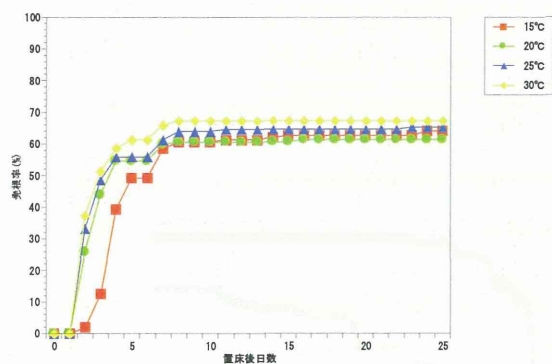
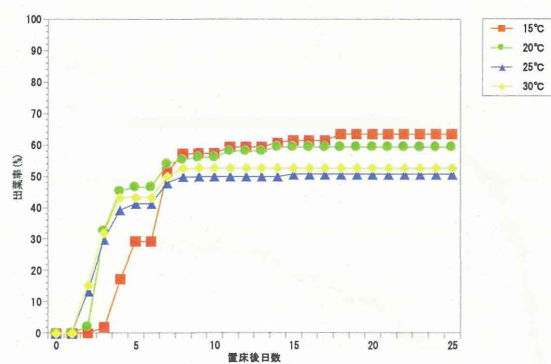


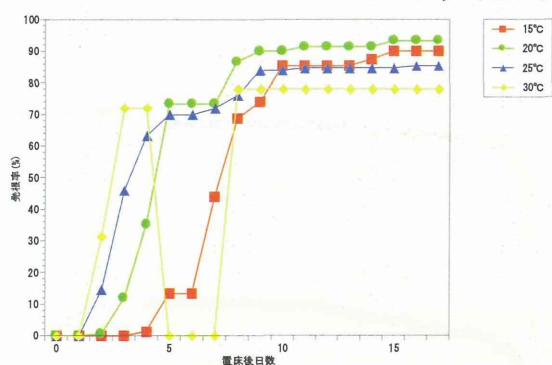


発根率

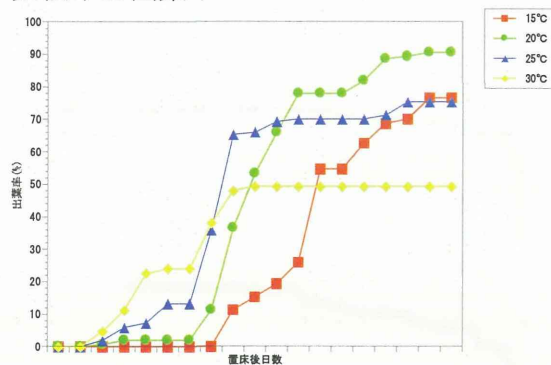


出葉率

コウヤカミツレの発根率と出葉率

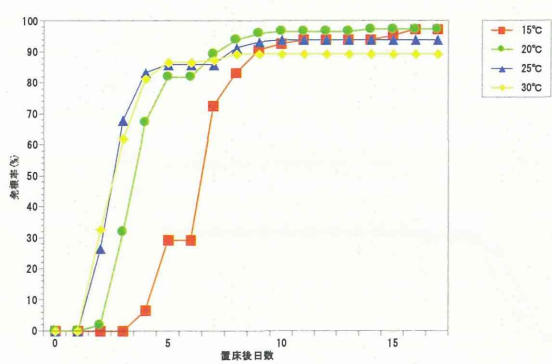


発根率

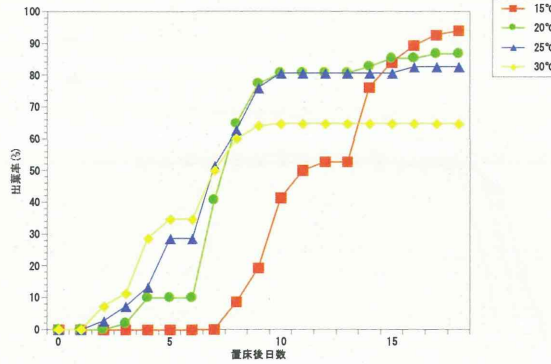


出葉率

ヒナタイノコズチの発根率と出葉率



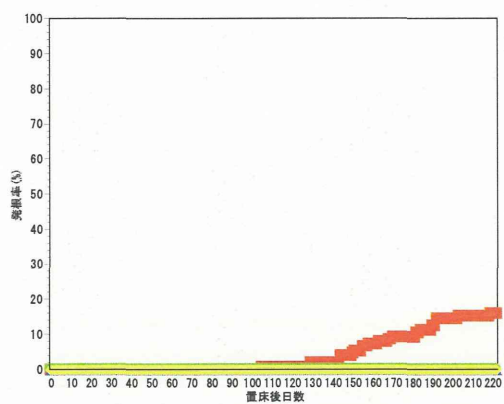
発根率



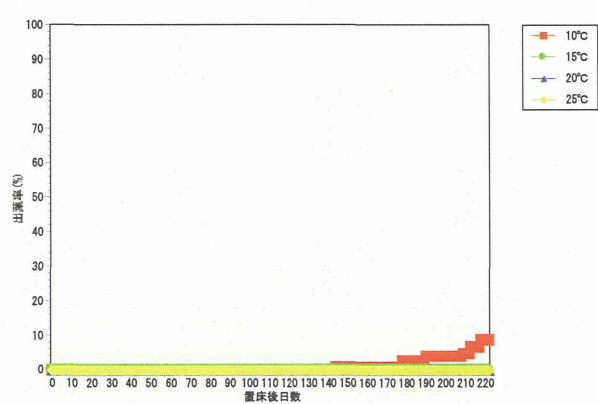
出葉率

トウイノコズチの発根率と出葉率

図1 発根率と出葉率の推移

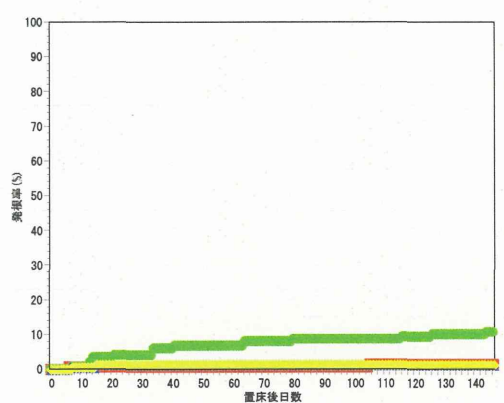


発根率

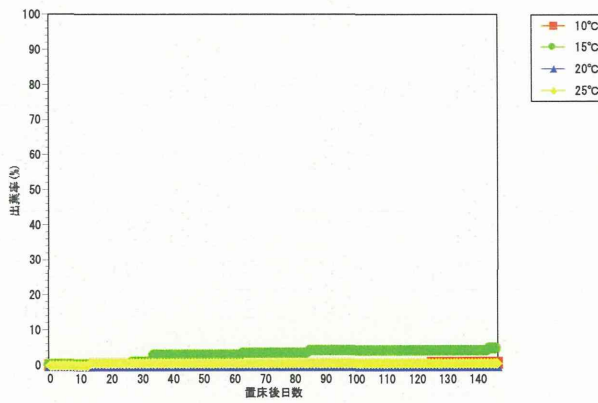


出葉率

サンシュユ無処理の発根率と出葉率



発根率



出葉率

図2 サンシュユ砂湿潤処理の発根率と出葉率

表3 サンシュユの発根率と出葉率の推移

サンシュユ（無処理）

温度 (℃)	反復	発根 開始日 (日 目)	開始 発根率 (%)	発根終了 日	最終 発根率 (%)	平均 発根所要 日数	出葉 開始日 (日 目)	開始 出葉率 (%)	出葉 終了日 (日 目)	最終 出葉率 (%)	平均出葉 所要日数
10	平均	93.7	2.7	172.0	16.0	166.5	177.3	0.7	207.3	8.0	196.6
	標準偏差	19.8	1.2	15.6	4.0	3.8	33.0	1.2	15.3	8.7	12.5
15	平均	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	標準偏差	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	平均	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	標準偏差	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
25	平均	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	標準偏差	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

サンシュユ（5℃砂湿润処理）

温度 (℃)	反復	発根 開始日 (日 目)	開始 発根率 (%)	発根終了 日	最終 発根率 (%)	平均 発根所要 日数	出葉 開始日 (日 目)	開始 出葉率 (%)	出葉 終了日 (日 目)	最終 出葉率 (%)	平均出葉 所要日数
10	平均	55.5	2.0	55.5	1.3	55.5	125.0	0.7	125.0	0.7	125.0
	標準偏差	70.0	0.0	70.0	1.2	70.0	—	1.2	—	1.2	—
15	平均	13.7	2.7	90.7	10.7	52.1	68.3	2.7	99.3	5.3	77.8
	標準偏差	7.0	1.2	54.5	1.2	40.0	65.6	1.2	59.4	2.3	60.7
20	平均	10.5	1.3	10.5	1.3	10.5	—	—	—	—	—
	標準偏差	6.4	1.2	6.4	1.2	6.4	—	—	—	—	—
25	平均	7.0	0.7	15.0	1.3	12.0	13.0	0.7	13.0	0.7	13.0
	標準偏差	—!	1.2	—	2.3	—	—	1.2	—	1.2	—



サンシュユ無処理 10℃（播種後 17 日）



サンシュユ無処理 15℃（播種後 17 日）



サンシュユ砂湿潤処理 10℃（播種後 17 日）



サンシュユ砂湿潤処理 15℃（播種後 17 日）

図 3 サンシュユの発芽

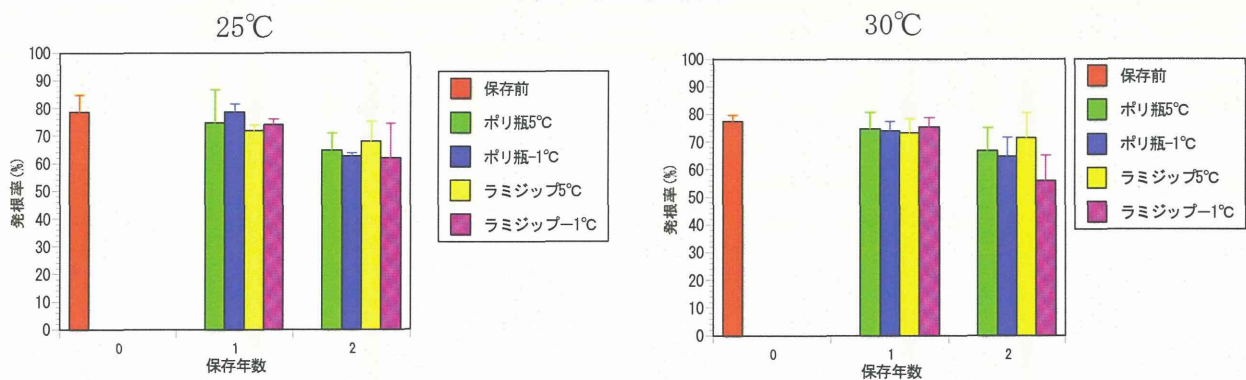
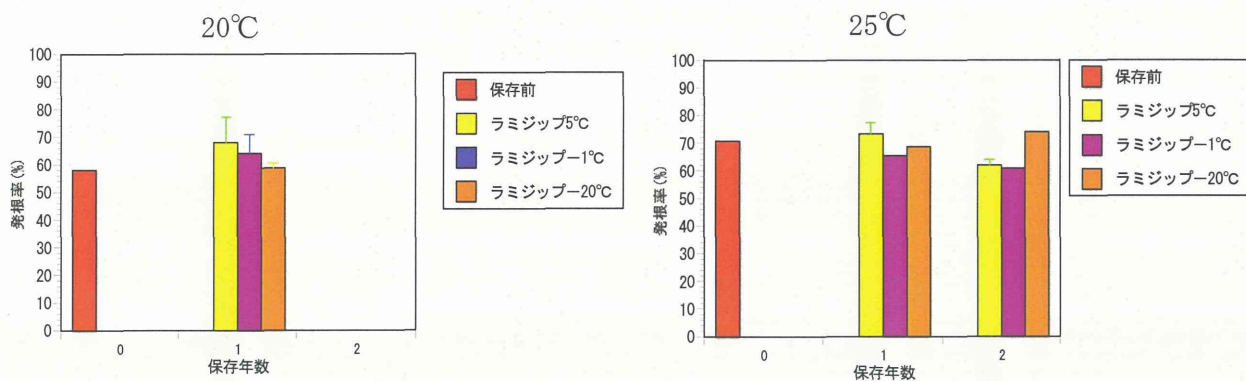
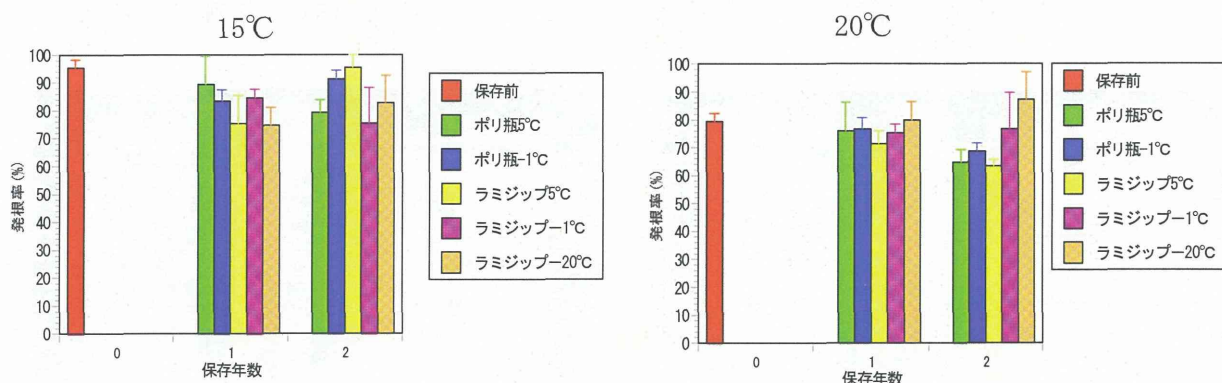
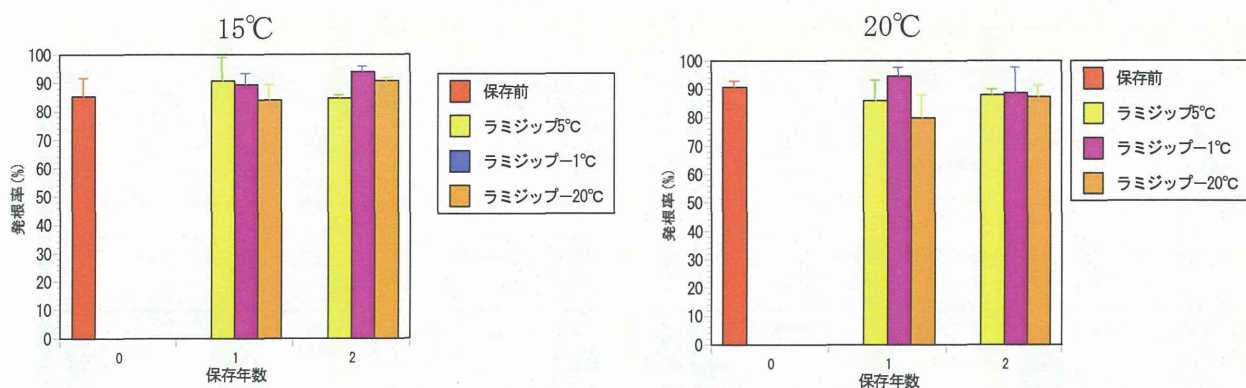


図4 保存種子の発根率の推移

表4 ハナトリカブトの収穫期の形質

稲わら区

	草丈 (cm)	茎数	茎径* (mm)	母根径 (mm)	母根長 (cm)	子根径 (mm)	子根長 (cm)	子いも 数
平均	37.9	1	13.5	23.7	7.6	29.1	12.1	4.4
標準偏差	5.5	0	2.8	4.4	2.7	7.1	2.4	2.1

裸地区

	草丈 (cm)	茎数	茎径* (mm)	母根径 (mm)	母根長 (cm)	子根径 (mm)	子根長 (cm)	子いも 数
平均値	37.3	1	17.9	27.7	11.2	25.3	12.7	6.9
標準偏差	7.9	0	3.8	3.9	2.1	3.7	3.4	2.4

シルバーマルチ区

	草丈 (cm)	茎数	茎径* (mm)	母根径 (mm)	母根長 (cm)	子根径 (mm)	子根長 (cm)	子いも 数
平均	38.9	1	14.6	24.6	6.6	21.3	5.5	4.3
標準偏差	8.6	0	2.8	2.8	1.7	7.2	5.0	3.1

* 地際部第一節間

表5 ハナトリカブトの収穫期の部位別の個体当たり乾重(g)
稲わら区

	地上部重	母根重	子根重	細根重
平均値	10.3	2.9	18.5	0.8
標準偏差	3.3	1.2	6.3	0.5

裸地区

	地上部重	母根重	子根重	細根重
平均値	11.4	5.5	27.3	1.7
標準偏差	6.3	2.6	11.7	0.9

シルバーマルチ区

	地上部重	母根重	子根重	細根重
平均値	16.0	3.6	11.9	0.2
標準偏差	6.3	2.4	12.1	0.3

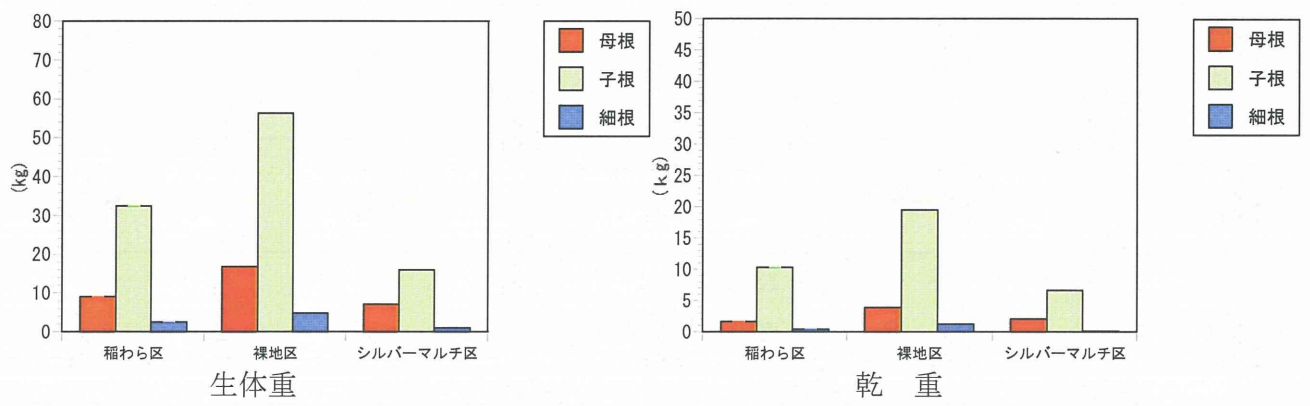


図5 ハナトリカブトの収穫期の1a当たり部位別根重



稲わら区 (2013.9.2)



裸地区(2013.9.2)



シルバーマルチ区(2013.9、2)

図6 ハナトリカブトの生育期

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
薬用植物、生薬の持続的生産を目指した新品種育成および新規栽培技術の開発
並びにこれらの技術移転の基盤構築に関する研究（H25-創薬-一般-003）
分担研究報告書

分担研究課題：種苗の効率的増殖法および保存に関する研究

研究分担者 吉松 嘉代 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部 室長
研究協力者 河野 徳昭 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部 主任研究員
研究協力者 乾 貴幸 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部 特任研究員
研究協力者 北澤 尚 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部 主任技術専門員
研究協力者 飯田 修 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部 研究員
研究協力者 田村 隆幸 富山県薬用植物指導センター 主任研究員

要旨 重要生薬である地黄、大黃の基原植物であるアカヤジオウ及びダイオウについて、植物組織培養による効率的増殖法の確立を行った。アカヤジオウについては、圃場栽培植物を材料に、ダイオウについては北海道研究部産種子を材料に、植物組織培養系の確立と、増殖維持法の検討及び高品質な種苗生産に有望な株の育成を行った。その結果、アカヤジオウでは、ショ糖2%含有1/2MS培地で継代培養と植物体再生が可能で、増殖効率の高い3クローンを、ダイオウでは1%ショ糖、0.5g/L MES、IBA 0.1 mg/L、BA 0.1 mg/L 含有MS培地での継代培養と植物体再生が可能で、生育の良好な1クローンの育成に成功し、これらのクローンが土壌へ移植後も正常に生育することを確認した。

A. 研究目的

生物多様性条約の発効に伴う世界各国における生物資源保護政策の強化により、また、地球規模での自然環境の悪化により、生薬原料となる野生植物が激減しており、特に、従来良品とされてきたものの確保が困難となっている。

本研究は、国内での増殖が困難あるいは交雑により含有成分が変化し易い、又は、病害虫に汚染されていない健全な漢方薬原料植物の安定的・戦略的確保のため、植物組織培養による優良株の選抜と継代維持及び効率的増殖法の確立を行い、種苗及び生薬生産の基盤を確立することを目的とする。

本研究では、季節、気候や土壌など、外的要因の影響受けない環境での安定した薬用

植物栽培を基盤とした研究を行うため、野外圃場等を利用した従来法に比べて効率化を図れ、極めて独創性が高い。また、本研究により培養苗由来の生薬の有効性、有用性が明らかとなり、製品化への道筋が示されれば、これまでにない全く新しい国内薬用植物生産方法を提供することができ、極めて独創的である。

従って、本研究で得られる成果は、漢方薬原料生薬の90%以上を中国等の海外からの輸入に依存している日本における漢方薬の安定的・持続的生産に貢献し、国民の健康の増進を図る上で、その意義は大きい。

B. 研究方法

1) 植物材料

アカヤジオウは筑波研究部圃場で栽培している植物の新芽が付いた根、ダイオウは、北海道研究部圃場栽培植物の種子を植物材料として用いた。

2) 植物材料の殺菌

植物材料をガーゼあるいはミラクロスで作製した袋に入れて、径 9 cm のガラスシャーレに入れ、75%エタノールで1分間殺菌し、滅菌水 50mL で洗浄後、植物材料の入った材料を 75%エタノールで殺菌したピンセットを用いて、ガラスビーカーに入れた殺菌液 (0.1% v/v Tween 20 を含む 3% w/v 次亜塩素酸ナトリウム溶液) に浸け、攪拌しながら室温 (約 25℃) で 15-20 分間殺菌した。クリーンベンチ内で植物材料の入った袋を滅菌した径 9 cm のガラスシャーレに入れ、滅菌水 50mL で 3 又は 7 回洗浄した。植物材料が入ったガラスシャーレに傾斜をつけて静置して余分な水分を取り除いた後、植物材料の入った袋を新しい径 9 cm の滅菌シャーレに移し、植付け片の調製又は種子の取り出しを行い、培地への植付けを行った。

3) アカヤジオウの殺菌と培養

筑波研究部圃場栽培植物 (茨城県産) (掘り上げ直後、あるいは培養土を入れた鉢に移植し、非閉鎖温室内で育成後) の根より新芽を含む約 3 cm の切片を調製し、前述の方法により殺菌後、茎頂片 (約 1 mm 長又は約 3 mm 長) を無菌的に取り出し、植物ホルモン含有、ショ糖 2%、主要無機成分が 1/2 の Murashige and Skoog[(2)/2MS] 固形培地 (0.25% Gelrite®で固化) に植付け、23℃、14 時間照明下で培養した。得られたシュート又はカルスは、各種培地に移植しながら培養を継続し、植物体再生、継代培養及び増殖条件を検討するとともに、生育が良好で増殖効率の高いクローンの選抜を行った。

4) ダイオウ種子の殺菌と培養

北海道研究部圃場栽培植物の種子の翼を切り落とし、前述の方法により殺菌後、植物ホルモン無添加 (HF)、(2)/2MS 固形培地に

植付け、20℃、14 時間照明下及び暗所で培養した。経時的に発芽を観察し、得られたシュート部を種々培地に植え付け、シュート増殖、発根、継代培養及び増殖条件を検討するとともに、生育が良好で増殖効率の高いクローンの選抜を行った。

5) ジオウ属植物及びダイオウ培養苗の水耕栽培

培養苗は、ゲルを流水で良く洗い流した後、軽石を支持体とする水耕栽培 (カイケイジオウ及びアカヤジオウ)、又はバーミキュライト (福島バーミ、目土・覆土用) を支持体とする水耕栽培 (ダイオウ培養苗) に供試した。

C. 研究結果

1) アカヤジオウ植物組織培養系、効率的増殖法の確立と優良クローンの育成

掘上直後の材料を外植片採取材料として用いた場合、約 1 mm 長の茎頂組織でのみ植物組織培養物の誘導が可能であった。非閉鎖温室内で 1 ヶ月間育成を行った新芽の場合は、茎頂片よりも滅菌成功率は劣るが、約 3 mm 長のシュート片からも植物組織培養物の誘導が可能であった (図 1)。

茎頂片をベンジルアデニン (BA) 1 mg/L 添加培地で 63 日間培養すると、17.4%の茎頂片にマルチプルシュートが形成した (シュート数: 3.5 ± 3.1 、図 1)。一方、シュート片をインドール酪酸 (IBA) 0.01 mg/L と BA 0.1 mg/L 添加培地で 36 日間培養すると 16.7%のシュート片にシュートが形成したが、その後、シュートが枯死するものが増加し、56 日間培養継続後、マルチプルシュート形成が認められたのは、わずか 1 シュート片であった (マルチプルシュート形成率: 5.6%、図 1)。

BA 1 mg/L 添加培地で茎頂片から誘導したマルチプルシュートよりシュート片を調製し、HF 培地に移植すると、再びマルチプルシュートが形成し、シュートの生育は良好であった。しかし、発根した植物体は得られなかった (図 2)。

HF 培地で形成した移植 1 代目のマルチプルシュートよりシュート片を調製し、各種培

地に植付け、発根と植物体再生を検討した。その結果、IBA 0.1 又は 0.5 mg/L 添加培地において、平均 50～60%の発根率が得られたが、HF 培地においても平均 33.3%の発根した再生植物体を得られた（図 3）。

HF 及び IBA0.01mg/L と BA0.1 mg/L を添加した培地で得られたシュート片は同培地へ移植、IBA 0.1 及び 0.5 mg/L 添加培地で得られたシュート片は、それぞれ IBA 1 及び IBA3 mg/L 添加培地へ移植したところ、全ての培地において、平均発根率の上昇が認められ、いずれのクローンも HF での植物体再生が可能なことを確認した（図 4）。

そこで上記植物体より約 1 cm 長のシュート片を調製し、HF 培地に移植したところ、さらに生育促進と発根率増殖が認められ、アカヤジオウ培養植物体は、HF 培地での継代維持、増殖及び植物体再生が可能であることが明らかとなった（図 5）。

育成した 6 クローンのうち、成長が早く、かつ植物体再生能が高く、さらにガラス化が生じにくい RehA1、RehA2 及び RehA4 の 3 クローンを優良クローンとして継代培養にて維持しており、約 2 ヶ月間での増殖効率 2.0～2.5 倍が得られている（図 6）。

得られたアカヤジオウ培養苗は、カイケイジオウ培養苗とともに、軽石を支持体とする水耕栽培を開始した（図 7）。

2) ダイオウ植物組織培養系、効率的増殖法の確立と優良クローンの育成

北海道研究部 2007 年産種子を無菌的に播種し、20℃、14 時間照明下で培養したところ、26 日後の発芽率（発根+子葉展開）は 96.7%であった（図 8）。得られた無菌実生より約 2 cm 長のシュート片を調製し、文献（昭和 63 年度共同研究報告書、道産生薬の品質向上と栽培・育成に関する研究、平成元年 3 月、北海道立衛生研究所、北海道立北見農業試験場、北海道立林業試験場、北海道立中央農業試験場）を参考に、種々濃度のナフタレン酢酸（NAA）と BA を添加した MS 固形培地に植付け、20℃、14 時間照明下で培養した。培養 35 日後、NAA0.1+BA3（いずれも

単位は mg/L、以下同様）、NAA0.5+BA3 で平均 2 本以上のシュート形成が認められた。一方、HF は旺盛な発根が認められるものの、形成シュート数は 1 本で、生育率も低かった（図 9）。

上記種々培地で増殖したシュートより約 2 cm 長のシュート片を調製してショ糖 3%含有 MS HF 固形培地、20℃、14 時間照明下で培養し、植物体の再生を検討した。その結果、移植前の培地が HF、BA0.5、NAA0.1+BA3、NAA0.5+BA1 のシュート片からは発根した再生植物体を得られた（図 10）。

文献情報では発根に 1/2MS 培地を用いている。そこで、上記 MS HF で育成させたシュートより約 2 cm 長のシュート片を調製して種々濃度の IBA を添加した 1%ショ糖含有 1/2MS 固形培地に植付けて 20℃、14 時間照明下で培養し、植物体の再生を検討した。その結果、IBA0.1 は HF に比べて発根率が上昇したが、IBA0.5 では逆に低下した。また、1/2MS 培地での生育率は MS 培地に比べて低かった（図 11）。

移植 3 代目のシュート片（約 2 cm 長）を HF、NAA0.1+BA3、NAA0.5+BA3（いずれもショ糖 3%含有 MS 固形培地）に植付け、増殖と植物体再生を検討した。培養 23 日後に NAA0.1+BA3 では、平均シュート数 1.5 本、発根率 40.0%であり、本培地で植物体の増殖と再生の両方が可能であることが判明した（図 12）。そこで、本培地での継代培養（培養期間 36～87 日）を行った。

上記ダイオウ培養シュート及び植物体は、NAA0.1+BA3 培地での継代培養を経るごとに、生育が不良となるものが多くなり、生存本数が少なくなった。そこで、シュート片を NAA0.1+BA1、IBA0.1+BA1 培地（いずれもショ糖 3%含有 MS 固形培地）に植付け増殖と植物体再生を検討した。培養 23 日後、発根した再生植物体は得られなかったが、IBA0.1+BA1 培地において良好な生育の回復が認められた（図 13）。

さらに IBA0.1+BA1 培地で継代培養を行い、シュート増殖を行った。なお、個々の種子由来植物に番号を振って継代培養を行っ

た結果、本培地での生育が良好で増殖能が高い1クローン (RpSA13) を得た (図14)。

IBA0.1+BA1 培地で増殖させた RpSA13 シュートよりシュート片 (約2 cm 長) を調製し、種々濃度の NAA または IBA と BA を含み、さらに 0.5 g/L MES、1% ショ糖含有 MS 固形培地に植付け、シュート増殖と植物体再生を検討した。培養43日後、MES(1)IBA0.01+BA0.1 培地が最も平均シュート数が多く (2.3 本)、生育も良好であった (図15)。

上記種々培地で培養して得たシュートより調製したシュート片 (約2 cm 長) を MES(1)IBA0.01+BA0.1 培地に植付けてシュート増殖と植物体再生を検討した。培養46日後、シュート増殖及び生育が良好で、発根も認められた (図16)。その後、本培地での継代培養を行った。

さらに発根率上昇を目的に培地を MES(1)IBA0.1+BA0.1 に変更した。本培地での発根率上昇は認められなかったが、平均シュート数が2.1本とMES(1)IBA0.01+BA0.1よりも良好なため、現在は本培地での継代培養による増殖を行っている (図17)。得られた培養苗は、バーミキュライトを支持体とする水耕栽培での生育が良好であることを確認した (図18)。

D. 考察

アカヤジオウの植物組織培養系の誘導にあたっては、堀上直後の圃場栽培植物の根に形成した新芽を材料とする場合は、約1 mm 長の茎頂片の取り出しが必要で、さらに、シュート誘導までは2ヶ月間以上の培養期間が必要であった。一方、圃場から掘り上げた植物体を、一旦、温室内で、きれいな培養土を用いて栽培することで、より滅菌成功率の高い約3mm 長のシュート片を採取出来ることが判明し、この手法の方が技術普及には適していると思われる。

アカヤジオウでは、継代培養を行いながら培養条件を検討し、より手間がかからず、安価な HF 培地での継代維持、増殖が可能な優良クローンが3クローン得られた。

一方、ダイオウにおいては、植物組織培養系の継代維持、植物体増殖には、植物ホルモン (IBA0.1+BA0.1) が必須であり、また、低濃度のショ糖 (1%) と培地の pH 安定化に使用される MES が有効であった。ダイオウ植物組織培養物の継代維持、増殖、再生用培地として確立した本培地は、他の実生由来植物体の生育の回復に有効であった。

水耕栽培及び圃場栽培での培養苗の形質調査が今後の課題である。

E. 結論

薬用植物資源研究センター筑波研究部保有のアカヤジオウより、増殖能の高い培養植物体3クローンの育成と、継代培養方法を確認した。さらに、北海道研究部保有のダイオウ種子を材料に、増殖能の高い培養植物体1クローンの育成と、継代培養方法を確認した。

F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 吉松嘉代、乾貴幸：植物工場における薬用植物の栽培・生産、特産種苗、**16 (9)**、35-41 (2013)。

2. 学会発表

1) 吉松嘉代、松本敏一、岩本嗣、乾貴幸、飯田修、寺岡秀興、河野徳昭、川原信夫：漢方薬に使用される薬用植物の組織培養及び効率的増殖法に関する情報整備 (3)。第31回日本植物細胞分子生物学会大会 (2013. 9. 10-12、札幌)

2) 吉松嘉代、乾貴幸、河野徳昭、飯田修、北澤尚、菱田敦之、川原信夫：ジオウ属植物の植物組織培養による増殖と資源化に関する研究。日本薬学会134年会 (2014. 3. 28-30、熊本)

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

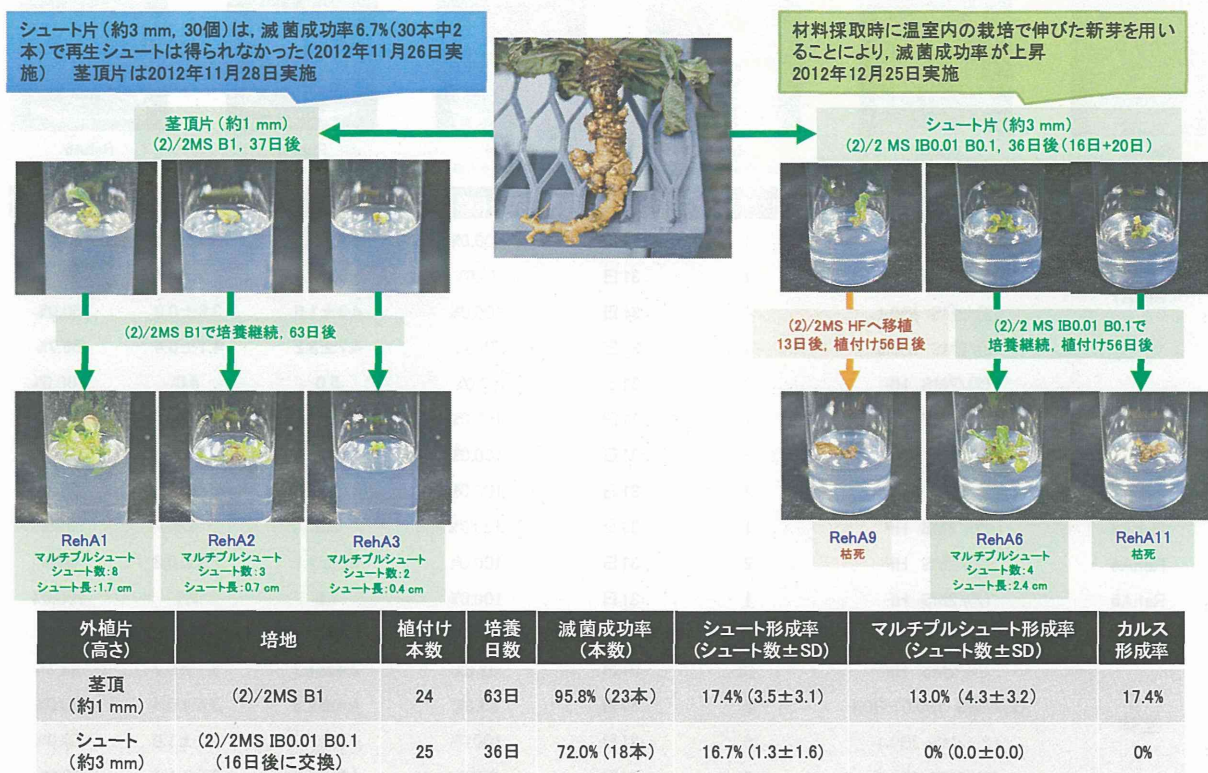


図1. アカヤジオウ (RehA) 無菌培養系の誘導



図2. アカヤジオウ (RehA) シュートの増殖と育成 (移植1代目)

							
RehA1 (2)/2MS HF 発根	RehA2 (2)/2MS HF 発根	RehA3 (2)/2MS HF 未発根	RehA4 (2)/2MS HF 未発根	RehA5 (2)/2MS HF 発根	RehA6 (2)/2MS HF 発根		
クローン	培地	植付け本数	培養日数	シュート形成率	シュート数	シュート長cm	発根率
RehA1	(2)/2MS HF	4	31日	100.0%	2.3±2.5	3.3±0.6	25.0%
	(2)/2MS IB0.01 B0.1	4	31日	75.0%	5.0±2.6	3.3±0.4	0.0%
	(2)/2MS IB0.1	4	31日	100.0%	4.8±1.5	3.6±0.3	50.0%
	(2)/2MS IB0.5	4	31日	75.0%	4.7±3.2	4.1±0.4	66.7%
RehA2	(2)/2MS HF	2	31日	50.0%	5.0	4.0	100.0%
	(2)/2MS IB0.01 B0.1	2	31日	100.0%	3.5±2.1	3.6±0.6	50.0%
	(2)/2MS IB0.1	2	31日	100.0%	2.5±2.1	2.1±1.3	50.0%
	(2)/2MS IB0.5	2	31日	100.0%	3.0±2.8	2.6±2.3	50.0%
RehA3	(2)/2MS HF	1	31日	100.0%	3.0	4.0	0.0%
RehA4	(2)/2MS HF	2	31日	100.0%	2.5±2.1	2.3±0.3	0.0%
RehA5	(2)/2MS HF	1	31日	100.0%	1.0	2.1	100.0%
RehA6	(2)/2MS HF	3	31日	100.0%	2.0±0.0	3.0±0.4	33.3%
全体	(2)/2MS HF	13	31日	92.3%	2.4±1.7	3.1±0.7	33.3%
	(2)/2MS IB0.01 B0.1	6	31日	83.3%	4.4±2.3	3.4±0.4	20.0%
	(2)/2MS IB0.1	6	31日	100.0%	4.0±1.9	3.1±1.0	50.0%
	(2)/2MS IB0.5	6	31日	83.3%	4.0±2.8	3.5±1.4	60.0%

図3. アカヤジオウ (RehA) 植物体の再生 (移植2代目)

								
RehA1 (2)/2MS HF 発根	RehA2 (2)/2MS HF 発根	RehA3 (2)/2MS HF 発根	RehA4 (2)/2MS HF 発根	RehA5 (2)/2MS HF 発根	RehA6 (2)/2MS HF 発根			
クローン	前培地	移植培地	植付け本数	培養日数	シュート形成率	シュート数	シュート長cm	発根率
RehA1	(2)/2MS HF	同左	4	38日	100.0%	3.5±5.0	3.6±1.5	75.0%
	(2)/2MS IB0.01 B0.1	同左	9	38日	100.0%	3.9±2.9	3.2±0.6	55.6%
	(2)/2MS IB0.1	(2)/2MS IB1	9	38日	100.0%	3.1±2.2	3.9±0.6	100.0%
	(2)/2MS IB0.5	(2)/2MS IB3	9	38日	100.0%	1.3±1.0	3.9±0.8	100.0%
RehA2	(2)/2MS HF	同左	4	38日	100.0%	2.5±1.9	3.2±1.1	50.0%
	(2)/2MS IB0.01 B0.1	同左	5	38日	100.0%	5.8±3.1	4.1±0.6	20.0%
	(2)/2MS IB0.1	(2)/2MS IB1	4	38日	100.0%	2.0±2.0	3.8±0.7	100.0%
	(2)/2MS IB0.5	(2)/2MS IB3	3	38日	100.0%	1.0±0.0	3.9±1.5	100.0%
RehA3	(2)/2MS HF	同左	2	38日	100.0%	1.0±0.0	2.9±0.1	100.0%
RehA4	(2)/2MS HF	同左	3	38日	100.0%	5.3±3.5	4.0±0.5	100.0%
RehA5	(2)/2MS HF	同左	1	38日	100.0%	1.0	2.8	100.0%
RehA6	(2)/2MS HF	同左	6	38日	83.3%	1.4±0.9	3.3±0.3	66.7%
全体	(2)/2MS HF	同左	20	38日	95.0%	2.6±2.9	3.4±0.9	78.9%
	(2)/2MS IB0.01 B0.1	同左	14	38日	100.0%	4.6±3.0	3.5±0.7	42.9%
	(2)/2MS IB0.1	(2)/2MS IB1	13	38日	100.0%	2.8±2.1	3.8±0.6	100.0%
	(2)/2MS IB0.5	(2)/2MS IB3	12	38日	100.0%	1.3±0.9	3.9±0.9	100.0%

図4. アカヤジオウ (RehA) 植物体の再生 (移植3代目)



図5. アカジャジオウ (RehA) 植物体の再生 (移植4代目)

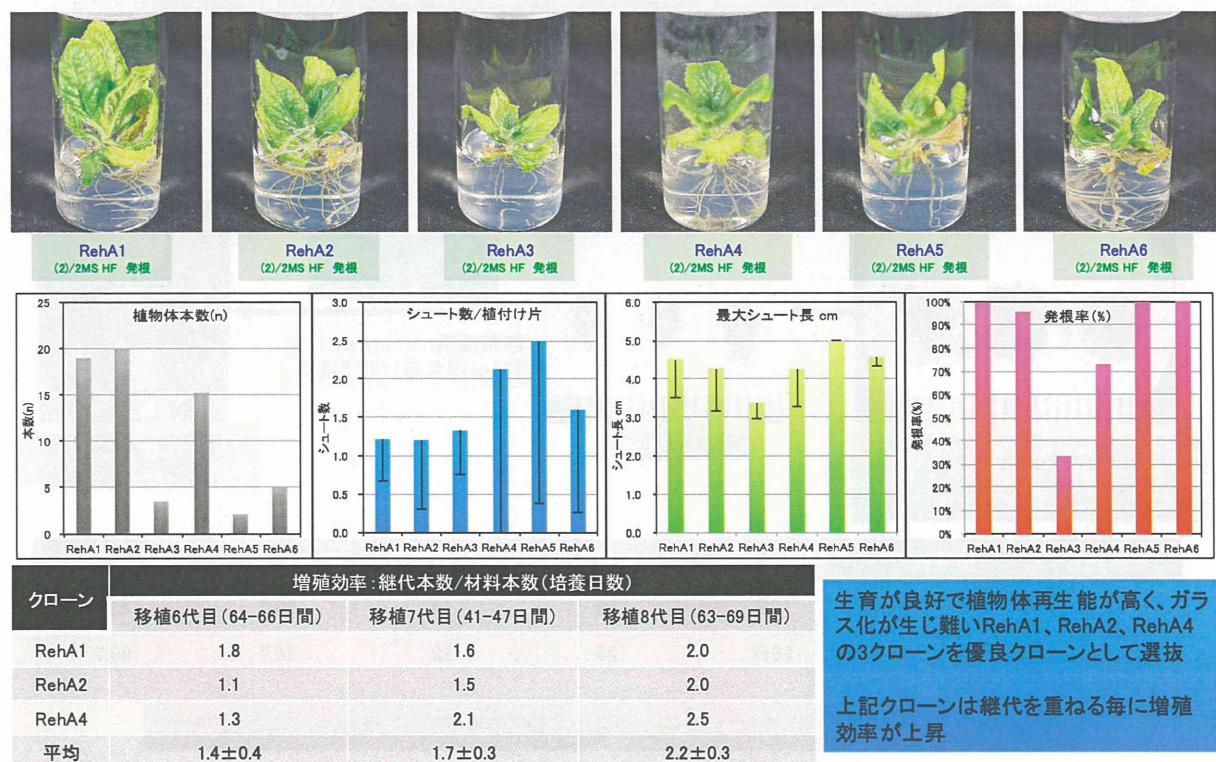


図6. アカジャジオウ (RehA) 植物体の再生 (移植5代目以降)

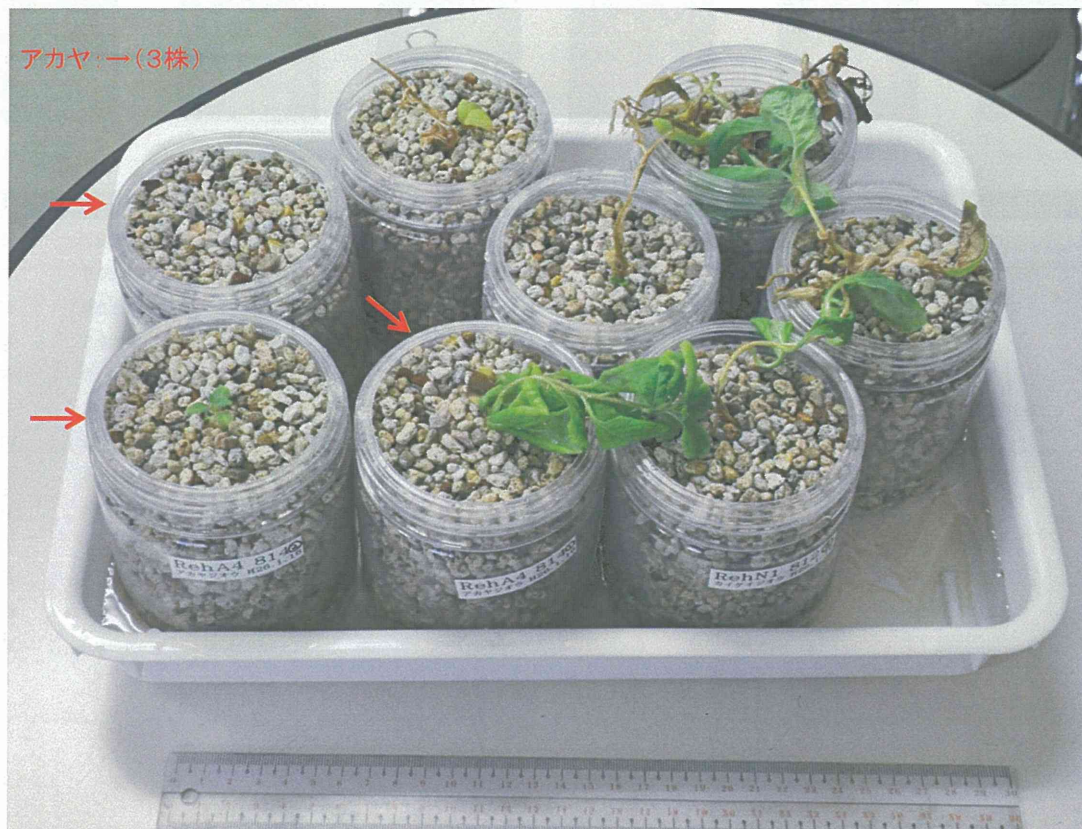


図7. アカヤジオウ (RehA) 及びカイケイジオウ (RehN) 培養苗の水耕栽培 (移植直後)



植物記号	播種数	播種後日数	発根数	子葉展開数	発根率%	子葉展開率%
RpSA	30	12日	29	13	96.7	43.3
		26日	29	29	96.7	96.7

低温(4℃)で保管したダイオウ種子は3年7ヵ月間保管後も高い発芽率を示す

図8. ダイオウ (*Rheum palmatum* L.) 無菌培養系の誘導

植物ホルモン(mg/L)	本数	生育率	シュート数(平均±SD)	草丈 cm(平均±SD)	発根率	発根数(平均±SD)	カルス化
HF	2	50.0%	1.0 ± 0.0	8.4	100.0%	8.0	-
BA0.5	3	100.0%	1.0 ± 0.0	5.9 ± 3.1	66.7%	2.0 ± 1.4	+~+++
BA1	3	100.0%	1.0 ± 0.0	5.4 ± 2.2	0.0%	0.0	++
BA3	3	100.0%	1.3 ± 0.6	4.2 ± 1.1	33.3%	1.0	+~++
NAA0.1+BA0.5	3	100.0%	1.0 ± 0.0	6.3 ± 1.2	0.0%	0.0	+~+++
NAA0.1+BA1	3	100.0%	1.3 ± 0.6	7.2 ± 1.3	0.0%	0.0	+++~+++
NAA0.1+BA3	3	66.7%	2.3 ± 2.3	6.4 ± 0.2	50.0%	2.0	+++
NAA0.5+BA0.5	3	100.0%	1.3 ± 0.6	5.6 ± 0.6	0.0%	0.0	+++
NAA0.5+BA1	3	100.0%	1.3 ± 0.6	4.4 ± 0.4	33.3%	3.0	+++
NAA0.5+BA3	3	100.0%	2.3 ± 1.2	5.8 ± 0.8	0.0%	0.0	+++

Culture conditions: MS medium containing 3% sucrose and 0.25% Gelrite® (San Ei Gen FFI, Inc.), 20°C, 14 hour Light for 35 days
 HF: Phytohormone-free, BA: 6-benzylaminopurine, NAA: 1-naphthaleneacetic acid
 カルス化 (Callusing) -: not observed, +: Slightly, ++: Obviously, +++: Vigorously

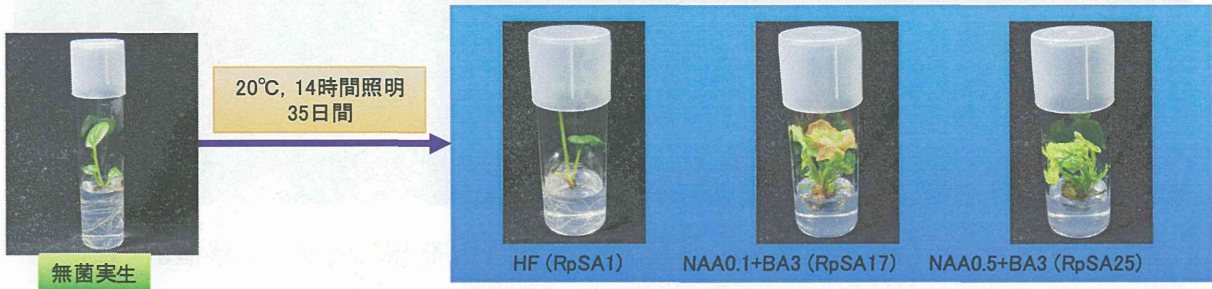


図9. ダイオウ (*Rheum palmatum* L.) シュートの増殖 (その1: 移植1代目)

植付け培地	前培地	本数	生育率	シュート数(平均±SD)	草丈 cm(平均±SD)	発根率	発根数(平均±SD)	カルス化
HF	HF	3	33.3%	1.0	6.0	100.0%	5.0	-
	BA0.5	4	50.0%	1.0 ± 0.0	5.0 ± 2.8	100.0%	5.5 ± 3.5	-
	BA1	3	66.7%	2.0 ± 1.4	6.9 ± 4.7	0.0%	0.0	+++
	BA3	4	75.0%	2.3 ± 0.6	3.3 ± 1.0	0.0%	0.0	+~++
	NAA0.1+BA0.5	3	66.7%	1.0 ± 0.0	7.7 ± 2.1	0.0%	0.0	+++
	NAA0.1+BA1	4	75.0%	1.3 ± 0.6	5.8 ± 2.3	0.0%	0.0	+++
	NAA0.1+BA3	5	100.0%	2.2 ± 0.8	3.9 ± 1.0	60.0%	3.3 ± 1.5	+~+++
	NAA0.5+BA0.5	4	50.0%	1.5 ± 0.7	7.3 ± 1.3	0.0%	0.0	+~++
	NAA0.5+BA1	4	75.0%	1.3 ± 0.6	4.1 ± 1.4	33.3%	5.0	+~+++
	NAA0.5+BA3	7	85.7%	1.5 ± 0.5	5.3 ± 1.9	0.0%	0.0	+~+++

Culture conditions: MS medium containing 3% sucrose and 0.25% Gelrite® (San Ei Gen FFI, Inc.), 20°C, 14 hour Light for 34 days
 HF: Phytohormone-free, BA: 6-benzylaminopurine, NAA: 1-naphthaleneacetic acid
 カルス化 (Callusing) -: not observed, +: Slightly, ++: Obviously, +++: Vigorously



図10. ダイオウ (*Rheum palmatum* L.) シュートの発根 (その1: 移植2代目)

植付け培地(mg/L)	本数	生育率	シュート数 (平均±SD)	草丈 cm (平均±SD)	発根率	発根数 (平均±SD)	カルス化
1/2MS(1) HF	5	40.0%	1.0 ± 0.0	3.8 ± 0.4	20.0%	17.0	-
1/2MS(1) IBA0.1	4	50.0%	1.0 ± 0.0	4.8 ± 0.4	100.0%	4.0 ± 0.0	-
1/2MS(1) IBA0.5	4	25.0%	1.0	6.7	0.0%	0.0	-

Culture conditions: 20°C, 14 hour Light for 26 days

1/2MS(1): 1/2MS medium containing 1% sucrose and 0.25% Gelrite® (San Ei Gen FFI, Inc.)

HF: Phytohormone-free, IBA: Indole-3-butyric acid

カルス化 (Callusing) -: not observed, +: Slightly, ++: Obviously, +++: Vigorously



図11. ダイオウ (*Rheum palmatum* L.) シュートの発根 (その2: 移植3代目)

植付け培地 (mg/L)	本数	生育率	シュート数 (平均±SD)	草丈 cm (平均±SD)	発根率	発根数 (平均±SD)	カルス化
HF	10	90.0%	1.1 ± 0.3	4.8 ± 2.5	70.0%	4.0 ± 3.6	-
NAA0.1+BA3	10	60.0%	1.5 ± 0.5	6.2 ± 2.2	40.0%	4.0 ± 2.2	+~+++
NAA0.5+BA3	10	80.0%	2.0 ± 1.1	5.9 ± 1.8	0.0%	0.0	+~+++

Culture conditions: MS medium containing 3% sucrose and 0.25% Gelrite® (San Ei Gen FFI, Inc.), 20°C, 14 hour Light for 23 days

HF: Phytohormone-free, NAA: 1-naphthaleneacetic acid, BA: 6-benzylaminopurine

カルス化 (Callusing) -: not observed, +: Slightly, ++: Obviously, +++: Vigorously



図12. ダイオウ (*Rheum palmatum* L.) シュートの増殖 (その2: 移植3代目)

植付け培地 (mg/L)	本数	生育率	シュート数 (平均±SD)	草丈 cm (平均±SD)	発根率	カルス化
NAA0.1+BA1	4	75.0%	1.7 ± 0.6	2.4 ± 1.1	0.0%	-
IBA0.1+BA1	5	80.0%	1.3 ± 0.5	4.9 ± 2.0	0.0%	-

Culture conditions: MS medium containing 3% sucrose and 0.25% Gelrite® (San Ei Gen FFI, Inc.), 20°C, 14 hour Light for 23 days
 HF: Phytohormone-free, NAA: 1-naphthaleneacetic acid, BA: 6-benzylaminopurine, IBA: Indole-3-butyric acid
 カルス化 (Callusing) -: not observed, +: Slightly, ++: Obviously, +++: Vigorously



図13. ダイオウ (*Rheum palmatum* L.) の増殖と植物体再生 (移植7-8代目)

植物	植付け培地(mg/L)	本数	生育率	シュート数 (平均±SD)	草丈 cm(平均±SD)	発根率
RpSA13	IBA0.1+BA1	5	100.0%	2.4 ± 1.3	9.3 ± 3.3	0.0%

Culture conditions: MS medium containing 3% sucrose and 0.25% Gelrite® (San Ei Gen FFI, Inc.), 20°C, 14 hour Light for 37 days
 BA: 6-benzylaminopurine, IBA: Indole-3-butyric acid



図14. ダイオウ (*Rheum palmatum* L.) の増殖と植物体再生 (移植9代目)

植物	植付け培地(mg/L)	本数	生育率	シュート数(平均±SD)	草丈 cm(平均±SD)	発根率
RpSA13	MES(1) NAA0.01+BA0.1	3	66.7%	2.0 ± 0.0	7.5 ± 0.0	0.0%
	MES(1) NAA0.1+BA1	3	66.7%	1.5 ± 0.7	7.4 ± 1.2	0.0%
	MES(1) IBA0.01+BA0.1	3	100.0%	2.3 ± 0.6	7.4 ± 0.5	0.0%
	MES(1) IBA0.1+BA1	3	100.0%	1.3 ± 0.6	8.0 ± 3.0	0.0%

Culture conditions: , 20℃, 14 hour Light for 43 days
MES(1):MS medium containing 0.5 g/L MES, 1% sucrose and 0.25% Gelrite® (San Ei Gen FFI, Inc.)
NAA: 1-naphthaleneacetic acid, BA: 6-benzylaminopurine, IBA: Indole-3-butyric acid



図15. ダイオウ (*Rheum palmatum* L.) の増殖と植物体再生 (移植10代目)

植物	植付け培地 (mg/L)	前培地 (mg/L)	本数	生育率	シュート数 (平均±SD)	草丈 cm (平均±SD)	発根率	発根数 (平均±SD)
RpSA13	MES(1) IBA0.01+BA0.1	MES(1) NAA0.01+BA0.1	5	80.0%	1.5 ± 1.0	8.6 ± 1.6	50.0%	4.5 ± 4.9
		MES(1) NAA0.1+BA1	4	25.0%	1.0	12.0	100.0%	7.0
		MES(1) IBA0.01+BA0.1	7	71.4%	1.4 ± 0.5	9.5 ± 1.8	20.0%	7.0
		MES(1) IBA0.1+BA1	4	25.0%	2.0	6.0	100.0%	7.0
		全体	20	55.0%	1.5 ± 0.7	9.1 ± 2.0	45.5%	6.0 ± 2.8

Culture conditions: , 20℃, 14 hour Light for 46 days
MES(1):MS medium containing 0.5 g/L MES, 1% sucrose and 0.25% Gelrite® (San Ei Gen FFI, Inc.)
NAA: 1-naphthaleneacetic acid, BA: 6-benzylaminopurine, IBA: Indole-3-butyric acid



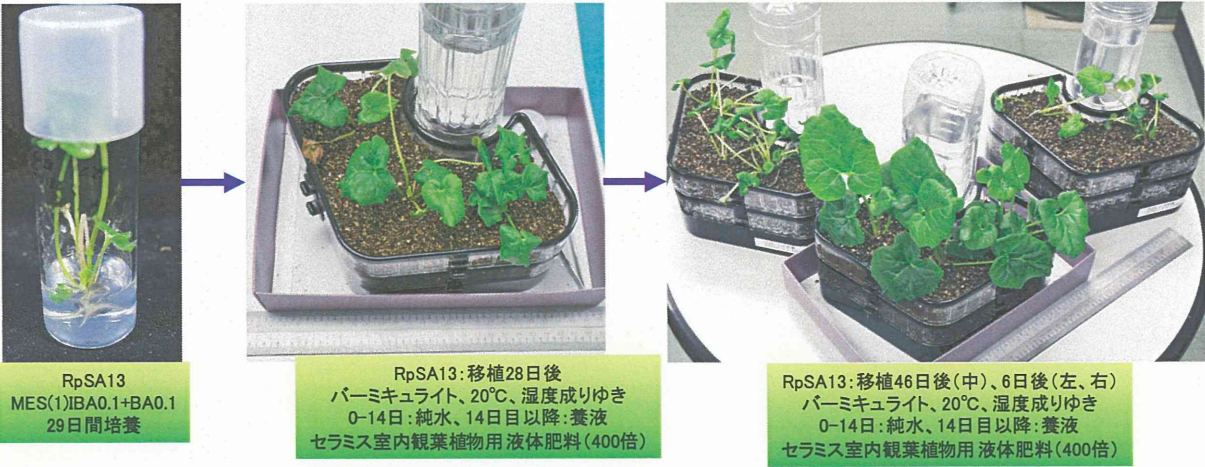
図16. ダイオウ (*Rheum palmatum* L.) の増殖と植物体再生 (移植11代目)

植物	植付け培地 (mg/L)	前培地 (mg/L)	本数	生育率	シュート数 (平均±SD)	草丈 cm (平均±SD)	発根率	発根数 (平均±SD)
RpSA13	MES(1) IBA0.1+BA0.1	MES(1) IBA0.01+BA0.1	50	94.0%	2.1 ± 1.1	11.1 ± 1.8	34.0%	13.5 ± 8.0

Culture conditions: , 20℃, 14 hour Light for 61-64 days
MES(1): MS medium containing 0.5 g/L MES, 1% sucrose and 0.25% Gelrite® (San Ei Gen FFI, Inc.)
IBA: Indole-3-butyric acid, BA: 6-benzylaminopurine, IBA: Indole-3-butyric acid



図17. ダイオウ (*Rheum palmatum* L.) の増殖と植物体再生 (移植17代目)



ダイオウ培養苗 (RpSA13) は、パーミキュライトを支持体とする水耕栽培が可能

図18. ダイオウ (*Rheum palmatum* L.) 培養苗の水耕栽培