

ショウガ科植物の組織培養 I

ショウガの大量増殖

佐藤 誠*・黒柳正典*・上野 明*・下村講一郎**・佐竹元吉**

* 静岡薬科大学

(〒422 静岡市小鹿 2-2-1)

** 国立衛生試験所筑波薬用植物栽培試験場

(〒305 茨城県筑波郡谷田部町八幡台 1)

(1987年 2月 7日 受付)

(1987年 3月 13日 受理)

ショウガ (*Zingiber officinale* Rosc.) は、その根茎を食用、香辛料として世界各地で広く用いられているほか、生薬としても多くの漢方処方に配合されている¹⁾。しかしショウガは栄養繁殖性植物であり、病害に侵された場合、種苗伝染するため損害が大きい。また、ショウガの増殖率は比較的低く、通常の栽培では一つの塊茎から1年間で5~6倍に増やせる程度である²⁾。組織培養法で増殖を行うことにより、以上の問題が解決できるものと期待される。ショウガの組織培養に関しては、すでにいくつかの報告があり、細木ら³⁾は主要無機成分に Murashige-Skoog (MS) 培地⁴⁾、微量無機成分およびビタミンに Ringe-Nitsch 培地⁵⁾を用いた改変培地に、6-benzyladenine (BA) 1 mg/l, 1-naphthalene acetic acid (NAA) 1 mg/l を添加した培地で茎頂から植物体形成に成功し、Nadgauda ら⁶⁾は kinetin (kin) 0.1 mg/l, BA 0.2 mg/l, ココナッツミルク 10% を添加した MS 培地でシュート形成を、White 液体培地⁷⁾で根形成を行う二段階増殖法を用いている。しかし、以上の方法では培地組成が複雑であり、しかも日本国内において新鮮で良質のココナッツミルクの入手は難しく、発根培地へ継代する操作も煩雑である。一方、成分に関しては菅ら⁸⁾によって MS 培地と Gamborg B5 (B5) 培地⁹⁾による幼植物根茎中のテルペン成分の比較が行われている。

本研究においては、簡単な培地組成で、より効率的な幼植物の増殖を目的として、基本培地および添加植物ホルモンについて検討し、さらに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による辛味成分¹⁰⁾の定量も行った。

茨城県産の中ショウガ、“三州白芽”の根茎から1~2 cm に伸長した新芽を切りとり調整し、75% エタノールに30秒間浸漬、滅菌水で1回水洗、2~3% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (Tween 20 1滴 (パスツールピペット)/50 ml を含む) に10分間浸漬し、滅菌水で3回水洗した。滅菌処理後、実体顕微鏡下で茎頂部を高さ1 mm で摘出し、固型培地上に置床した。固型培地の調整は基本培地として MS および B5 培地を用い、これに indole-3-acetic acid (IAA), NAA, kin を添加、pH 5.7 に調整後 Gelrite 2 g/l 加えた。培地の滅菌はオートクレーブ 120°C, 15分間行った。培養は、25±2°C, 12時間照明下で行った。継代はシュートを1本ずつに分割し、根を除去して、高さを1 cm にそろえたものを新しい培地に移植した。

茎頂からの植物体形成

MS 培地ではシュート、根の形成は認められなかった。B5 培地に NAA-kin 0.1-1 mg/l 添加では発根のみでシュートは形成せず、kin 1 mg/l 添加培地でシュート、根を形成し、13週間後幼植物となった (Table 1)。

基本培地の効果

kin 1 mg/l 添加 MS および B5 培地に茎頂より形成したシュートを継代して比較した (Table 2)。その結果、シュート形成数は B5 の方が多く、発根も良好であった。しかし B5 培地 (シュークロス 20 g/l) での植物は、MS 培地 (シュークロス 30 g/l) での植物に比較し、シュートの伸長が悪く、葉の黄色化が観察された。そこで Table 3 に示すように B5 培地のシュークロス濃度を変えた結果、30 g/l 以上で葉が緑色とな

Table 1. Effects of plant growth regulators on plant regeneration from shoot tip of *Z. officinale* after 14 weeks culture.

Medium	Growth regulators	Concentration (mg/l)	% of shoot formation	% of root formation
MS	kin	1	0	0
	IAA-kin	0.5-1	0	0
	NAA-kin	0.1-1	0	0
B 5	kin	1	66.7 (3.0) ^a	66.7 (25.0) ^b
	IAA-kin	0.5-1	0	0
	NAA kin	0.1-1	0	33.3 (3.0) ^b

^a No. of shoots/culture.^b No. of roots/culture.

Shoot tips were cultured on MS and B 5 media containing various concentration of growth regulators at 12 hr light at 25°C

Table 2. Effects of medium on multiplication and root formation in *Z. officinale* after 9 weeks culture.

Medium	Growth regulators	Concentration (mg/l)	No. of shoots/culture	No. of roots/culture
MS	kin	1	4.5	16.7
B 5	kin	1	6.8	23.2

Table 3. Influence of sucrose concentration on growth in *Z. officinale*.

Sucrose concentration (g/l)	No. of cultures	No. of shoots	No. of roots	Color of leaves
20	7	5 (2.4) ^a	5 (3.8) ^b	yellow
30	7	5 (1.4)	5 (3.8)	green
40	7	6 (2.4)	6 (8.0)	green
50	7	4 (2.3)	4 (7.8)	green

^a No. of shoots/culture.^b No. of roots/culture.

Shoots were cultured on B 5 media containing mg/l kinetin and various concentration of sucrose for 5 weeks.

り、40 g/l でシュート、根の形成が最大となった。そこで以後はB 5 培地にシュクロース 40 g/l 添加したものを基本培地として使用した。

植物ホルモンの種類、濃度

シュートおよび根の形成を促進させるため Table 4 に示すように IAA, NAA, kin を組みあわせて添加して比較した。その結果、継代培養 4 週間後では IAA-kin 0.5-1, 0.5-3 mg/l で他のホルモン区に比べてシュートおよび根が多数形成された。しかし、培養 7 週間後においては NAA-kin 0.01~5 mg/l 添加培地で多数シュートが形成され、培養 9 週間後、1 本のシュートが平均 7.8 本に増加した (Fig. 1)。NAA 添加区は、IAA 添加区に比べてシュートの伸長は抑えられており、植物

個体の生長は IAA-kin 0.5-1 mg/l で最も良好であった。一方、kin の濃度が高くなるとシュートの形成数は増加するが、シュートの伸長は抑制される傾向があった。

幼植物体の土壌への移植

Table 4 に示した培地で形成した幼植物を赤玉土、腐葉土、砂 (5 : 2 : 1) 混合土壌へ 6 月初旬に移植し、3 日間ビニールでおおい馴化させ、その後温室内で 2 か月間、屋外で 2 か月間栽培した。活着率はほぼ 100% で草高約 50 cm に生育し、形状も親植物とほとんど同じであった。ただ根茎の肥大は親植物の方がわずかに良好であった (Fig. 2)。

Table 4. Effects of Plant growth regulators on multiple shoot formation of *Z. officinale*.

Growth regulators	Concentration (mg/l)	No. of shoots/culture	No. of roots/culture
hormone-free	—	3.5	8.4
kin	1	4.8	4.9
	3	5.0	7.9
	5	5.3	6.6
	0.5-1	4.7	9.4
IAA-kin	0.5-3	3.8	7.9
	0.5-5	4.3	7.4
	0.01-1	4.7	6.3
NAA-kin	0.01-3	5.0	6.0
	0.01-5	7.8	4.9

Shoots were cultured on B5 media containing 40 g/l sucrose and various growth regulators for 9 weeks.



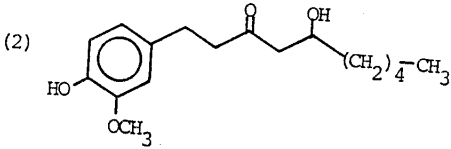
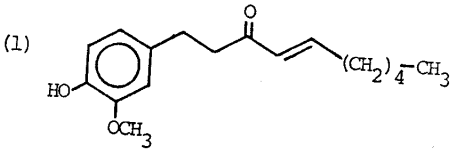
Fig. 1. Multiple shoot formed on B5 media containing 40 g/l sucrose, 0.01 mg/l NAA and 5mg/l kinetin.



Fig. 2. Regenerated (left) and mother (right) plants of *Z. officinale* forming rhizomes.

Table 5. Contents of shogaol and gingerol in rhizomes of mother plants and regenerants of *Z. officinale*.

	% (dry weight)	
	shogaol (1)	gingerol (2)
Mother plants	0	0.529
Regenerants	0	0.347



HPLC による成分定量

辛味成分である shogaol と gingerol の標準品を用いてピーク高より検量線を求めた結果、両者共原点を通る良好な直線性を得、定量が可能であった。HPLC の条件は次のとおりである。

カラム：TSK-gel LS-410 AK 4.6 mm (内径)，
300 mm (長さ)，

移動相：アセトニトリル：水 (6 : 4)，

流速：1.0 ml/min，

検出：UV 検出器 225 nm.

親植物および組織培養で得られた植物の根茎を凍結乾

乾燥後、メタノールで還流抽出し、濾過、溶媒を減圧除去し、一定量のメタノールに溶解し試料溶液とした。定量結果は両者に shogaol は検出されず、gingerol の含量は親植物の方が高かった (Table 5)。これは親植物に比べ、栽培期間が短かったこともあり、根茎の形成が不十分なためと考えられる。一方、市販のショウガや生薬の生姜を定量した結果、shogaol が検出され、特に生姜では含量が高く、調整、保存中に gingerol から shogaol への変換が起こっているものと思われる。

ま と め

シュークロース濃度を 40 g/l に変更した B 5 培地で好結果が得られ、NAA-kin 0.01-5 mg/l のように低濃度の NAA と高濃度の kin を組みあわせることにより、ココナッツミルクの添加がなくとも多数のシュート形成が認められた。この培地では1本のシュートから約2カ月で7〜8本のシュートを形成し、さらに継代をくり返しても増殖率の低下は認められなかった。本研究においては、植付け切片の条件をできる限り同一とするため、継代の際シュート基部のカルス様組織を除去したが、この部分を含むように調整した場合、9週間後に14本のシュートを形成した。実際に増殖を目的とする場合には、この部位も用いることにより、さらに大量に増やすことが可能である。また、この培地ではシュートの増殖のみならず、発根も認められることから発根培地に継代する操作を省略することができる。

数多くの有益な御助言を頂きました佐賀大学農学部

宮崎貞巳教授に感謝致します。

文 献

- 1) 難波恒雄, 1980. “原色和漢薬図鑑(上)”, p. 118-119, 保育社, 東京.
- 2) 森 憲昭, 1985. 昭和59年度技術情報調査報告書 “急速大量増殖およびクローン増殖における組織培養技術の応用”, p. 108-112, 社団法人日本種苗協会, 東京.
- 3) Hosoki, T., Y. Sagawa, 1977. Hort. Sci., 12(5): 451-452.
- 4) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- 5) Ringe, F., J.P. Nitsch, 1968. Plant Cell Physiol., 9: 639-652.
- 6) Nadgauda, R.S., D.D. Kulkarni, A.F. Mascarenhas, V. Jagannathan, 1980. Proceedings of the National Symposium on Plant Tissue Culture, Genetic Manipulation and Somatic Hybridization of Plant Cells, p. 358-365.
- 7) White, P.R., 1963. The Cultivation of Animal and Plant Cells, Ronald Press, New York.
- 8) Sakamura, F., K. Ogiwara, T. Suga, K. Taniguchi, R. Tanaka, 1986. Phytochemistry, 25: 1333-1335.
- 9) Gamborg, O.L., R.A. Miller, K. Ojima, 1968. Exp. Cell Res., 50: 151-158.
- 10) Nomura, H., K. Iwamoto, 1928. Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ., 17: 973.

Summary

Plant Tissue Culture of Zingiberaceae (I) In Vitro Propagation of Ginger [*Zingiber officinale* Rosc.]

Makoto SATO,* Masanori KUROYANAGI,* Akira UENO,*
Koichiro SHIMOMURA** and Motoyoshi SATAKE**

* Shizuoka College of Pharmacy, 2-2-1, Oshika, Shizuoka-shi, 422 Japan

** Tsukuba Medicinal Plant Research Station, National Institute of Hygienic Sciences, 1 Hachimandai, Yatabe-machi, Tsukuba-gun, Ibaraki-ken, 305 Japan

Clonal propagation of ginger was established by shoot culture on Gamborg B 5 medium containing 40 g/l sucrose and plant growth regulators. Combination of 0.01 mg/l NAA and 5 mg/l kinetin was effective for both multiple shoot formation and root formation. Thus, plantlet propagation could be performed by using one kind of medium without the step of root formation.