

Cistanche 属植物の組織培養研究: I. *Cistanche tubulosa* Wight. 種子からのカルスの誘導とシュートの分化

守屋 明*・唐澤傳英*・有馬 博*・出山 武**

伊部奈緒美**・氣賀澤恭子**・Khan ÜSMANGHANI***

* 岐阜大学院連合農学研究科(信州大学)

(〒399-45 長野県上伊那郡南箕輪村 8304)

** 養命酒製造(株)中央研究所

(〒399-46 長野県上伊那郡箕輪町中箕輪 2132-37)

*** カラチ大学薬学部生薬学科

(パキスタン国カラチ市 75270)

(1994年5月19日受付)

(1994年11月5日受理)

ハマウツボ科の全寄生植物 *Cistanche tubulosa* Wight. の種子の発芽と種子からのカルスの誘導条件および誘導カルスからのシュートの分化条件について実験し、合わせてこれら培養物のフェニルエタノイド配糖体含量について検討した。

発芽は種皮の除去と培地へのジベレリンの添加で促進された。カルスは播種後3週ころから種子から直接誘導され、この誘導は4°C 3か月間の種子の低温処理および培地への IAA 2.5 mg/l とカイネチン 0.5 mg/l 添加により促進された。播種後7週でカルスからシュートが分化したが寄生根は形成されなかった。シュートには縦走する維管束が観察され、その数や分布状態は親植物のものと異なっていた。よく発育したシュートの鱗片葉の縁にはアントシアン系色素が生成され、親植物により近い形態を示した。親植物に含まれる有効成分のフェニルエタノイド配糖体はカルスとシュートにも存在し、その含有量は親植物の数倍から10倍以上であった。

1. 緒言

Cistanche 属植物はハマウツボ科 Orobanchaceae に属し、アカザ科やギョリュウ科を宿主とする全寄生植物で、中国、モンゴル、中近東からアフリカ、イベリア半島などの乾燥地帯に約18種が分布している¹⁾。これらのうち、ホンオニク *Cistanche deserticola* Y. C. Ma の乾燥物は生薬肉苁蓉として中国最古の本草書である「神農本草経」(西暦25~220年の後漢代にはその原型ができていたと考えられている)に収載され、古くから強壯、強精薬として用いられてきた²⁾。しかしホンオニクのほか *C. tubulosa* Wight., *C. ambigua* G. Beck, *C. sinensis* G. Beck, *C. salsa* (C. A. Mey) G. Beck の乾燥物も肉苁蓉と同様に利用されてきたようである。これらの中で

Cistanche tubulosa Wight.³⁾ は、*Salvadora* 属や *Calotropis* 属をはじめとする14科35種の植物の根への寄生が報告されていて⁴⁾、北アフリカ、アラビア半島、パキスタン、インドおよび中国にかけた広い範囲に分布している。これの乾燥物は肉苁蓉と同様の効果を持つと記載され⁵⁾、パキスタンでもこれの全草を下痢や傷の薬として用いている⁶⁾。

近年、ニクショウヨウ類の成分検索が行われ、Kobayashi ら⁷⁾ はフェニルエタノイド配糖体が、また Yoshizawa ら⁸⁾ はリグナンおよびイリド配糖体が含有されていると報告している。これらの配糖体のうち、echinacoside には抗菌作用が^{9,10)}、また acteoside には抗腫瘍作用¹¹⁾、鎮痛作用¹²⁾ およびストレス負荷により低

下した性行動と学習行動の回復作用¹³⁾が報告され、*C. tubulosa*の乾燥物が多面的な薬効を具えていることが証明されつつある。ところが近年、*C. deserticola*や*C. tubulosa*はともに減少傾向にあり、中国の国家環境保護局により珍瀕危植物388種のうち最も絶滅が危惧されるランクの種121の中に挙げられている¹⁴⁾。これらの肉蓯蓉を今後とも生薬として利用していくためには、人為的な増殖、栽培方法を確立する必要がある。

そこで、我々は*Cistanche*属植物の資源確保を目的として本研究を行っている。本報では*C. tubulosa*の種子からのカルスの誘導と植物体の分化状態およびこれらの培養物に含有されるフェニルエタノイド配糖体の種類と量について報告する。

2. 材料および方法

*C. tubulosa*の種子はパキスタン産のものを、また成分比較用の親植物はパキスタンとバーレーン産の乾燥物を用いた。種子はTween 20を数滴加えた有効塩素濃度2%の次亜塩素酸ソーダで5分間滅菌し、滅菌水で3回洗浄した後、試験管の斜面培地上に1本当たり20粒ずつ播種した。これを25°Cの定温器中で培養し、発根とカルスの形成状況を調べた。誘導されたカルスは播種時と同じ培地に数代植え継ぎ、増殖させてから分化条件の検討と液体培養に供した。

(1) 発根に及ぼす因子の影響

発根に及ぼす影響が大きいと考えられる基本培地の種類、植物成長調節物質3種、pH、照明、イーストエキスおよび種皮除去の8因子をTable 1に示した2水準について田口のL₁₆(2¹⁵)直交表に割り付けて実験を行った。

8因子のうち照明については植物育成用蛍光灯(ナショナル、ホモルクス)により2000~3000 Lux、1日16時間照射と全暗黒の2区を設けた。また種皮は乳鉢で軽く摺って除去した。発根状態は播種後40日に調査した。なお、種子から直接カルスが発生したものは除外した。

(2) 種子からのカルス誘導

種子からカルスを効率良く誘導するため、培地の種類、植物成長調節物質、低温処理、照明および種子の押し潰し処理について別々に検討した。培地は1/2 MS、WhiteおよびHyponex(3 g/l、N:P:K=5:10:5)の3種類とし、それぞれに4%しよ糖、15%ココナッツミルク(CM)および400 mg/lカゼイン水解物(CH)を添加した。植物成長調節物質については、上記の1/2 MS培地に、カイネチンとインドール酢酸(IAA)をTable 3のように添加した9区について実験した。低温処理は4°Cで3か月間行い、9~11月の間室温で保存し

たものと比較した。光条件は(1)と同様に明暗2区を設けた。種子の押し潰し処理は播種1週間後にカルスが形成されていないものについて行い、いずれも播種2か月後のカルス形成状態により処理効果を判定した。

(3) シュートの分化と分化に及ぼす因子の影響

誘導されたカルスからのシュートの分化に影響すると考えられる因子のうち、基本培地の種類、IAA濃度、サイトカイニンの種類と濃度、糖の種類と濃度、有機物の種類、照明および培養温度の9因子を、田口のL₂₇(3¹³)直交表へTable 4に示した水準で割り付けて実験を行った。植物体の分化はカルスの系統により異なる傾向がみられたので、培養中に分化しなかったものだけを植え継ぎ培養した。シュートの分化率は3か月後に調査した。

(4) 分化した植物体の組織観察

分化したシュートをマイクロスライサーで厚さ80 μmに横断または縦断し、サフランインとファーストグリーンで二重染色した後検鏡した。親植物の乾燥物は水で膨潤させた後、マイクロスライサーにより厚さ約0.5 mmの切片にした。しかし、褐変が激しかったので次亜塩素酸ナトリウムで漂白した後、塩基性フクシンで染色して観察した。

(5) カルスの液体培養

実験には誘導したカルス165株のうち比較的旺盛に増殖した21株を用い、これらを2か月間液体培養した。培地はしよ糖4%、CH 400 mg/lおよびCM 15%を添加した1/2 MS培地に各カルスの誘導時と同濃度のIAAとカイネチン(Table 3)を添加したものをを用いた。

(6) カルスと分化シュートおよび親植物体の成分分析

液体培養した21株のカルスと分化シュートおよび親植物(パキスタン産とバーレーン産)に含有されるフェニルエタノイド配糖体のうち代表的な4成分(echinacoside, acteoside, tubuloside A, 2'-acetylacteoside)(Fig. 4)の含量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により定量して比較した。分析試料は、カルスは株別に、分化したシュートは10個体を一緒にした。また、親植物のうちパキスタン産のものは5個体を一緒に粉砕して用いたが、バーレーン産のものは粉末状態で入手したため個体数は不明であった。各乾燥試料50 mg(親植物0.5 g)にメタノール10 ml(親植物50 ml)を加え、超音波で15分間抽出した。ろ過後残渣は更に2回同様な操作を行い、3回分のろ液を合わせて減圧乾固した。これを12%アセトニトリル2 ml(親植物10 ml)に溶解して、0.45 μmのフィルターを通し、

Table 1. Effect of seed coat removal, basal medium, light, yeast extract and plant growth regulators on germination of *Cistanche tubulosa*.

No.	Basal medium	Seed coat	Light ^(a)	pH	Yeast ext. (%)	Concentration of plant growth regulators(mg/l)			Result ^(b)
						GA ₃	IBA	ZEA	
1	WH	RE	L	6	0.05	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	7/18
2	WH	RE	D	8	0	0	10 ⁻³	10 ⁻³	1/18
3	MS	RE	L	6	0	0	10 ⁻³	0	3/17
4	MS	RE	D	8	0.05	10 ⁻³	10 ⁻³	0	17/18
5	MS	RE	D	6	0.05	0	0	10 ⁻³	3/18
6	MS	RE	L	8	0	10 ⁻³	0	10 ⁻³	7/14
7	WH	RE	D	6	0	10 ⁻³	0	0	7/13
8	WH	RE	L	8	0.05	0	0	0	3/18
9	MS	IN	L	6	0.05	0	10 ⁻³	10 ⁻³	0/18
10	MS	IN	D	8	0	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	2/17
11	WH	IN	L	6	0	10 ⁻³	10 ⁻³	0	1/18
12	WH	IN	D	8	0.05	0	10 ⁻³	0	1/18
13	WH	IN	D	6	0.05	10 ⁻³	0	10 ⁻³	0/16
14	WH	IN	L	8	0	0	0	10 ⁻³	0/17
15	MS	IN	D	6	0	0	0	0	0/17
16	MS	IN	L	8	0.05	10 ⁻³	0	0	1/18

(a) : L=16 hours/day lighting, D=Total darkness.

(b) : Result was indicated as follows: No. of tube seeds germinated/No. of tube seeds placed.

Abbreviations are as follows. WH: White medium, MS: Murashige-Skoog basal medium, RE: Removed, IN: Intact, L: Light, D: Dark, GA₃: Gibereric acid, IBA: Indol butylic acid, ZEA: Zeatin.

HPLC 試料とした。標品の echinacoside (E), acteoside (A), tubuloside A (TA) および 2'-acetylacteoside (2'AA) は Kobayashi ら⁷⁾の方法により親植物から単離同定したものをを用いた。分析試料中の4成分の同定は retention time と共に標品との Co-injection による方法で行った。成分の定量は各標品とのピーク面積比による絶対検量線法により行った。

HPLC の条件は次に示す通りである。装置: 日立 D-6500 形三次元クロマトシステム, カラム: Wakosil II 5C₁₈HG 4.6×250 mm, カラム温度: 45°C, 検出波長: 335 nm, 移動相: 1液 CH₃CN, 2液 1.5% CH₃COOH, 1液を8%から20%のリニアグラジェント法(60分), 流速: 1.2 ml/min., 注入量: 5 μl.

3. 結果および考察

(1) 発根に及ぼす因子の影響

C. tubulosa の種子は表面が蜂の巣状を呈した特異な種皮をもつ微細な楕円体である。その大きさは、平均長径 0.88±標準偏差 0.11×平均短径 0.69±標準偏差 0.08 mm で、種皮を除去したときの大きさは平均長径 0.61±標準偏差 0.07×平均短径 0.29±標準偏差 0.03 mm であり、硬く乾燥している。しかし滅菌・洗浄時からしだいに吸水して膨潤しはじめ、播種 5~6 時間後には長径はほとんど変化しないまま短径だけが約 20% 増

加した。そして播種後3週ころより根が種子の先端から押し出されるように発生したが、その大多数は長さ 1 mm 以下で伸長を停止し、根端が肥大した。しかし少数の根は成長を続け、根端が培地表面に接し (Fig. 1-A), やがて培地中に食い込むように肥大した。*C. tubulosa*

Table 2. Analysis of variance on germination.

Factor	F ₀ ^(a)	Contribution ratio
Seed coat (SC)	65.11*	14.62
IBA	4.26*	0.74
SC×IBA	0.88	0.00
ZEA	5.95*	1.13
SC×ZEA	4.26*	1.74
IBA×ZEA	4.26*	0.74
Basal medium	5.95*	1.13
pH	4.26*	0.74
Error		65.41
Light	2.85	0.42
ZEA×GA ₃	1.73	0.17
Yeast ext.	4.26*	0.74
IBA×GA ₃	5.95*	1.13
SC×GA ₃	22.01*	4.79
GA ₃	33.84*	7.49

(a) : F₀=Ratio of mean square. * : P<0.05

Abbreviations as are in Table 1.

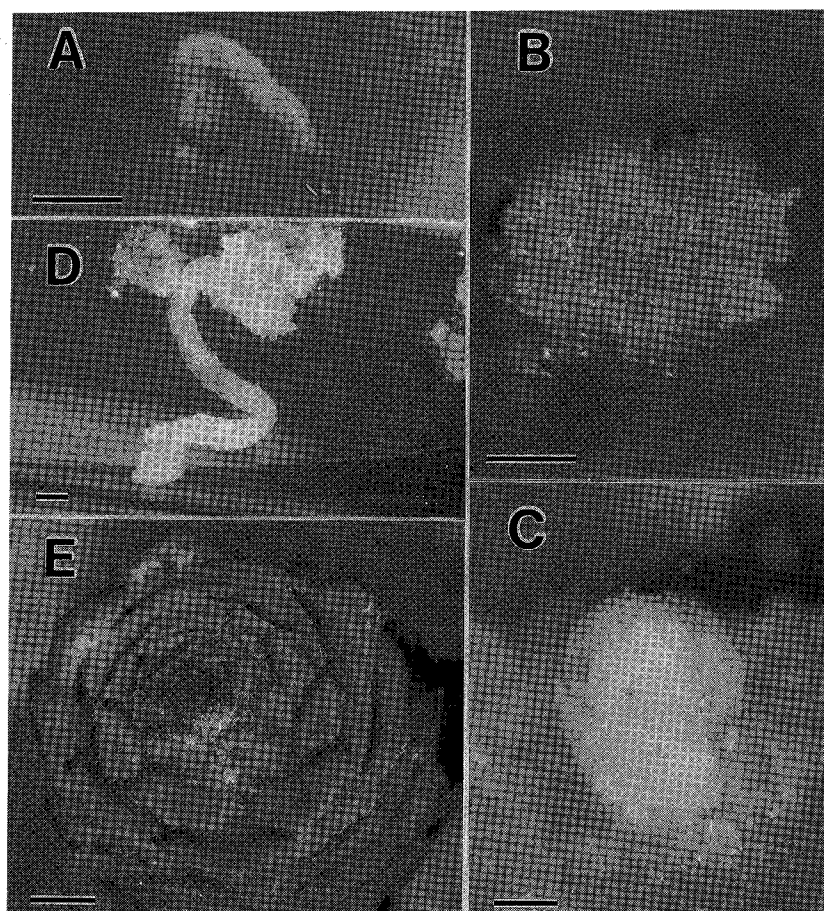


Fig. 1 Germination, callus induction and shoot differentiation from seed of *Cistanche tubulosa*. Bars present the length of 1 mm.

- (A) Germinated seed. Tip of the radicle attached to the surface of solid medium, 30 days after seeding.
- (B) Callus formation from seed on 1/2 MS medium with IAA and kinetin at 0.1 mg/l each, 42 days after incubation.
- (C) Shoot development from callus on Hyponex medium with IAA and kinetin at 0.5 mg/l each, 125 days after incubation.
- (D) Root formation from callus on 1/2 MS medium with IAA and kinetin at 0.1 mg/l each, 170 days after incubation.
- (E) Well-developed shoot. Pigmentation was observed at the margin of scale leaves. 200 days after incubation.

Table 3. Effects of varied concentrations of auxin (IAA) and cytokinin (kinetin) on callus formation from seeds of *Cistanche tubulosa*.

Conc. (mg/l) Kinetin	IAA	0.1	0.5	2.5
0.1		±	±	++
0.5		±	±	++
2.5		+	+	+

± : no or slight growth.

+ : moderate growth.

++ : vigorous growth.

は寄生植物であるから、この発根時に適当な宿主が存在すれば、まず根端で寄生を開始するのであろうが、培地上ではその後の成長を維持することができず、7週を経過したところから種子に近い部分は褐変し根端はカルス化した。

発根に及ぼす因子の影響に関する実験結果を **Table 1** に、またこれについての分散分析結果を **Table 2** に示した。この結果から発根には種皮の除去(SC)、基本培地の種類(Basal medium)、pH、イーストエキス(YE)やインドール酪酸(IBA)、ジベレリン(GA₃)、ゼアチン(ZEA)の添加が影響していることが明らかとなった。

中でも種皮の除去と GA₃ の添加が比較的強く発根を促進していることが判明した。寄生植物における GA の作用については、ナンバンギセル *Aeginetia indica* L.¹⁵⁾ や *Orobanche ludoviciana*, *O. ramosa*¹⁶⁾ の種子の GA による単独処理や *Orobanche crenata* Forsk. 種子に対するアマの根の抽出物との併用処理による発根促進が報告されている¹⁷⁾。本実験の *C. tubulosa* に対する GA の発根刺激はおそらく宿主が与えている刺激に似たものと考えられる。今後は宿主の根の浸出物も含めて更に強い発芽促進物質の検索を行う必要がある。また、この植物の種皮中の発芽抑制物質の存在も考えられる。

(2) 種子からのカルス誘導

カルスの色は黄ないし黄褐色で、発根と同様に播種後 3 週ころから種子から直接誘導されはじめ、6 週ころには直径数 mm の塊を形成した (**Fig. 1-B**)。

カルス形成は IAA 2.5 mg/l にカイネチンを 0.1 ないし 0.5 mg/l 添加した培地で良好であった (**Table 3**)。温度処理では、室温区のカルス形成率が 2.9% (カルス形成数 41/播種数 1405) に対し、低温処理区では 4.7% (27/577) と有意に (Fisher's Exact Test: P<0.01) カルス形成率が上昇した。また、種子の押し潰し処理も、無処理区のカルス形成率が 2.7% (33/1212) に対し処理区では 8.2% (27/330)、カルス形成を有意に (Fisher's Exact Test: P<0.01) 促進した。照明と基本培地の種類はカルス形成に全く影響しなかった。

(3) シュートの分化と分化に及ぼす因子の影響

シュートの分化は、カルスの形成直後から観察された。若いカルスでは分化個体が再びカルス化する例も見られたが、多くの試験管内で数 mm から 10 mm 程度の白色のシュートが分化した (**Fig. 1-C**)。成長の良好なシュ-

Table 4. Effects of basal mediums, plant growth regulators, sugars, organic substances, light and temperature on the shoot differentiation from callus of *Cistanche tubulosa*.

No.	Conc. (mg/l)			Basal medium	sugar	Conc. (%) sugar	Organic substance	Light	Temp. (°C)	Result ^(a)
	IAA	CK	CK							
1	0.0	0.0	—	MS	G	0	—	D	25	0/5
2	0.0	0.0	—	1/2 MS	S	4	CM	D	20	3/5
3	0.0	0.0	—	WH	F	8	CH	L	25	0/5
4	0.0	0.2	KIN	MS	S	4	CH	L	25	0/5
5	0.0	0.2	BAP	1/2 MS	F	8	—	D	25	2/5
6	0.0	0.2	ZEA	WH	G	0	CM	D	20	2/5
7	0.0	5.0	KIN	MS	F	8	CM	D	20	0/5
8	0.0	5.0	BAP	1/2 MS	G	0	CH	L	25	0/5
9	0.0	5.0	ZEA	WH	S	4	—	D	25	3/5
10	0.2	0.0	—	1/2 MS	S	8	CM	L	25	3/5
11	0.2	0.0	—	WH	F	0	CH	D	25	0/5
12	0.2	0.0	—	MS	G	4	—	D	20	1/5
13	0.2	0.2	KIN	1/2 MS	F	0	—	D	20	0/5
14	0.2	0.2	BAP	WH	G	4	CM	L	25	2/5
15	0.2	0.2	ZEA	MS	S	8	CH	D	25	1/5
16	0.2	5.0	KIN	1/2 MS	G	4	CH	D	25	3/5
17	0.2	5.0	BAP	WH	S	8	—	D	20	2/5
18	0.2	5.0	ZEA	MS	F	0	CM	L	25	0/5
19	5.0	0.0	—	WH	F	4	CH	D	20	2/5
20	5.0	0.0	—	MS	G	8	—	L	25	0/5
21	5.0	0.0	—	1/2 MS	S	0	CM	D	25	4/5
22	5.0	0.2	KIN	WH	G	8	CM	D	25	1/5
23	5.0	0.2	BAP	MS	S	0	CH	D	20	0/5
24	5.0	0.2	ZEA	1/2 MS	F	4	—	L	25	2/5
25	5.0	5.0	KIN	WH	S	0	—	L	25	0/5
26	5.0	5.0	BAP	MS	F	4	CM	D	25	2/5
27	5.0	5.0	ZEA	1/2 MS	G	8	CH	D	20	0/5

^(a): Data were scored 3 months of culture after transferring to the differentiation medium. Result was indicated as follows: No. of tube shoot differentiated/No. of tube callus placed.

Abbreviations are as follows. IAA: Indol acetic acid, CK: Cytokinin, KIN: Kinetin, BAP: 6-Benzylaminopurine, G: Glucose, S: Sucrose, F: Fructose, CM: Coconut milk, CH: Casein hydrolysate. Others are as in **Table 1**.

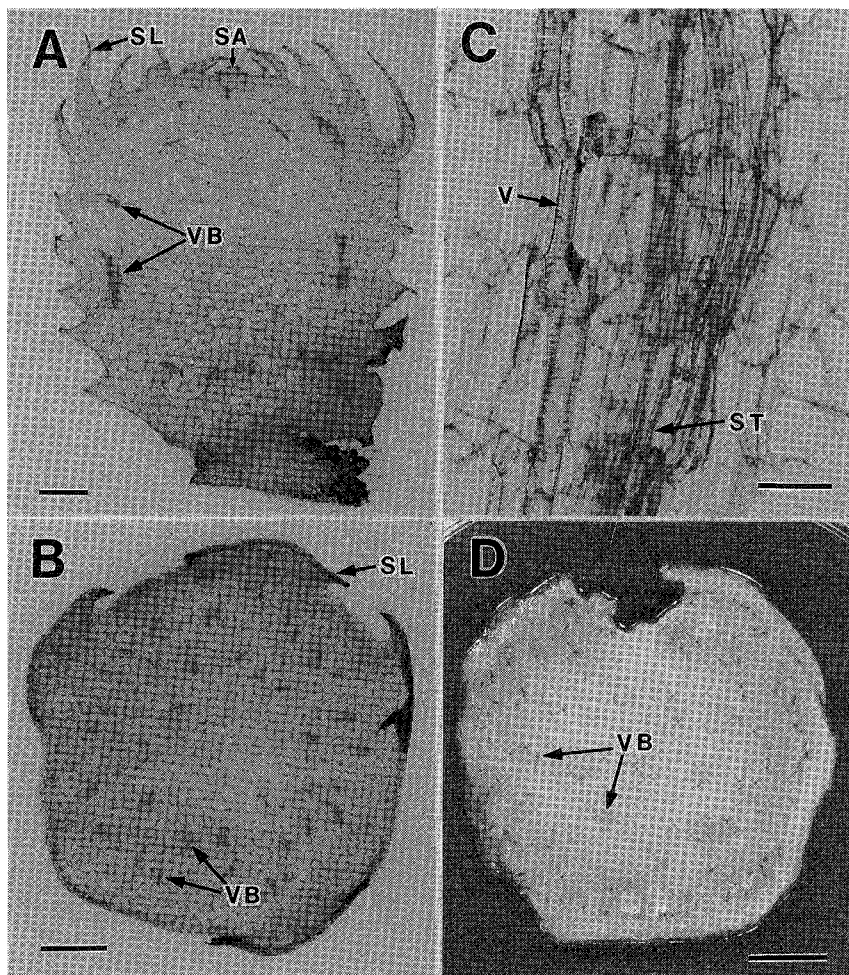


Fig. 2 Anatomical observations of the differentiated shoot.

Bars present the length of 1 mm in photograph A and B, 50 μ m in photograph C, 10 mm in photograph D.

- (A) Longitudinal section of the shoot. (VB: vascular bundle, SL: scale leaf, SA: shoot apex)
 (B) Transverse section of shoot.
 (C) Vascular bundle in longitudinal section of the shoot. (V: vessel, ST: sieve tube)
 (D) Transverse section of the mother plant.

ト(直径 8 mm, 高さ 30 mm)の鱗片葉の縁にはアントシアン系色素が生成され, 親植物により近い形態を示した(Fig. 1-E). また, 1つのカルス塊より大小数十個のシュートが分化した株もあった. しかしこれらのシュートの基部には寄生根は全く形成されなかった. さらに一部のカルスには根だけの分化も観察された(Fig. 1-D). この形態と成育は種子から発生した根によく似ていた(Fig. 1-A 参照).

分化に及ぼす因子の影響についての実験結果を Table 4 に示したが, いずれも分化に対し統計上有意な結果が得られなかった.

(4) 分化した植物体の組織観察

分化したシュートの縦断および横断切片, 縦断切片中

の維管束およびパキスタン産親植物の横断切片を Fig. 2 に示す. 縦断切片中には基部から上方に走る維管束の断片と, 植物体を被う明確に分化した鱗片葉や茎頂が観察された(Fig. 2-A). 維管束中には数本ずつの道管と篩管が観察されたが, その数は親植物のものが 20 本前後あるのに比較し著しく少なかった(Fig. 2-C). 維管束は横断切片で観察すると中心部には存在せず, 茎の外側に点在していた(Fig. 2-B). 親植物では数本の維管束が接近して多数のグループを形成する傾向があり, しかもそれらが茎の中心部にも点在し(Fig. 2-D), 分化個体のもとはかなり異なった様相を呈していた. しかし分化したシュートでも大きいものほど維管束数が増加する傾向があり, 両者の違いは成長段階の差ということが考えられる.

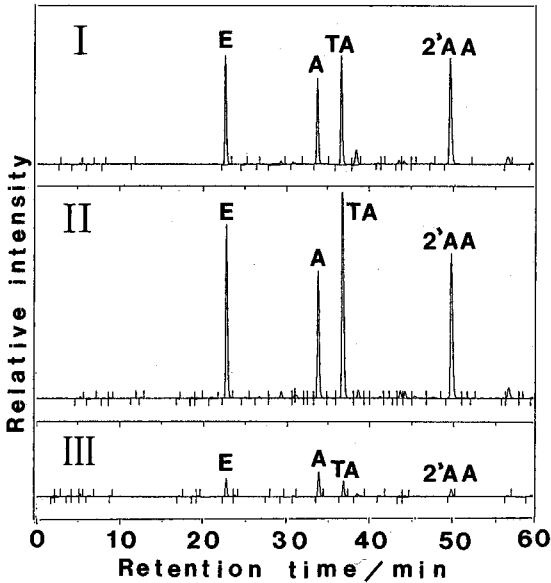


Fig. 3 HPLC of phenylethanoid glycosides in *Cistanche tubulosa*.

(I): seedling callus, (II): differentiated shoot, (III): mother plant from Pakistan. E: echinacoside, A: acteoside, TA: tubuloside A, 2'AA: 2'-acetylacteoside.

(5) カルスの液体培養

カルスの液体培養は、IAA 2.5 mg/l, カイネチン 0.1, 0.5 mg/l 添加培地でカルスの育成が良好であった。これは固体培地における最適条件と一致するもので、カルスは2か月間に2~3倍に増加した。

液体培養カルスの性状は、黄褐色から褐色、結節状から微粉末状とさまざまで、培地の色も透明から暗褐色まで変化に富んでいた。株別にみると、C-7は育成良好な黄色結節状カルス(培地は透明)でE, TA, Aおよび2'AAの4成分とも含量が少なかったのに対し、C-13は成長不良な褐色塊状カルス(培地は褐色)で、配糖体含量が多かった。

(6) カルスと分化シュートおよび親植物体の成分分析

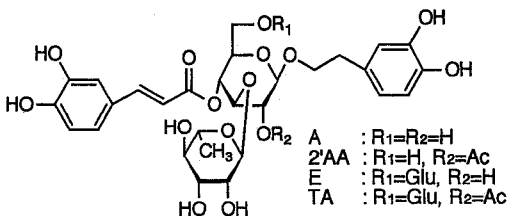


Fig. 4 Structures of phenylethanoid glycosides in *Cistanche tubulosa*.

Abbreviations are as in Fig. 3.

Table 5. Contents of phenylethanoid glycosides (mg/g dry wt.) in seedling callus, differentiated plant and mother plants.

Compound*	E	A	TA	2'AA
Callus (No.)				
C-1	37.6	12.4	56.9	21.1
C-2	25.9	8.1	37.8	16.5
C-3	26.3	8.4	41.6	16.9
C-4	29.6	10.7	45.7	17.0
C-5	31.2	15.9	65.0	36.6
C-6	26.5	12.6	55.2	32.4
C-7	30.3	13.6	49.7	23.0
C-8	32.0	24.0	34.9	16.3
C-9	38.0	19.8	43.1	17.3
C-10	41.1	20.0	47.5	18.4
C-11	35.2	15.2	38.8	12.6
C-12	30.5	17.5	41.4	18.0
C-13	128.7	26.4	139.1	30.3
C-14	65.0	15.6	68.7	12.0
C-15	67.5	18.0	82.9	23.8
C-16	33.5	20.9	44.5	39.7
C-17	35.7	21.4	42.9	26.3
C-18	65.2	61.5	69.8	53.6
C-19	53.5	48.0	46.2	39.9
C-20	33.1	11.8	106.4	32.8
C-21	25.9	9.9	94.4	31.3
Mean	42.5	19.6	59.6	25.5
S. D.	23.7	12.9	26.5	10.8
Differentiated plant				
	56.1	30.1	99.6	50.8
Mother plants (Habitat)				
Pakistan	5.4	5.8	5.9	2.3
Bahrain	3.5	2.0	5.0	2.1

* E: echinacoside, A: acteoside, TA: tubuloside A, 2'AA: 2'-acetylacteoside

E, TA, Aおよび2'AAの4成分は標品とのCo-injectionにより確認できた。液体培養したカルスのうち、平均的な成分含量を示したカルス(C-16)と分化したシュートおよびパキスタン産親植物のHPLCクロマトグラムをそれぞれFig. 3に示す。成分含量をみると、カルスや分化シュート中の4成分は親植物の数倍から10倍以上も含有されていた。また、分化したシュートはカルスより何れも成分含量が高く、分化により二次代謝物が多く産生されることが示唆された(Table 5)。なお培地中に4成分はほとんど含有されていなかった。また一部のカルスではAと2'AAのピークの間親植物にはみられない未同定のピークがみられ、親植物にはないフェニルエタノイド配糖体を産生している可能性が示唆

された。分析した 21 株のカルスの E と TA, A と 2'AA の含量間には高い正の相関が認められた(それぞれ $r=0.731, 0.679$, 共に $P<0.01$)。ここで E と TA, A と 2'AA はどちらも前者をアセチル化することにより後者が得られるもので(Fig. 4), アセチル化の代謝経路や生物変換の面からも興味を持たれる。

今回、誘導カルスと分化したシュートに親植物より明らかに多い量の有効成分が含有されていることが確認できたことは、今後、組織培養学的手法により植物体や有効成分を産生させる可能性を示したもので、栽培学的手法への応用と共に、資源の確保の一助になるものと考えらる。

文 献

- 1) 馬 毓泉, 1977. 内蒙古大学学报(自然科学), 第 1 期: p. 69-75.
- 2) 中華人民共和国薬典委員会編, 1990. 中華人民共和国薬典 1990 年版一部, p. 110, 人民衛生出版社.
- 3) Nasir, E., S. I. Ali, 1976. In "Flora of West Pakistan, Vol. 98", p. 4, Shamin Printing Press, Karachi.
- 4) Qadir, S. A., M. A. Ahmed, S. Z. Qureshi, M. I. Shafi, 1966. Pakistan J. Forestry, January 1966: 81-84.
- 5) 中国科学院蘭州砂漠研究所編, 1992. 中国砂漠植物誌, 第 3 卷, p. 188, 科学出版社, 北京.
- 6) Baquar, S. R., M. Tasnif, 1967. In "Medical Plants of Southern West Pakistan", Vol. 3, p. 56, Pakistan Council of Scientific and Industrial Research Bulletin, Karach.
- 7) Kobayashi, H., H. Oguchi, N. Takizawa, T. Miyase, A. Ueno, K. Usmanghani, M. Ahmad, 1987. Chem. Pharm. Bull., 35: 3309-3314.
- 8) Yoshizawa, F., T. Deyama, N. Takizawa, K. Usmanghani, M. Ahmad, 1990. Chem. Pharm. Bull., 38: 1927-1930.
- 9) Stoll, A., J. Renz, A. Brack, 1950. Helv. Chim. Acta, 33: 1877-1893.
- 10) Becker, H., W. C. Hsieh, R. Wylde, C. Laffite, C. Andary, 1982. Z. Naturforsch., 37C: 351-353.
- 11) Petit, G., A. Numata, T. Takemura, R. Ode, A. Naruba, J. M. Schmidt, G. M. Gragg, C. P. Pase, 1990. J. Nat. Prod., 53: 456-458.
- 12) 中村智徳, 奥山恵美, 山崎幹夫, 西部三省, 西村浩昭, 丸野政雄, 守屋 明, 出山 武, 1992. 日本薬学会第 39 回大会講演要旨集, p. 126.
- 13) 佐藤 侑, 小島 暁, 小林久美子, 小林弘美, 1985. 薬学雑誌, 105: 1131-1144.
- 14) 傅 立国, 1989. 中国珍稀濒危植物, p. 250, 上海教育出版社, 上海.
- 15) French, R. C., L. J. Sherman, 1976. Amer. J. Bot., 63: 558-570.
- 16) Nash, S. M., Wilhelm, S. 1960. Phytopathology, 50: 772-774.
- 17) Garas, N. A., C. M. Karssen, J. Bruinsma, 1974. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 71: 108-114.

Summary

Studies on the Tissue Culture of *Cistanche* Plants: I. Callus Induction and Shoot Differentiation from the Seed of *Cistanche tubulosa* Wight.

Akira MORIYA*, Den-ei KARASAWA*, Hiroshi ARIMA*, Takeshi DEYAMA**, Naomi IBE**, Kyoko KEGASAWA** and Khan USMANGHANI***

* The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University (Shinshu Univ.), 8304 Minamiminowa, Kamiina, Nagano 399-45, Japan

** Central Research Laboratories, Yomeishu Seizo Co., Ltd., 2132-37 Nakaminowa, Minowa, Kamiina, Nagano 399-46, Japan

*** Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Karachi, Karachi 75270, Pakistan

Cistanche tubulosa Wight. is an important herbal medicine including such phenylethanoide glycosides as echinacoside (E), tubuloside A (TA), acteoside (A) and 2'-acetylacteoside (2'AA), and is a holoparasitic plant distributed in a wide range from the North African to Chinese in arid and semi arid regions. In this plant, seed germination occurred without a host plant by the addition of gibberellic acid to the medium and the removal of the seed coat. Callus were induced on 1/2 MS medium containing 2.5 mg/l indol-3-acetic acid and 0.5 mg/l kinetin, and with chilling treatment (at 4°C for 3 months) of the seeds. With this

condition, a shoot differentiated from the callus in 6 weeks, but a parasitic root did not form. The shape of the vascular bundle of the shoot and that of the mother plant was slightly different.

The largest value for phenylethanoide glycosides contained in the shoot was 10 fold that of the mother plant.