

ショウガ科植物の組織培養 II

ウコンの大量増殖

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)

ウコン (*Curcuma longa* LINN.) は熱帯アジア原産の植物で生薬として用いられるほか天然色素としての需要も多く、主として東南アジア、中国南部等で栽培されている¹⁾。しかし根茎による栄養繁殖のため増殖率は低い。そのため組織培養法を用いての増殖方法の研究が行われているが^{2,3)}、添加植物ホルモン、培地についての詳細な検討および再生した植物体の色素成分の分析は行われていない。本研究では、植物ホルモン、培地がウコンに及ぼす効果について調べ、植物増殖に適した培地条件を検討した。そして得られた幼植物を土壌に移植し、生育した植物中の色素成分(クルクミノイド)^{4,5)}を分析、定量した。

屋久島平野産のウコンの根茎から2~5cm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、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)/50ml)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1mm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 Murashige-Skoog (MS) 培地⁶⁾、Gamborg B5 (B5) 培地⁷⁾を用い、これに indole-3-acetic acid (IAA), 1-naphthalene-acetic acid (NAA), kinetin (kin), 6-benzyladenine (BA), phloroglucinol (PG)⁸⁾ を添加、pH 5.7 に調整後、Gelrite 2g/l を加えた。培地の滅菌はオートクレーブ 120℃, 15 分間行った。培養は 25±2℃, 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1cm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

kin 1mg/l, PG 1mM 添加 MS 培地で短期間に茎頂が肥大し、3週間後には高さ7mmになり、8週間後には幼植物体を形成した。これに対し kin 1mg/l 添加、および IAA-kin 0.5-1mg/l 添加培地では植物体形成は認められず、NAA-kin 0.1-1mg/l 添加培地では植物体形成に14週間を要した。

サイトカイニンおよび培地のマルチプルシュート形成に及ぼす効果

茎頂から形成した植物体を kin 1mg/l 添加 MS 培地に継代したところ、良好に生長したが、シュートの形成数は1~2本であった。そこで次にシュートの形成数増加をめざして、kin, BA を Fig. 1 に示す各種濃度添加 MS 培地に継代して比較した。その結果、サイトカイニンの濃度が上昇するにしたがってシュート形成数も増加し、kin 20mg/l, BA 10mg/l で最大となり培養6週間後、1本のシュートが約5本に増加した。kin よりも BA の方がシュート形成数は良好であったが、シュートの伸長は抑えられた。kin, BA とともに 20mg/l 以上添加した高濃度区では、シュートは多数形成しているが、根はほとんど形成せず、一部の植物には葉に異常な形態が認められた。発根はサイトカイニンの添加によって抑制された。そこで発根を促すため、NAA と kin および NAA と BA を組みあわせて添加した MS, B5 培地にシュートを継代した。その結果、NAA を添加しても、サイトカイニンによる発根抑制は改善されなかった。一方、基本培地による違いはあまり認められなかったが、MS 培地の方がシュート形成数が多く、B5 培地の方が

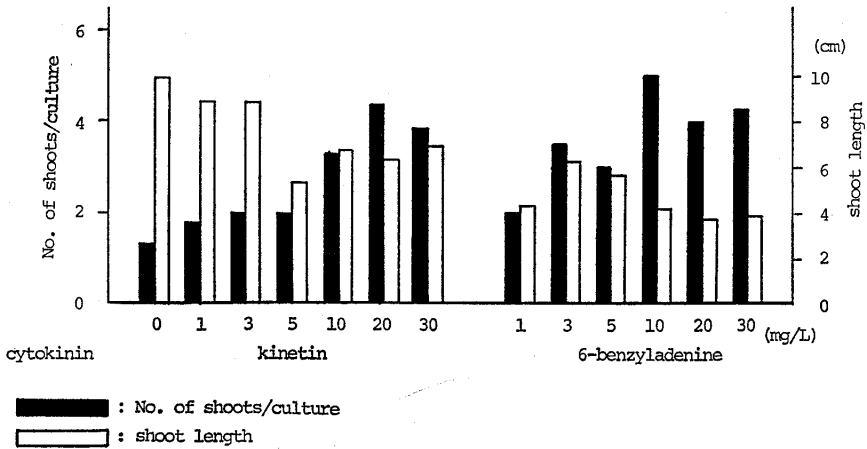


Fig. 1. Effects of cytokinin on Multiple shoot formation of *C. longa* after 6 weeks culture.

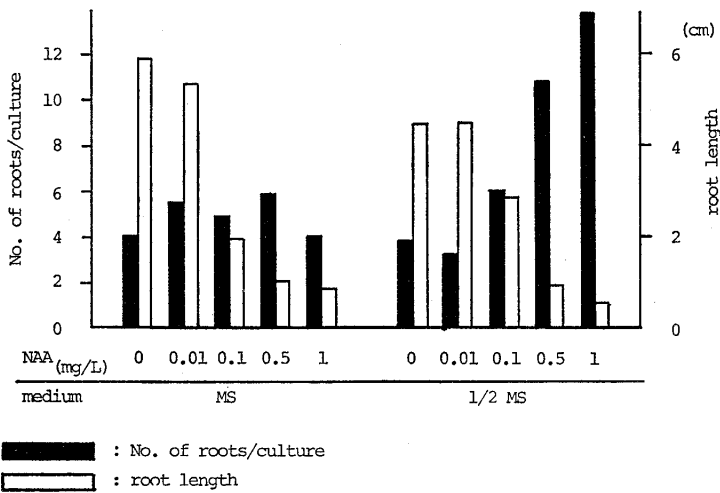


Fig. 2. Effects of NAA on root formation of shoots cultured on 10 mg/l BA in *C. longa*.

発根数が多い傾向にあった。

オーキシンおよび培地の発根に及ぼす効果

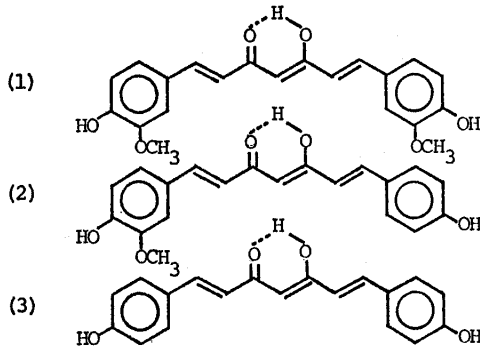
IAA, NAA を添加した MS 培地にシュートを植えたところ, NAA 添加区で多数発根が認められた。そこで Fig. 2 に示す各種濃度で NAA を添加した MS, 1/2 MS 培地に BA 10 mg/l 添加 MS 培地で形成したシュートを植えつけ比較した。その結果, 1/2 MS 培地に NAA 0.5~1 mg/l 添加で多数の発根が観察されたが, NAA の濃度が高くなるにつれて根の伸長は抑制された。特に 1/2 MS 培地においては, 発根数と根の伸長には負の相関が認められ, 両方を考慮すると 1/2 MS 培地に NAA 0.1 mg/l 添加が適当と推定された。

幼植物体の土壌への移植および成分分析

用土は赤玉土, 腐葉土, 砂 (5:2:1) を混合したものをを用い, これを素焼きの鉢に入れた。これに Fig. 2 に示した培地のうち, 1/2 MS に NAA 0~0.1 mg/l 添加で形成した幼植物を移植し, 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 70 cm に生育し, 形状は親植物に酷似していたが, 根茎はまだ形成しておらず, 茎の下部が少し肥大して黄色を呈していた。この部分を採取し, 凍結乾燥後, 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, 色素成分を HPLC で分析した。HPLC

Table 1. Contents of curcuminoids in rhizomes of mother plants and regenerants of *C. longa*.

	% (dry weight)		
	curcumin (1)	monodesmethoxy- curcumin (2)	didesmethoxy- curcumin (3)
Mother plants	0.421	0.266	0.027
Regenerants	0.034	0.013	0.001



の条件は次のとおりである。

カラム：TSK-gel ODS-80 TM 4.6 mm (内径), 150 mm (長さ),

移動相：アセトニトリル：水：酢酸 (10 : 10 : 1),

流速：1.0 ml/min,

検出：UV 検出器 420 nm.

分析結果, curcumin, monodesmethoxy-curcumin, didesmethoxy-curcumin の3つのピークが認められ, 色素成分を産生していることが確認された。HPLCのパターンは親植物に類似しており, 3種のクルクミノイドの成分含量比は等しかった (Table 1)。しかし含量は親植物に比べかなり低く, これは根茎の発達が不十分なためであり, 根茎が肥大すれば含量は高くなると思われる。

ま と め

ウコンのシュート増殖には高濃度のサイトカイニンが有効であるが, それに伴い発根の抑制が認められた。そのためシュート増殖培地と発根培地を用い, シュートの形成には BA 10 mg/l 添加 MS 培地で継代培養をくり返してシュートを多数増殖させ, 得られたシュートを NAA

0.1 mg/l 添加 1/2 MS 培地に継代し, 発根させることにより, 幼植物を大量に得ることが可能である。

文 献

- 1) 難波恒雄, 1980. “原色和漢図鑑 (上)”, p. 178-181, 保育社, 東京.
- 2) Nadgauda, R. S., A. F. Mascarenhas, R. R. Hendre, V. Jagannathan, 1978, Indian J. Exp. Biol., **16**: 120-122.
- 3) Mukhri, Z., H. Yamaguchi, 1986. Plant Tissue Cult. Lett., **3**: 28-30.
- 4) Hegnauer, R., 1963. “Chemotaxonomie der Pflanzen,” Band II, p. 451, Birkhauser Verlag, Basel und Stuttgart.
- 5) Srinivasan, K. R., 1953. J. Pharmacol., **5**: 448.
- 6) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**: 473-497.
- 7) Gamborg, O. L., R. A. Miller, K. Ojima, 1968. Exp. Cell Res., **50**: 151-158.
- 8) Zimmerman, R. H., 1984. Plant Cell Tissue Organ Cult., **3**: 301-311.

Summary

Plant Tissue Culture of Zingiberaceae (II)
In Vitro Propagation of Turmeric [*Curcuma longa* LINN.]

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*

This report deals with an investigation of media and plant growth regulators for obtaining multiple plantlets of turmeric. Murashige-Skoog (MS) medium containing 10 mg/l BA was effective for shoot formation. These shoots formed healthy roots on 1/2 MS medium containing 0.1 mg/l NAA. Plantlets were transferred to soil and healthily grew. Curcuminoids in rhizomes of mother plants and regenerants were analysed by HPLC.