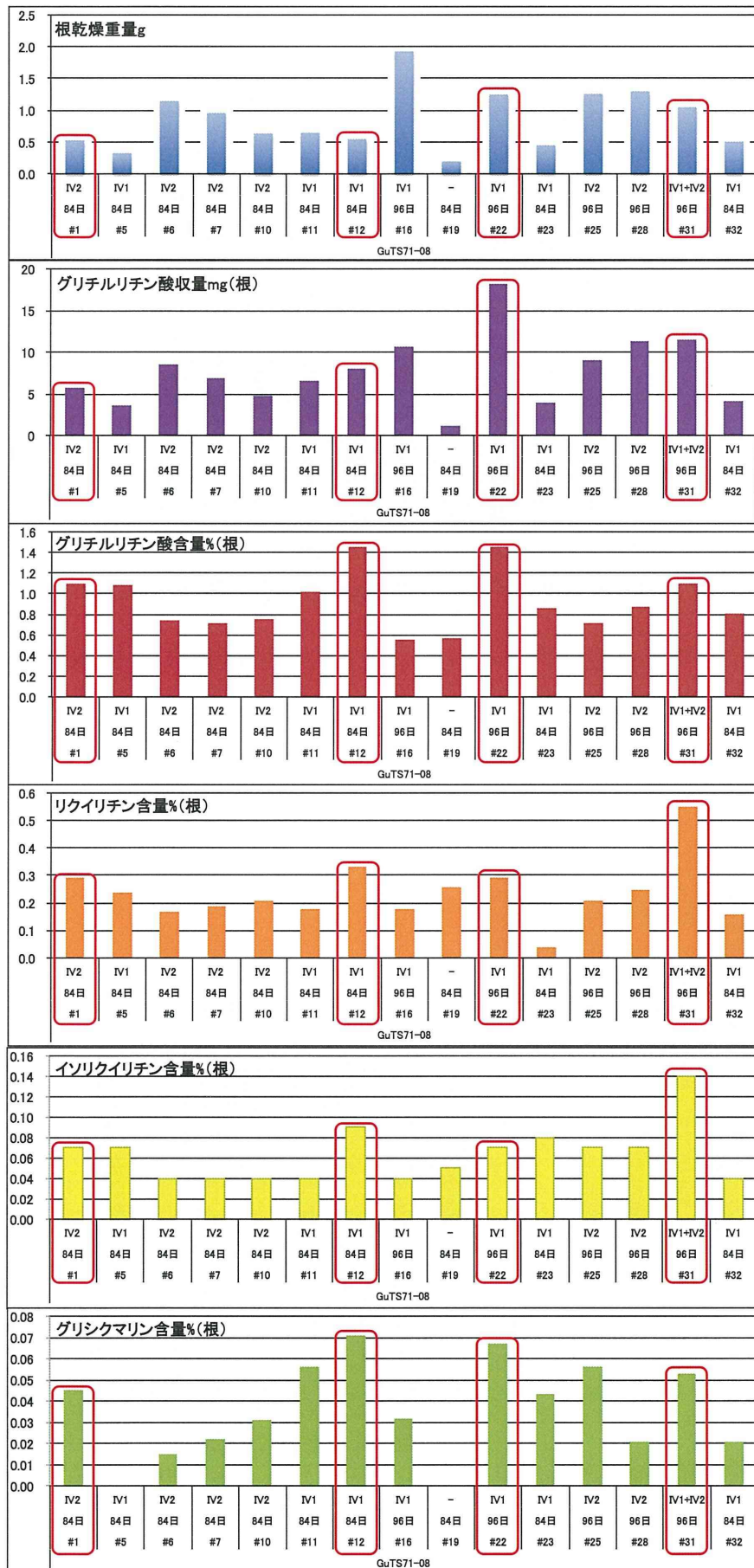


図11. ウラルカンゾウGuTS71-08系統実生クローン株のCYP88D6遺伝子イントロン7配列タイプと二次代謝物含量 (栽培84-96日後の根)

系統名	前処理条件	培養土	管理条件	シュート形成率
Gu2-2-1	メネデル200倍液、2時間以上	水でふくらむタネまき土ポット(径48 mm)	毎日灌水、20℃、14時間照明、相対湿度50%	72.2%(27日後)
Gu2-3-2	メネデル200倍液、2時間以上	水でふくらむタネまき土ポット(径48 mm)	毎日灌水、20℃、14時間照明、相対湿度50%	59.8%(27日後)
GuIV1	メネデル100倍液、30分以上	パーミキュライト(アラバスケツト)	メネデル100倍液、25℃/12時間明、25℃/12時間暗、相対湿度60%	63.1%(27日後)
GuIV2	メネデル100倍液、5分以上	水でふくらむタネまき土ポット(径48 mm)、ロックウール2x2x2cm	メネデル100倍液、25℃/12時間明、15℃/12時間暗、相対湿度60%	79.2%(27日後)



Gu2-2-1 (27 days)



Gu2-3-2 (27 days)



GuIV1 (20 days)



GuIV2 (14 days)

養液栽培により得られた優良株のストロン挿しでは高い植物体再生率(59.8~79.2%)が得られた

ウラルカンゾウ優良株  
Gu2-2-1, Gu2-3-2, GuIV1, GuIV2は、増殖法とともに特許出願

特願2011-245757  
「カンゾウ属植物株及びカンゾウ属植物増殖方法」

図12. ストロン挿しによるウラルカンゾウ優良株の増殖



Gu2-2-1(95日後)



Gu2-3-2(118日後)



GuIV1(364日後)



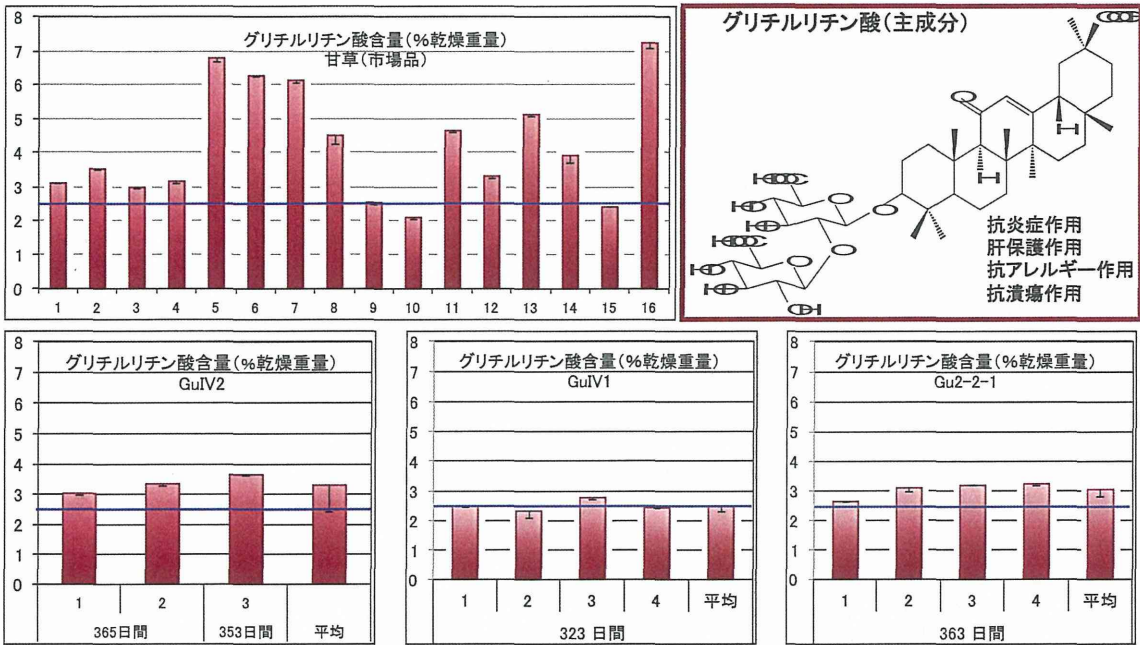
GuIV2(110, 95, 83日後)



いずれの優良株のクローン苗も人工環境(グロースチャンパー室)内で良好に生育し開花・結実も認められた全ての優良株より発芽能のある種子が得られた

図13. 養液栽培したウラルカンゾウ優良株の生育と開花

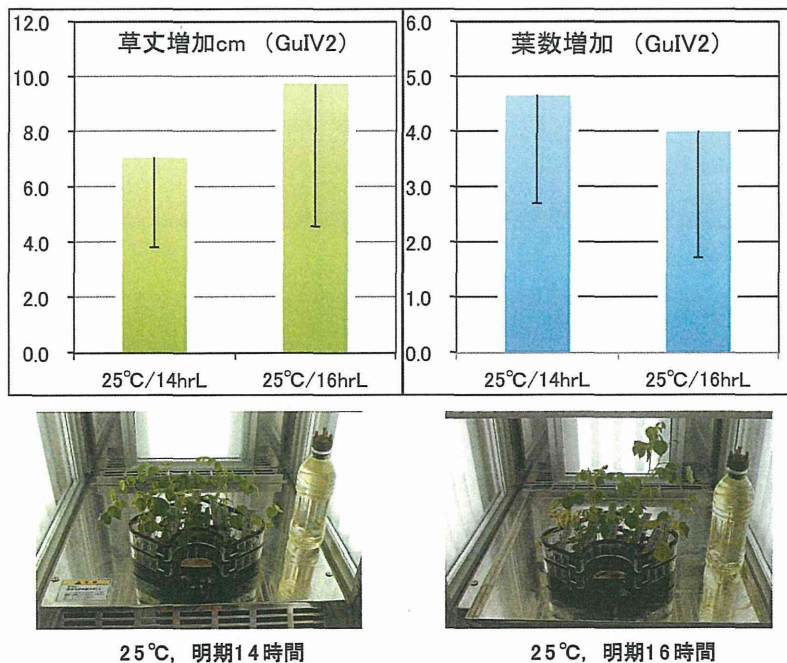
ストロン苗、養液栽培(支持体:ハイドロボール)、栽培環境:グロースチャンパー室[温度25℃、相対湿度60%、明期16時間(セラミックメタルハライドランプ:セラルクス400W、照度30,000 lux、光合成有効放射550μmol/m<sup>2</sup>S)]



- 市場品(野生植物由来)の甘草は、グリチルリチン酸含量のばらつきが大きい
- 養液栽培1年間のGuIV2, Gu2-2-1のグリチルリチン酸含量は市場品5品(1, 2, 3, 4, 12)と同程度
- 養液栽培1年間Gu2-2-1のグリチルリチン酸含量は市場品2品(9, 15)と同程度 青線: 日本薬局方の規格値(2.5%)

図 14. 甘草(市場品)と養液栽培した GuIV1、GuIV2 及び Gu2-2-1 の根のグリチルリチン酸含量(%)

栽培条件は、図 13 と同様



葉数増加は明期14時間の方が多いが、草丈増加は明期16時間の方が良好

図 15. 27日間養液栽培した GuIV2 (ストロン苗) の生育(明期14時間 vs 16時間)

ストロン苗 (n=6)、養液栽培(支持体: ジフィーセブン水でふくらむタネまき土ポット)、栽培環境: 植物インキュベーターTOMY CFH-305[温度 25℃、相対湿度 40%、明期 14 時間又は 16 時間(蛍光灯:TOSHIBA 40W FL40S・W 白色、照度: 19,000 lux、光合成有効放射: 300μmol/m<sup>2</sup>S)]

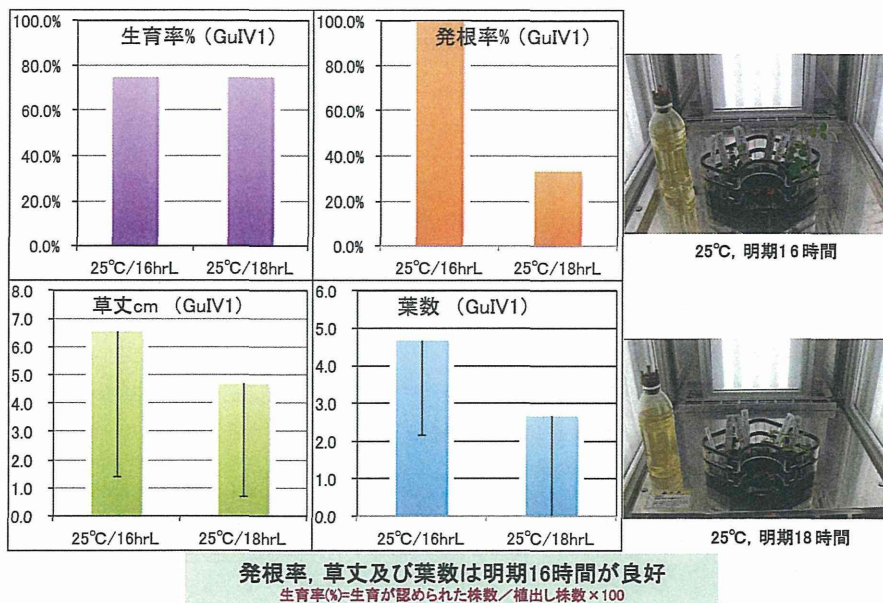


図 16. 31 日間養液栽培した GuIV1 培養シュートの生育 (明期 16 時間 vs 18 時間)

培養シュート (養液栽培植物の地上部を殺菌後、植物ホルモ無添加 WPG (グルタミン 10 mg/L 添加 Woody Plant) 培地に植付け、23口、14 時間照明下で 30 日間培養、n=4)、養液栽培 (支持体: ジフィーセブン水でふくらむタネまき土ポット)、栽培環境: 植物インキュベーター TOMY CFH-305 [温度 25°C、相対湿度 40%、明期 16 時間又は 18 時間 (蛍光管: TOSHIBA 40W FL40S・W 白色、照度: 19,000 lux、光合成有効放射: 300 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>S)]

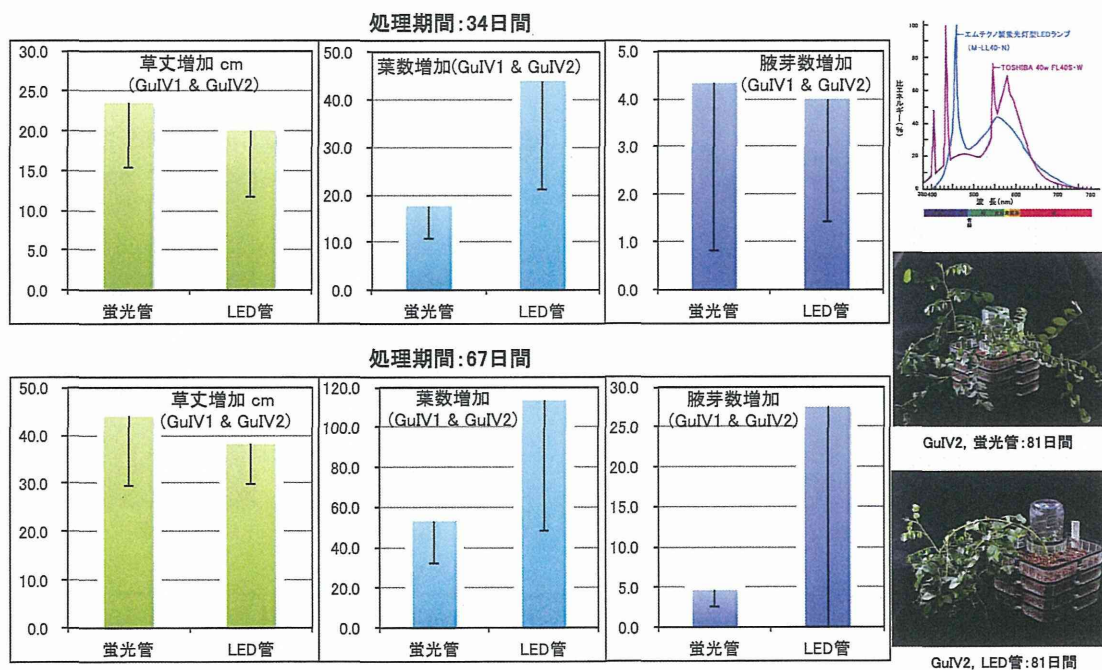


図 17. 種々光源 (蛍光管/白色 LED 管) 下で養液栽培した GuIV1 及び GuIV2 の生育 (処理期間: 34 日間及び 67 日間)

植物体 [ストロン苗及び培養苗、植物インキュベーター TOMY CFH-305 (温度 25°C、相対湿度 40%、明期 16 時間、光源: 蛍光灯: TOSHIBA 40W FL40S・W 白色) で一定期間養液栽培したもの、n=3-4 (生育調査)、n=1 (成分分析)]、養液栽培 (支持体: ハイドロボール)、栽培環境: 同インキュベーター (温度 25°C、相対湿度 40%、明期 16 時間)、光源: 蛍光管 (TOSHIBA 40W FL40S・W 白色、照度: 19,000 lux、光合成有効放射: 300 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>S) 又は白色 LED 管 (エムテクノ社製 M-LL40ND 100V、照度: 14,000 lux、光合成有効放射: 220 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>S)