HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 冷湿処理、ジベレリン酸（GA3）処理および胚のin vitro培養によるハマボウフウ（Glehnia littoralis Fr. Schmidt）種子の発芽促進 |
| Author(s) | 白井, 菊子; 増田, 清; 田村, 春人 他 |
| Citation | 北海道大学農学部農場研究報告, 31, 35-40 |
| Issue Date | 1999-03-29 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/13440 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 31_p35-40.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道大学農学部農場研究報告　第31号：35～40（1999）

# 冷湿処理，ジベレリン酸（$GA_3$）処理および胚の *in vitro* 培養によるハマボウフウ（*Glehnia littoralis* Fr. Schmidt）種子の発芽促進

白井 菊子・増田　清
（北海道大学大学院農学研究科園芸緑地学講座）
田村 春人
（北海道大学農学部附属農場植物資源科学部門）
後藤 真咲
（北海道大学大学院地球環境科学研究科）

（1999年2月1日受理）

## 緒　　言

セリ科植物であるハマボウフウは，若い茎葉は食用として，根は漢方薬として古くから利用されており，現在，主に埼玉県や愛知県で栽培されている[1,2]。

かつてハマボウフウは，日本全国の海岸砂丘に多く自生していたが，現在ではその生育場所である海岸砂丘の減少，ならびに人為的な乱獲のため，その数が急速に減ってきている[3,4]。この様な実状に対し，ハマボウフウの栽培拡大は，将来的には生物資源としてのハマボウフウの減少をくい止めることにつながると思われる。

ハマボウフウの種子は，他の多くの山野草種子と同様に発芽率が低いうえに不斉一であることが知られている。この性質は栽培するうえでの大きな障害となってきた[5,6,7]。そこで，ハマボウフウの栽培拡大のためには，種子の発芽特性を調べ，発芽を人為的に補助することによって発芽率を改善し，種子による繁殖を容易にすることが重要であると考えられる。

本研究では，多くの植物で種子の発芽を促進することが知られている冷湿処理およびジベレリン処理[8]がハマボウフウ種子の発芽率向上におよぼす効果について検討した。さらに，成熟種子から摘出した胚を用いることによってその発育能力を調べ，併せて発芽促進のための胚培養の利用について検討を加えた。

## 材料および方法

**植物材料の調製**：

ハマボウフウ（*Glehnia littoralis* Fr. Schmidt）の果実は，1997年10月に北海道大学農学部附属農場に栽植してある株および北海道石狩市内の海岸砂丘に自生する成株より採種し，天日で乾燥させた後，室温（15℃～20℃）で貯蔵した。

**冷湿処理**：

冷湿処理は，ハマボウフウ果実を一晩水に浸漬し，篩で余分な水気を除いた後，ポリエチレンの袋に入れ，乾燥を避けて5℃もしくは0℃の暗所で保温することにより行った。冷湿処理の期間は「結果および考察」に記載した。

**発芽試験**：

発芽床として，直径7 cmの濾紙2枚を敷き，3 mlの脱イオン水を加えた直径9 cmプラスチックシャーレを用いた。これに，必要に応じて$GA_3$（ナカライテスク，京都）およびAncymidol（和光純薬工業，大阪）水溶液を加えた。播種したプラスチックシャーレはパラフィルムで封じ，20℃，白色螢光灯の連続照明下（4000 lx）で保温した。発芽処理の期間は「結果および考察」に記載した。それぞれの試験は2もしくは3反復行い，1回の試験で7～12個の種子を供試した。

本研究では，種子については発根の認められた

ものを発芽種子とし，発芽率を以下の計算式により算出した。

発芽率＝(発芽した種子の個数/播種した種子の個数)×100

**胚の摘出および培養：**

種子を一晩水に浸漬して吸水させ，種皮を除いた後，種子を0.1％Tween 20を含む次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素1％)に10分間浸漬し，表面殺菌した。滅菌水で十分に洗浄した後，実体顕微鏡の下で胚を摘出した。種子の解剖と胚の摘出には柄付針を用いた。摘出した胚は，2 mlのMS固形培地[9](7 g/ℓ寒天を添加，pH 5.7に調整)を含む直径3 cmプラスチックシャーレに置床した。培養は，25℃，16時間日長(白色螢光灯，4000 lx)のもとで行った。

胚の培養においては，根の伸長および子葉の緑化が認められたものを生長した胚とし，本研究においては，これも便宜的に発芽と称した。従って，胚培養における発芽率は以下の計算式によって算出した。

発芽率＝

(生長した胚の個数/培養した胚の個数)×100

## 結果および考察

**冷湿処理による発芽促進：**

本研究に用いたハマボウフウ種子の発芽率および冷湿処理したハマボウフウ種子の発芽率の促進をFig. 1に示す。冷湿処理を行わなかったハマボウフウ種子は全く発芽しなかったのに対し，冷湿処理した種子では14.3％から52.4％の発芽率が得られた(Fig. 2A, B)。冷湿処理の温度を0℃と5℃で比較したところ，0℃よりも5℃の方が短い処理期間で高い発芽率が得られ，5℃で2か月間処理した場合に最も高い発芽率となった。しかし，5℃で3か月以上処理したところ，発芽率はむしろ低下した。この結果から，冷湿処理はハマ

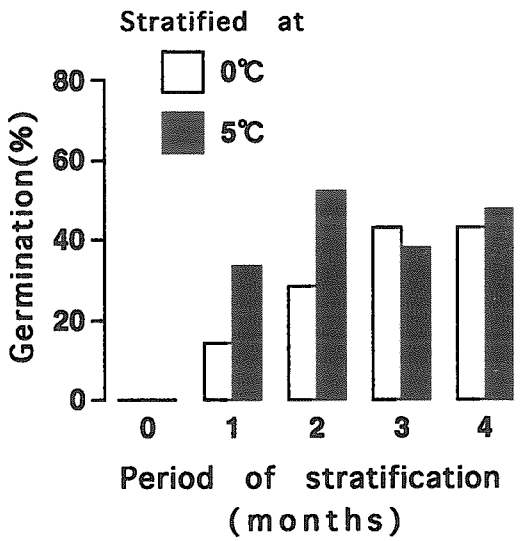


**Fig. 1.** Effect of stratification on the germination of *Glehnia littoralis* seeds. Seeds were stratified at 0°C or 5°C for 0, 1, 2, 3 and 4 months, followed by incubation for 18 days at 20°C.

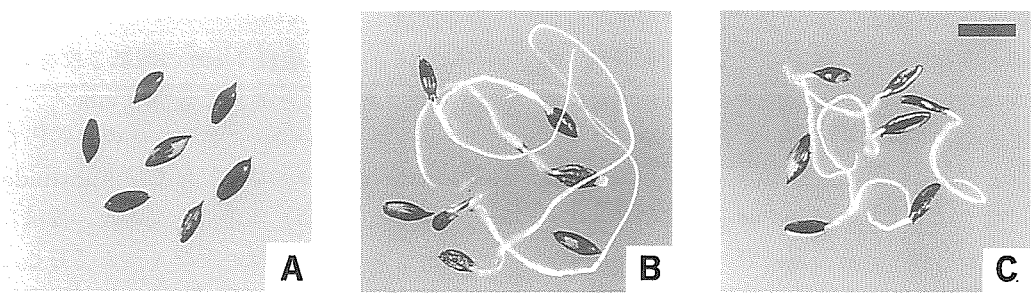


**Fig. 2.** Germination of *Glehnia littoralis* seeds promoted by cold stratification and the application of $GA_3$. Seeds without treatment (A). Germination of seeds stratified at 5°C for 2 months (B). Seeds incubated at 20°C for 2 weeks in the presence of $10^{-3}$ M $GA_3$ (C). Scale bar indicates 1 cm.

ボウフウ種子の発芽を促進し，本研究において設定した処理条件の中では，5℃，2か月間の保温が最も効果的であることが明らかとなった。この場合，種子の冷湿処理は湿潤条件下で行うことが必須であった。冷湿処理については，多くの植物の種子において，処理にともない様々な生理的変化が起こることがすでに報告されているが[8]，ハマボウフウ種子において，0℃に比べ5℃の方がより短期間で発芽を促進した結果は，冷湿処理の間に何らかの生理的な過程が進行するとされるこれまでの知見と矛盾しない。

**ジベレリン処理によるハマボウフウ種子の発芽促進：**

ジベレリン酸 ($GA_3$) を含む発芽床に播種したハマボウフウ種子の18日後の発芽率をTable 1に示す。対照区 ($GA_3$ 無添加) では発芽率が0％であったのに対し，$10^{-4}$M, $10^{-3}$M および $10^{-2}$M $GA_3$ を添加した区では発芽が認められ，その発芽率は濃度が高いほど増大した(Fig. 2A, C)。この結果から，$GA_3$ 処理はハマボウフウ種子の発芽を促進することが明らかとなった。

**Table 1.** Effect of the application of $GA_3$ on the germination of *Glehnia littoralis* seeds.

| $GA_3$ (M) | germination (%)* |
|---|---|
| 0 | 0.0 |
| $10^{-5}$ | 0.0 |
| $10^{-4}$ | 28.6 |
| $10^{-3}$ | 47.6 |
| $10^{-2}$ | 66.6 |

*Determined after 18 days of incubation at 20℃.

一方，5℃で10週間の冷湿処理をした種子をジベレリン生合成阻害剤であるAncymidolを含む発芽床に播種したところ，対照区 (Ancymidol無添加) では，47.2％の種子が発芽したのに対し，Ancymidolが $10^{-5}$M 以上の濃度で種子の発芽は完全に抑制された(Table 2)。一方，この発芽抑制は，$10^{-5}$M から $10^{-2}$M の $GA_3$ を発芽床に添加することにより，その濃度の高さに依存して回復した(Table3)。この結果から，冷湿処理したハマボウフウ種子は，発芽適温条件に置かれた後にジベレリン合成活性が上昇し，その結果，発芽が促進されるものと推察された。

**Table 2.** Effect of Ancymidol on the germination of *Glehnia littoralis* seeds stratified at 5℃ for 10 weeks.

| Ancymidol (M) | germination (%)* |
|---|---|
| 0 | 47.2 |
| $10^{-8}$ | 33.3 |
| $10^{-7}$ | 19.4 |
| $10^{-6}$ | 11.1 |
| $10^{-5}$ | 0.0 |
| $10^{-4}$ | 0.0 |

*Determined after 18 days of incubation at 20℃.

**Table 3.** The rate of germination promoted by the application of $GA_3$ that was reduced in the presence $10^{-5}$ M Ancymidol in stratified Glehnia littorallis seeds.*

| $GA_3$ (M) | germination (%)** |
|---|---|
| 0 | 0.0 |
| $10^{-6}$ | 0.0 |
| $10^{-5}$ | 2.8 |
| $10^{-4}$ | 13.9 |
| $10^{-3}$ | 47.2 |
| $10^{-2}$ | 75.0 |

*Stratified at 5℃ for 10 weeks.
**Determined after 18 days of incubation at 20℃.
The seeds showed 0% of germination in control experiments.

**胚の *in vitro* 培養：**

ハマボウフウ種子の発芽率は，湿潤，低温環境を経た後でも，たかだか52.4％であった。このような発芽率の低さの原因は，種子における胚の発育不良あるいは胚の休眠にあると考えられた。そこで，ハマボウフウ種子から胚を摘出し，培養することによって，胚そのものに発芽する（生長を開始する）能力があるか否かについて検討した。摘出したハマボウフウ胚の培養は，マイクロプロパゲーションを目的[10]としてこれまでにもしばしば行われてきたが，胚から幼植物への生長を促す手法として利用された報告がなく，従って，胚の摘出が生長に及ぼす効果についても定性的な理解に限られてきた。

本実験において，冷湿処理する前のハマボウフウ種子から摘出した胚は，培養18日目には90％が生長した。一方，用いた種子の発芽率は0％であった（Table 4, Fig. 3）。さらに，培養18日目の種子から胚を摘出し，培養したところ，胚は生長し，正常な実生となった（データ非掲載）。これらの結果から，ハマボウフウ種子における低発芽率が，胚の休眠や発育不全に起因するものではないこと，ハマボウフウの休眠種子における発芽抑制が胚以外の部分によって生じていることが推察された。さらに，成熟種子から胚を摘出し，培養することによって，接合子胚から植物体へと発育する割合が改善されることが明らかとなった。この手法は，高度な人為的補助が必要な植物種において，種子の発芽促進に利用することができると考えられる。

**Table 4.** The growth of embryos excised from *Glehnia littoralis* seeds.

| materials | germination (growth)* (%) |
|---|---|
| Seed | 0.0 |
| Embryo | (90.0) |

*Incubated on a semi-solidified MS medium at 25℃ for 18 days.

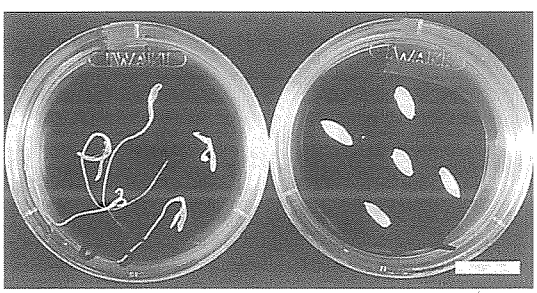

**Fig. 3.** Growth of mature embryos extirpated from *Glehnia littoralis* seeds and cultured on a nutrient medium. 'Germination' of the extirpated embryos incubated at 25°C for 18 days (left) ; intact seeds incubated at 25°C for 18 days (right). Scale bar indicates 1 cm.


## 摘　　要

冷湿処理およびジベレリン処理がハマボウフウ（*Glehnia littoralis* Fr. Schmidt）種子の発芽におよぼす影響ならびに胚の *in vitro* 培養による発芽促進について検討した。材料として用いた種子は，10月に採種し，実験期間中を通して室温で貯蔵した。この時期に採種した種子は，発芽好適条件においても発芽しなかったが，5℃，2か月間の冷湿処理，あるいは $10^{-2}$M の $GA_3$ 処理を施すことにより，52.4％から66.6％の種子が発芽するようになった。冷湿処理したハマボウフウ種子の発芽は，$10^{-5}$M の Ancymidol で完全に抑制されたが，この発芽抑制は，$10^{-5}$M から $10^{-2}$M の $GA_3$ の添加によって回復した。一方，採種後，室温で貯蔵していた種子から胚を摘出し，MS培地で培養した胚は，90％が生長を開始した。同一条件下での種子の発芽率は0％であった。本研究によって，冷湿処理によるハマボウフウ種子の発芽促進にはジベレリン合成系の活性化が関与していることが明らかとなった。さらに，ジベレリンは，ハマボウフウ種子の胚以外の部位で合成され，種子の休眠解除に重要な役割を果たしていることが推察された。



## 謝　　辞

本研究を遂行するにあたり，石狩市には貴重なハマボウフウの種子を御提供いただいた。また，原田　隆教授には多くの御助言と御援助をいただいた。ここに記して深く感謝の意を表する。


## 引用文献


1）青葉　高：日本の野菜．56-57 pp．八坂書房，東京．1983.

2）園芸植物大事典．**4**：12-13 pp．小学館，東京．1989.

3）平岡　昇：新潟県におけるハマボウフウの分布．薬用植物研究．**1**：1-5．1995.

4）山本　正・高畑　滋・森田弘彦：北海道山菜誌．197-199 pp．北大図書刊行会.

5）八田亮三・後藤　実・松岡俊郎・長尾弓朗・奥村弥三郎：ハマボウフウ *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt の栽培研究．（第2報）自生地別各系統の比較栽培研究．武田研究所年報．**26**：98-106．1967.

6）松岡敏郎・奥村弥三郎・長尾弓朗：ハマボウフウ *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt の栽培研究．（第3報）種子の貯蔵について．武田研究所年報．**29**：249-253. 1970.
7）村井正和・吉田俊郎：ハマボウフウ種子の発芽特性．園学雑．**60** 別2：428-429. 1991.
8）中村俊一郎：農林種子学総論．養賢堂，東京．：63-87. 1985.
9）Murashige, T. and Skoog,F .: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. **15**: 473-497. 1962.
10）Hirai, G., Kasai, N. and Harada, T. : Somatic embryogenesis in mature zygotic embryo culture of *Glehnia littoralis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. **48**: 175-180. 1997.

# Germination Promoted by Cold Stratification, the Application of Gibberellic Acid ($GA_3$) and an *in vitro* Culture of Embryos in *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt Seeds

Kikuko SHIRAI and Kiyoshi MASUDA
(Research Group of Horticultural Science and Landscape Architecture, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan)
Haruto TAMURA
(Experiment Farms, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-0811, Japan)
Masaki GOTO
(Division of Biological Science, Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido University, Sapporo 060-0810, Japan)
(Recieved February 1, 1999)

**Summary**

Effect of cold stratification and the application of gibberellic acid ($GA_3$) on the germination of *Glehnia littralis* Fr. Schmidt seeds was examined. The *Glehnia littralis* seeds harvested in October and stored at room temperature did not germinate under suboptimal conditions for germination. Germination of the seeds was promoted by stratification at 5°C for 2 months or the application of $10^{-2}$ M $GA_3$. The germination promoted by the stratification was inhibited completely in the presence of $10^{-5}$ M Ancymidol, a gibberellin biosynthetic inhibitor. On the other hand, 90% of the embryos extirpated from the seeds germinated on MS semi-solidified medium at 25°C. These results suggest that the germination of *Glehnia littralis* seeds by stratification is involved with the elevated synthetic activity of gibberellin, and that a portion of seed except for the embryo may participate in the synthesis of gibberellin, thus playing an important role in breaking the dormancy of *Glehnia littralis* seeds.