

201208015A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

優良形質を持った薬用植物新品種の育成
及びそれら種苗の安定供給体制構築のための保存、
増殖に関する基盤的研究

平成24年度 総括・分担研究報告書
(H22-創薬総合-指定-015)

研究代表者 飯田 修

平成25（2013）年3月

目 次

I. 総括研究報告

- 優良形質を持った薬用植物新品種の育成及びそれら種苗の安定供給体制構築のための保存、増殖に関する基盤的研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
飯田 修

II. 分担・協力研究報告

1. 選抜育種による新品種育成と普及および種苗増殖に関する研究・・・・・・・・・・ 25
川原信夫、飯田 修、菱田敦之、林 茂樹、杉村康司
2. 選抜育種による品種育成、種苗の増殖および普及に関する研究
-カンゾウおよびシクヤクの優良系統の育成およびその普及-・・ 31
林 茂樹、菱田敦之、高上馬希重
3. 新品種育成及び種苗増殖に関する研究
-ハトムギ3系統の栽培比較試験研究-・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 39
杉村康司、飯田 修、香月茂樹
4. 外来遺伝子導入による品種作出を目指した基盤的技術の研究・・・・・・・・・・ 44
河野徳昭、乾 貴幸
5. 遺伝子マーカーの解明による品種識別技術の確立・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 52
河野徳昭、乾 貴幸
6. DNA塩基配列情報に基づく薬用植物の品種識別法の開発に関する研究・・・・・・・・ 59
菱田敦之、林 茂樹
7. 生薬シコン中のシコニン類の定量法の検討について・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 64
渕野裕之、竹脇大気、菱田敦之、林 茂樹
8. 薬用植物の発芽試験法および効率的増殖法に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 69
熊谷健夫
9. 薬用植物の発芽試験法に関する研究
-種子の発芽力簡易検定の検討-・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 90
飯田 修、杉村康司
10. 保存種子の形質変異に関する実証試験研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 93
-ハトムギ保存種子の形質変異に関する栽培研究-
杉村康司、飯田 修、香月茂樹
11. セリバオウレンおよびウラルカンゾウの培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 97
林 茂樹、菱田敦之、吉松嘉代、飯田 修
12. ウコンおよびショウガの培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験・ 102
飯田 修、杉村康司、吉松嘉代、林 茂樹
13. 人工環境制御下での種苗の保存と効率的増殖に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 108
吉松嘉代、河野徳昭、乾 貴幸、北澤 尚、飯田 修、御影雅幸、根岸直希
14. 薬用植物栽培における農薬の適正使用に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 126
菱田敦之、林 茂樹

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

134

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成24年度総括研究報告書

優良形質を持った薬用植物新品種の育成及びそれら種苗の安定供給体制構築のための
の保存、増殖に関する基盤的研究
(H22-創薬総合-指定-015)

研究代表者

飯田 修（独）医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 種子島研究リーダー

薬用植物の国内栽培を推進するためには、各地域の環境に適した収量性の高い、日本薬局方の品質基準を満たす品種の育成と、それらの種苗の安定供給が必要である。そこで、本研究では①新品種の育成と普及に関する研究、②種苗の保存に関する研究および③種苗の効率的増殖法に関する研究を行う。本年度、以下の研究について行った。

①新品種の育成と普及に関する研究では、薬用植物資源研究センターで育成したハトムギ品種‘北のはと’および‘はとろまん’の普及の促進と拡大を図るため、生産栽培および試験栽培の現地実態調査と栽培指導を行った。平成24年度北海道内における‘北のはと’の生産量は、作付面積が18.5 ha、規格品の収穫量が32.7トン、規格品外と合わせた総生産量が34.4トンであった。4月にハトムギ‘北のはと’を原料とした日本薬局方ヨクイニンが発売され、7月にハトムギ入りのべひや麦が製品化された。埼玉県秩父市で‘はとろまん’の試験栽培を行い、11,643m²の圃場から合計427.62 kgの乾燥果実を収穫した(36.73 kg/10 a)。新品種の育成に関する基盤的研究では、昨年度に第二次選抜したカンゾウの高GL系統No.70およびNo.10の栄養繁殖による種苗増殖を試みた。シャクヤクについては、品種登録申請中の‘べにしずか’および次期品種登録申請候補のNo.513について種苗増殖および栽培5年目株の収量調査を実施した。ハトムギの新品種の育成を目指し、種子島選抜系統、‘あきしずく’および岡山在来種の3系統の栽培比較試験を行った。エレクトロポレーションにより緑色蛍光タンパク質遺伝子導入ベクターをナイモウオウギ種子へ導入したところ、ベクターコントロール導入系統と比較し、緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した系統特異的に約7%の実生で顕著な緑色蛍光を認めた。さらに、これら実生を約1ヶ月育成した植物体の本葉よりゲノムDNAを抽出し、PCRによりゲノムDNAへのsGFP遺伝子の挿入を確認した。ウラルカンゾウのグリチルリチン生合成経路の鍵酵素のCYP72A154遺伝子のゲノムDNA配列をもとに系統間の識別を試みた結果、本遺伝子もカンゾウ属植物優良系統の系統間識別に有用であることが明らかとなった。ウラルカンゾウ北農試系の来歴を明らかにするため、DNA塩基配列情報に基づく産地の推定と文献等の調査を行った。生薬シコンのシコニン色素含量評価法として分光測色計を用いた方法を検討した結果、HPLC法によるシコニン類定量合計値と測色計測定値と非常に良い相関を示し、本方法は生薬シコンのシコニン系色素含量を測定する新しい測定法になると考えられた。

②種苗の保存に関する研究では、種子の発芽条件の規格化を図るため、オトギリ

ソウ、キキョウ、メボウキ、カワミドリ、ウイキョウ、ニラ、カミツレ、コロシント、ノリアサ、オランダセンニチ、キバナオランダセンニチ、チョウセンアザミ、アサガオについて発芽、子葉展開に及ぼす温度条件の影響について調査し、それぞれの植物について発芽試験法の規格化の検討を行った。また、ムラサキの発芽は低温湿潤処理をすると発芽率が高くなることを明らかにし、さらに、採取年が異なるインドジャボクの種子を用いて、テトラゾリウム塩 (TTC:2, 3, 5-Triphenyl-2H-tetrazolium Chloride) による発芽力の簡易検定法について検討した。ハナトリカブトの効率的増殖法を検討するため、裸地と稲わら被覆処理の比較栽培試験を行った。保存種子の形質変異に関する実証試験では、2009年から保存を開始したハトムギ種子を3年間継続して栽培した結果、生育相、外部形態および生育ともに、それぞれの特性を維持していることが明らかになった。培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験では、セリバオウレン、ウラルカンゾウ、ウコンおよびショウガについて培養苗と圃場苗について生育関連形質を比較した結果、セリバオウレンでは培養苗が根茎増殖率および根重が圃場苗を上回り、カンゾウでは培養苗は生育が旺盛になる一方、グリチルリチン含量が低下することが明らかとなった。ウコンおよびショウガの培養苗由来根茎は、生薬生産用および種苗生産用双方の種苗としての適性が高いと判断した。

③種苗の効率的増殖法に関する研究では、奈良県産のカイケイジオウを材料に、植物組織培養による効率的増殖方法を確立し、薬用植物資源研究センター保有のアカヤジオウより培養シュートの育成と増殖に成功した。また、内モンゴル産シナマオウ種子より、増殖能の高いシュート培養の育成と、継代培養方法を確立した。さらに、富山県産のイトヒメハギを材料に、無菌シュートの育成に成功した。これらの成果により、人工環境制御下での生薬生産技術構築のための基盤を確立した。カノコソウ栽培における登録農薬除草剤の適用拡大のため、ロロックス水和剤、トレフアノサイド乳剤およびレナパック水和剤3種の土壌処理型除草剤の効果、薬害、一部の薬剤について残留値を試験した。

研究分担者

川原信夫

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター センター長

淵野裕之

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 研究室長

吉松嘉代

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 研究室長

菱田敦之

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 北海道研究サブリーダー

熊谷健夫

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 主任研究員

河野徳昭

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 主任研究員

杉村康司

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 研究員

林 茂樹

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 研究員

研究協力者

乾 貴幸

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 特任研究員

北澤 尚

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 技術専門員

香月茂樹
（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 客員研究員
御影雅幸
金沢大学薬学部 教授
高上馬希重
北海道医療大学薬学部 准教授
竹脇大気
東京理科大学薬学部
根岸直希
日本製紙株式会社

A. 研究目的

長寿社会で重要な役割が期待される漢方薬やサプリメントの原料生薬や薬用植物は、現在国内使用量の80%以上が低価格な中国やアジア諸国など海外からの輸入に依存している。しかし、それらの国々の経済発展並びに乱獲等による資源枯渇にともない価格が高騰しつつある。一方、中国における土壌汚染および農薬問題等、安全性の面から生産履歴の明確な国内生産品を求める意見が業界からも高まっており、品質の一定した安全な生薬を生薬を医療の場へ安定的に供給することは、国民の健康を保証する立場からも必要となっている。薬用植物の国内栽培を推進するためには、栽培技術の改良研究とともに、各地域の気象条件や環境に適した収量性の高い、日本薬局方の品質基準を満たす品種の育成が必要であるが、それらの組織的な研究は行われておらず、新品種の育成は急務である。新品種の育成には、従来の選抜育種法とともに、組織培養や外来遺伝子の導入による短期間での育成技術の確立や、育成品種の知的財産権保護のためのDNAマーカーの解明が必要であり、一部の農産物では既に実用化されている。

このような状況に対処するために、薬用植物の選抜育種法による新品種育成と普及および種苗増殖に関する研究、外来遺伝子導入など先端的な品種育成技術や品質評価法の研究、および育成品種の権

利保護のためのDNAマーカーに関する研究を行い、さらに種子の発芽試験法および種子の発芽能力の簡易検定法の確立や長期保存の影響、培養苗由来再生植物体の形質への影響および種苗の効率的増殖方法を明らかにし、薬用植物栽培における農薬の適性使用について検討し、育成された品種の種苗を安定して供給可能とする体制を構築することを目的として研究を行った。

本研究の結果は国内での薬用植物栽培生産を促進し、生産履歴の明確な生薬や薬用植物の安定確保に貢献できるものであり、品質が均一で安全な原料生薬を将来にわたって医療の場へ安定的に供給することによって医療の安心や国民の健康に大きく貢献することが期待される。

B. 研究方法

【新品種の育成に関する基盤的研究】

(1) 選抜育種による品種育成、種苗の増殖および普及に関する研究

1) 薬用植物資源研究センターで育成したハトムギ品種‘北のはと’の生産栽培と試験栽培および‘はとろまん’の試験栽培を行い、普及状況および生育状況を調査し、栽培指導を行った。

‘北のはと’の生産栽培は北海道士別市、二海郡八雲町、滝川市、虻田郡豊浦町で、試験栽培は名寄市で行った。‘はとろまん’の試験栽培は、埼玉県秩父市上吉田の休耕田を利用して行った(川原、飯田、菱田、林、杉村)。

2) カンゾウについては、昨年度に二次選抜したグリチルリチン酸高含有系統

(高GL系統) No. 70およびNo. 10の栄養繁殖による種苗増殖を試みた。また、各系統の種子繁殖適性を評価するために栽培1年目の開花個体率を測定したほか、No.10の自殖第一代(S₁)の生育およびGL含量を調査し、種子繁殖の可能性について検討した。

シャクヤクについては、品種登録申請

中の‘べにしずか’および次期品種登録申請候補のNo.513について種苗増殖および栽培5年目株の収量調査を実施したほか、埼玉県秩父市で実証栽培を行っている‘べにしずか’の生育を調査した(林、菱田、高上馬)。

3)種子島など九州地域で生産栽培可能なハトムギの新品種の育成を目指して、種子島在来種選抜系統、‘あきしずく’、岡山在来種の3系統の栽培比較試験を行った(杉村、飯田、香月)。

(2)外来遺伝子導入による品種作出を目指した基盤的技術の研究

従来法による形質転換が困難なマメ科のナイモウオウギを材料に、種子への高効率直接遺伝子導入のため、前年度までに確立した種子の硬実打破・育成条件並びにエレクトロポレーション(EP)条件に従って遺伝子導入を行い、育成植物体における遺伝子導入確認を行った。

[EP処理]減圧処理後の種子を氷上で冷却したEP処理用のチャンバー(CUY495P10)に入れ、電極をセットした後、抵抗値が40-50Ωになるようにキューベット内のEP buffer量を調節し、EP装置(CUY21, NEPA GENE)によりパルスを加えた。さらに、氷上で2分間静置した後、電極を逆にして再度同条件でパルスを加えた。EP処理した種子を使用したbufferとともに培養シャーレに戻し、氷上で冷却しながら1時間養生した。

[芽生えの蛍光観察]育成した種子及び芽生えを実体蛍光顕微鏡VG-05シリーズ(キーエンス)を用いて、緑色蛍光観察には、バンドパスフィルターFF01-513/17-25(励起波長455-490 nm, 透過中心波長513 nm, Semrock)を、赤色 α 蛍光観察には、バンドパスフィルターFF01-593/40-25(励起波長530-560 nm, 透過中心波長593 nm, Semrock)を使用して実生の各蛍光を観察した。

[ゲノムDNA調製] グロースチャンバ

一内で育成した形質転換植物体の葉1枚をビーズ破碎装置MS-100で破碎し、DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用いてゲノムDNAを抽出した。

[PCRによる導入遺伝子の検出] 上記ゲノムDNAを鋳型に、GoTaq Green Master Mix(Promega)を用いたPCRを行い、1%アガロースゲル電気泳動により、目的遺伝子のゲノムDNAへの挿入を確認した(河野、乾)。

(3)遺伝子マーカーの解明による品種識別技術の確立

生薬カンゾウの基原植物のひとつであるウラルカンゾウにおいて、水耕栽培で良好な生育及び高グリチルリチン酸含量を示す優良系統をモデルとして、グリチルリチン生合成経路上の11-オキソ- β -アミリン30位酸化酵素(CYP72A154)遺伝子のゲノムDNA配列に着目し、それらの多型情報をもとに系統間の識別を試みた。3つの優良系統(Gu2-3-2, GuTS71-08 IV1, GuTS71-08 IV2)から、CYP72A154遺伝子のゲノムDNA塩基配列情報を収集し、各優良系統間で配列を比較した。

ウラルカンゾウ植物試料

本実験では、以下のウラルカンゾウ(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)優良系統3系統を対象とした。

- GuTS71-08系統(北海道農業試験場系統由来の実生由来):2系統(GuTS71-08 IV1, GuTS71-08 IV2)
- Gu2系統(北海道医療大学系統 導入番号TS301-07シュートより誘導した培養植物のサブクローン):1系統(Gu2-3-2)

CYP72A154 遺伝子ゲノム DNA 配列の多型情報の解析

1)イントロン領域の解析

ゲノム情報がデータベース上に登録されているタルウマゴヤシ、ダイズ等マメ科植物のCYP72Aファミリー遺伝子のゲノムDNAの情報より、CYP72A154遺伝子の5つのエキソン及び4つのイントロ

ンからなるゲノム DNA 構造を予測し、データベース上の CYP72A154 遺伝子のコーディング配列 (AB558153.1) をもとに、各イントロンを含む領域を増幅するプライマーを設計し、CYP72A154 遺伝子のイントロン領域を中心とする塩基配列情報を収集した。

識別対象試料より DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて調製したゲノム DNA を鋳型とし、KOD plus (TOYOBO) を用いて PCR を行い、増幅産物は 1% アガロースゲル電気泳動により確認した。

2) エキソン領域の解析

上記で得られたイントロン配列情報をもとに各配列に特異的な部位にプライマーを設計し、データベース上のコーディングシーケンスをもとにエキソン配列の末端に設計したプライマーとともに、2720 Thermal Cycler (ABI 製) を用いて、対象試料より調製したゲノム DNA を鋳型とし、KOD plus により PCR を行った。PCR 産物は、illustra ExoStar を用いて精製し、PCR ダイレクトシーケンスにより塩基配列を解析した (河野、乾)。

(4) DNA塩基配列情報に基づく薬用植物の品種識別法の開発に関する研究

北海道研究部で保存するウラルカンゾウ北農試系の来歴を明らかにするため、DNA塩基配列情報に基づく産地の推定と文献等の調査を行った。

供試材料：北海道研究部に保存されているウラルカンゾウ *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 保存系統の北農試系、医療大系および北大系の3系統。

鋳型DNAの調製：それぞれのサンプルの葉 (約100mg) から、細断・Lysis処理の後、フェノール/クロロホルム抽出法により鋳型DNA溶液を調製した。

ターゲット領域の増幅：植物の種および品種の識別で汎用される葉緑体DNAおよびリボソームDNAの3領域をターゲット領域とした。増幅は、Invitrogen Platinum Taq DNA polymeraseを用いた。

塩基配列の決定：シーケンス反応にはABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitを用い、シーケンス解析にはABI 3100 Genetic Analyzerを用いた (菱田、林)。

(5) 生薬シコニン中のシコニン類の定量法の検討について

生薬シコニンのシコニン色素含量評価法として分光測色計を用いた方法を検討した。

抽出溶媒としては、shikonin 類が脂溶性であることから酢酸エチルとエタノール混合溶液にて抽出した。シコニン系色素は赤色および青色による強い呈色を示すため、分光測色計による分析を行ない、HPLC による定量結果との相関性を検討した。

検討用試料として、北海道研究部にて栽培されているムラサキについて物理性が異なる2つの土壌について生育したシコニン中のシコニン系色素含量を検討するための試料を用いた。

Shikonin 誘導体のうち、

Shikonin (SK)

Acetylshikonin (ASK)

Isobutyrylshikonin (IBSK)

β -hydroxyisovalerylshikonin (HISK)

β , β -dimethylacrylshikonin (DMASK)

の5種類の一斉定量を行った。

分光測色計 コニカミノルタ製 CM-5 を用いた。

試料溶液調製方法 粉碎して乾燥した試料 0.5 g を精密に遠沈管に測りとり、酢酸エチル/エタノール混液(1:1)20 mL を加えて 20 分間振り混ぜた。その後遠心分離を行い、上澄液をとり 50 mL のメスフラスコに移す。残さにさらに酢酸エチル/エタノール混液(1:1)20 mL を加えて振り混ぜ、遠心分離後にメスフラスコに加え、さらに酢酸エチル/エタノール混液(1:1)を加えて正確に 50 mL とし試料溶液とした。

分光測色計における試料は上記調製試料

をそのまま用いた。2 mm ガラスセルを用いた液体透過率測定により、L*a*b*の表色系にて数値を算出した(瀧野、竹脇、菱田、林)。

【種苗の保存に関する基盤的研究】

(1) 薬用植物の発芽試験法および効率的増殖法に関する研究

1) 発芽試験の規格化

薬用植物種子の発芽条件の規格化を図るため、オトギリソウ、キキョウ、メボウキ、カワミドリ、ウイキョウ、ニラ、カミツレ、コロシント、ノリアサ、オランダセンニチ、キバナオランダセンニチ、チョウセンアザミ、アサガオの発根、出葉に及ぼす温度条件の影響について調査し、それぞれの植物について発芽試験法の規格化を検討した。

蓋付きプラスチックケースにろ紙を2枚敷き発芽床(78 x 142 mm)にする。発芽床は、10~12 mLの蒸留水で湿潤させた。50粒の種子を置床し、温度15~30°C(一定)に設定したインキュベーター内で発芽試験を行った。発芽試験時の照明条件は、12時間の明暗サイクルで行った。各温度条件ともに3反復で試験を行った。発芽の確認：発根時および出葉(子葉展開)時の2段階で確認した。

2) 種子発芽に及ぼす低温湿潤処理の影響
材料：ムラサキ *Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zucc. 2010年産北海道研究部産種子を用いた。

試験1

- (1) 5°Cラミジップ保存(120日)無処理
- (2) 5°C砂湿潤処理120日(砂と種子を混合し、蓋付きスチロール角形ケースに入れ、湿潤状態にして、5°Cの恒温器に120日保存した。)

試験2

- (1) 5°Cラミジップ保存(296日)無処理
- (2) 5°C砂湿潤処理246日(砂と種子を混合し、蓋付きスチロール角形ケースに入れ、湿潤状態にして、5°Cの恒温器に246

日保存した。)

(3) -1°Cラミジップ保存(296日)無処理
蓋付きスチロール角形ケース(148×84×32 mm)1個に種子50粒置床、下記温度条件下でそれぞれ3反復で実施。
試験温度：発芽チャンバーを用い、10、15、20、25°Cの恒温条件で行った。
照明条件：明暗各12時間 発芽の確認：発根時および出葉(子葉展開)時の2段階で確認した。

3) ハナトリカブトの効率的増殖法に関する研究

試験方法：材料 ハナトリカブト(*Aconitum carmichaeli* Debx.)

0871-09 北海道研究部からの導入系統
方法：植え付け 2011年10月26日
施肥(kg/10a) 基肥：堆肥2000、苦土石灰100、化成(8-8-8)50、ようりん20
追肥：2012年4月10日 化成(8-8-8)50、ようりん20

試験区 稲わら区：120cm幅 2条植え
株間30cm 稲わら被覆は2012年5月8日~
収穫まで行った。裸地区：条間70cm 株間20cm

収穫 2012年10月3日 各区20個体
収穫、収穫後、50°C48時間で乾燥、乾物重を測定した(熊谷)。

(2) 種子の発芽力簡易検定の検討

種子の発芽力を確認するための簡易検定法を見出すため、テトラゾリウム塩(TTC)法について、インドジャボク種子を用い検討を行った。

種子は種子島研究部で保存している植物から採取し、5°Cで保存している種子を用いた。染色は2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium Chloride (TTC) (和光純薬工業KK) 1%濃度溶液を用いた。

異なる採取年種子の検討：2006年、2007年、2009年および2011年産種子を用い、種子を被う固い殻を半分に割り、そのままの状態ですべて25°C下、1%TTC液に48時間浸

漬し、その後胚を取り出し染色程度を観察した。各年産種子100粒を供試した。同じ種子を用い、土を入れた育苗箱に播種し、加温温室内で発芽させた。播種は2012年2月22日に行い、各年産種子50粒を供試した。採取年毎の発芽率を調査し、TTC液による胚の染色程度との関係について検討した（飯田、杉村）。

(3) 保存種子の形質変異に関する研究

長期保存した種子の形質の変異を確認するため、2009年に採種し冷蔵保存したハトムギ種子を用い、2010年から3年間継続して栽培を行い、形質について調査した。

2009年に種子島研究部で採取した種子島在来種の種子を用い、種子島研究部第9圃場で栽培した。播種は、2010年と2012年共に3月17日と4月19日に固定した。畝幅60cm、株間20cmに統一し、2粒ずつ点播し、発芽後1本仕立てに間引きした。

生育相調査は、発芽開始日、発芽揃い日、出穂開始日、出穂期、開花開始日、開花盛期に加えて、収穫日、発芽率を記録し、2010年と2012年の調査結果を比較した。特性調査は3月播種が8月上中旬、4月播種が8月中下旬に実施した。調査は、草丈、最上位果の高さ、茎数、稈径、主稈節数、分枝数、稈実果実数、稈実率、稈実果実の乾燥重量、稈実果実の100粒重について行い、2010年と2012年の調査結果を比較した（杉村、飯田）。

(4) 培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験

1) セリバオウレンおよびウラルカンゾウの培養苗由来の再生植物体形質変異に関する研究実証試験

セリバオウレン

材料：

培養苗：筑波育種生理研究室において、WPG 固形培地、20℃、14時間照明（100 lux）の条件で培養した丹波オウレンを苗

とした。2010年5月13日に赤玉が充填されたポリポットにおいて室内で順化し、5月27日に温室へ、また7月1日に野外へ移動。

圃場苗：基盤研植物番号 5415-69HK（丹波オウレン）を2012年4月23日に圃場より掘上げて苗を作成。

栽培方法：

1/5000a ワグネルポットにポットエース、ピートモス、バーミキュライトをそれぞれ体積比 2：1：1 で混合した配合土を1.6kg 充填し、2012年5月1日に各7ポットへ重量を測定した苗を定植した。寒冷紗を被覆した屋外において、灌水は1日2回、肥料はハイポネックスを適宜施用した。

調査：

2012年5月2日に花茎数、10月29日に草丈、茎数、頂小葉の色（分光測色計、 $L^*a^*b^*$ 表色系）、新鮮重（根茎）、乾物重（茎葉重、根茎重および根重、50℃乾燥）を各区7個体測定した。また、種根茎重と収穫した根茎重（新鮮重）から根茎の増加率を算出した。

ウラルカンゾウ

材料：

培養苗：筑波育種生理研究室において組織培養されたウラルカンゾウ苗（医療大系、Gu2-5-2）を2012年4月16日にビニルポットへ植え替え、温室内で育苗した。圃場苗：基盤研植物番号 13905-96HK（医療大系）を2012年5月18日に掘上げストロン苗を作成した。

栽培方法：

基肥として炭酸カルシウム 100 kg/10 a が施用された北海道研究部圃場（褐色低地土、北海道名寄市）へ、2012年5月28日に株間 50cm、畝間 80cm で各苗を定植した。追肥として、6月26日に化成肥料 N 8 kg、P 8 kg、K 8 kg/10 a（IBS1 80 kg/10 a）を施用。

調査：

2012年8月6日に草丈、茎数を、10月29日に根頭径、根数(>2mm)、ストロンおよび根の新鮮重および乾物重(50°C乾燥)を測定した。また、苗の重量と収穫時の地下部(ストロン+根)の重量から地下部増殖率を算出した。さらに、乾燥根を微粉碎し、グリチルリチン酸(GL)含量を日本薬局方に準じて測定した(林、菱田、吉松、飯田)。

2) ウコンおよびショウガの培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験

材料：培養苗は筑波研究部育種生理研究室で育成、継代培養されたウコン(種子島在来種)およびショウガ(品種：三州)株を用いた。圃場苗はウコンでは種子島研究部保存の種子島在来種を、ショウガでは2012年にタキイ種苗より購入した品種‘三州’を用いた。ウコン、ショウガともに圃場苗と培養苗に用いた親植物の起源は異なった。

馴化および育成：培養由来苗の育成は、2010年5月18日および7月21日に、腐葉土を用いポリポットに移植後温室内で馴化し、2011年1月24日に根茎を温室内の土中に保存した。2011年5月16日に根茎を取り出し、直径15cmの素焼き鉢に1鉢1根茎を植え付け、温室内で育成し、2012年1月30日に根茎を温室内の土中に保存した。

圃場栽培：培養苗および圃場苗由来のウコン、ショウガのそれぞれの根茎を2012年5月25日に野外圃場に定植した。

地上部の生育調査はウコンが11月9日、ショウガが11月29日に行った。収穫はウコンが2013年1月29日、ショウガが2012年11月28日に行った。根茎の調査はウコンが1月29日、ショウガが11月30日に行った(飯田、杉村、吉松、林)。

【種苗の効率的増殖法に関する研究】

(1) 人工環境制御下での種苗の保存と効率的増殖に関する研究

重要生薬である地黄、麻黄及び遠志の基原植物であるカイケイジオウ、アカヤジオウ、シナマオウ及びイトヒメハギについて、組織培養による効率的増殖法を検討した。

1) 植物材料

カイケイジオウは、奈良県で生産されている圃場栽培植物の根茎(新芽付き)、アカヤジオウは筑波研究部圃場で栽培している植物の根茎(新芽付き)、シナマオウは、金沢大学医薬保健学域薬学類・創薬科学類附属薬用植物園で栽培されている植物より採取した種子、イトヒメハギは、富山大学薬用植物園圃場で栽培している植物より採取した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9cm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2%又は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°C)で10-20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9cmのガラスシャーレに入れ、滅菌水50mLで3回(但し、アカヤジオウシュート及びイトヒメハギ種子の再殺菌時は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9cm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) カイケイジオウの殺菌と培養

根茎より新芽を含む約1cmの切片を調製して殺菌後、痛んだところと外側の葉を取り除いて約0.5cm長のシュート片を調製して植物ホルモン無添加(2)/2MS固

形培地 [(2)/2MS HF] に植付け、23°C、14時間照明下で培養した。6日後、雑菌の繁殖が無い切片を種々培地に移植し、形態形成を観察した。さらに得られた培養シュートを種々培地で培養し、増殖法を検討した。

4) アカヤジオウの殺菌と培養

根茎より新芽を含む約1 cmの切片を調製して殺菌後、約1-3mm長のシュートあるいは茎頂片を調製してベンジルアデニン (BA) 1mg/1 添加 (2)/2MS 固形培地 [(2)/2MS B1] 又は IBA 0.01 mg/1 と BA 0.1 mg/1 添加 (2)/2MS 固形培地 [(2)/2MS IB0.01 B0.1] に植付け、23°C、14時間照明下で培養した。

5) シナマオウ種子の発芽と増殖

シナマオウ種子を殺菌後、(2)/2MS HF に植付け、23°C、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、生育及び発根を検討した。また、培養シュートより挿し穂 (頂芽を含む3節程度) を調製して光独立栄養培養に供し、発根を検討した。

6) イトヒメハギ種子の発芽と培養

イトヒメハギ種子を殺菌後、(2)/2MS HF に植付け、23°C、14時間照明下及び暗所で培養した。経時的に発芽及び雑菌の混入の有無を観察し、雑菌の混入が見られた種子は、培養試験管より取り出し、周りの培地を75%エタノールで湿らせたキムタオルで拭き取った後、さらに75%エタノールで湿らせたキムワイプに挟んでこすり合わせた後、再度殺菌を行い、同様に植付けと培養を行った。得られた実生のシュートを種々培地に植え付け、シュートの形成と増殖を検討した (吉松、河野、乾、北澤、飯田、御影、根岸)。

(2) 薬用植物栽培における農薬の適正使用に関する研究

カノコソウ栽培における登録農薬除草剤の適用拡大のため、ロロックス水和剤、トレファノサイド乳剤およびレナバック水和剤3種の土壤処理型除草剤の効果、薬害、一部の薬剤について残留値を試験した。

供試材料：カノコソウ (北海吉草) *Valeriana fauriei* Briq.

定植日：2011年10月5日。栽植密度：畝幅 60 cm X 株間 25 cm。施肥方法：基肥堆肥 2,000 kg/10a、炭カル 100 kg/10a。化成 S121 50 kg/10a、IB化成 50 kg/10a。

除草剤試験方法：

薬剤処理日：2011年11月4日 (秋処理)、2012年5月8日 (春処理)。

使用薬剤と施用量：

薬剤1 (土壤処理剤) ロロックス (100 g/10a)

薬剤2 (土壤処理剤) トレファノサイド乳剤 (300 mL/10a)

薬剤3 (土壤処理剤) レナバック水和剤 (200 g/10a)

試験区の設定：

試験区面積：1区当り 8.1 m² (1.8 m x 4.5 m)

- ・無処理区 除草処理を行わない。
- ・手除草区 適宜、手除草を行った。
- ・秋春処理区 土壤処理を秋、春に各1回処理した。
- ・春処理区 土壤処理を春に1回処理した。
- ・茎葉処理区 茎葉処理剤を雑草生育期に処理した。

*試験は野菜・花き除草剤試験実施基準 (平成12年改訂) に準じた。

調査と収穫：

雑草調査は、6月12、13日に実施し、各処理区の任意の箇所について発生した雑草の種類、本数及び乾燥重量を測定した。薬害の調査は、6月に地上部の状態を調査する。さらに、9月25日に根茎を収穫して乾燥し、収量を測定した。

残留農薬の調査収量調査に用いた根茎の一部は、薬剤の残留濃度を測定した (菱

田、林)。

C. 研究結果

【新品種の育成に関する基盤的研究】

(1) 選抜育種による品種育成、種苗の増殖および普及に関する研究

1. ハトムギ品種‘北のはと’の生産栽培、普及および試験栽培

1) 北海道上川北部地域では、2012年5月中旬～6月下旬の期間は早魃が続き、北海道研究部のハトムギ栽培試験区、士別市の生産栽培地は発芽不良、初期生育不良が顕著に認められた。なお、北海道研究部のハトムギ荒れ地試験区(6月3日播種、50 a)は、ほとんど発芽しなかったためで廃耕した。

2) 窒素肥料の追肥施用効果は、無施用区の10 a当たりの収量(平均値)が178.0 kg、窒素5 kg/10 a施用区187.9 kg、10 kg/10 a施用区195.0 kgであった。緩効性肥料CDU化成施用区は、164.7 kgであった。これらの試験区間の比較では有意差が認められなかった。連作試験(8年)では、移植栽培区の10 a当たりの収量が60.9 kg、直播栽培区が81.6 kg、新規栽培試験では約55.7 kgであった。

3) 平成24年度の生産栽培は、栽培面積が18.5 ha、規格品の生産量が32.7トンであった。一部の栽培地において、葉枯病の発生が認められ、栽培地の南下に従い発生の頻度が高くなった。

4) 4月にハトムギ‘北のはと’を原料とした日本薬局方ヨクイニンが発売され、7月にハトムギ入り手のべひや麦が製品化された。

2. ハトムギ品種‘はとろまん’の試験栽培

16箇所の圃場、合計29,277 m²で栽培を行ったが、その内収穫した圃場は僅か6箇所、11,643 m²で、収穫果実総重量は427.62 kg(10 a当たり換算収量36.73 kg)であった。

本年度の不作の原因は、一に8月の早魃、

二に雑草の繁茂、三に猪の食害であり、その他圃場によっては肥量不足や日当たり不良であった。

3. カンゾウのGL高含有系統の増殖とそのS₁の特性

高GL系統No. 70およびNo. 10についてそれぞれ38株および6株を増殖し、圃場へ定植した。栽培1年目の開花個体率についてみると、北農試系、北大系、医療大系およびNo. 70は0～3.3%であったのに対し、No. 10は50%と高い値を示した。

No. 10のS₁を121粒播種し、20個体の発芽(16.5%)が確認され、播種後200日までに12個体が枯死した(生存率40%)。正常な生育を示し、播種後697日まで生存したのは7個体(生存率35%)であった。この7個体の地下部新鮮重は83.4±28.7g(49.2～127.2g)、根のGL含量は2.30±0.26%(2.04～2.76%)となった。

4. シャクヤク優良系統の増殖およびその普及

2012年における栽培5年目株の収量は、‘べにしずか’が857kg/10a、No. 513が1,348kg/10aとなった。2012年収穫の5年目株と3年目株の平均値および2010年収穫の5年目株との相関係数はそれぞれr=0.836(n=6, p<0.05)、r=0.821(n=7, p<0.05)となり、有意な正の相関関係が認められ、各系統の収量に関する形質再現性が確認された。また、在来種の佐呂間系が730kg/10aであることから、これら育成系統が高い収量水準であることが示された。本年度収穫した根茎から‘べにしずか’を900株およびNo. 513を600株増殖し、各系統600株を圃場に定植した。

埼玉県秩父市において実証栽培している‘べにしずか’の生育調査を実施し、7月12日における草丈は15.5cm、茎数は4.6本、枯れ上がり指数は0となった。9月20日には枯れ上がり指数が8.2となり葉の80%以上が枯れ上がり状態であった。

また、2012年12月に新たに300株を同市の圃場に定植した。

5. ハトムギ3系統の栽培比較試験

3系統の発芽開始日、発芽揃い日、出穂開始日、出穂期、開花開始日、開花盛期は種子島選抜系統が最も早く、次いであきしづくが早い傾向が見られた。

種子島選抜系統の発芽率は、播種時期(3月、4月)の違いにかかわらず82%以上と、他の2系統のあきしづく(3月66%、4月91%)と岡山在来(3月47%、4月56%)に比べて高かった。

種子島選抜系統は、他の2系統(あきしづく、岡山在来種)と比べると、茎数と主幹節数がやや少なく、1株あたりの稔実果実数が少ないが、稔実率が80%以上と高い傾向が見られた。

各系統別の果実ならびに種子の乾燥重量を見ると、果実の100粒重は、あきしづく<岡山在来種<種子島選抜系統の順に重く、種子の100粒重は、あきしづく<岡山在来種<種子島選抜系統の順に重い傾向が見られた。それに対して、果実と種子の100ml容積重は、岡山在来種<あきしづく<種子島選抜系統の順に重い傾向が見られた。

6. 外来遺伝子導入による品種作出を目指した基盤的技術の研究

本年度は、エレクトロポレーション(EP)処理後の育成植物体における導入遺伝子の確認を行った。

ベクターコントロール(MCS)導入79粒、緑色蛍光タンパク質遺伝子(sGFP)導入130粒、赤色蛍光タンパク質遺伝子(RFP)導入119粒のナイモウオウギ種子について、EPによる種子への遺伝子導入を行い、ビーナスライト上で育成を行った結果、EP処理後4日目において、70~80%の種子が発根した。これら実生について緑色及び赤色蛍光の観察を行った結果、白化した子葉や着色した根等傷害を受けた部位で顕著な自家蛍光を認めた。

また、MCS導入系統の健全な実生において、緑色蛍光では比較的自家蛍光が弱かったのに対し、赤色蛍光では強い自家蛍光が認められた。そのため、RFP遺伝子導入系統では強い自家蛍光のため、導入遺伝子による赤色蛍光の有無を判断することができなかった。一方、sGFP遺伝子導入系統では、健全な実生において約7%の頻度(9/130粒)でベクターコントロールの自家蛍光よりも顕著な緑色蛍光を認めた。

EP処理後14日目において、20~50%の種子で子葉の展開が認められ、これら実生について赤色及び緑色蛍光の観察を行った結果、EP処理後4日目の実生と比較し、葉身部分を除き、緑色蛍光の自家蛍光強度が顕著に増加していた。このため、子葉が展開する程度まで成長した実生において導入遺伝子による蛍光の有無を判断することは困難であった。

EP処理後、23~30日目で本葉が2枚以上展開した実生より、最下位の葉一枚をサンプリングし、ゲノムDNAを抽出し、PCRにより蛍光タンパク質遺伝子のゲノム導入の有無を確認した結果、RFP遺伝子導入系統では、PCR陽性の株を認めなかったが、sGFP遺伝子導入系統ではPCR陽性株1クローンを認めた(1/42個体; 2.2%)。遺伝子導入が確認された個体の葉において顕著な緑色蛍光は観察されなかった。

7. 遺伝子マーカーの解明による品種識別技術の確立

ウラルカンゾウの優良系統3系統(Gu2-3-2、GuTS71-08 IV1、GuTS71-08 IV2)のゲノムDNAを鋳型にPCRを行い、増幅配列の塩基配列情報を収集・比較した結果、Gu2系統(北海道医療大学系統:Gu2-3-2)では、いずれのイントロンでも1種類の配列のみが得られた。一方で、GuTS71-08系統(北海道農業試験場系統:GuTS71-08 IV1、GuTS71-08 IV2)では、イントロン2を除く、イントロン1、

イントロン3、イントロン4において、配列長の異なる2種類の配列を取得した。この2種類の配列のうち、一方は、Gu2系統で得られた配列とほぼ一致する共通配列であり、もう一方は、GuTS71-08系統に特徴的な配列であった。

その結果、イントロン2を除く各PCRにおいて、GuTS71-08系統では増幅サイズの異なる2本のバンドが増幅されるのに対し、Gu2系統では1本のバンドのみ増幅されることから、PCRにより両系統の識別が可能であった。

取得したCYP72A154遺伝子のイントロン配列について、Gu2-3-2系統で得られた配列(共通配列)とGuTS71-08系統に特徴的な配列(71-08配列)で比較すると、71-08配列特異的プライマーでは、GuTS71-08系統でのみ増幅を認め、Gu2-3-2系統とGuTS71-08系統を明確に識別可能であった。

8. DNA塩基配列情報に基づく薬用植物の品種識別法の開発に関する研究

調製した鋳型DNA溶液の濃度は、北農試系のサンプルでは113.8 ng/ml、医療大系のサンプルでは53.4 ng/ml、北大系のサンプルでは49.1 ng/mlであった。

PCR法により各ターゲット領域を増幅した結果、想定される塩基長の位置に増幅産物が確認された。

北農試系の遺伝子型はTG-9に分類され、内モンゴルで多く見られる種であった。医療大系の遺伝子型はTG-8に分類され、中国西部で多く見られる種、北大系はTG-9に分類され、内モンゴルで多く見られる種と一致した。

9. 生薬シコン中のシコニン類の定量法の検討について

1) HPLCによるシコン中シコニン類の定量

分析条件にてすべてのシコニン類化合物は良好な分離チャートを与えた。シコン抽出試料溶液についても良好な分離で

あった。

2) シコン試料溶液の分光測色計による表色測定について

コニカミノルタ社製分光測色計CR-5を用いてシコン抽出液の色の測定を行った。

【種苗の保存に関する基盤的研究】

(1) 薬用植物の発芽試験法および効率的増殖法に関する研究

1) 発芽試験の規格化

オトギリソウの発芽は15~20°Cで発根率、出葉率が高く、15°Cで発根率69.3%、出葉率52%を示した。キキョウの発芽は20~30°Cの発根、出葉率が高く、15°Cでは発根、出葉率は低下した。カワミドリは15~30°Cの発根率5.3~11.3%、出葉率は8.0~10.0%、ウイキョウの発芽は15~25°Cの発根率は9.3~12.0%、出葉率は8.0~10.0%で、30°Cではやや発芽率は低かった。ニラの発芽は20~30°Cの発芽は97.3~100%と高かったが、30°Cの発根率が56.7%で低下した。カミツレの発芽は15~20°Cで発根率52.7~56.0%、出葉率49.3~54.7%であったが、25、30°Cでは発根率32.0~44.7%と低下した。コロシントでは25、30°Cの発芽率が高く、25°Cで発根率42%、出葉率15%であった。オランダセンニチでは15~25°Cの発根率は100%、キバナオランダセンニチでは15~25°Cの発根率は97~100%であった。チョウセンアザミでは25°Cで発根、出葉率が高く、発根率78%、出葉率63%であった。アサガオの発芽は15、20°Cで高く、15°Cで発根率83%、出葉率76%、20°Cで発根率90%、出葉率79%を示した。

2) 種子発芽に及ぼす低温湿潤処理の影響

供試したムラサキ種子の100粒重は0.697gであった。ムラサキの発芽は5°C砂湿潤処理した区で発芽率が高く、120日処理区の10、15°C区では36.0~37.3%の発根率を示したのに対して、無処理区では0~22.7%であった。また、5°C砂湿

潤処理 246 日処理区の 10、15°C区では 68.7~72.0%の発根率を示し、120 日処理に比べて高かった。

3) ハナトリカブトの効率的増殖法に関する研究

ハナトリカブトの効率的増殖法の検討を行った。2011 年 10 月植え付け、2012 年 10 月収穫の収穫期の草丈は稲わら区で 65.8 cm、裸地区で 70.1 cm、子いも数は稲わら区で 6.5、裸地区で 6.2、子根径は稲わら区で 31.3 mm、裸地区で 30.1 mm であり、収穫期の形質には裸地区と稲わら区の違いはなかった。1a 当たり根の乾収量は稲わら処理区で母根重 4.6 kg、子根重 27.2 kg、裸地区で、母根重 5.8 kg、子根重 30.8 kg であった。

(2) 種子の発芽力簡易検定の検討

胚の染色の程度を濃赤色、淡赤色、微一無色の3段階に分け、各年産の胚を区分した。淡赤色群には、全体的に淡赤色のものや、部分的に濃淡があるものなどがあり、多様であった。

胚が濃赤色に染色したもののイコール発芽力があるものと想定した。濃赤色に染色した胚の割合は2011年、2009年、2007年、2006年産種子ではそれぞれ35%、25%、13%、14%であった。一方、実際の発芽率はそれぞれ14%、40%、0%、0%であり、染色率と実際の発芽率に関連性は見られなかった。

(3) 保存種子の形質変異に関する研究

ハトムギ種子島在来種の発芽開始日、発芽揃い日、出穂開始日、出穂期、開花開始日、開花盛期、収穫期は、2010年に比べて2012年の方が全体的にやや早くなっているものの、大きな変化はなく、発芽率も高い値を維持していた。

2010年と2012年に栽培試験を行った植物体、果実、種子の形状に大きな違いは見られなかった。

3月播種の草丈、最上位果の高さ、稈径、分枝数、稔実果実数、稔実率、稔実果実の乾燥重量、稔実果実の100粒重は、2010年と2012年で大きな違いはなかった。一方、4月播種も3月播種と同様に大きな違いは見られないものの、2012年の稔実果実数と稔実果実の乾燥重は、2010年に比べて少し減少していた。また、茎数と主稈節数は、3月と4月の播種時期の違いにかかわらず、2010年と2012年で少し変動が見られた。

(4) 培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験

1) セリバオウレン

花茎数、草丈、茎数および茎葉重については培養苗と圃場苗の間に顕著な差が認められなかった。一方、圃場苗では収穫時の茎葉の枯れ上がり（紅葉）が顕著であり、 $L^*a^*b^*$ 表色系による頂小葉の評価では L^* 、 a^* および b^* 値において両者で有意差が認められた。

根茎重は培養苗が圃場苗より有意に低く、種根茎重と根茎重の間には0.1%水準で有意な正の相関関係が認められた

($r=0.885$, $n=14$)。一方、根重については培養苗が圃場苗よりも有意に高かった。また根茎増加率についてみると、培養苗が205%であるのに対し、圃場苗では66%と両者に有意差が認められた。さらに、圃場苗では収穫時に根茎と根に腐敗が観察された。

2) ウラルカンゾウ

草丈については両者に顕著な差が認められなかったのに対し、茎数は培養苗が圃場苗よりも有意に高くなった。根重については顕著な差が認められなかったが、根のGL含量については培養苗が0.99%となり、圃場苗の1.84%に対して有意に低い値となった。また、根頭径については、培養苗が圃場苗よりも有意に大きかった。地下部増殖率については両者で有意差が認められなかった。

3) ウコン

花序を形成した個体数は、圃場苗由来株では16個体中10株、培養苗由来株では1株であった。根茎の形態は側根茎でやや異なり、外表面の色が圃場苗由来株では橙色を帯び、培養苗由来株では褐色であったが、根茎断面の色には差異は見られなかった。側根茎の大きさは圃場苗由来株の方が太く、大きい傾向が見られた。

地上部および地下部の成長量は圃場苗由来株の方が大きかったが、植え付け時の種イモの大きさによる影響と思われた。種イモの1根茎から生産された1株当たり根茎生重量は圃場苗由来では 949.0 ± 313.2 g、培養苗由来では 699.5 ± 220.2 gと前者が大きかったが、生産物の増殖率は、培養苗由来株がやや大であった。

培養苗由来の2年生1株から生産された3年生株の根茎総生産量は平均 2077.5 g ($1756.5 \sim 2506.3$ g)で、増殖率は平均 $2,757.0\%$ ($2,513 \sim 3,675\%$)であった。

4) ショウガ

外部形態は圃場苗由来株に比べ培養苗由来株は全体的に大きく、根は太かった。芽の色は培養苗由来株の方が濃赤だった。

草丈、地上部重量は圃場苗由来株に比べ培養苗由来株が大きかったが、茎数は少なかった。種イモの1根茎から生産された1株当たり根茎生重量は、圃場苗由来では 365.0 ± 136.9 g、培養苗由来では 212.4 ± 53.1 gと前者が大きく、生産物の増殖率も1.7倍高かった。

培養苗由来の2年生株1株から生産された3年生株の根茎総生産量は平均 376.2 g ($272.8 \sim 429.8$ g)で、増殖率は平均 780.9% ($513 \sim 992\%$)であった。

【種苗の効率的増殖法に関する研究】

(1)人工環境制御下での種苗の保存と効率的増殖に関する研究

1) カイケイジオウ無菌植物体の誘導

秋に掘り上げ保管した新芽のついた根茎を材料に、殺菌液：3%次亜塩素酸ナトリウム溶液、殺菌液での処理時間15分と

し、各種培地への植付け前に(2)/2MS HFで6日間培養し、雑菌混入の有無を確認した。

植付け6日後、22切片中18切片に雑菌の混入が認められ、雑菌混入率は 81.8% であった。本切片を種々培地に植付けてさらに27日間培養した結果、BA $1\text{mg}/1$ 添加培地 [(2)/2MS B1] ではマルチプルシュート形成が、NAA $0.5\text{mg}/1$ 添加培地 [(2)/2MS N0.5] ではカルス形成と発根が認められ、NAA $0.1\text{mg}/1$ とBA $1\text{mg}/1$ 添加培地 [(2)/2MS N0.1B1] ではマルチプルシュートとカルスの形成が認められた。

得られたシュート [(2)/2MS B1 : RehN1] より約 1cm 長のシュート切片 (St) を調製して種々培地に移植し同条件で培養した。また、シュートを含むカルス [(2)/2MS N0.1B1 : RehN2及び(2)/2MS N0.5 : RehN3] より約 0.5cm 角のシュートを含むカルス切片 (StC) を、カルス [(2)/2MS N0.5 : RehN3] より約 0.5cm 角のカルス切片 (C) を調製して(2)/2MS HFに移植し同条件で培養した。

植付け30日後に観察した結果、(2)/2MS HFで培養したStではマルチプルシュート形成と発根が認められ、正常な形態の植物体が得られた。IBA $1\text{mg}/1$ を添加した培地 [(2)/2MS IB1] で培養したStは、2本のシュート形成と発根が認められ、正常な形態の植物体が得られた。一方、前培地と同じ(2)/2MS B1培地で培養したStでは発根は認められず、正常な形態のシュートと異常な形態 (葉が小さい、葉がねじれるなど) を示すシュートが混在した。

(2)/2MS HFで培養したStCではマルチプルシュートの形成と発根が認められたが、シュートの多くが異常な形態を示した。

(2)/2MS HFで培養したCではシュートが形成せず、不定根の形成が認められた。

2) カイケイジオウ再生植物体の増殖

前述のRehN1及びRehN2植物体より約2

cm長のシュート切片を調製して(2)/2MS HF (RehN1及びRehN2)又は(2)/2MS IB1 (RehN1)に植付けて同条件で培養し、植物体再生を検討した。

培養40日後、RehN1及びRehN2とも(2)/2MS HFで発根と植物体再生が認められ、本シュート切片からの発根と植物体再生にIBAの添加は不要であり、1シュート切片あたりの形成シュート数は1~1.5本であった。初代培養物において、カルス形成が認められなかったRehN1は、初回の移植ではBA添加培地で異常な形態のシュートが出現したが、移植二代目では全て正常形態のシュートが生育した。

RehN1及びRehN2とも(2)/2MS HF、23°C、14時間照明下で30~40日ごとの継代培養を繰り返すことにより、増殖率1.5~2.0倍での増殖が可能となった。

3) アカヤジオウ無菌培養物の誘導

殺菌処理後、約1~3 mm長の茎頂組織又はシュート切片を取り出し、(2)/2MS B1又はIBA 0.01 mg/lとBA 0.1 mg/l添加(2)/2MS [(2)/2MS IB0.01B0.1]に植付け、無菌培養系の誘導を行った。

約1 mm長の茎頂を外植片としたときの雑菌混入率は、植付け63日後で4.2%であり、約3 mm長のシュート片を外植片としたときの雑菌混入率28.0%よりも低かった。また、茎頂を(2)/2MS B1で培養63日後のシュート形成率は17.4%、マルチプルシュート形成率は13.0%であり、1マルチプルシュートあたりの平均シュート数は 4.3 ± 3.2 本であった。

約3 mm長のシュート切片を外植片として(2)/2MS IB0.01 B0.1で培養すると、その多くで培地の褐変が認められた。植付け16日後に新しい培地に交換し培養を継続したところ、植付け36日後(培地交換20日後)のシュート形成率は16.7%、1本あたりのシュート数は 1.3 ± 1.6 本であった。植付け56日後まで同培地で培養を継続したシュート2本のうち、1本にマルチプルシュートが形成しシュート数は4本、

最大シュート長は2.4 cmであった。

4) アカヤジオウシュートの増殖

茎頂切片より誘導したマルチプルシュートを個々に分割し、また、同様に形成したカルスをそのまま(2)/2MS HFに移植し13日間培養したところ、シュート切片からはマルチプルシュートが形成し、シュート数は2.0~3.5本であった。また、移植したカルス切片4個のうち、2個からはマルチプルシュートが形成し、シュート数は2.0~4.0本であった。

5) シナマオウ種子の発芽と無菌培養系の誘導

金沢大で採取された材料種子(内蒙古産)の親植物の地上部茎の2008年及び2009年の総アルカロイド含量は、それぞれ、Es145(TS1025-10):0.15及び0.21%、Es513(TS1026-10):1.10及び0.64%、Es611(TS1027-10):0.91及び0.69%である。

シナマオウ種子は、いずれも長径約5 mmで一方が鋭端になっており、短径は $Es513 < Es145 < Es611$ の順であった。これら3系統の種子を殺菌後、無菌的に播種し、23°C、暗所又は14時間照明下で30日間培養したところ、Es145及びEs513は種子の発芽に対する光の影響は少なく、いずれの条件でもほぼ同じ発根率及び子葉展開率(Es145の子葉展開率:暗所及び照明下とも60.0%、Es513の子葉展開率:暗所80.0%、照明下90.0%)を示したが、Es611の発根と子葉展開は、14時間照明下よりも暗所の方が良好であった(Es611の子葉展開率:暗所55.6%、照明下30.0%)。

6) シナマオウシュートの増殖と植物体再生(移植一代目)

種々基本培地と種々濃度のIBA添加培地の効果を調べた。得られた実生より2節を含むシュート切片を調製し、種々培地に植付けてシュート増殖及び植物体再生条件を検討した。

実生からの移植1代目は、HFでも50%以

上の発根率を示し、いずれの基本培地においても発根に対するIBAの顕著な促進効果は認められず、IBA 1mg/lではC2D(2)以外の培地において発根が阻害された。

シュートの生育はIBA 0.5 mg/l以下で良好になる傾向が認められ、特にIBA0.1 mg/l添加DKW(2)培地でのシュート長は最大であった(17.9±0.2 cm)。得られた結果を基本培地ごとに集計した結果、シュート数、シュート長及び発根数はDKW(2)が最も良好であった。

7) シナマオウシュートの増殖と植物体再生(移植二代目)

移植一代目の培養シュート及び培養植物体より、同様に2節を含むシュート切片を調製して同培地に継代し、シュート増殖と植物体再生を調べた。

移植二代目は、いずれの基本培地でも、HFでは発根は認められず、IBA添加区で発根が認められた。DKW(2)HF及びDKW(2)IB0.1は、シュートの発根は認められないものの、シュート数は最大であり(それぞれ3.5±0.7本及び3.5±2.1本)、シュートの伸長も良好で、それぞれシュート長10.1±3.4 cm及び15.5±4.9 cmであった。また、MES(2)IB0.5では、シュート数は1本であるが、良好なシュートの伸長(シュート長:15.4±10.7 cm)と植物体再生(発根率:100.0%、発根数2.0±1.4本)が認められた。

8) シナマオウシュートの増殖と植物体再生(移植三代目)

移植二代目で生育の良好であった培養シュート及び植物体より、2節を含むシュート切片及び茎切片を調製し、移植二代目の培養で最もシュートの増殖及び伸長が良好であったDKW(2)IB0.1に移植し、シュート増殖と成長を調査した。

植付け片として茎切片を用いた場合、移植二代目での培地の種類に関わらず、成長せずに枯死する割合がシュート切片よりも多かった(培養56日後の枯死率

シュート切片:31本中3本 9.7%、茎切片:16本中6本 37.5%)。

9) シナマオウシュートの増殖、生育と植物体再生に対する塩化ナトリウムの影響

DKW(1)IB0.1での継代培養で試験材料が十分に確保できたEs611D2及びEs611L1より、2節を含むシュート切片及び茎切片を調製して100 mM NaCl無添加あるいは添加した培地に植え付けて、シュート増殖、生育及び植物体再生に対する影響を調べた。

培養43日後のシュート切片の枯死率[MS(1)IB0.1及びMES(1)IB0.1]は、NaCl無添加で7.1%(14切片中1本)、100 mM NaCl添加で28.6%(14切片中4本)であり、NaClの添加により、切片枯死率が増加した。また、同様に、培養43日後の茎切片の枯死率はNaCl無添加で25%(12切片中3本)、100 mM NaCl添加で41.7%(12切片中5本)であり、シュート切片よりも枯死率の増加割合が大きかった。

10) シナマオウシュートEs611D2及びEs611L1の増殖、生育と植物体再生に対するサイトカイニンの効果

DKW(1)IB0.1またはMES(1)IB0.1で増殖させたEs611D2及びEs611L1より2節を含むシュート切片及び茎切片を調製して、1%ショ糖、IBA 0.1 mg/lとともにベンジルアデニン(BA)を0.5 mg/l添加したDKW及びMES培地に植付け、シュートの増殖、生育と植物体再生を調査した結果、発根した植物体は得られなかった。

11) 継代培養したシナマオウ各クローンの増殖、生育と植物体再生

DKW(1)IB0.1培地で継代維持可能で増殖能が高いクローンとして、Es145系統は2クローン(Es145L1及びEs145L4)、Es513系統は4クローン(Es513D3、Es513L5、Es513L6、Es513L7)、Es611系統では3クローン(Es611D3、Es611D4、Es611L1)得られた。

12) 光独立栄養培養によるシナマオウシュートEs611L1の発根

DKW(1)IB0.1で増殖・育成したEs611L1シュートより挿し穂(頂芽を含む3節程度)を調製して光独立栄養培養に供し、発根した苗の育成を試みた。培養91日後、挿し穂22本のうち、8本に発根が認められた(発根率36.4%)。

13) イトヒメハギ種子の発芽と培養(1回目)

湿らせた川砂で保管中の種子より砂を落とし、殺菌液:3%次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分間の殺菌処理後、(2)/2MS、23℃、14時間照明下で培養したところ、播種6日後に種子30粒中、26粒で雑菌の混入が認められ(雑菌混入率86.7%)、発芽が認められたのはわずか1粒であった(幼根は種皮中で、種子の割れ目から子葉が展開)。

子葉展開のみの種子1粒を、種皮を取り除き培養を継続し、得られた組織(子葉+芽+幼根)からカルス形成とともにマルチプルシュートの形成(10シュート)が観察された。マルチプルシュートを培養したところ、植物体の再生(5本中1本が発根:発根率20.0%)とシュートの形成(同5本:形成率100.0%)およびカルスの褐変が観察された。

得られたマルチプルシュートよりシュート切片を調製し、IBA 0.1、0.5及び1mg/lを添加した3%ショ糖含有MS固形培地に移植(3回目)し培養したところ、全てのシュートが褐変後枯死し、培養物の育成に至らなかった。

14) イトヒメハギ種子の発芽と培養(2回目)

採取後直ぐのイトヒメハギ種子(種皮の表面に毛がついている)を、1回目と同様に、殺菌、播種したところ、4日後の雑菌混入率は96.4%(55個中53個)であった。種子表面の毛を取り除き、再度、同

様に殺菌処理を行った結果、再播種21日後の雑菌混入率は69.0%となり、その後の雑菌繁殖は認められなかった。

胚状組織を新しい(2)/2MSに移植し培養したところ、子葉の緑化と展開は観察されたが、発根およびシュートの生育は認められなかった。

種皮がとれた種子より生育した実生(発根、子葉展開)を培養し、(2)/2MS IB0.01B0.1に移植し40日間培養した結果、マルチプルシュート形成(7.0±1.0本)と発根(発根率100.0%、発根数1.5±1.7本)が認められ、現在、育成を継続中である。

(2)薬用植物栽培における農薬の適正使用に関する研究

除草(抑草)は、レナパック2回処理(雑草の発生程度:6%)が手除草と同等であり、次にロロックス2回処理(20.9%)、トレファノサイド2回処理(21.0%)、トレファノサイド1回処理(31.5%)であった。

薬害については、各除草剤の施用区において薬剤の影響による萎縮、黄変、褐変および枯死は認められなかった。収量調査において無処理区が153.7g/m²、手除草区が143.0g/m²であり、各処理区では87.9~149.8g/m²の範囲にあることから、薬害による収量減少は認められないと判断した。

除草剤レナパックを施用した試験区の薬剤残留値は、レナパック1回処理のクロリダゾンの残留値が0.01~0.02ppm、2回処理では0.03~0.04ppmであった。この値は、野菜類の残留基準値以下であった。なおレナシルは何れの試験区でも検出されなかった。

D. 考察

【新品種の育成に関する基盤的研究】

北海道上川北部地域では、2012年5月中旬~6月下旬の期間は早魃が続き、北海道研究部のハトムギ栽培試験区、士別市の生産栽培地は発芽不良、初期生育不

良が顕著に認められた。本年度減収となった結果は、定植時期から生育期にかけて十分な水分が得られず、枯死が多く発生して減収につながったことに起因する。

窒素肥料の追肥施用効果は、旱魃による気象災害の影響もあり明確な結果は得られなかったが、窒素肥料量の増加に伴い増収する傾向が認められた。また緩効性肥料である CDU 化成については、期待された効果が認められず、ハトムギの肥料要求時期と肥効に時間的な差があると思われた。

八雲町、豊浦町で認められた葉枯病は局所的に発生し、滝川市、士別市でも軽微な発生が認められている。播種の際にベンレート水和剤による種子消毒、生育期において殺菌剤ロブラール水和剤を散布することで十分対応できると思われる。

秩父市におけるハトムギ‘はとろまん’の本年度の不作の主たる原因は、8月の旱魃、雑草の繁茂および猪の食害であった。休耕田として長期間未利用であったため、雑草の密度が高く、今後抜本的な除草対策が必要である。昨年度には見られなかった猪による食害が、数カ所の圃場で見られた。

カンゾウの GL 高含有系統の増殖とその S₁ の特性について、高 GL 系統 No.10 の栄養繁殖 1 年目における開花個体率は 50% と他の系統と比較して極めて高く、種子繁殖または育種親に適する系統であることが判明した。

栽培 2 年目における GL 含量について、日本薬局方規定値 2.5% を満たした個体の割合は、全体の 29% であった。種子繁殖による実生産を可能にするため、生存した優良株の更なる自殖世代更新、高 GL 含量系統間の放任受粉および F₁ 品種の育成等の検討を要すると思われる。

シャクヤク優良系統の増殖およびその普及について、品種登録申請中の‘べにしずか’および次期品種登録申請候補の系統 No. 513 を各 600 株圃場へ定植し、2016 年にそれぞれ約 2,100 株の苗に増殖

される予定である。

埼玉県秩父市における‘べにしずか’の栽培 1 年目の生育は、生存個体については健全な生育を示したが、栽培 1 年目の生存率が 66% と低い値であった。秩父市で生存率が低下した要因として、高温多湿環境における耐病性の低下、また、定植が適期から 2 か月遅れたことなどが考えられた。今後、適地（排水性が高い等）への作付け、土壤排水性の改善、登録農薬を適期に散布等の栽培条件の改善が必要であると思われた。

ハトムギ種子島選抜系統は、他の 2 系統に比べて低温下での発芽率が高く成長が比較的早いこと、1 株あたりの稔実果実数が気候の変化などにあまり影響を受けることなく安定していること、稔実率が高く穂発芽数が少ないこと、果実の形状が整っていること、病虫害の影響をあまり受けにくいことなど多くの利点を有し、他の系統に比べて環境適応力に優れていることが明らかになった。しかし、あきしづくに比べると 1 株あたりの稔実果実数が少なく収量性がやや低いため、九州地域に特化した新品種作出のための育種素材として重要性が高い系統であると考えられる。

エレクトロポレーションにより緑色蛍光タンパク質遺伝子をナイモウオウギ種子へ導入した結果、約 7% の実生で顕著な緑色蛍光を観察した。また、活着植物の約 2% で本葉のゲノム DNA への遺伝子導入を確認し、形質転換植物体の作出に成功した。エレクトロポレーションを用いた種子への遺伝子直接導入法は、単子葉植物のイネ科ハトムギから、双子葉植物のマメ科のナイモウオウギまで、広範な薬用植物種に応用可能な方法であることが示唆された。

遺伝子導入操作を行わない実生では、緑色蛍光、赤色蛍光ともに顕著な自家蛍光は認められなかったが、エレクトロポレ