

光、温度がミシマサイコ (*Bupleurum falcatum*) 種子の 発芽率、胚の分化及び発芽過程中の saikosaponin 類の 消長に及ぼす影響について¹⁾

南 基 泰*, 杉 野 守, 秦 和 弘
長谷川 千 晃, 大 江 千 里

近畿大学農学部

Effects of Light and Temperature on Germination Rate, Development of Embryo and Change of Saikosaponins Content during Germinating Process in the Seeds of *Bupleurum falcatum*

MOTOYASU MINAMI,* MAMORU SUGINO, KAZUHIRO HATA,
CHIAKI HASEGAWA and CHISATO OHE

Faculty of Agriculture, Kinki University, 3327-204 Naka-machi, Nara 531, Japan

(Received May 16, 1996)

The effects of light and temperature (15, 25 and 35°C) conditions on the germination rate and the development of embryo of *Bupleurum falcatum* were studied. Their effects on the contents of saikosaponins a, c and d (sa, sc and sd) in the seeds. The highest germination rate was observed at 15°C. At 25°C, emergence of the radicle root at the stage of complete embryo was inhibited and the germination rate was very low. At 35°C, the embryo developed only until the terpedo stage, and the germination rate was nil. During germination the sd content in seeds increased rapidly from original 0.09% to 0.6-0.9% on the 4th day, and then decreased to original level on the 8th day. The sd content decreased as the sc content increased and increased as the sc content decreased. The sa was not detected during germinating. Under the light condition, the sc and sd contents in the seeds were apparently not significantly affected by temperature. However, under the dark condition, the sd content on the 2nd to 4th day tended to decrease when incubated at higher temperature.

Key words—*Bupleurum falcatum*; seeds; germination; saikosaponin

ミシマサイコの種子は、播種後出芽までに約1か月以上を要する^{2a, b)}。この原因は、種子は母植物から落下した段階では、胚はまだ未熟で発芽能力がなく、後熟性であるためである³⁾。そのため発芽に至るまでの種子中の胚の分化、成長様式について明らかにする必要があると思われるが、いまだ報告はない。また、saikosaponin類は、主に根部に含有されているが、種子中にも約0.47 (% DW) 程度含まれていることは既に報告されている⁴⁾。しかし、本来薬用部位として用いられない種子中のsaikosaponin類についての関心度は低く、詳細な検討及び報告はされていない。著者らは発芽過程中の種子中のsaikosaponin類の消長を把握しておくことは、今後種子の発芽特性やsaikosaponin類のミシマサイコに対する役割を考えていく上での手掛かりになると考えた。そこで、本実験では発芽過程中の胚の分化、成長様式及び種子中のsaikosaponin類の消長に、光、温度がどのように影響するかについて2因子要因実験を行

った。また、これらの結果より発芽過程中の胚の分化及び成長とsaikosaponin類の消長に何らかの関連があるかについても合わせて検討した。

実験材料及び方法

1. 供試種子 近畿大学農学部（奈良市）実験圃場で栽培されている兵庫系統から1990年11月に採種し、その後室温で風乾保存したもの。
2. 選種 均一な大きさ（長径3 mm 前後）のものを選種し、種子100粒分の風乾重（以降、種子重）を秤量した。
3. 発芽実験用培地 脱イオン水を用いて1%寒天培地を作製し、9 cm シャーレに充填したものを発芽実験用培地とした。
4. 置床 寒天培地上に、種子を等間隔に種枕が寒天培地上と接するように1シャーレ当たり100粒ずつ置床した。
5. 光、温度条件 種子の置床後、シャーレは3つの温

度 (15, 25, 35℃) に設定されたグロースキャビネット (20 W 蛍光灯ランプ, 12本) 内に 1 温度区当たり 6 シャーレずつ設置した。それらの光条件を変えるため, 3 シャーレは光 (約 500 lx) が当たるようにサラン樹脂⁵⁾で包み (以降, L 区), 残り 3 シャーレは完全暗黒となるようにアルミニウム箔で包み (以降, D 区), 計 6 試験区の光, 温度条件を変えた 2 因子要因実験を設定した (TABLE I) (以降, TABLE I の実験区名を使用した)。

6. 発芽測定 置床後, 2, 3 日毎に発芽した種子をカウントした。この際, 幼根が種子から突出しているのが肉眼で観察されたものを発芽と定義した。発芽数をカウント後, 各試験区毎に累積発芽率 (%、以降, 発芽率) を算出した。なお各試験区ともに発芽締め切りは置床後 2 週間とした。

7. 胚の分化, 成長の観察 発芽数をカウントした後の種子を, 各試験区より任意に 5 粒ずつ選び出し, 凍結ミクロトーム (有限会社清和光器商会) で約 35 μ m の切片を作製した。観察は, サフラニンで染色後, 全自動顕微鏡写真撮影装置 (PM-10AD, Olympus) を装備した実体顕微鏡 (JM-TR, Olympus) で観察, 写真撮影した。

胚の成長程度を評価する方法として, 胚成長比 (Embryo Growth Rate, EGR) (=胚の長軸方向の長さ/胚乳の長軸方向の長さ) を算出した (Fig. 1)。ただし, 各試験区共に発芽が最初に観察された日をもって, 胚の観察及び胚成長

TABLE I. Two-Factorial Design (Light and Temperature Condition) and Experimental Plot

Light	Temperature		
	15℃	25℃	35℃
Light	15 L	25 L	35 L
Dark	15 D	25 D	35 D

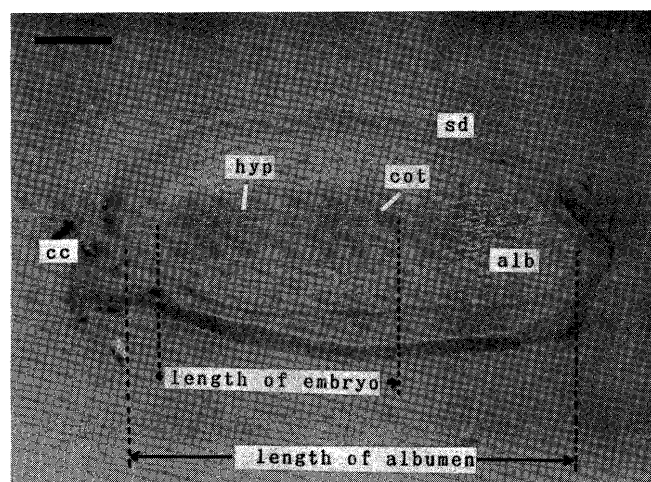


Fig. 1. Cross-Section of Seed and Method of Length of Embryo and Albumen

Embryo growth rate, $EGR = \text{length of embryo} \div \text{length of albumen}$. sd : seed coat, cc : caruncle, alb : albumen, hyp : hypocotyl, cot : cotyledon. bar, 1 mm.

比の算出を終了した。

8. Saikosaponin a, c 及び d の定量 発芽数をカウントした後の種子を, 各試験区より任意に 50 粒ずつ, 3 反復選り出し, 乾燥 (60℃, 24 h) 後, 50 粒重を秤量し, 乳鉢で粉碎した。各粉末試料を 0.2% KOH·MeOH (30 ml) を抽出溶媒とし, 還流抽出 (80℃, 2 回, 各 1 時間) した。抽出溶液を減圧乾固した後, 残渣を 0.2% KOH·MeOH で 20 ml にメスアップし, メンブランフィルター (Millex-GV Filter unit, pore size 0.22 μ m) で濾過した。濾液 20 μ l を標準品 (saikosaponin a, c 及び d, 和光純薬工業 (株) 製, 生薬試験用標準品) との比較により, 絶対検量法で定量した。

測定機器 : pump, Shimadzu LC-6AD (Shimadzu) ; column, Shim-pack CLC-ODS (0.15 $\times$ 6.0 ϕ) (室温) (Shimadzu) ; 移動相, MeCN : H₂O = 2 : 3 (v/v) ; 流速, 1.8 ml/min ; 検出器, Shimadzu SPD-6AV (Shimadzu) ; UV204 nm, 0.08 AUFS ; computing integrater, Shimadzu C-R5A (Shimadzu)⁴⁾。

結果及び考察

1) 光が発芽に及ぼす影響について (Fig. 2)

ミシマサイコ種子は光発芽性種子^{2a, b)}とされてきたが, 本実験では各温度区共に L 区と D 区間に有意な差はなかった ($p < 0.05$, two-way analysis of variance)。ミシマサイコ種子の発芽は, 採種直後は光による発芽促進効果が認められる。この原因については, 種子中の発芽抑制物質が光によって失活されるためと推測されている³⁾。しかし, この抑制物質は貯蔵期間の延長に伴い失活されるため, 6 か月以上貯蔵されたものでは光発芽性は失われると報告されている³⁾。本実験でも 6 か月以上貯蔵されていた種子のため, 発芽抑制物質が失活し, L, D 区間で発芽率に差がなかったものと推測された。

2) 温度が発芽に及ぼす影響について (Fig. 2)

発芽率 (以降, 特別のことわりがない限り発芽締め切日の発芽率を示す) が高かったのは, 光の有無に関係なく 15℃で, 25℃では極端に低くなった。35℃では, 光条件に関係なく本実験中発芽は観察されなかった。

3) 胚の分化・成長様式 (Fig. 3)

置床前の胚はほぼ球状~楕円形状胚段階で EGR は 0.15 前後と, ほとんどの胚で器官分化は起こっていなかった (Fig. 3a)。その後, 球状胚の上端両側より左右対称に 2 枚の幼子葉が分化し, 心臓型胚の段階 (Fig. 3b) になった。また, 幼子葉の間には幼芽の原基が分化していた。幼子葉の伸長に伴い, 胚軸, 幼根が分化し, EGR が約 0.5 程度になった時魚雷型胚の段階 (Fig. 3c) に達した。胚は更に胚乳の長軸方向に成長し, 完全胚段階 (EGR 約 0.6, Fig. 3d) となり, 種枕より幼根が突出し, 発芽が完了した。また, 幼子葉は種皮より完全に抜け出すまで, 胚の緑化は観察さ

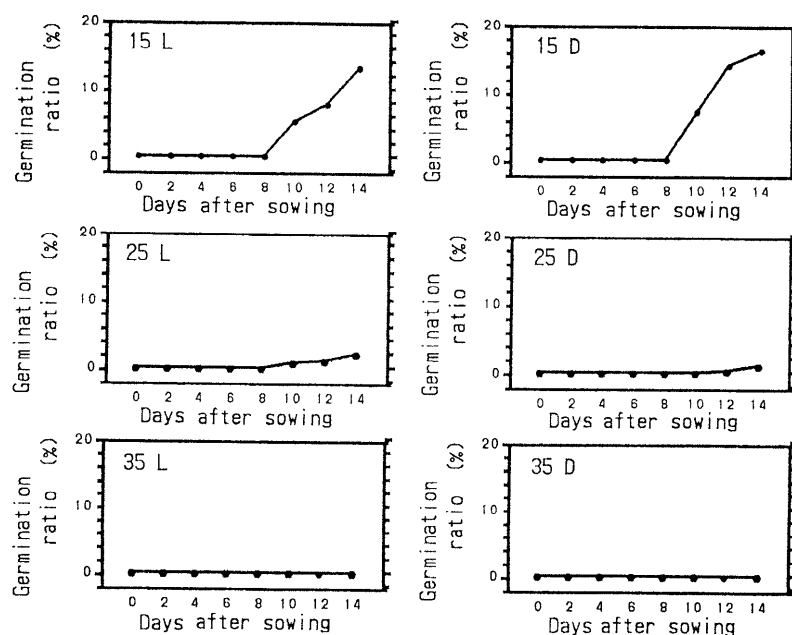


Fig. 2. Effects of Light and Temperature on Germination Ratio of Seed
Experimental design and plot see in TABLE I. EGR is explained in Fig. 1.

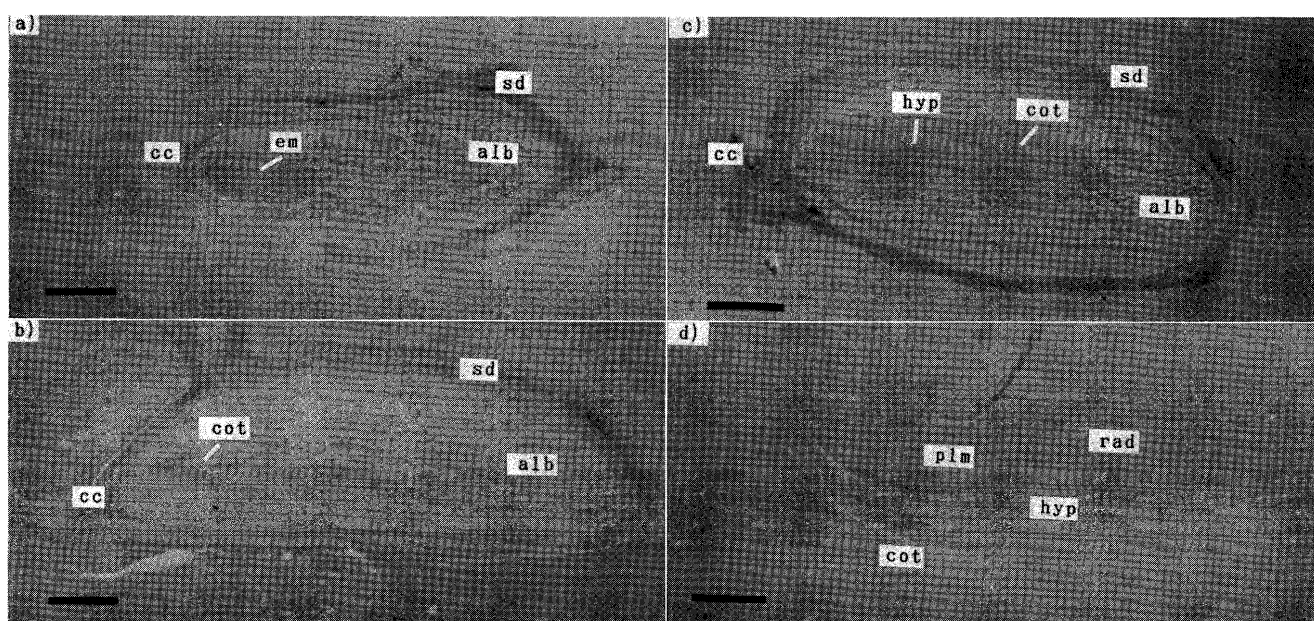


Fig. 3. Development and Growth Pattern of Embryo in Seed

a) sphaeroidal embryo stage, b) heart stage, c) torpedo stage, d) complete embryo stage. sd : seed coat, cc : caruncle, alb : albumen, hyp : hypocotyl, cot : cotyledon, em : embryo, plm : plumule, rad : radicle root. bar, 1 mm.

れなかった。

4) 光が胚の分化・成長に及ぼす影響について (Fig. 4)

各温度区共に胚の分化・成長は光条件に左右されなかった。上記の発芽率が光条件に影響されなかったのは、このように胚が光条件に関係なく分化、成長したためであった。

5) 温度が胚の分化・成長に及ぼす影響について (Fig. 4)

15, 25°C 共に、発芽直前の EGR は約 0.6 で、有意な差は

なかった ($p < 0.05$, two-way analysis of variance)。それにもかかわらず、25°C で発芽率が低くなったのは、完全胚以降の幼根の成長が抑えられ、結果として種皮からの幼根の突出が起こらなかったためであった。一方、35°C では EGR は 0.4~0.5 程度にしかならず、分化も魚雷型胚の段階で停止した。このことから、35°C で未発芽だったのは、魚雷型胚以降の完全胚段階への分化・成長が抑制されたためであることが明らかとなった。

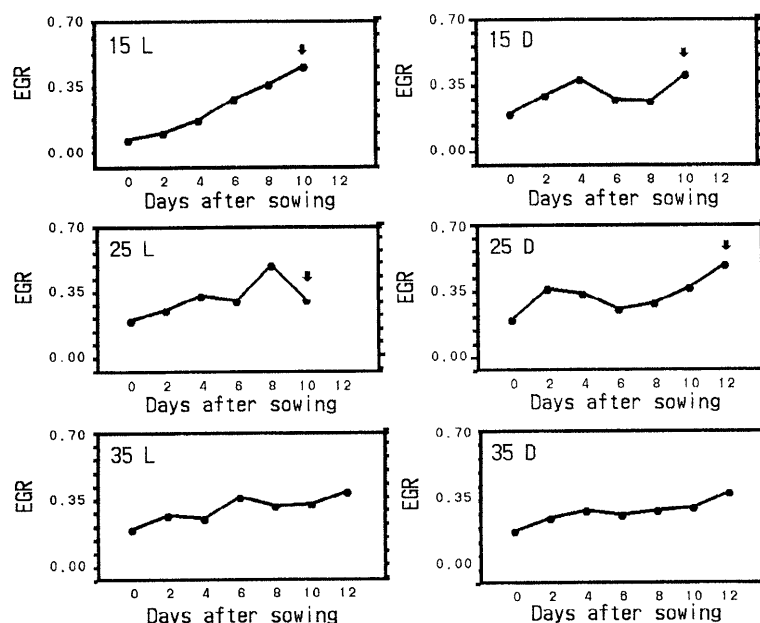


Fig. 4. Effects of Light and Temperature on Embryo Growth Rate (EGR)

↓, germination start. Experimental design and plot see in TABLE I. EGR is explained in Fig. 1.

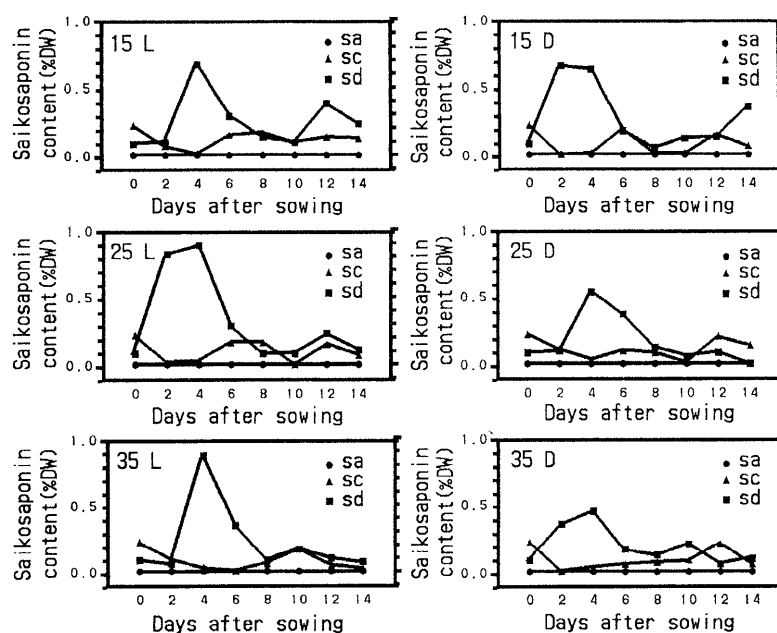


Fig. 5. Effects of Light and Temperature on Saikosaponin a, c and d Content (% DW) in Seed

●: sa, saikosaponin a, ▲: sc, saikosaponin c, ■: sd, saikosaponin d. Experimental design and plot see in TABLE I.

6) 光, 温度が saikosaponin a, c 及び d (sa, sc 及び sd) の含有率 (% DW) の消長に及ぼす影響について (Fig. 5)

L 区では, sa は置床前は未検出で, その後も発芽締切日まで一度も検出されなかった. sc は置床前は 0.22 (% DW) で, 置床後一旦は減少したが, 15 L, 25 L では 4 日目以降, また 35 L では 6 日目以降増加し, その後ほぼ一定となった

が, いずれも有意な消長ではなかった ($p < 0.05$, Friedman test). sd は置床前は 0.09 (% DW) と sc に比べると低くなったが, 置床後 4 日目まで急激かつ有意に増加し ($p < 0.05$, t -test, 以降同様), 0.7~0.9 (% DW) となり発芽試験中で最も高くなった. この時の含有率は, いずれも根部中の sd に匹敵するほどであったが⁶⁾, その後急激に減少し, 置床後 8 日目には有意に低くなった. その後再び増加

するが有意なものではなく、発芽締切日にはほぼ置床前のレベルに戻った。

D区のsa, scの消長は、L区とほぼ同じ傾向を示した。sdは置床後急激かつ有意に増加し、2もしくは4日目には実験中で最も高くなったが、この時期の含有率は、L区と異なり15, 25, 35℃と温度が高くなるにつれて有意に低くなった。置床後4日目以降は、L区同様sdは有意に低くなった。

結 論

本発芽実験で設定された光、温度条件下では、発芽率は光の有無に関係なく15℃が高く、25℃では著しく低下し、35℃では全く発芽しなかった。このことと胚の顕微解剖的観察結果より、球状胚～魚雷型胚までの分化・成長は15～35℃の範囲内なら可能であるが、それ以降の発根までの過程は25, 35℃では抑制され、胚の分化・成長が可能な温度は、球状胚～心臓型胚、魚雷型胚及び完全胚段階以降の幼根の成長と各段階毎に異なることが明らかとなった。

発芽過程中最も変動したのはsdで、胚の分化・成長の開始とほぼ同調して含有率は有意に増加し、その後置床前の含有率(% DW)に戻った頃には、胚の分化・成長もほぼ

停止していた。このsdの消長は光存在下では温度に左右されなかったが、光がない条件下では温度に左右される現象であった。現象論的な推測ではあるが、胚の分化・成長とsaikosaponin類の含有率(% DW)の消長は、同時期に同じ種子内で起こる現象ではあるが、これら2つの現象には直接的な関連はないものと推測された。

引用文献及び注

- 1) 本報告の一部は、日本生薬学会第39回年会(1992年9月、東京)及びXV International Botanical Congress, Yokohama, Japan, Aug.-Sep. 1993において発表された。
- 2) a) 藤田早苗之助, (財)日本公定書協会編, “新しい薬用植物栽培法”, 廣川書店, 東京, 1970, pp. 354-359; b) 厚生省薬務局監修, “薬用植物, 栽培と品質評価, Part 1”, 薬事日報社, 東京, pp. 53-62.
- 3) 川谷豊彦, 金木良三, 桃木芳枝, 日作紀, **45**, 243(1976).
- 4) 田中俊弘, 伊藤寿美, 酒井英二, 水野瑞夫, 川村智子, 久田陽一, 奥田和代, 野呂征男, 鄭 学忠, 方 鼎, 生薬, **42**, 236 (1988).
- 5) アルミニウム箔で包まれたD区と空気の出入りの状態が同じになるようにするため, 種子レベルでの照度は低下するが, L区のものにはサラン樹脂で包んだ。
- 6) 南 基泰, 杉野 守, 定岡麻衣子, 芦田 馨, 尾垣光治, 薬誌, **115**, 145 (1995).