

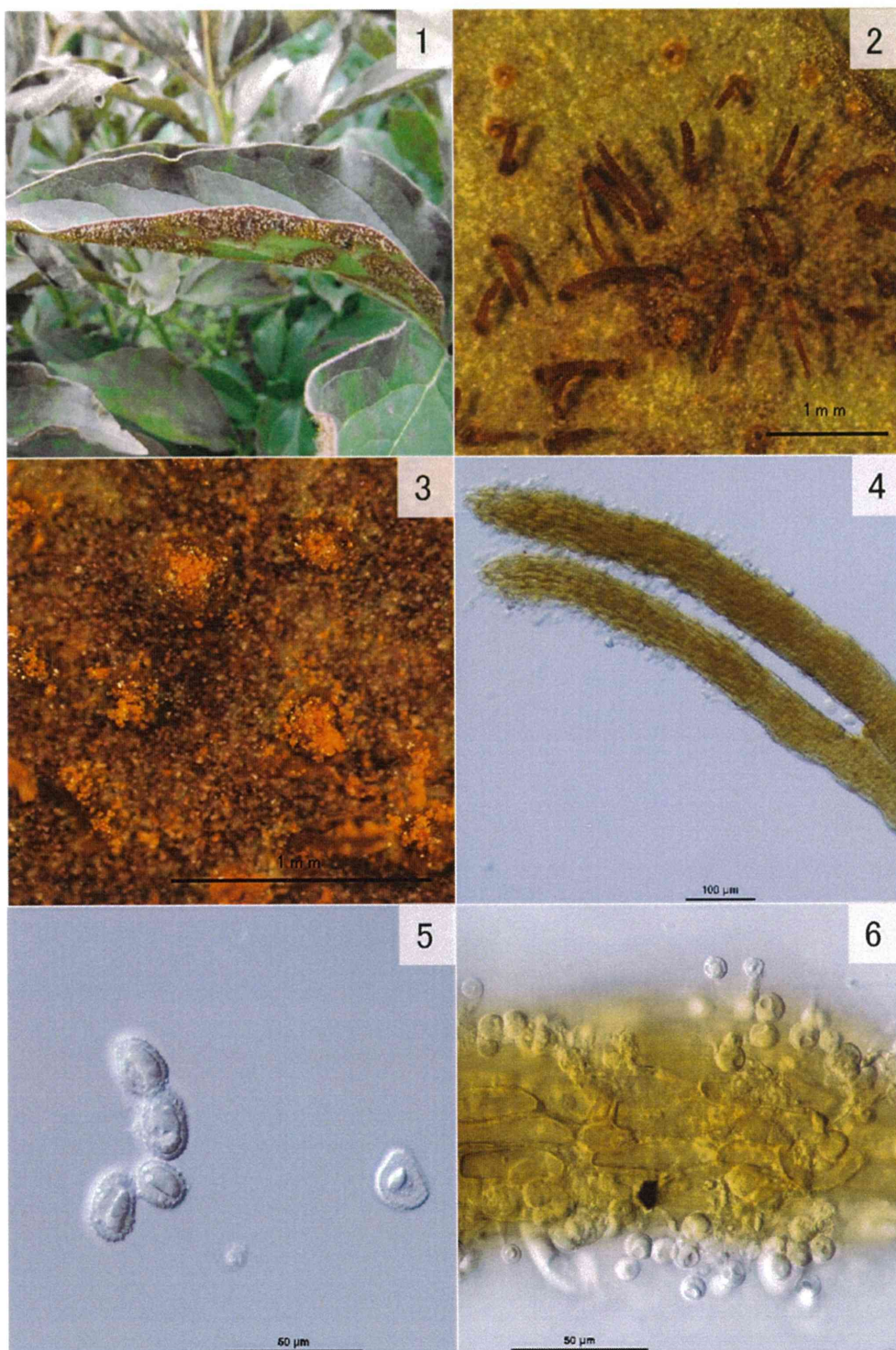


図1 圃場で発生したシャクヤクさび病の病徴およびさび病菌  
 1: シャクヤクさび病の病徴, 2: 罹病葉上の冬孢子堆,  
 3: 罹病葉上の夏孢子堆, 4: 冬孢子堆, 5: 夏孢子, 6: 担子胞子

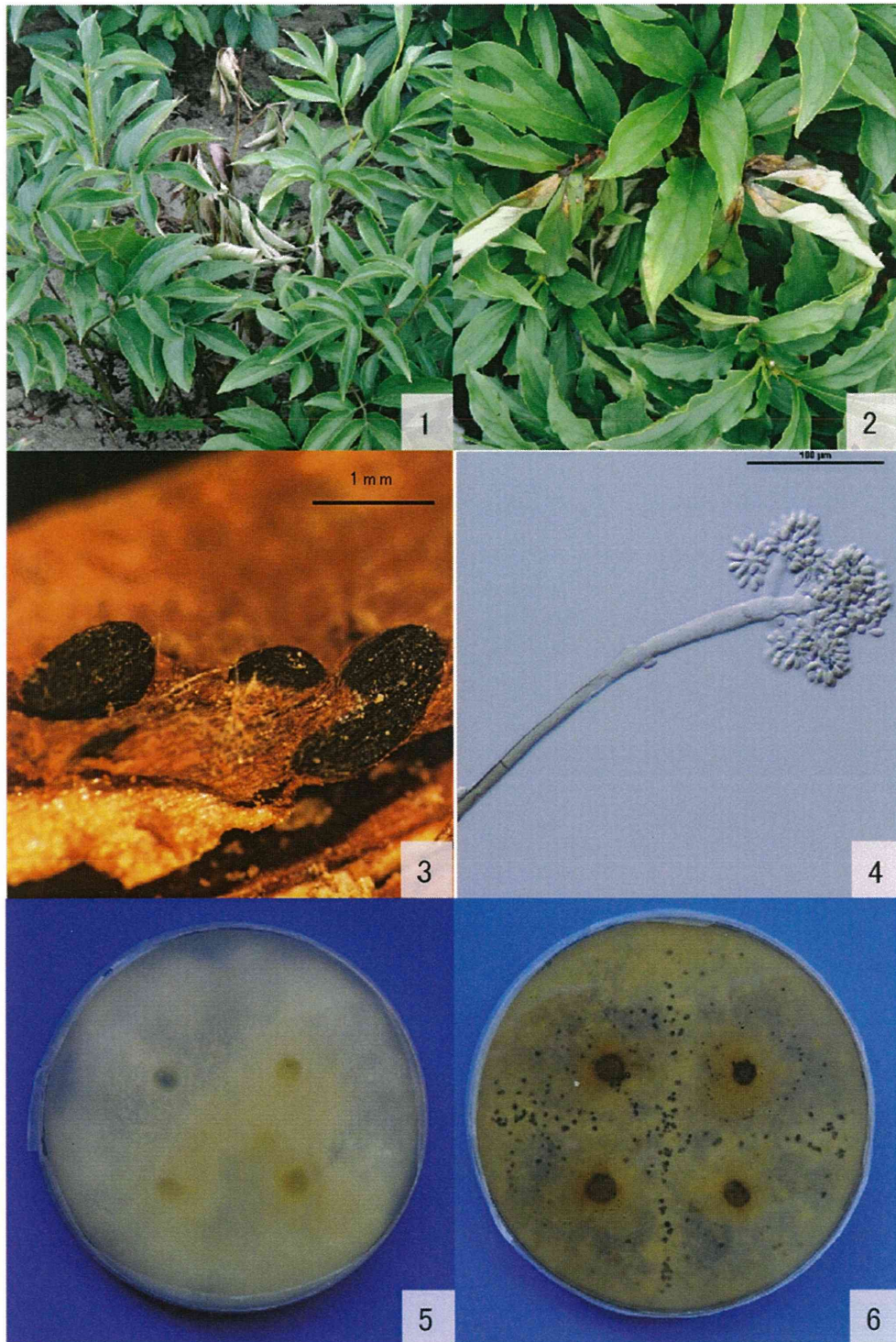


図2 圃場で発生したシャクヤク立枯病の病徴および分離糸状菌  
 1: シャクヤク立枯れ症状を呈した株, 2: 罹病葉, 3: 枯死葉柄上の小型菌核, 4: 分生子柄および分生子, 5: 分生子から分離した糸状菌の菌叢(PDA 23°C 38日間), 6: 小型菌核から分離した糸状菌の菌叢(PDA 23°C 38日間).

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
薬用植物、生薬の持続的生産を目指した新品種育成および新規栽培技術の開発  
並びにこれらの技術移転の基盤構築に関する研究（H25-創薬-一般-003）  
分担研究報告書

分担研究課題：種子の保存と発芽に関する研究  
-薬用植物の発芽および効率的増殖法に関する研究-

研究分担者 熊谷 健夫 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター筑波研究部 主任研究員

要旨 薬用植物の種苗の保存および効率的増殖法を確立するため、以下の研究を行った。(1) チリメンアカジソ、クララ、コヘンルーダ、ウイキョウ、カリン、トウネズミモチ、アマウなど9種の薬用植物の発芽、子葉展開に及ぼす温度条件の影響を調査した。各植物の発芽適温は発根率、出葉率、所要日数から判断して、チリメンアカジソでは20～25℃、クララでは20～25℃、コヘンルーダでは15～25℃、ウイキョウでは15～25℃、トウネズミモチでは15～20℃、カリンでは15～20℃、アマウイキョウでは20～25℃、ウシノシタクサ20～30℃であると考えられた。(2) クララの発芽は精米機による種子に傷処理をした区で発芽率が高く、処理の効果が認められた。(3) カイケイジオウの効率的増殖法の検討を行った結果、シルバーマルチ区が稲わら区、裸地区に比べて収量が高く、カイケイジオウの栽培に有効であることが明らかになった。

A. 研究目的

薬用植物は、野生あるいは野生に近いものが多く、種子の休眠性や発芽条件等を明らかにし、薬用植物の栽培や資源保存のための情報整備が急務である。本研究では、薬用植物の発芽試験に必要な温度、試験期間等を設定するため、薬用植物9種について発芽試験法の至適条件の検討およびクララ種子の発芽に及ぼす種子の傷処理の影響について調査を行った。さらに国内における薬用植物栽培を推進するために、カイケイジオウの効率的増殖法について検討を行った。

B. 研究方法

(1) 薬用植物の発芽に及ぼす温度の影響

材料：供試した植物と採取地、採取年は以下の通りで、前年産栽培種子を用いた。

チリメンアカジソ *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *crispa* Decne. 2013年筑波研究部産種子

クララ *Sophora flavescens* Sol. [JP16: *Sophora flavescens* Aiton] 2013年筑波研究部産種子

コヘンルーダ *Ruta chalepensis* L. var. *bracteosa* Halácsy 2013年筑波研究部産種子

ウイキョウ *Foeniculum vulgare* Mill. [JP16] 2013年筑波研究部産種子

ムラサキウイキョウ *Foeniculum vulgare* Mill. 'Purpurascens' 2013年筑波研究部産種子

カリン *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne 2013年筑波研究部産種子

トウネズミモチ *Ligustrum lucidum* Aiton 2013年筑波研究部産種子

アマウイキョウ *Foeniculum vulgare* Hill. var. *dulce* (Mill) Batt. et Trab. 2013年筑波研究部産種子

ウシノシタクサ *Anchusa azurea* Mill. 2013年筑波研究部産種子

蓋付きプラスチックケースにろ紙を2枚敷き発芽床(75 x 140 mm)とした。発芽床は、10～12 mLの蒸留水で湿潤させた。50粒の種子を置床し、温度15～30℃(一定)に設定したインキュベーター内で発芽試験を

行った。発芽試験時の照明条件は、12 時間の明暗サイクルで行った。各温度条件ともに 3 反復で試験を行った。発芽の確認：発根時および出葉（子葉展開）時の 2 段階で確認した。

### (2) 種子発芽に及ぼす種子傷処理の影響

材料：クララ *Sophora flavescens* Sol. [JP16: *Sophora flavescens* Aiton] 2013 年筑波研究部産種子

処理：(1)無処理、(2)5 分 1 回、(3)白米 1 回、(4)5 分 2 回、(5)白米 2 回、各処理はマジックミル：型式 SKM-58（株式会社サタケ）を用いて種子に傷をつけた。量と白さで強さを設定できるようになっており、量はすべて 1 合で白さは 5 分と白米処理を行った。

回数は 1～2 回行い、1 回あたりの時間は 6 秒であった（図 1）。

蓋付きプラスチックケースにろ紙を 2 枚敷き発芽床（75×140 mm）とした。発芽床は、10～12 mL の蒸留水で湿潤させた。35 粒の種子を置床し、20℃と 25℃の、温度を一定に設定したインキュベーター内で発芽試験を行った。発芽試験時の照明条件は、12 時間の明暗サイクルで行った。各温度条件ともに 2 反復で試験を行った。

### (3) カイケイジオウの効率的増殖法に関する研究

材料：カイケイジオウ (*Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. forma *hueichingensis* (Chao et Schih) Hsiao ) 1765-84TS

定植：カイケイジオウの2014年5月に掘り上げた株から種根を作り、2014年6月4日に圃場に植え付けた。

施肥：基肥は堆肥200kg/a、苦土石灰10kg/a、化成(8-8-8) 5kg/a、ようりん2kg/aを施用した。

試験区：

稲わら区、シルバーマルチ区：畝間110cm 幅 株間30cm、株間50cm、裸地区：畝間110cm 幅 株間30cm、稲わら被覆区：畝間110cm幅 株間30cm、株間50cm

シルバーマルチ被覆：2014年6月4日～収穫

稲わら被覆：2014年6月4日～収穫、

収穫：2014年12月10日 各区 20個体収穫  
収穫後、2015年2月6日まで屋外で乾燥し、風乾重を測定した。

## C. 研究結果

### (1) 薬用植物の発芽に及ぼす温度の影響

チリメンアカジソ、クララ、コヘンルーダ、ウイキョウ、ムラサキウイキョウ、カリン、トウネズミモチ、アマウイキョウ、ウシノシタクサについて発芽、子葉展開に及ぼす温度条件の影響について調査した。供試植物の100粒重はチリメンアカジソ 76.5mg、クララ 15408.9 mg、コヘンルーダ 184.7 mg、ウイキョウ 250.6 mg、ムラサキウイキョウ 162.7 mg、カリン 4488 mg、トウネズミモチ 2034 mg、アマウイキョウ 262.8 mg、ウシノシタサ 308.5 mg であった（表 1）。チリメンアカジソの発芽は 20～25℃で発根率、出葉率が高く、20℃で発根率 88.7%、出葉率 87.3%を示した。クララの発芽は 20～25℃の発根、出葉率が高く、20℃で発根率 13.3%、出葉率 12.7%を示した。コヘンルーダの発芽は 20～25℃の発根、出葉率が高く、25℃で発根率 68.7%、出葉率 67.3%を示した。ウイキョウの発芽は 20～25℃の発根、出葉率が高く、20℃の発根率は 36.7%、出葉率は 36.0%を示し、ムラサキウイキョウの発芽は 15～30℃の発根、出葉率に差はなく、1.3～4.0%の発根率を示した。カリンの発芽は 15～20℃の発芽率が高く、15℃で発根率 84.0%、20℃で 65.8%であった。トウネズミモチの発芽は 15℃で 50%、20℃で 64%の発根率を示した。アマウイキョウの発芽は 20～25℃で発根率、出葉率が高く、発根率は 20℃で 39.3%、25℃で 45.3%、ウシノシタクサの発芽は 20～30℃で発根率が 27～33%、出葉率が 22～27%を示した。（図 2、3）。

### (2) クララの種子発芽に及ぼす種子傷処理の影響

クララの発芽は精米処理機で傷処理をした区で発芽率が高く、無処理区では 20℃の発根率は 10%、25℃の発根率は 15.7%であったが、白米 2 回処理区では 20℃の発根率は

65.7%、25℃の発根率 77.1%で、無処理区に比べて高くなった(図 4)。

### (3) カイケイジオウの効率的増殖法に関する研究

カイケイジオウの効率的増殖法の検討を行った。収穫期の草丈はシルバーマルチ区で 19.3~21.7cm、裸地区で 17.7cm、稲わら被覆区で 10.7~12.2cm で、ややシルバーマルチ区の草丈が高かった(表 2)。収穫期の根の形質は最大根径が 18.4~20.4mm、根数は 14~26 であった。根数は各区とも 5~10mm の径の根数が多く、7.5~14.8 であった(表 3)。個体当たりの風乾根重(全重)はシルバーマルチ株間 30cm 区で 74.5g、シルバーマルチ株間 50cm 区で 84.4g、裸地区株間 30cm 区で 67.1g、稲わら区 30cm 区 53.1g、稲わら区 50cm 区 32.8g で、シルバーマルチ区で根重が大きかった(図 5、6)。収穫根重の植え付け時の種根重に対する増殖率はシルバーマルチ株間 50cm 区で最も大きく、風乾重で 18.3 倍であった(表 4)。

### D. 考察

各植物の発芽適温は発根率、出葉率、所要日数から判断して、チリメンアカジソでは 20~25℃、クララでは 20~25℃、コヘンルーダでは 15~25℃、ウイキョウでは 15~25℃、トウネズミモチでは 15~20℃、カリンでは 15~20℃、アマウイキョウでは 20~25℃、ウシノシタクサ 20~30℃であると考えられた。

クララの発芽は種子を傷処理した区で発芽率が高く、精米処理による傷処理の効果が認められた。

カイケイジオウの収穫根はシルバーマルチ区で収量が高く、増殖率もシルバーマルチ株間 50cm で高く、カイケイジオウ栽培にシルバーマルチ被覆が有効であることが明ら

かになった。

### E. 結論

チリメンアカジソ、クララ、コヘンルーダ、ウイキョウ、カリン、トウネズミモチ、アマウイキョウなど 9 種の薬用植物の発芽、子葉展開に及ぼす温度条件の影響を調査した。各植物の発芽適温は発根率、出葉率、所要日数から判断して、チリメンアカジソでは 20~25℃、クララでは 20~25℃、コヘンルーダでは 15~25℃、ウイキョウでは 15~25℃、ムラサキウイキョウでは 15~20℃、トウネズミモチでは 15~20℃、カリンでは 15~20℃、アマウイキョウでは 20~25℃、ウシノシタクサ 20~30℃であると考えられた。

カイケイジオウの収穫根はシルバーマルチ区で収量が高かった。種根の増殖率もシルバーマルチ株間 50cm で高く、カイケイジオウ栽培にシルバーマルチ被覆が有効であることが明らかになった。

### F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報はない。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

- 1) 熊谷健夫、淵野裕之、菱田敦之、川原信夫：薬用植物の種子発芽に関する研究－薬用植物の種子発芽に関する研究－キバナオウギ、ダイオウ、モッコウ、ホッカイトウキ、トウキの種子発芽に及ぼす温度の影響、日本薬学会第 135 年会(2015. 3. 25-28、神戸)

### H. 知的財産権の出願・登録状況

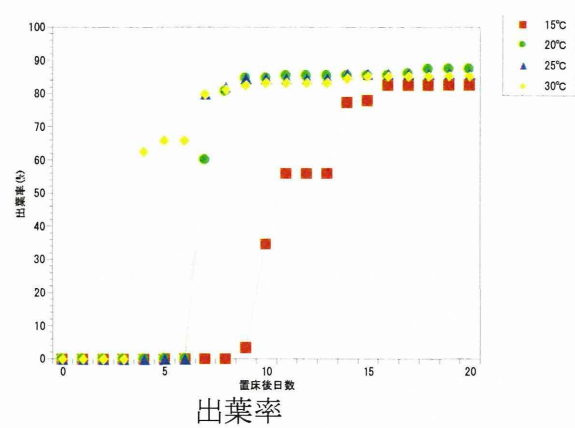
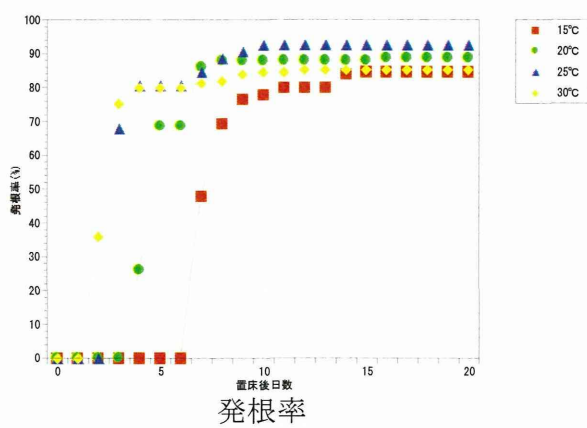
なし



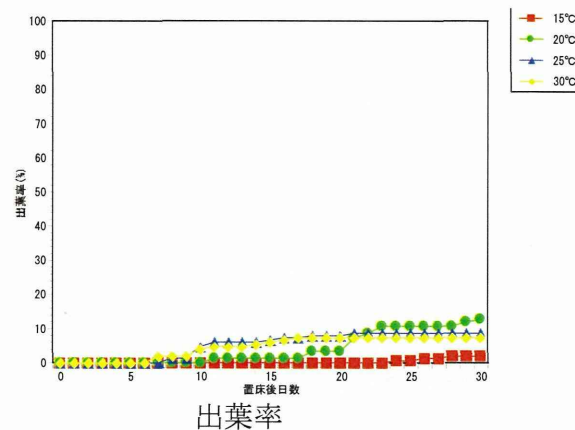
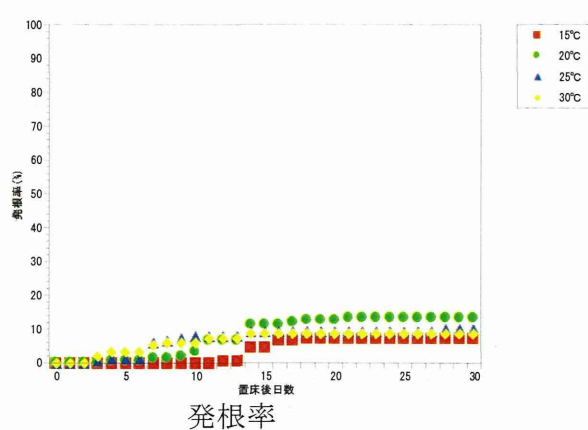
図1 クララ種子の傷処理に用いたマジックミル：型式 SKM-58

表1 供試植物の100粒重(mg)

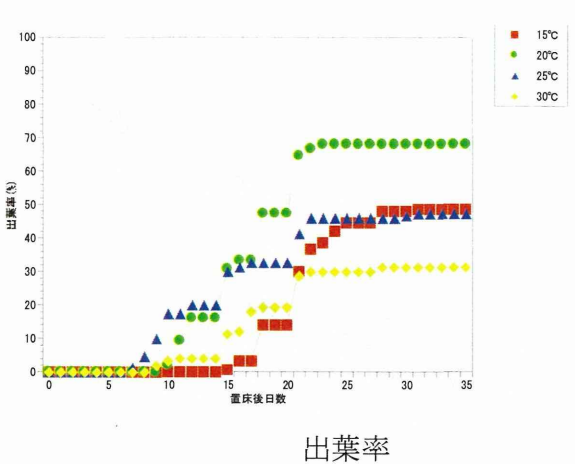
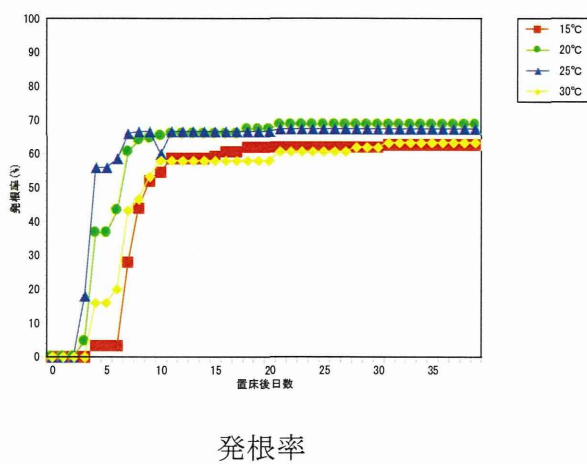
|           | 100粒重(mg)     | 反復 |
|-----------|---------------|----|
| チリメンアカジソ  | 76.5±1.6      | 10 |
| クララ       | 15408.9±382.3 | 5  |
| コヘンルーダ    | 184.7±2.3     | 10 |
| ウイキョウ     | 250.6±6.8     | 5  |
| ムラサキウイキョウ | 162.7±11.1    | 5  |
| カリン       | 4488±269      | 5  |
| トウネズミモチ   | 2034±28       | 5  |
| アマウイキョウ   | 262.8±12.5    | 5  |
| ウシノシタサ    | 308.5±49.1    | 5  |



チリメンアカジソの発根率と出葉率

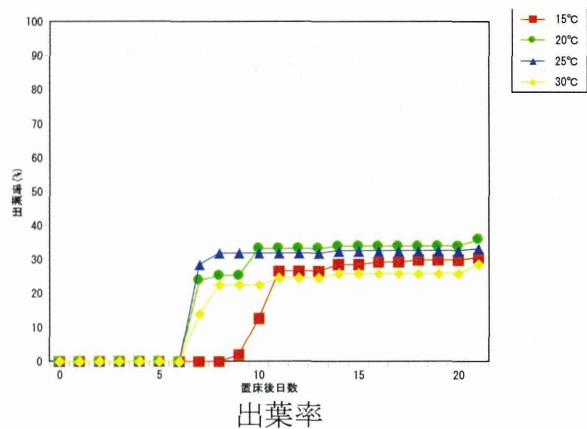
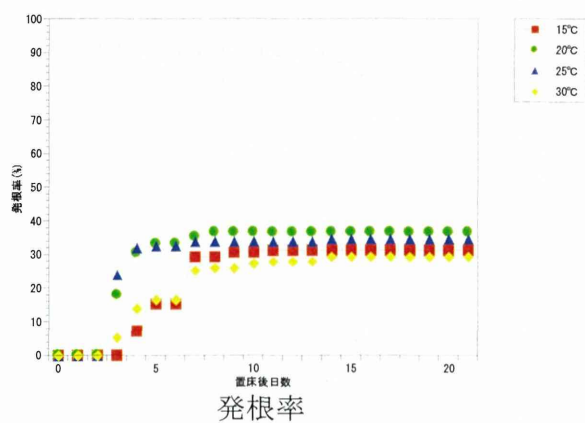


クラの発根率と出葉率

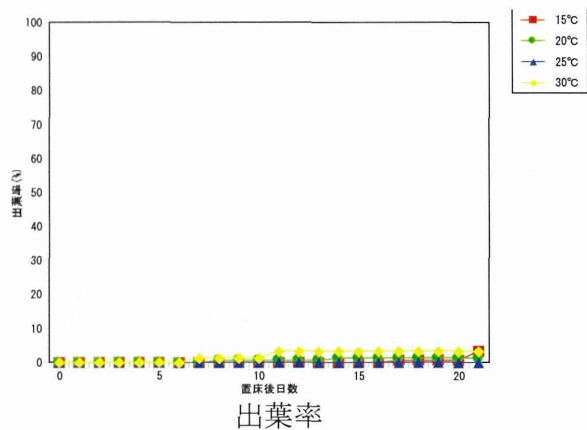
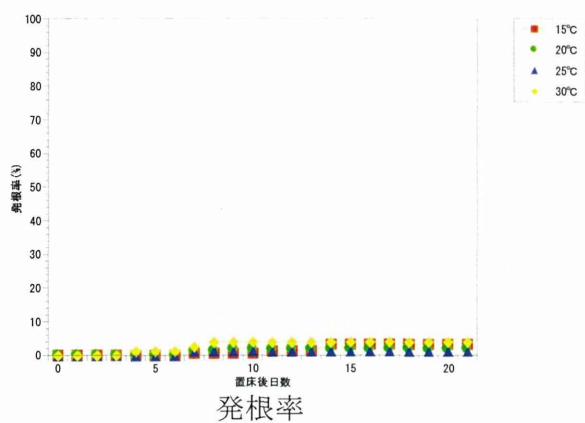


コヘンルーダの発根率と出葉率

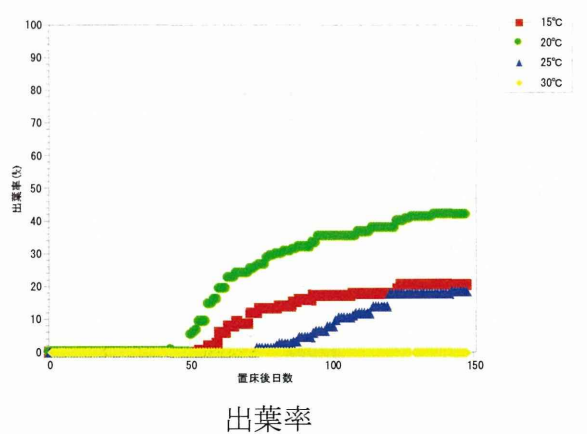
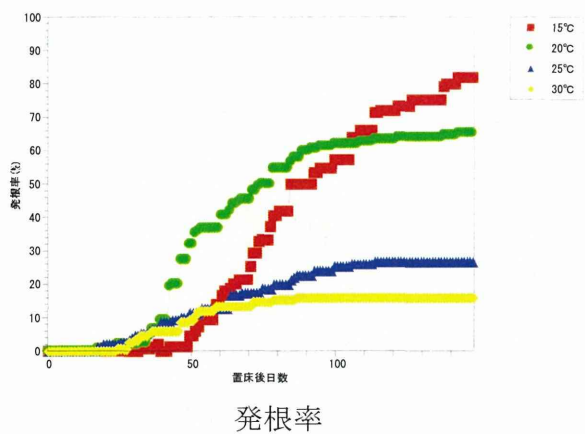
図 2-1 各植物の発根率と出葉率の推移



ウイキョウの発根率と出葉率

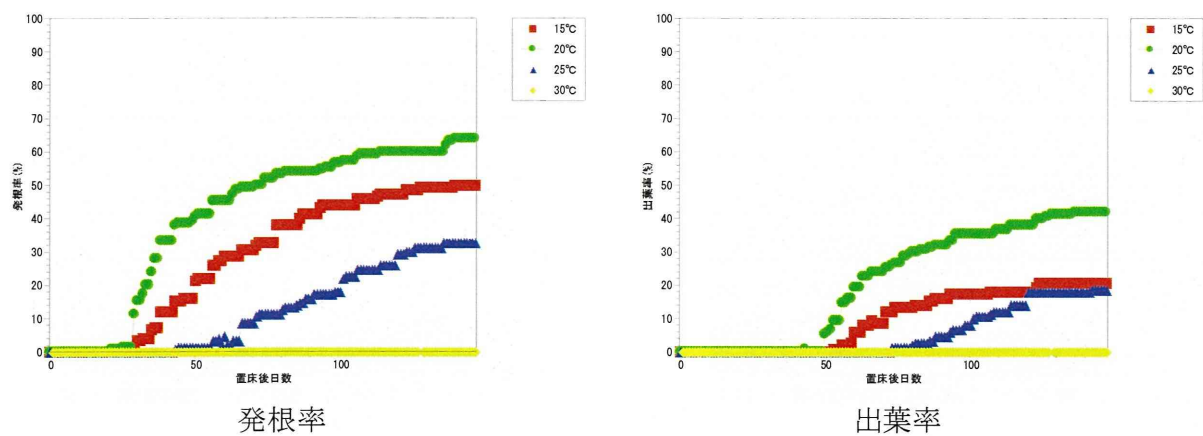


ムラサキウイキョウの発根率と出葉率

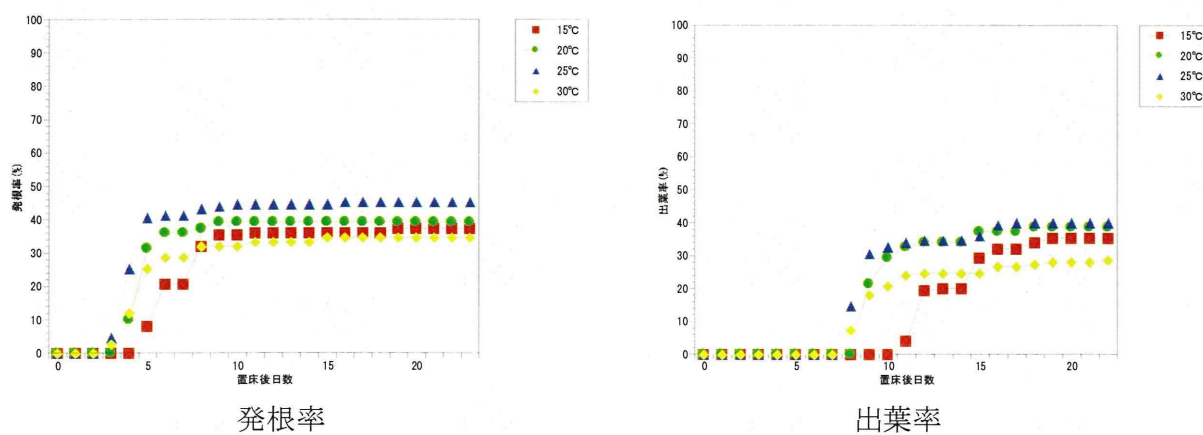


カリンの発根率と出葉率

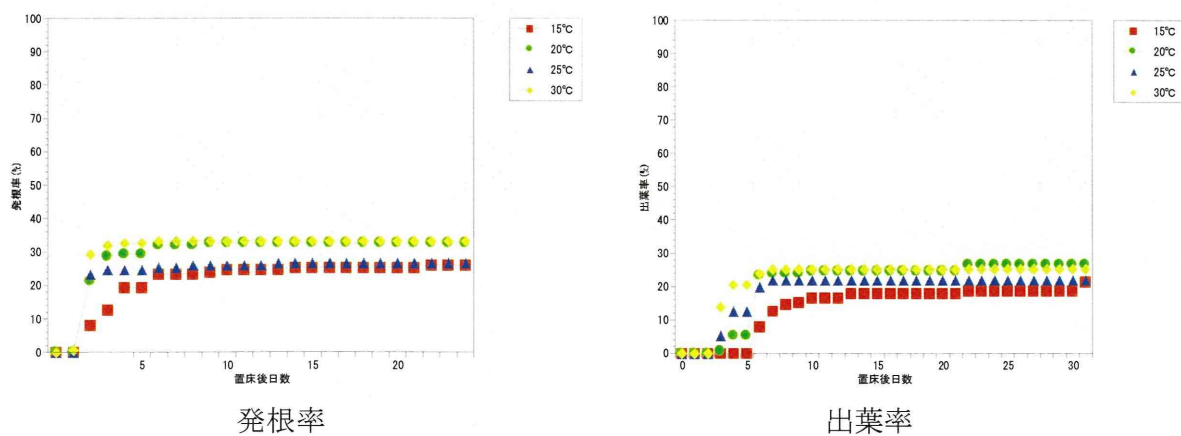
図 2-2 各植物の発根率と出葉率の推移



トウネズミモチの発根率と出葉率



アマウイキョウの発根率と出葉率



ウシノシタクサの発根率と出葉率

図 2-3 各植物の発根率と出葉率の推移



チリメンアカジソ (20℃ 播種後 7 日)



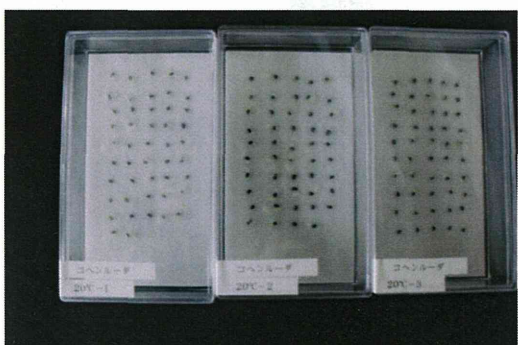
チリメンアカジソ (25℃ 播種後 7 日)



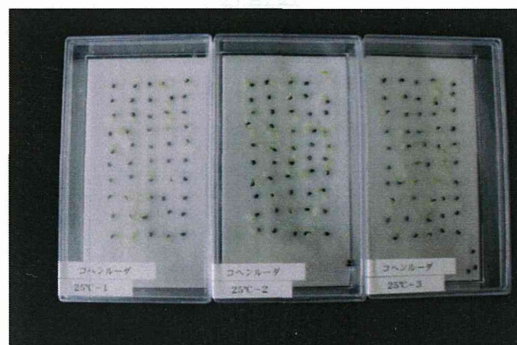
クララ (20℃ 播種後 17 日)



クララ (25℃ 播種後 17 日)



コヘンルーダ (20℃ 播種後 8 日)



コヘンルーダ (25℃ 播種後 8 日)

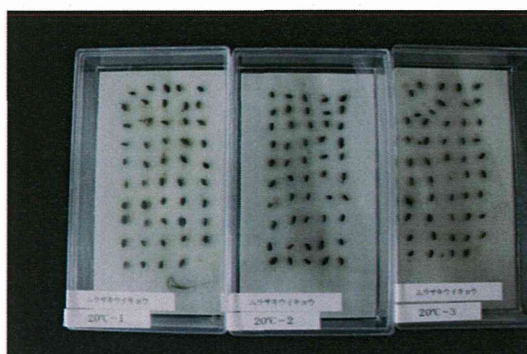
図 3-1 各植物の発芽



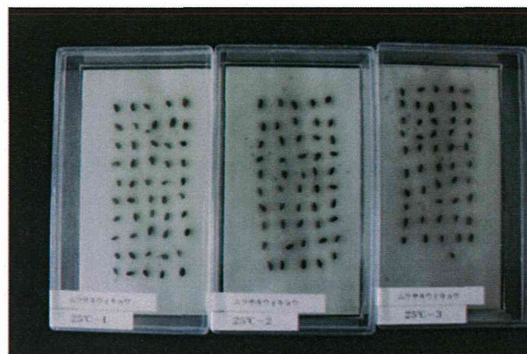
ウイキョウ (20℃ 播種後 16 日)



ウイキョウ (25℃ 播種後 16 日)



ムラサキウイキョウ (20℃ 播種後 16 日)



ムラサキウイキョウ (25℃ 播種後 16 日)



カリン (15℃ 播種後 58 日)



カリン (20℃ 播種後 58 日)

図 3-2 各植物の発芽



トウネズミモチ (15°C 播種後 78 日)



トウネズミモチ (20°C 播種後 78 日)



アマウイキョウ (20°C 播種後 10 日)



アマウイキョウ (25°C 播種後 10 日)

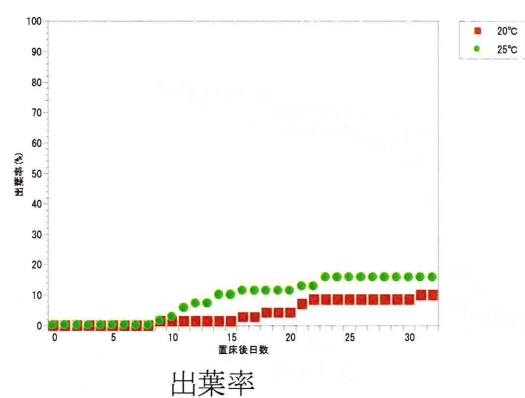
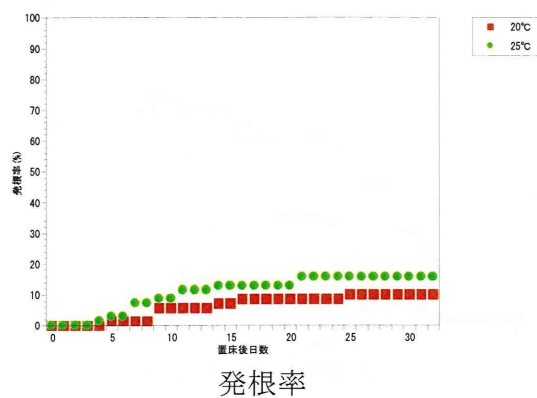


ウシノシタクサ (20°C 播種後 7 日)

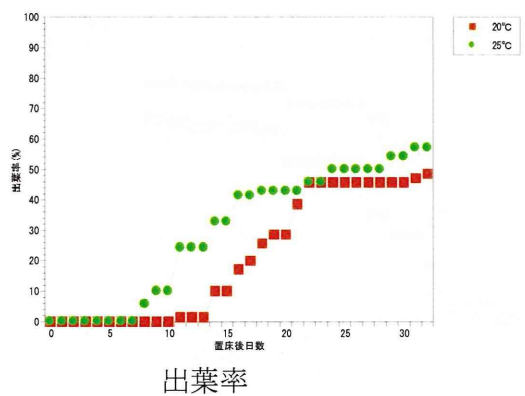
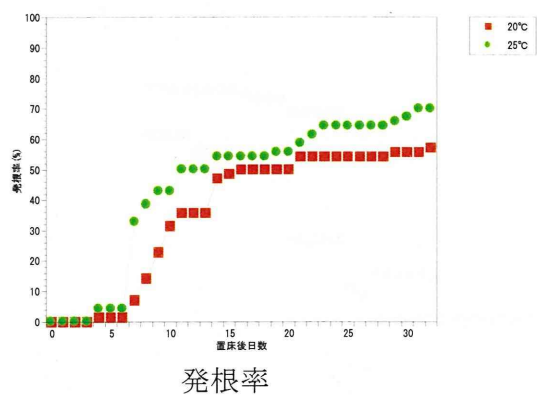


ウシノシタクサ (25°C 播種後 7 日)

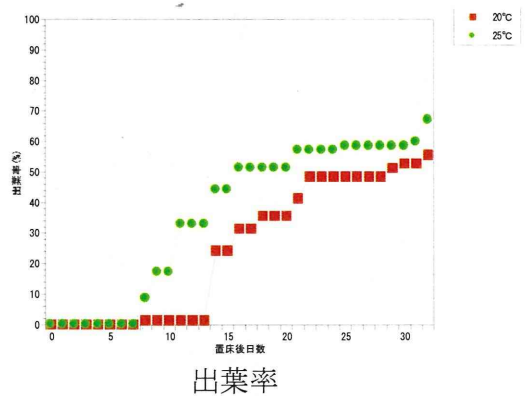
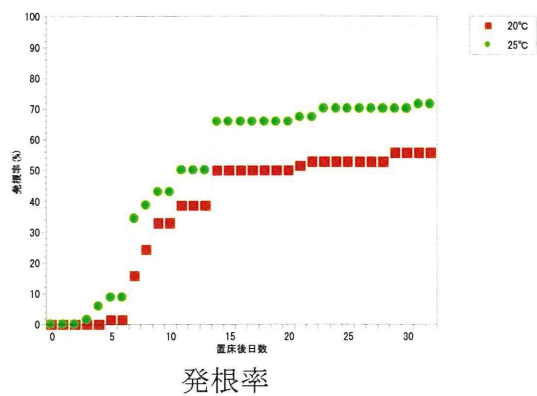
図3-3 各植物の発芽



(1) 無処理区

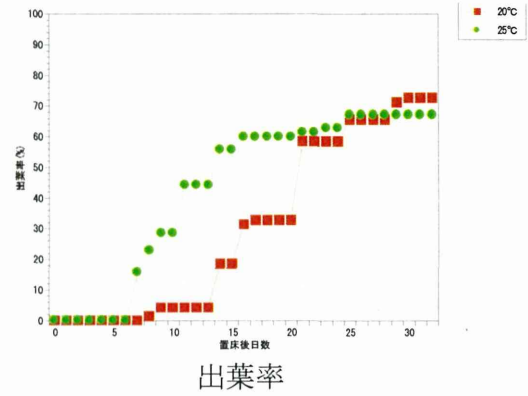
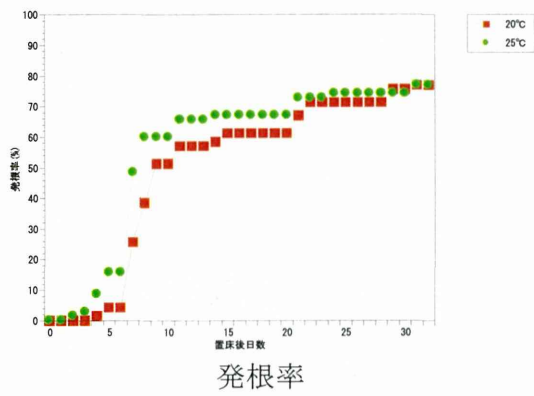


(2) 5分1回

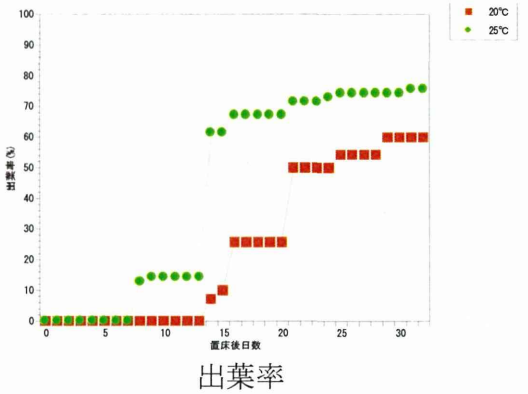
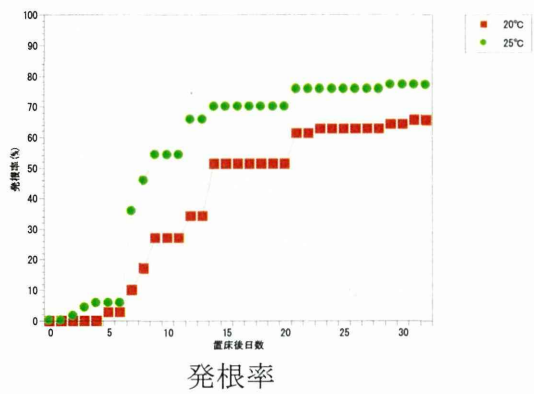


(3) 白米1回

図 4-1 クララ種子傷処理区の発芽率の推移



(4)5分2回



(5)白米2回

図 4-2 クララ種子傷処理区の発芽率の推移

表2 カイケイジオウの収穫期の形質

シルバーマルチ区 畝間 110cm 株間 30cm

|      | 草丈 (cm) | 葉数   | 最大葉長 (cm) | 最大葉幅 (cm) | 苗条数 |
|------|---------|------|-----------|-----------|-----|
| 平均   | 19.3    | 37.9 | 18.3      | 3.6       | 6.1 |
| 標準偏差 | 4.8     | 15.4 | 5.9       | 1.5       | 4.1 |

シルバーマルチ区 畝間 110cm 株間 50cm

|      | 草丈 (cm) | 葉数   | 最大葉長 (cm) | 最大葉幅 (cm) | 苗条数 |
|------|---------|------|-----------|-----------|-----|
| 平均   | 21.7    | 31.9 | 19.1      | 4.8       | 5.0 |
| 標準偏差 | 6.7     | 10.2 | 6.0       | 2.0       | 2.4 |

裸地区 畝間 110cm 株間 30cm

|      | 草丈 (cm) | 葉数   | 最大葉長 (cm) | 最大葉幅 (cm) | 苗条数 |
|------|---------|------|-----------|-----------|-----|
| 平均   | 17.7    | 27.8 | 17.0      | 4.0       | 2.6 |
| 標準偏差 | 5.2     | 7.3  | 5.2       | 1.9       | 2.2 |

稲わら被覆 畝間 110cm 株間 30cm

|      | 草丈 (cm) | 葉数   | 最大葉長 (cm) | 最大葉幅 (cm) | 苗条数 |
|------|---------|------|-----------|-----------|-----|
| 平均   | 10.7    | 14.8 | 7.6       | 1.6       | 3.6 |
| 標準偏差 | 5.3     | 7.3  | 4.8       | 1.4       | 2.8 |

稲わら被覆 畝間 110cm 株間 50cm

|      | 草丈 (cm) | 葉数  | 最大葉長 (cm) | 最大葉幅 (cm) | 苗条数 |
|------|---------|-----|-----------|-----------|-----|
| 平均   | 12.2    | 8.2 | 5.7       | 1.6       | 2.4 |
| 標準偏差 | 13.3    | 4.8 | 2.7       | 1.4       | 2.1 |

表 3 カイケイジオウの収穫期の形質

|         |              | 最大根径<br>(mm) | 根数(径<br>20mm 以<br>上) | 根数<br>(径 10～<br>20mm) | 根数<br>(径 5～<br>10mm) | 根数<br>(計) | 根長<br>(径 5mm 以<br>上)<br>(cm) | 最長<br>根長<br>(cm) |
|---------|--------------|--------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------|------------------------------|------------------|
| シルバーマルチ | 平均           | 20.4         | 1.4                  | 9.4                   | 14.8                 | 25.6      | 26.6                         | 33.3             |
|         | 株間 30cm 標準偏差 | 4.3          | 1.5                  | 4.9                   | 10.0                 | 15.0      | 10.8                         | 9.9              |
| シルバーマルチ | 平均           | 18.7         | 1.4                  | 8.8                   | 12.1                 | 22.4      | 20.4                         | 44.4             |
|         | 株間 50cm 標準偏差 | 4.8          | 3.0                  | 6.0                   | 6.4                  | 13.0      | 12.4                         | 12.2             |
| 裸地      | 平均           | 19.5         | 1.1                  | 9.2                   | 10.0                 | 20.7      | 19.2                         | 44.2             |
|         | 株間 30cm 標準偏差 | 4.1          | 1.7                  | 5.3                   | 5.4                  | 10.9      | 10.9                         | 14.4             |
| 稲わら被覆   | 平均           | 19.1         | 6.7                  | 8.0                   | 11.3                 | 24.5      | 17.8                         | 46.4             |
|         | 株間 30cm 標準偏差 | 4.6          | 5.5                  | 4.4                   | 5.8                  | 11.2      | 10.5                         | 11.3             |
| 稲わら被覆   | 平均           | 18.4         | 0.7                  | 5.6                   | 7.5                  | 13.9      | 13.4                         | 27.0             |
|         | 株間 50cm 標準偏差 | 3.5          | 1.4                  | 4.7                   | 6.3                  | 10.5      | 6.4                          | 8.4              |

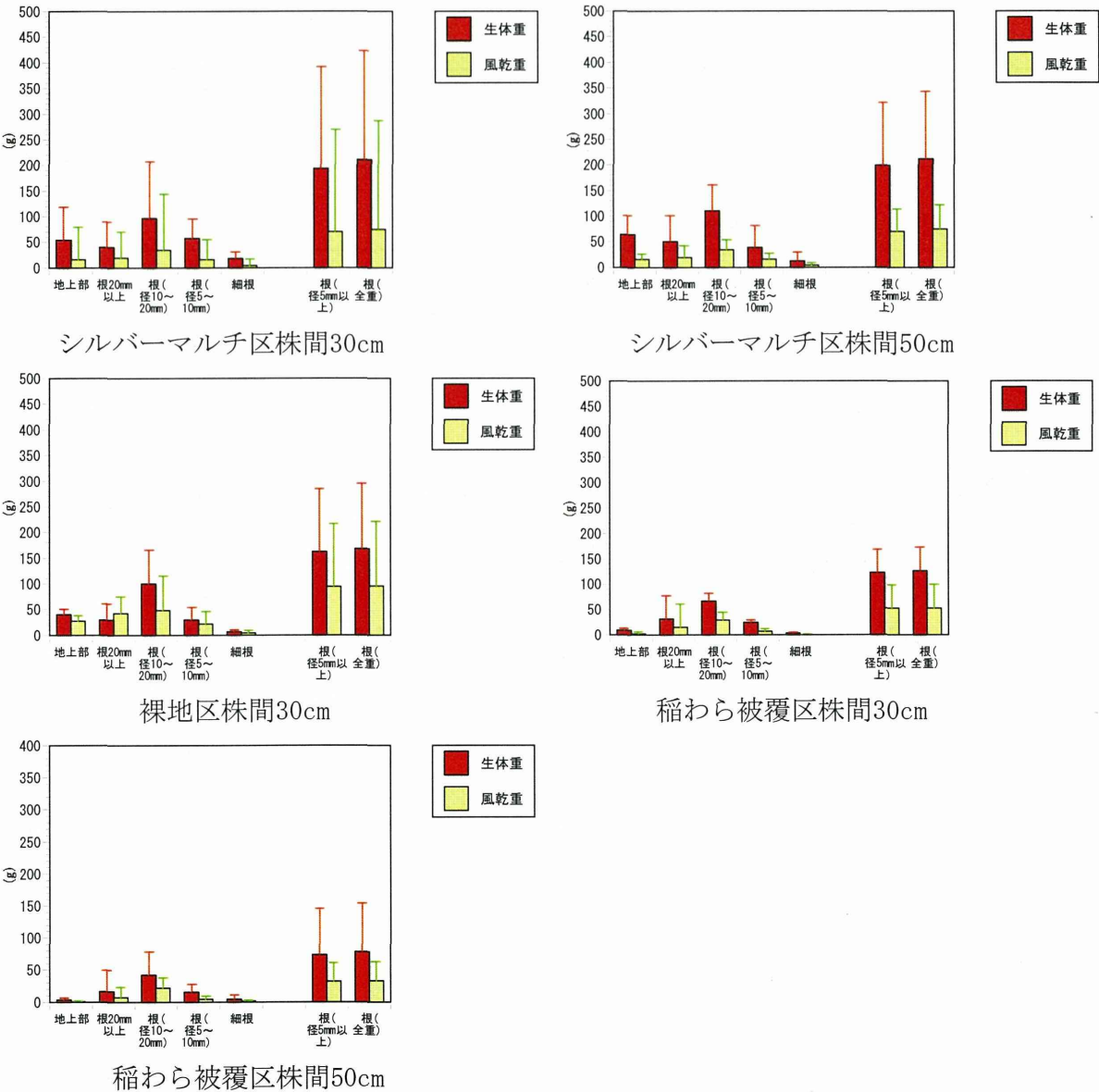


図5 カイケイジオウの収穫期の部位別の個体当たり重量

表4 植え付け前の種根重と増殖率

|          |               | 種根重 (g)  | 増殖率 (生根重) <sup>1)</sup> | 増殖率 (風乾根重) <sup>2)</sup> |
|----------|---------------|----------|-------------------------|--------------------------|
| シルバーマルチ区 |               |          |                         |                          |
| 畝間       | 110cm 株間 30cm | 11.2±4.5 | 1868                    | 675                      |
| シルバーマルチ区 |               |          |                         |                          |
| 畝間       | 110cm 株間 50cm | 5.8±2.7  | 4578                    | 1827                     |
| 裸地区      |               |          |                         |                          |
| 畝間       | 110cm 株間 30cm | 8.6±4.8  | 2168                    | 920                      |
| 稲わら区     |               |          |                         |                          |
| 畝間       | 110cm 株間 30cm | 5.8±2.5  | 2311                    | 984                      |
| 稲わら区     |               |          |                         |                          |
| 畝間       | 110cm 株間 50cm | 4.7±1.9  | 1730                    | 726                      |

1)生根重 (全重) /種根重×100

2)風乾根重 (全重) /種根重×100



シルバーマルチ被覆 株間50 c m区



稲わら被覆 株間50 c m区

図6 カイケイジオウの収穫期(2014. 12. 9)



図7 カイケイジオウの収穫物

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
薬用植物、生薬の持続的生産を目指した新品種育成および新規栽培技術の開発  
並びにこれらの技術移転の基盤構築に関する研究（H25-創薬-一般-003）  
分担研究報告書

分担研究課題：種苗の効率的増殖法および保存に関する研究

研究分担者 吉松 嘉代 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部 室長

研究協力者 飯田 修 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部 研究員

**要旨** イトヒメハギ種子を無菌的に播種した結果、高い雑菌混入率と低い発芽率が観察された。得られた3個体を材料に、組織培養系の確立と増殖法の検討を行い、ショ糖 1%、インドール酪酸 (IB) 0.1 mg/L、ベンジルアデニン 0.1 mg/L 添加、主要無機塩類が 1/2 濃度の Murashige and Skoog 固形培地（1%寒天）で培養することで、シュートの効率的増殖と長期の継代培養が可能なシュート培養系を確立した。本シュートは、誘導初期では発根が認められた、植物ホルモン無添加培地、及び IB 0.1 mg/L 添加培地では発根が認められなかった。しかし、本シュートを直接土壌に移植して非閉鎖温室内で栽培したところ、発根と正常な生育が認められ、本シュート培養がイトヒメハギの効率的増殖に有効であることが示された。

#### A. 研究目的

生物多様性条約の発効に伴う世界各国における生物資源保護政策の強化により、また、地球規模での自然環境の悪化により、生薬原料となる野生植物が激減しており、特に、従来良品とされてきたものの確保が困難となっている。

本研究は、国内での増殖が困難あるいは交雑により含有成分が変化し易い、又は、病害虫に汚染されていない健全な漢方薬原料植物の安定的・戦略的確保のため、植物組織培養による優良株の選抜と継代維持及び効率的増殖法の確立を行い、種苗及び生薬生産の基盤を確立することを目的とする。

本研究では、季節、気候や土壌など、外的要因の影響を受けない環境での安定した薬用植物栽培を基盤とした研究を行うため、野外圃場等を利用した従来法に比べて効率化を図れ、極めて独創性が高い。また、本研究により培養苗由来の生薬の有効性、有用性が明らかとなり、製品化への道筋が示されれば、これまでにない全く新しい国内薬用植物生産方法を提供することができ、極めて独創的である。

従って、本研究で得られる成果は、漢方薬原料生薬の90%以上を中国等の海外からの輸入に依存している日本における漢方薬の安定的・持続的生産に貢献し、国民の健康の増進を図る上で、その意義は大きい。

平成26年度においては、近年、認知症への効果が報告されている<sup>1)</sup>が、原料生薬の供給の100%を中国に依存している生薬「遠志」<sup>2)</sup>の基原植物であるイトヒメハギ (*Polygala tenuifolia* Willd.) について、組織培養系の確立と増殖法の検討を行った結果を報告する。

#### B. 研究方法

##### 1) 種子の殺菌と播種

材料（外植片）は、富山大学薬用植物園より新規に導入した種子を用いた。

種子をガーゼ袋に入れて、径9 cmのガラスシャーレに入れ、75%エタノールで1分間殺菌し、滅菌水50mLで洗浄後、75%エタノールで殺菌したピンセットを用いて、ガラスビーカーに入れた殺菌液（0.1% v/v Tween 20を含む3% w/v 次亜塩素酸ナトリウム溶液）に浸け、攪拌しながら室温（約25℃）で15分間殺

菌した。クリーンベンチ内で種子の入った袋を滅菌した径9 cmのガラスシャーレに入れ、滅菌水50mLで3又は7回洗浄した。ガラスシャーレに傾斜をつけて静置して余分な水分を取り除いた後、種子が入ったガーゼ袋を新しい径9 cmの滅菌シャーレに移して種子の取り出しを行い、ショ糖2%を含む主要無機塩類が1/2濃度のMurashige and Skoog固形培地[0.25% Gelriteで固化、(2)/2MS培地、5 mL/径1.8 cm高さ9 cm培養試験管]に播種し、23℃、14時間明期(約6,000 lux)で培養した。

雑菌の繁殖状況に応じ、適宜、殺菌操作を繰り返した。

## 2) 組織培養系の確立と増殖法の検討

無菌的に発芽した実生を、各種培地に移植しながら培養を継続し、植物体再生、継代培養及び増殖条件を検討するとともに、生育が良好で増殖効率の高いクローンの選抜を行った。

## 3) 培養シュートの移植と栽培

培養シュートは、寒天を流水で良く洗い流した後、T0ポリポット(丸形UAタイプ、No. 4、径7.5、高さ6.5、底径5.5 cm、容量220 mL、東海化成)に入れた培養土[赤玉土-クレハ粒状培土-堆肥=3:1:1]に移植した。T0ポリポットは、マルチ底面給水トレー上に設置したT0システムトレーT0-40Tに入れ、下方より1日1回、10分灌水を行いながら非閉鎖温室内で栽培した[温度下限20℃、相対湿度50%、太陽光(フラットシートで60%遮光)+補光照明(岩崎電気社製セラルクスM400FCE-W/BUD)で明期16時間]。

移植直後は、過度の乾燥を防ぐため、T0ポット全体をビニールで覆った。約4週間後、ビニール袋を取り外して栽培した。

## C. 研究結果

### 1) 種子の殺菌と培養

はじめに入手した種子を殺菌後、無菌的に播種して培養した結果、高い雑菌混入率(14日後:26/30:86.7%)、低い発芽率(14日後:1/4:25.0%)が観察された(図1)。なお、

培養期間を延長したところ、培養75日後に1種子の発根が認められたが、その後の生育は停止した。

発芽した1実生から、カルスを経由しながらマルチプルシュートは誘導できたものの、安定した組織培養系の確立には至らなかった(図1)。

再度種子を入手し殺菌後、同様に無菌的に播種したところ、高い雑菌混入率(4日後:53/55:96.4%)であったため、再度殺菌操作を行った(図2)。しかし、依然として高い雑菌混入率(8日後:26/42:61.9%)が認められ、発芽率(63日後:2/13:15.4%)も低かった(図2)。なお、培養期間を延長しても新たな発芽は認められなかった。

### 2) 培養シュート Pt1 の増殖と発根

2回目の無菌播種(図2)において、最初に発芽した種子は、培養16日後に発根が、20日後に子葉展開が認められた。本実生(Pt1:播種21日後)を、同培地(但し、30 mL/径4 cm高さ12 cm培養試験管)に移植して同条件で42日間培養して得た幼植物体より、頂芽及び節切片を調製して、ショ糖2%、インドール酪酸(IB) 0.01 mg/L、ベンジルアデニン(B) 0.1 mg/L添加、主要無機塩類が1/2濃度のMurashige and Skoog固形培地(0.25% Gelriteで固化、30 mL/径4 cm高さ12 cm培養試験管)[(2)/2MS IB0.01B0.1]に移植し、同条件で培養したところマルチプルシュートが形成した。

33-42日ごとに同培地での継代培養を2回繰り返して十分な数のシュートを確保した後、シュート片(1-2 cm長、1-2シュート/切片)又はシュート塊(約0.5 cm角)を調製(以後同様に切片を調製)して種々培地に植付けて49日間培養し、発根と増殖を検討した。

発根試験においては、試験した条件[IB 0、0.01、0.1、0.5 mg/L]での発根は観察されなかったが、IB 0.1及び0.5 mg/L添加区において、より良好な生育が観察された(図2)。

増殖試験[ショ糖1又は2%]では、ショ糖濃度の違いによりシュートの状態に違いが

認められ、1%ショ糖では緑色であるのに対し、2%では、葉及び茎が赤みを帯びた。シュートの生育及び増殖は、1%ショ糖の方が良好であった（図2）。

さらに、前述の培養シュートより調製した切片を各種培地に植え付けて 58-63 日間同条件で培養し、シュートの増殖、生育、発根を検討した（図3）。

発根は、植物ホルモン無添加培地（HF）で高い発根率（100%、n=3）が認められた（図3）。しかし、枯死するシュートが多く生存率は低かった（3/13：生存率 23.1%）。生存率、発根率及び最大シュート長を考慮すると、発根に適した培地は、IB0.1 と思われた（図3）。

形成シュート数は IB1B1 が最も多く、20.6 本であったが、シュート及び葉が小型化し、シュート塊中心部の褐変が認められた。

### 3) 培養シュート Pt3 の誘導

Pt1 に引き続き子葉展開が認められた Pt3 は、播種 65 日後においても発根が認められなかったため、種皮を取り除いて同培地（但し、30 mL/径 4 cm 高さ 12 cm 培養試験管）に移植し培養を継続したところ、20 日後（播種 85 日後）に発根が認められた（図4）。

得られた実生を Pt1 と同様に (2)/2MS IB0.01B0.1 に移植し、シュートの生育と増殖を試みたが、生育が停止した。そこで、Pt1 での増殖が良好であった (1)/2MS IB0.01B0.1（図2）に移植し、1 回継代培養したところ、マルチプルシュートが得られた（8 シュート／切片、最大シュート長 3.5 cm、図4）。

### 4) シュート培養（Pt1、Pt3）の確立と増殖

前述の 1-3）で得られた Pt1 及び Pt3 シュートより切片を調製し、前述までの実験において、発根と良好なシュートの生育及び増殖が認められた 3 種の培地：(1)/2MS HF、(1)/2MS IB0.1、(1)/2MS IB0.1B0.1 に植付け、発根、生育及び増殖を検討した。なお、これまでの実験において、シュートの赤色化が生じると生育不良となり、強い光では赤色化が誘発されると予想された<sup>3)</sup>ため、この試

験においては、23℃、弱光下（14 時間明期、蛍光灯の消灯により約 800 lux）で培養した。

52-55 日後、Pt1、Pt3 のいずれのクローンにおいても生育良好（草丈 1 cm 以上）なシュートが得られたのは (1)/2MS IB0.1B0.1 であった（図4）。

そこで同培地での継代を繰り返したところ、両クローンともシュートのガラス化が生じ、生育が不良となった。そこで培地の固化剤を 0.25 % Gelrite から 1%寒天に変更 [(1)/2MSA IB0.1B0.1] したところ、シュートのガラス化は回避され、生育が良好で増殖効率の高いシュート培養系が確立できた（図4）。

さらに同培地・同条件で継代培養した Pt1 及び Pt3 よりシュート片（約 2 cm 長：1 シュート／培養試験管：ST）を調製して (1)/2MSA IB0.1 に植付けて、シュートの増殖と生育及び発根を検討した。また、シュート片（約 2 cm 長：1 シュート／培養試験管：ST）及びシュート塊（1 cm 未満の約 3 本のシュートを含む 1 切片／培養試験管：SB）を (1)/2MSA IB0.1B0.1 に植付けて、切片の種類ごとにシュートの増殖と生育及び発根を検討した（図5）。

その結果、いずれの条件でも発根した植物体は得られなかった。シュートの増殖は、Pt1、Pt3 と同様の傾向がみられ、いずれも SB を (1)/2MSA IB0.1B0.1 で培養したものが最も多かった（Pt1：8.7 本、Pt3：9.5 本）。

生存率及び最大シュート長はいずれの条件においても Pt3 の方が高かった（図5）。

### 5) 発根条件の検討と生存率・増殖能の確認

(1)/2MSA IB0.1B0.1 で増殖させた Pt1 及び Pt3 シュート培養より、ST を調製して種々濃度の IB（0.5、1、3 mg/L）を添加した (1)/2MSA 培地及び (1)/2MSA IB0.1B0.1 に植付け、発根、生育及び増殖を検討した（図6）。

Pt1、Pt3 いずれも、IB 濃度を 3 mg/L まで増加させても発根した植物体は得られなかった。一方、(1)/2MSA IB0.1B0.1 は、継代後も前の実験と同様のシュートの高い生存率、良好な増殖と成長が認められ、Pt1 及び Pt3 シュート培養の継代培養培地として適し