

Anatomical, Chemical, and Molecular Genetic Studies of *Ephedra distachya*

Siran NI^a, Masashi MATSUMOTO^a, Yui SHIMOYAMA^b, Nathalie ALLAIN^c,
Maksut COŞKUN^d, Turgut YILMAZ^d and Masayuki MIKAGE^{a,*}

^aGraduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University,
Kakuma, Kanazawa, 920-1192 JAPAN;

^bSchool of Pharmacy, College of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa
University, Kakuma, Kanazawa, 920-1192 JAPAN;

^cMuséum National d'Histoire Naturelle, Paris, FRANCE;

^dFaculty of Pharmacy, Ankara University, Ankara, TURKEY

*Corresponding author: mikage@ip.kanazawa-u.ac.jp

(Accepted on January 12, 2013)

Ephedrae Herba (ma-huang in Chinese), the herbal stems of *Ephedra sinica* Stapf, which belongs to the Ephedraceae family, is an important crude drug in traditional Chinese medicine. Some researchers think that this species is identical to *E. distachya* L., which mainly grows in Europe. Thus, in this study, we carried out anatomical, chemical, and molecular genetic studies on *E. distachya* plants collected in Switzerland, France, and Turkey to consider whether *E. distachya* could be used to produce *Ephedrae Herba*. As a result, we found that the morphology of the subepidermal fiber bundles in cross sections of the herbal stems of *E. distachya* and the frequencies of ephedrine alkaloids in *E. distachya* were quite different from those observed in *E. sinica* and that the DNA sequence of the ITS1 region of *E. distachya* contains 11 base changes compared with that of *E. sinica*. Based on these facts, we concluded that *E. distachya* and *E. sinica* should be treated as different taxa and that, according to the prescriptions of the current Japanese and Chinese pharmacopoeias, *E. distachya* is not suitable for producing *Ephedrae Herba*.

Key words: alkaloid, anatomical study, *Ephedra distachya*, *Ephedrae Herba*, ITS1.

The genus *Ephedra*, which belongs to the Ephedraceae family, one of the three extant genera of the Gnetales, comprises about 50 species, which are native to arid and semiarid regions of Eurasia, northern Africa, western North America, and South America (Price 1996). Most species of this genus are erect or sprawling shrubs, except for a few species of vine-like climbing shrubs or small trees. Since ancient times, the aerial parts of *Ephedra* plants have been used for treating colds, coughs, bronchitis,

etc. in traditional Japanese medicine (Kampo) and traditional Chinese medicine (TCM) (Tang 2002), under the name ma-huang (*Ephedrae Herba*). The ephedrine group alkaloids contained in *Ephedrae Herba* are considered to be active constituents and have been used as bronchodilators or decongestants against asthma or colds in Western medicine.

Ephedra sinica Stapf, one of three plant sources of *Ephedrae Herba* prescribed in both the Japanese and Chinese Pharmacopoeias, was

denominated in 1927 on the basis of a specimen collected in Hebei Province (Stapf 1927). This species is distributed from central China (Gansu province) and Mongolia, eastward up to the Gulf of Bohai (Hebei province) and the northeast of China (Jilin province) (Cheng 1978, Fu et al. 1999). Due to its relative abundance in nature, *E. sinica* dominates the crude drug market in China (Hong et al. 2011a). However, the export of Ephedrae Herba has been restricted in order to conserve natural ephedra resources and prevent desertification since 1999. Considering the continued use of Ephedrae Herba, substitutes for *E. sinica* should be sought.

Ephedra distachya L. was the first candidate that we considered might be a useful substitute for *E. sinica* because some researchers think that it is identical to *E. sinica*. *Ephedra distachya* was denominated in 1753 by Linnaeus and is widely distributed from Europe to west central Asia (Linnaeus 1753). *Ephedra distachya* subsp. *helvetica* (C. A. Mey.) Asch. & Graebn. was found in the dry Rhône valley in the Swiss Alps and was recorded as a variety of *E. distachya*, based on its slightly longer and twisted micropylar tubes. In morphology-based studies of plant taxonomy, it has been suggested that *E. sinica* and *E. distachya* subsp. *distachya* are conspecific as they both possess fleshy 2-seeded female cones and have rather short micropylar tubes (Kitagawa 1939, Yang 2002), whereas others have indicated that they can be distinguished by the size of the opening at the tips of their micropylar tubes and the shape of the free parts of their leaves (Cheng 1978, Fu et al. 1999). Recent molecular studies have shown that *E. distachya* subsp. *distachya* and *E. sinica* belong to the same clade but different subclades (Ickert-Bond and Wojciechowski 2004, Huang et al. 2005, Rydin and Korall 2009, Kakiuchi et al. 2011). However, because plants of the Genus *Ephedra* are polyphyletic, some species such as *E. przewalskii* Stapf and *E. intermedia* Schrenk & C. A. Mey., whose cone bracts and micropylar tubes are morphologically different from those

of *E. sinica* and *E. distachya*, remained nested together with the latter species after molecular analysis (Ickert-Bond and Wojciechowski 2004, Rydin and Korall 2009, Kakiuchi et al. 2011). Moreover, *E. intermedia* can be easily distinguished by its long and spiral micropylar tube, but different accession samples of the species have been placed in different clades (Kakiuchi et al. 2011). Considering these conflicting results, it is not suitable to separate *E. sinica* from *E. distachya* (subsp. *distachya*) using molecular data alone.

Besides molecular studies, attempts have been made to discriminate between *Ephedra* species using the anatomical characteristics of their stems (Chen 1989, Zhang 1989b, Fushimi 2008) or their ephedrine contents (Liu 1993, Hong 2011b) and have succeeded in identifying some *Ephedra* plants from China. However, no samples of *E. distachya* subsp. *distachya* from Europe have been subjected to studies of these two features. Thus, in the present study, anatomical, phytochemical, and molecular assessments were carried out on samples of *E. distachya* subsp. *distachya* and *E. distachya* subsp. *helvetica* collected from France, Switzerland, and Turkey, and the results were compared with those for *E. sinica*. Our intention is to clarify whether *E. distachya* and *E. sinica* are the same species and investigate the possibility of using *E. distachya* as a substitute for *E. sinica* in Chinese medicine.

Materials

Ephedra distachya subsp. *distachya* plant materials were collected in France in 2011 and in Turkey in 2009 and 2012, and *E. distachya* subsp. *helvetica* plant materials were collected in Switzerland in 2008. Each field study was performed in July or August, the seed-maturing season. All the plant specimens were collected by M. Mikage or M. Mikage & al., and were deposited in the Herbarium of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University (KANP), Japan.

1. *Ephedra distachya* subsp. *distachya*

France. Saint-Jean de Védas (Hérault), open hill slope, 9 km southwest of Montpellier, 43°33'03.3" N, 3°49'24.1" E, alt. 5 m (17 Sep. 2011, 1109171); Etang du Ponant, Le Boucanet, Le Grau-du-Roi (Gard), sandy shore of a lake, 20 km southeast of Montpellier, 43°33'31.4" N, 4°07'17.9" E, alt. 5 m (17 Sep. 2011, 1109172); Etang du Ponant, Le Boucanet, Le Grau-du-Roi (Gard), sandy shore of a lake, 20 km southeast of Montpellier, 43°33'42.4" N, 4°07'04.8" E, alt. 5 m (17 Sep. 2011, 1109173); Le Grand Travers, between Carnon and La Grande-Motte (Hérault), a sandy beach bordering the Mediterranean Sea, northern side of road D59, 13 km southeast of Montpellier, 43°33'20.3" N, 4°01'03.2" E, alt. 5 m (17 Sep. 2011, 1109174); Le Grand Travers, between Carnon and La Grande-Motte (Hérault), sandy beach bordering the Mediterranean Sea, northern side of road D59, 13 km southeast of Montpellier, 43°33'23.2" N, 4°01'16.1" E, alt. 5 m (17 Sep. 2011, 1109175); Les Aresquiers, Vic-la-Gardiole (Hérault), sandy shore, between Mediterranean and Etang de Pierre Blanche, 16 km southwest of Montpellier, 43°28'51.2" N, 3°50'37.5" E, alt. 5 m (17 Sep. 2011, 1109176); north of Etang de Pissevaches, Cabanes de Fleury, Fleury-d'Aude (Aude), west of a naturist resort, 1.2 km inland from the beach, 15 km south of Beziers, 43°12'29.1" N, 3°12'41.3" E, alt. 5 m (18 Sep. 2011, 1109181); Réserve Naturelle du Mas Larrieu, Argelès-sur-Mer (Pyrénées-Orientales), near the beach and south of the Le Tech river, 18 km southeast of Perpignan, 42°35'15.6" N, 3°02'37.9" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109191); between Saint-Cyprien et Canet (Pyrénées-Orientales), sandy coastal land near the southern end of Lake Canet-St-Nazaire, 14 km southeast of Perpignan, 42°38'31.1" N, 3°02'13.7" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109192); between Saint-Cyprien et Canet (Pyrénées-Orientales), near the baraques de pêcheurs, eastern side of Lake Canet-St-Nazaire, 13 km southeast of Perpignan, 42°39'37.7" N, 3°02'07.3" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109193); Torrelles (Pyrénées-Orientales), sandy beach, south of Torrelles Plage, 15 km northeast of Perpignan, 42°45'26.9" N, 3°02'26.5" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109194); Torrelles (Pyrénées-Orientales), sandy beach near the mouth of the River L'Agry, 16 km northeast of Perpignan, 42°46'40.0" N, 3°02'27.7" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109195); Port Barcarès (Pyrénées-Orientales), sandy land along the Mediterranean coast, near Mas de l'Illa, 20 km northeast of Perpignan, 42°48'48.6" N, 3°48'26.5" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109196); Les Coussoules, La Franqui (Aude), sandy land near a camping ground, north of Leucate, 30 km north of Perpignan, 42°56'45.0" N, 3°02'09.6" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109197); Les Coussoules, La Franqui (Aude), edge of the tideland near a camping ground, north of Leucate, 30 km north of Perpignan, 42°56'57.2" N, 3°20'09.6" E, alt. 5 m (19 Sep. 2011, 1109198).

Turkey. B5 Kayseri, Yılanlı Mountain, Sallıbayır,

Kulaklı Bağları, alt. 1170 m (07 Jul. 2009, 09070701); Kayseri, 38°42'52" N, 35°26'04" E, alt. 1170 m (29 Jun. 2012, U62911).

2. *Ephedra distachya* subsp. *helvetica*

Switzerland. Sion. The slope around Sion castle, 46°13'40" N, 7°21'41" E, alt. 700 m (08 Aug. 2008, 0808S1; 0808S2; 0808S3); the back of Sion castle, 46°13'40" N, 7°21'41" E, alt. 700 m (08 Aug. 2008, 0808S5-1; 0808S5-2; 0808S6-1; 0808S6-2).

3. *Ephedra sinica*

China. Inner Mongolia. Chagannaoer, 60 km south of Sonid Zuoqi, grassland, 43°24'49.2" N, 113°05'04.6" E, alt. 1030 m (16 Aug. 2007, 7081605); 10 km from Bayachagan, Abagaqi, grassland, 43°59'30.4" N, 115°06'57.0" E, alt. 1200 m (17 Aug. 2007, 7081706); along Axi Highway marker 75, Dongwujinqin, grassland, 44°33'34.1" N, 115°53'32.2" E, alt. 1060 m (18 Aug. 2007, 7081803); along road 304 marker 510, 340km south of Tongliao, 43°19'53.7" N, 122°13'33.2" E, alt. 240 m (21 Aug. 2007, 7082102). **Liaoning Province.** Along road 304, Zhangwu County, beside the railway, 42°46'20.8" N, 122°26'10.8" E, alt. 255 m (21 Aug. 2007, 7082104). **Hebei Province.** Seashore, near the mouth of the Nandaihe river, 39°47'57.1" N, 119°26'11.8" E, alt. 2 m (22 Aug. 2007, 070822A01; 070822A02; 070822A03).

Methods

Anatomy

Transverse sections of internodes or herbal stems were examined using an optical microscope without treatment or after clarification with chloral hydrate solution. Three stems with one to six secondary xylem cell layers between their vascular bundles were chosen from each of the specimens to ensure that the experimental stems displayed uniform maturity. The following parameters were examined: the longitudinal and transverse lengths of the herbal stem and cambium ring; the presence of cuticular protuberances; and the numbers of subepidermal, cortical, and pith fibers. Moreover, the ratio of subepidermal fiber bundle length to cortex length was calculated for the 5 longest subepidermal fiber bundles in each stem. We also measured the angle between the two long edges of the subepidermal fiber bundle, as shown in Fig. 1A. This value was considered

to be negative if the lines extrapolated from the two long edges intersected on the epidermal side.

Analysis of alkaloid content

Sample preparation for high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis

First, 0.1 g powdered samples, which had been dried at 105°C for 15 h, were suspended in 5.0 mL of the mobile phase and then left at room temperature for 20 min, after which sonication extraction was performed for 20 min. After being centrifuged at 3000 r/min for 15 min, the supernatant solution was filtered through a membrane filter (pore size: 0.45 µm) into a HPLC vial, which was then capped.

HPLC conditions

The analysis was performed using a Hitachi Elite LaChrom HPLC system, consisting of an L-2130 pump, an L-2200 auto sampler, and an L-2400 UV detector. An ODS column was used as the analytical column (4.6 mm, 250 mm). The mobile phase consisted of 195 mL CH₃CN, 305 mL H₂O, 0.4 mL H₃PO₄, and 2.4 g sodium dodecyl sulfate. The flow rate was 1.0 mL/min, the sample injection volume was 10 µL, and the detector monitored the eluent at 210 nm.

DNA preparation, PCR amplification and Sequencing

Dried twigs were cut into pieces, frozen in liquid nitrogen, and ground into a powder. Using a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), DNA was extracted according to the manufacturer's protocol. The primer sets for Eph-1F (GAC GTC GCG AGA AGT TCA TT) and 5.8S-R (CGG GAT TCT GCA ATT CAC AC) designed by Kakiuchi were used to amplify the ITS1 region. Standard PCR was carried out in a 25 µL reaction mixture containing 2.5 µL of 10× PCR buffer for KOD-Plus, 0.2 mM of each dNTP, 1 mM MgSO₄, 0.4 M of each primer, approximately 100 ng of the DNA sample, and 0.5 units of KOD-Plus DNA polymerase (Toyobo). The cycling parameters used for the

PCR were as follows: 94°C for 2 min; 30 cycles of denaturation at 94°C for 15 s, annealing at 55°C for 30 s, and elongation at 68°C for 45 s; and a final elongation step at 68°C for 5 min. Three microliters of the PCR product were used for agarose gel electrophoresis, and the remaining product was purified using the QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen).

The purified PCR products were sequenced using a BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) on an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Result and Discussion

Microscopic characteristics of the herbal stems

1. Ephedra distachya subsp. distachya

Generally, the transverse sections were circular or elliptical in shape, and there were many ridges and furrows on their surfaces. Cuticular tubers were observed on the ridges, and stomata with guard cells were located within the furrows. The epidermal cells were arranged compactly and were covered with a thick cuticle. Below the surface, ridges composed of fiber bundles with rectangular shapes (Fig. 1B, C) were in contact with the epidermis. In the samples from France, the longest 5 of these subepidermal fiber bundles were 149.44 ± 22.87 µm in length and accounted for $42 \pm 6\%$ of the cortex, whereas those of the samples from Turkey measured 165.78 ± 26.28 µm in length and accounted for $50 \pm 7\%$ of the cortex (Table 1, Fig. 1B, C). The cortex mainly consisted of parenchyma cells, including radially elongated palisade cells in the outer cortex and circular cells in the inner cortex. Many fibers or small groups of fibers with irregular shapes were scattered throughout the cortex, and the samples from France contained many more of these fibers than the samples from Turkey (Table 1, Fig. 1B, C). The individual collateral vascular bundles were triangular and arranged in a ring, and their phloem bundles were usually capped by fibers. The pith consisted of large parenchyma cells, most of which were circular and were frequently

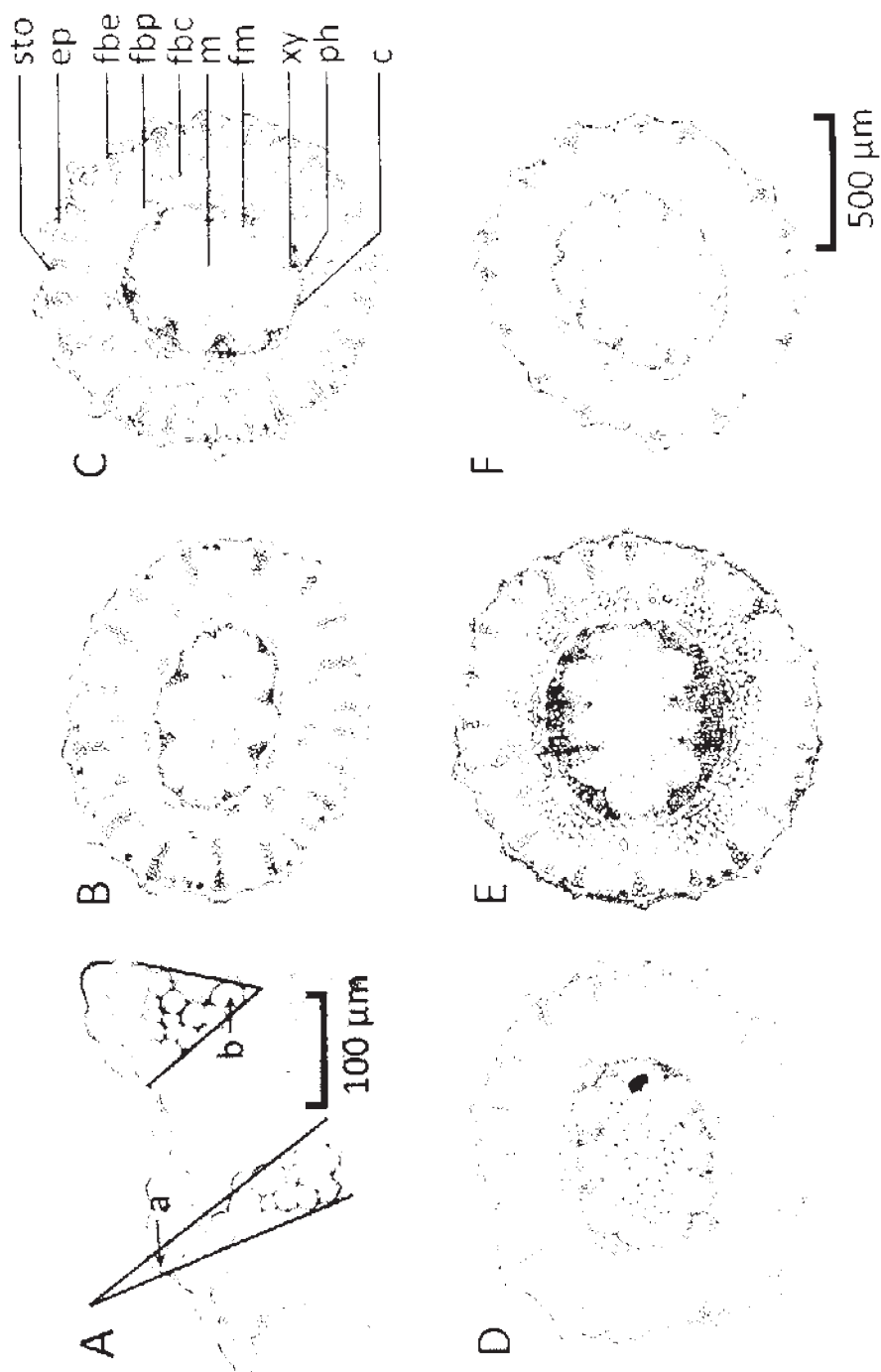


Fig. 1. Transverse section of herbarial stems of *Ephedra distachya* and *E. sinica*. A. Angle of tip of subepidermal bundle fiber. a. Negative value. b. Positive value. B, C. *E. distachya* subsp. *distachya*. B. 1109173 (France). C. 09070701 (Turkey). D, E. *E. distachya* subsp. *hehervica*. D. No fiber existed in the pith (080855-2). E. Fibers existed in the pith (080856-2). F. *E. sinica* (7081706). Abbreviations: c, cambium; ep, epidermis; fbc, fiber bundle in the cortex; fbe, subepidermal fiber bundle; fbp, fiber bundle of the vascular bundle sheath; fm, fiber in pith; m, pith; ph, phloem; sto, stoma; xy, xylem.

Table 1. Anatomical characteristics of transverse sections of herbal stems of *Fopetia sinica* and *E. distachya*

	<i>E. distachya</i> ssp. <i>distachya</i> (France)		<i>E. distachya</i> ssp. <i>distachya</i> (Turkey)		<i>E. distachya</i> ssp. <i>helvetica</i>		<i>E. sinica</i>
Shape of transverse sections	circular, elliptical		elliptical, triangular		circular, elliptical		elliptical, circular ^{a)} , triangular ^{a)}
Longitudinal length of herbal stem (mm)	1.21–1.95 (1.53 ± 0.16) ^{b)}		1.32–1.73 (1.50 ± 0.16)		1.17–1.67 (1.41 ± 0.15)		1.27–1.74 (1.46 ± 0.14)
Transverse length of herbal stem (mm)	1.08–1.80 (1.44 ± 0.16)		1.14–1.55 (1.34 ± 0.15)		1.17–1.59 (1.33 ± 0.13)		1.14–1.53 (1.27 ± 0.11)
Longitudinal length of cambium ring (mm)	0.47–0.95 (0.68 ± 0.12)		0.58–0.91 (0.75 ± 0.12)		0.47–0.85 (0.67 ± 0.11)		0.68–1.10 (0.82 ± 0.11)
Transverse length of cambium ring (mm)	0.39–0.81 (0.55 ± 0.12)		0.45–0.70 (0.60 ± 0.09)		0.35–0.72 (0.54 ± 0.11)		0.50–0.77 (1.41 ± 0.08)
Existence of cuticular protuberances	present		present		present		present
Number of subepidermal fiber bundles	15–30 (20.23 ± 3.51)		19–31 (23.17 ± 4.79)		15–24 (20.37 ± 2.67)		14–28 (19.96 ± 3.22)
Number of fiber bundles in the cortex	10–92 (41.68 ± 13.79)		12–43 (27.50 ± 14.54)		1–19 (6.53 ± 5.54)		0–48 (9.50 ± 12.00)
Number of parenchyma cell layers in the cortex	4–7		5–7		4–5		5–6
Number of palisade cell layers	2–3		2–3		2–3		2–3
Number of fibers in the pith	8–137 (49.08 ± 30.47)		0		0–25 (8.53 ± 8.56)		0–9 (1.29 ± 2.77)
Mean length of subepidermal fiber bundles (longest 5 stems, μm)	92.06–243.68 (149.44 ± 22.87)		109.36–213.16 (165.78 ± 26.28)		61.52–188.77 (127.92 ± 29.39)		62.03–153.55 (95.90 ± 12.99)
Ratio of subepidermal fiber bundle length to cortex length (longest 5 stems)	0.25–0.65 (0.42 ± 0.06)		0.36–0.68 (0.50 ± 0.07)		0.21–0.63 (0.40 ± 0.07)		0.21–0.46 (0.34 ± 0.04)
Mean angle of the subepidermal fiber bundle (tip (longest 5 stems, °))	–17.4–40.7 (11.3 ± 4.3)		5.4–30.3 (16.4 ± 2.4)		–1.4–50.8 (16.1 ± 6.0)		4.8–72.8 (33.0 ± 8.2)

^{a)} *: unusual finding.^{b)} (MEAN ± S.D.).

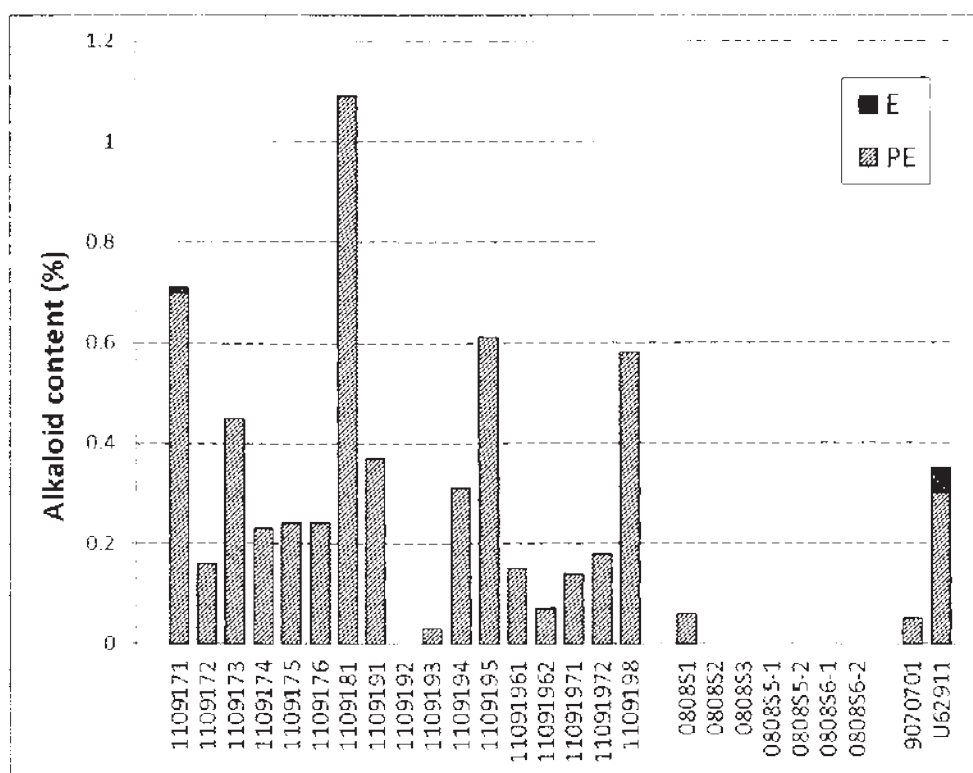


Fig. 2. Ephedrine and pseudoephedrine contents of *Ephedra distachya*. E, Ephedrine, PE, Pseudoephedrine.

filled with brown matter. Large numbers of fibers were observed in the pith of the samples from France, but no fibers were observed in the pith of the samples from Turkey (Table 1).

The anatomical characteristics of transverse sections of this species' herbal stems have been described previously using samples from China, but the results reported by these studies regarding the length and shape of the subepidermal fiber bundles were different from ours (Konoshima 1945b, Xu et al. 1992). Conversely, other studies have reported that *E. distachya* subsp. *distachya* samples collected from Inner Mongolia and Qinghai Province, China, belonged to the same species as *E. sinica* (Fushimi 2008), and another study could not confirm whether samples identified as *E. distachya* from Xinjiang Province, China, belonged to the same species as those from Europe (Fu et al. 1999).

2. *Ephedra distachya* subsp. *helvetica*

The anatomical characteristics of *E. distachya* subsp. *helvetica* were similar to those of *E. distachya* subsp. *distachya* (Fig. 1). However, 3 samples (0808S1, 0808S5-1, 2) contained less than 5 cortex fibers, and 2 of these samples (0808S1, 0808S5-1) contained no fibers in their pith (Fig. 1D). Other samples had more fibers in their cortex and pith (Fig. 1E). Thus, there was a great deal of variation in the findings for *E. distachya* subsp. *helvetica* (Table 1).

3. *Ephedra sinica*

The anatomical characteristics of *E. sinica* have been reported previously (Kimura 1930, Konoshima 1945a, Zhang 1989b, Fushimi 2008), and their results were in agreement with ours. Compared with *E. distachya* and *E. distachya* subsp. *helvetica*, *E. sinica* had shorter subepidermal fiber bundles (Table 1), which were almost trapezoidal in shape (Fig. 1F). Moreover, fewer fibers were observed in the

Table 2. Mutations in the ITS1 region of *Ephedra distachya* and its related species

	Nucleotide sequence of the ITS1 region														
	80	223	403	645	762	774	810	894	899	910	914	915	1023	1131	1134
<i>E. distachya</i> ssp. <i>distachya</i> (GU 065272)	C	G	—	C	T	G	A	C	T	C	A	G	C	Y	T
<i>E. distachya</i> ssp. <i>distachya</i> (France) 1109173, 1109176	*	*	*	*	*	*	*	Y	*	*	*	*	*	*	*
<i>E. distachya</i> ssp. <i>distachya</i> (France) 1109191	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>E. distachya</i> ssp. <i>distachya</i> (France) 12 samples	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>E. distachya</i> ssp. <i>distachya</i> (Turkey) 2 samples	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>E. distachya</i> ssp. <i>helvetica</i> (Switzerland) 6 samples	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>E. sinica</i> (AY 394071)	*	*	A	A	C	T	C	*	C	A	G	T	A	C	C

*: same as the top sequence. —: gap, Y: C or T, S: C or G.

cortex and pith of *E. sinica* than in those of the *E. distachya* samples collected in France (Table 1, Fig. 1F).

Ephedrine alkaloid content (Fig. 2)

1. *Ephedra distachya* subsp. *distachya*

There were no significant differences in the total amount of ephedrine alkaloids (ephedrine and pseudoephedrine) between the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from France (mean: $0.36 \pm 0.29\%$) and Turkey (mean: $0.17 \pm 0.17\%$). We also noticed that the ephedrine levels of all of the samples were so low that they could hardly be quantified. Moreover, only 3 of 21 samples met the requirements of the Japanese Pharmacopoeia (more than 0.7%), which suggests that *E. distachya* subsp. *distachya* does not have potential as a source of Ephedrae Herba.

However, two previous studies have reported that *E. distachya* subsp. *distachya* contained more ephedrine than pseudoephedrine (Moriyasu 1984, Kajimura 1994), which was contrary to our results. We noticed that the plant materials they used were cultivated in the Botanical Garden of Gifu College of Pharmacy and the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Osaka University, respectively. However, they did not provide clear information about the provenance of their cultivated plants, so the differing results might have been due to the samples having different origins. It was reported that the alkaloid content of *Ephedra* plants was influenced by the area in which they grew (Zhang 1989a) and soil alkalinity (Kondo 1999), so we consider that the samples being grown in different environments is a reasonable explanation for the differences between their and our alkaloid content results, especially considering that Japan is not the natural habitat of *E. distachya* subsp. *distachya*.

2. *Ephedra distachya* subsp. *helvetica*

Only one of the *Ephedra distachya* subsp. *helvetica* seven samples had their ephedrine alkaloid contents quantified, so we were not able

to reach any conclusion about the ephedrine/pseudoephedrine (E/PE) ratio. In addition, in the sample that was tested only pseudoephedrine was detected. Thus, like *E. distachya* subsp. *distachya*, *Ephedra distachya* subsp. *helvetica* could not be used as a source of Ephedrae Herba.

Nucleotide variations in the ITS1 regions of *Ephedra distachya* and *E. sinica* (Table 2)

Among 19 accession samples of *E. distachya* from France, two accession samples (1109173, 1109176) displayed substitutions at position 894, and 1 accession sample (1109191) had a substitution at position 80, whereas the other accession samples displayed identical ITS1 regions as the accession sample reported in a previous study (Kakiuchi et al. 2011). The specimens from Turkey displayed the same sequences as the *E. distachya* subsp. *helvetica* samples from Switzerland, whose ITS1 regions differed from those of the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from France due to a substitution at position 223. In contrast to the accession samples of *E. distachya*, whose ITS1 region sequences were reasonably similar, *E. sinica* was found to display about 12 nucleotide differences compared with the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from France, including a nucleotide insertion at position 403. Besides these 12 nucleotide differences, *E. sinica* differed from the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from Turkey and *E. distachya* subsp. *helvetica* at position 223, whereas it displayed an identical sequence to the *E. distachya* samples from France.

Comparisons between *Ephedra distachya* and *E. sinica*

Microscopic characteristics

We first tried to discriminate between *E. distachya* and *E. sinica* according to the numbers of fibers in the cortex and pith because these features have often been used by researchers to identify the official origins of Ephedrae

Herba including *E. sinica* (Konoshima 1945a, 1945b, Zhang 1989b, Xu et al. 1992, Fushimi 2008). Although some values overlapped, the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from France could be separated from *E. sinica* using these parameters ($P < 0.001$), as well as from the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from Turkey ($P < 0.001$) and the *E. distachya* subsp. *helvetica* samples from Switzerland ($P < 0.001$). However, the other samples could not be distinguished from each other according to the morphology of the fibers in their cortex or pith.

On the other hand, we noticed that the subepidermal fibers of the *E. distachya* and *E. sinica* samples displayed different morphologies. Statistical analysis showed that the mean length of the longest 5 subepidermal fiber bundles in *E. distachya* was longer than that in *E. sinica* (*E. distachya* subsp. *distachya*: $P < 0.001$; *E. distachya* subsp. *helvetica*: $P < 0.001$). As subepidermal fiber bundles might be longer in places where the cortex is wider, we also calculated the ratio of the length of subepidermal fiber bundles to the length of the corresponding cortex. The results confirmed that *E. distachya* has longer subepidermal fiber bundles than *E. sinica* (*E. distachya* subsp. *distachya*: $P < 0.001$; *E. distachya* subsp. *helvetica*: $P < 0.001$). We examined the mean angle of the tip of the longest 5 subepidermal fiber bundles as another parameter of subepidermal fiber morphology and found that *E. distachya* displayed smaller angles than *E. sinica* (*E. distachya* subsp. *distachya*: $P < 0.001$; *E. distachya* subsp. *helvetica*: $P < 0.001$), and it was indicated that the subepidermal fiber bundles of these two species are rectangular. Thus, we conclude that *E. distachya* can be morphologically distinguished from *E. sinica* using this feature.

Ephedrine alkaloid content and DNA sequence of ITS1 region

In chemical analysis, we found that the alkaloid content of *E. distachya* was much lower than the values reported for *E. sinica* by

us (Wang 2010) and other researchers (Hong 2011b), although the ranges of the two species overlapped a little. Moreover, *E. distachya* hardly contained any ephedrine. In contrast, we previously found that *E. sinica* normally contains more ephedrine than pseudoephedrine (Wang 2010), while a recent report also found that the F/PE ratio of *E. sinica* was greater than 0.7 (Hong 2011b). Therefore, we concluded that *E. distachya* is phytochemically different from *E. sinica*.

At the same time, both our molecular phylogenetic results and those reported previously (Ickert-Bond and Wojciechowski 2004, Huang et al. 2005, Rydin and Korall 2009, Kakiuchi et al. 2011) showed that *E. distachya* possesses a different ITS1 region from *E. sinica*.

Comparisons between *Ephedra distachya* subsp. *distachya* and *E. distachya* subsp. *helvetica* Microscopic characteristics

The *Ephedra distachya* subsp. *distachya* samples from France could be easily distinguished from *E. distachya* subsp. *helvetica* according to the morphology of the fiber bundles in their cortex ($P < 0.001$) and pith ($P < 0.001$). The length ($P < 0.001$) and angle ($P < 0.01$) of the subepidermal fiber bundles of these two species were also found to differ. It was difficult to determine the botanical characteristics of the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from Turkey because only two samples were studied, but generally they did not display any significant difference from *E. distachya* subsp. *helvetica* with regard to the morphology of the fiber bundles in their cortex or pith; however, they did have significantly longer subepidermal fibers than the *E. distachya* subsp. *distachya* ($P < 0.001$) samples from France and *E. distachya* subsp. *helvetica* ($P < 0.001$). Thus, we concluded that these longer subepidermal fiber bundles can be used to differentiate between *E. distachya* subsp. *distachya* and *E. distachya* subsp. *helvetica*. It was unclear why the *E. distachya* subsp. *distachya* samples from France had many

more fiber bundles in their cortex and pith than those from Turkey, although we consider that environmental differences might have played a role as the plants from France grew on a sandy seashore while those from Turkey grew in the clay soil at the foot of a mountain.

Ephedrine alkaloid content and the DNA sequence of the ITS1 region

Chemical analysis showed that *E. distachya* subsp. *helvetica* hardly contained any alkaloids, which was different from *E. distachya* subsp. *distachya*. In addition, a molecular phylogenetic study showed that these two species possessed no more than two nucleotide variations in their ITS1 regions.

Conclusion

We concluded that *Ephedra distachya* and *E. sinica* differ to some extent, based on the differences in the shapes of their subepidermal fiber bundles, their E/PE ratios, and their ITS1 region sequences. Thus, we suggest that these two species represent different taxa although they are morphologically similar.

This study is supported by a Grant-in-Aid from the Japan Society for the Promotion of Science (No. 20255005 to M. Mikage).

References

- Chen H. L., Qiu Z. Y. and Zhao L. Y. 1989. Anatomical Identification of Ma-huang. *J. Chin. Med. Mat.* **12**(3): 24–26 (in Chinese).
- Cheng C. Y. 1978. *Ephedra sinica* Stapf. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* tomus 7: 477–478. Science Press, Beijing (in Chinese).
- Fu L. G., Yu Y. F. and Riedl H. 1999. *Ephedra sinica* Stapf. *Flora of China* 4: 99–100. Science Press, Beijing & St. Louis, Missouri Botanical Garden.
- Fushimi N., Wang L., Ebisui S., Cai S. and Mikage M. 2008. Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 4. Morphological differences between *Ephedra sinica* Stapf and *E. intermedia* Schrenk & C. A. Meyer, and the botanical origin of Ma-huang produced in Qinghai Province. *J. Trad. Med.* **25**(3): 61–66.
- Huang J., Giannasi D. E. and Price R. A. 2005. Phylogenetic relationships in *Ephedra* (*Ephedraceae*) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* **35**: 48–59.
- Hong H., Chen H. B., Xu F., Zang X. Y., Yang D. H., Wang X., Cai S. Q. and Mikage M. 2011a. Surveys on resources and varieties on Chinese markets of crude drug Mahuang. *China J. Chin. Mat. Med.* **9**: 1129–1132 (in Chinese).
- Hong H., Chen H. B., Yang D. H., Shang M. Y., Wang X., Cai S. Q. and Mikage M. 2011b. Comparison of contents of five ephedrine alkaloids in three official origins of *Ephedra* Herb in China by high-performance liquid chromatography. *J. Nat. Med.* **65**: 623–628.
- Ickert-Bond S. M. and Wojciechowski M. F. 2004. Phylogenetic Relationships in *Ephedra* (*Gnetales*): Evidence from nuclear and chloroplast DNA sequence Data. *Syst. Bot.* **29**(4): 834–849.
- Kajimura K., Iwamoto Y., Yamasaki K., Sakagami Y., Yokoyama H. and Yoneda K. 1994. Variation of growth and contents of ephedrine type alkaloids in *Ephedra distachya*. *Nat. Med.* **48**(2): 122–125 (in Japanese).
- Kakiuchi N., Mikage M., Ickert-Bond S., Maier Stolte M. and Freitag, H. 2011. A molecular phylogenetic study of the *Ephedra distachya*/*E. sinica* complex in Eurasia. *Willdenowia* **41**: 203–215.
- Kimura K. and Takata J. 1930. A pharmacognostical study on “Ma-wō” or “Ma Huang” and “Ma-wō-kon” or “Ma Huang Hōn”. Chinese drugs. (Anatomies of *Ephedra sinica* Stapf. and *E. foliata* Boiss. *Gnetaceae*). *Yakugaku Zasshi* **50**: 563–572 (in Japanese).
- Kitagawa M. 1939. *Lineamenta Florae Manchuricae*. Report of the Institute of Scientific Research, Manchoukuo vol. 3, append 1: 49. Institute of Scientific Research, Manchoukuo.
- Kondo N., Mikage M. and Idaka K. 1999. Medico-botanical studies of *Ephedra* plants from Himalayan region Part III. The causative factors of variation of alkaloid content in herbal stem. *J. Nat. Med.* **53**(4): 194–200.
- Konoshima M. 1945a. Pharmacognostic studies on the crude drug Mahuang. III. Herbaceous *Ephedra* of northern China, Mongolia, and Manchuria. (2). *Yakugaku Zasshi* **65**: 482–489 (in Japanese).
- Konoshima M. 1945b. Pharmacognostic studies on the crude drug Mahuang. IV. Herbaceous *Ephedra* of northern China, Mongolia, and Manchuria. (2). *Yakugaku Zasshi* **65**: 490–496 (in Japanese).
- Linnaeus C. 1753. *Ephedra distachya* Linnaeus. *Sp. Pl.* **2**: 1040.
- Liu Y. M., Sheu S. J., Chiou S. H., Chang H. C. and Chen Y. P. 1993. A comparative study of commercial samples of *Ephedrae* Herba. *Planta Med.* **59**: 376–378.
- Moriyasu M., Endo M., Kanazawa R., Hashimoto Y., Kato A. and Mizuno M. 1984. High-performance liquid chromatographic determination of organic substances by metal chelate derivatization III. Analysis of *Ephedra* bases. *Chem. Pharm. Bull.* **32**(2): 744–747.

- Price R. A. 1996. Systematics of the *Gnetales*: A review of morphological and molecular evidence. *Int. J. Pl. Sci.* **157**: S40–S49.
- Rydin C. and Korall P. 2009. Evolutionary relationships in *Ephedra* (*Gnetales*), with implications for seed plant phylogeny. *Int. J. Pl. Sci.* **170**: 1031–1043.
- Stapf O. 1927. Ma huang of China (*Ephedra sinica* Stapf). *Bull. Misc. Inf. Kew.* **3**: 133–134.
- Tang S. W. [ed. by Shang Z. J., based on the 12 century edition by Cheng A.] 2002. Ma-huang. *Daguan Bencao*: 265–266 (in Chinese).
- Wang L. L., Kakiuchi N. and Mikage M. 2010. Studies of *Ephedra* plants in Asia. Part 6: Geographical changes of anatomical features and alkaloids content of *Ephedra sinica*. *J. Nat. Med.* **64**(1): 63–69.
- Xu S. F., Lin X. H., Zhong Y. and Liu G. J. 1992. An identification study on tissues of several species of *Ephedra* in Xinjiang. *Acta Acad. Med. Xinjiang* **15**(4): 238–240 (in Chinese).
- Yang Y. 2002. Systematics and Evolution of *Ephedra* L. (*Ephedraceae*) from China: 22–26. Submitted to the Graduate School of the Chinese Academy of Sciences in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in the subject of Botany. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing (in Chinese).
- Zhang J. S., Li S. H. and Lou Z. C. 1989b. Morphological and histological studies of Chinese *Ephedra* Mahuang 1. Seven species produced in north China. *Acta Pharm. Sin.* **24**(12): 937–948 (in Chinese).
- Zhang J. S., Tian Z. and Lou Z. C. 1989a. Quality evaluation of twelve species of Chinese *Ephedra* (mahuang). *Acta Pharm. Sin.* **24**(11): 865–871 (in Chinese).

倪 斯然^a, 松本昌士^a, 下山祐依^b, N. Allain^c, M. Coşkun^d, T. Yilmaz^d, 御影雅幸^a: *Ephedra distachya* の組織学的, 化学的, 分子遺伝学的研究

マオウ科の *Ephedra sinica* Stapf の草質茎は、中国伝統医学で麻黄の名称で薬用にされる重要生薬である。本種はヨーロッパを中心に自生する *E. distachya* L. と同種であるとする説がある。そこで本研究では、*E. distachya* を麻黄として利用可能か否かを検討するため、スイス、フランス及びトルコで採集した株について、内部形態、含有アルカロイド、並びに DNA 塩基配列を検討した。その結果、本種は *E. sinica* とは、草質茎の横断面では表皮下繊維群の形、化学的にはエフェドリン類

アルカロイドの組成比が大きく異なり、また ITS1 領域の DNA 配列は約 11 塩基が異なっていた。以上の観点から、両種は別の分類群であると判断され、現在の日・中の薬局方に照らし合わせると、*E. distachya* は麻黄として利用できないと結論した。

^a 金沢大学大学院自然科学研究科,

^b 金沢大学医薬保健学域薬学類,

^c フランス・国立自然史博物館,

^d トルコ・アンカラ大学薬学部

マオウ属植物の栽培研究（第2報）¹⁾

海水がシナマオウの生長およびアルカロイド含量に及ぼす影響

大富規弘, 野村幸宏, 井出達也, 大野剛史, 毛利千香, 御影雅幸

金沢大学医薬保健研究域薬学系資源生薬学研究室

〒920-1192 石川県金沢市角間町

Studies of Cultivation of Ephedra Plants (part 2).

Effect of sea water on the growth and alkaloid content of *Ephedra sinica* Stapf

Norihiro Ohtomi, Yukihiko Nomura, Tatsuya Ide, Takeshi Ohno, Chika Mouri, and Masayuki Mikage*

Laboratory of Crude Drug and Herbal Medicines, Faculty of pharmaceutical Sciences, Kanazawa

University, Kakuma-machi, Kanazawa, 920-1192 Japan

2013年5月16日受付

Summary

Ephedra plants have salt tolerance to some degree. We reported the salt tolerance of ephedra in germination stage in the previous paper. In this study, we report the salt tolerance of ephedra in growing stage, comparing with some wild plants, and the effect of salt water on alkaloid content of ephedra. The result showed that the salt tolerance of *Ephedra sinica* Stapf was superior than *Amphicarpaea edgeworthii* Benth. and *Artemisia indica* Willd. var. *maximowiczii* H.Hara (= *Aletrisia princeps* Pamp.), same as *Imperata cylindrica* Raeusch., and less than *Chenopodium album* L. Moreover, the alkaloid content of herbal stem of ephedra intentionally increased by giving the artificial sea waters thinned to 1/16 once a week.

要 旨

マオウ属植物はある程度の耐塩性を有している。前報ではマオウ種子の発芽期における耐塩性を検討した。本研究では生長株の耐塩性を他の野生植物と比較検討するとともに、アルカロイド含量への影響を調査した。その結果、シナマオウの耐塩性はヤブマス、ヨモギに勝り、チガヤと同程度であり、シロザに劣っていた。また、16分の1希釈した人工海水を週1回間灌水することにより、アルカロイド含量が有意に増加することが明らかになった。

緒 言

著者らの中国における *Ephedra* 属植物の自生地における現地調査の結果、[局]麻黄の1基原植物である *Ephedra sinica* Stapf (= *E. dahurica* Turcz.) シナマオウは、野生地では土質を選ばず生育し、塩性地や海岸などにも生育する一方、背が高くなる雑草との生存競争に弱いことが明らかになっている²⁾。中国では麻黄の栽培が行なわれているが、マオウ属植物は多年草で、同一場所で継続栽培されることから、他の一年生の農作物の場合には毎年耕作時に除草可能であるのに対して、除草に手間がかかる欠点がある。そこで、塩性地での栽培は除草の手間が少なくなる可能性があると考え、前報¹⁾ではシナマオウの発芽期の耐塩性について検討し、アカミタンボポやレンゲソウなどの一般の植物や海岸の砂地で自生するカワラヨモギよりも高く、日本の海岸砂地に一般的に見られるハマダイコンなどと同等の耐塩性があることを報告した。また、塩性地で生育した *Ephedra* 属植物は、通常よりアルカロイド含量が高いという報告がある³⁾。そこで、本報では、発芽後の生育を他の一般植物と比較するとともに、塩分がアルカロイド含量に及ぼす影響について検討した結果を報告する。

【実験方法】

実験材料：発芽後4年目のシナマオウ及び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（以下、薬草園）内に自生する4種の植物（キク科のヨモギ、アカザ科のシロザ、イネ科のチガヤ及びマメ科のヤブマメ）を用いた。これらの4種の植物は、中国における麻黄栽培畑地において多く見られた有害雑草と同科あるいは同属植物種である⁴⁾。

人工海水の調製：塩化ナトリウム434.0g、

硫酸マグネシウム七水和物103.9g、塩化マグネシウム六水和物78.6g、塩化カルシウム二水和物22.4g及び塩化カリウム11.1gを薬草園の地下水に溶解して15 Lにし、人工海水とした。人工海水1/2、1/4、1/8及び1/16希釈液は上記電解質の量をそれぞれ1/2、1/4、1/8及び1/16にし、薬草園の地下水に溶解して15 Lとして調製した。

栽培容器と土壌：容器として1/2000aのワグネルポット、栽培土壌として川砂を用い、土壌下層に元肥として化成肥料「普通化成8号（フジカワエック、N:P:K = 8:8:8）」25 g/potを混合し、実験植物を1ポットあたり3株定植した。定植直後に置肥としてプロミック遅効きタイプ中粒（ハイポネックスジャパン、N:P:K = 8:8:8）6錠/potを与えた。2007年7月11日に同内容の置肥を追加した。

定植と管理：定植日はシナマオウが実験第一年目（2007年）の4月8日～9日、ヨモギ及びチガヤが4月24日、シロザが5月2日、ヤブマメが5月21日、シナマオウは54株、他の植物は各18株定植した。実験は雨の当たらないビニールハウス内で行なった。

実験群と灌水方法：上記の方法で定植した実験材料の中から生長度が揃った株を選択し、1群あたりシナマオウ9株、他の植物3株とし、各6群ずつを準備した。毎週月曜日に各群にそれぞれ無希釈の人工海水、1/2、1/4、1/8、1/16希釈の人工海水、及びブランクとして薬草園の地下水を灌水した。土壌中塩分の濃縮を防ぐため、毎週金曜日にすべての群に地下水を灌水した。1回の灌水量は2 L/potとした。上記の灌水を実験一年目は2007年6月4日～2007年11月12日に行なった。

実験二年目（2008年）はシナマオウについてのみ、一年目に枯死しなかった株を3月31日～4月1日にすべて1/5000aのワグネルポットに1株ずつ新たな川砂で再定植し、施肥は元肥を10g/pot、置肥を2錠/potとした。実験材料は定植直後からビニールハウス内にて管理した。一年目に人工海水1/8、1/16希釈液及び地下水を与えた群は引き続き同濃度の希釈人工海水及び地下水を与えて栽培し、人工海水1/2及び1/4希釈液を与えて栽培した群の株には人工海水1/16希釈液を与えた。毎週金曜日に希釈人工海水を灌水し、毎週火曜日に地下水を灌水した。1回の灌水量は400 mL/potとした。上記の灌水を4月11日～11月7日に行なった。

生長の評価：シナマオウについては草質茎の総長（全ての茎の長さの総和）、ヨモギ及びシロザについては草丈及び葉の枚数、ヤブマメについては草丈及び小葉の枚数、チガヤについては葉の総長をそれぞれ生長評価の指標とした。一年目の生長評価は、シナマオウは5月9日～11日、6月1日、7月3日～4日、7月30日～31日、9月10日～12日、11月8日～13日に行なった。ヨモギ、シロザ、ヤブマメ、チガヤについては6月から10月まで、各月の初旬に行なった。シナマオウの二年目の生長評価は4月8日～12日、6月30日～7月4日、9月8日～9月11日に行なった。

アルカロイドの定量：実験一年目の11月13日に、分析に十分量の草質量を有する36株のシナマオウから3～5本の草質茎を基部から採取し、それらの全量を乾燥粉末化し、アルカロイド [ephedrine(E)及びpseudoephedrine(PE)]を定量した。〈装置：日立製〉ポンプ：L 2130、オートインジェクター：L 2200、紫

外部検出器：L 2400、クロマトデータ処理及びシステムコントロールソフト：D 2500。

〈HPLC条件〉カラム：ODS (4.6mm×250mm)、カラム温度：室温、流速：1.0mL/min、検出波長：210nm、注入量：10μL、移動相：C₁₂H₂₂O₅Na溶液（1→127）/MeCN/H₃PO₄（305:195:0.8）。

二年目は9月11日に同様に36株から草質茎を採取し、測定した。また、前年のデータと比較するため、11月14日に上記36株のうち3株から再び草質茎を採取し測定した。

【結果】

灌水液中塩分濃度が実験植物の生長に及ぼす影響

実験一年目における灌水液の塩分濃度別の平均草質茎長をFig. 1に示す。無希釈の人工海水を灌水した群では実験終了までにすべての株が枯死した。人工海水1/2希釈液を灌水した群では2株が枯死し、生存していた株も著しく生長が抑制され、最終生長評価時における平均草質茎長はブランクの半分程度であった。人工海水1/4、1/8及び1/16希釈液を灌水した群ではブランクと比較してわずかに生長が抑制されたものの、ほとんどの株がほぼ正常に生長した。

ヨモギについては、無希釈の人工海水および1/2希釈人工海水の群では全株が年内に枯死した。1/4液希釈液群ではブランクと比較して草丈では約90%、葉の枚数では55%程度であった。1/8希釈以下では顕著な生長不良は認められなかった。

シロザについては、無希釈の人工海水群で3株のうち2株が枯死し、残った1株の草丈も地下水群の70%程度であった。また、1/2希釈液群では枯死株はなかったが、明らかな生長阻害が見られ、1/4希釈以下では顕著な生

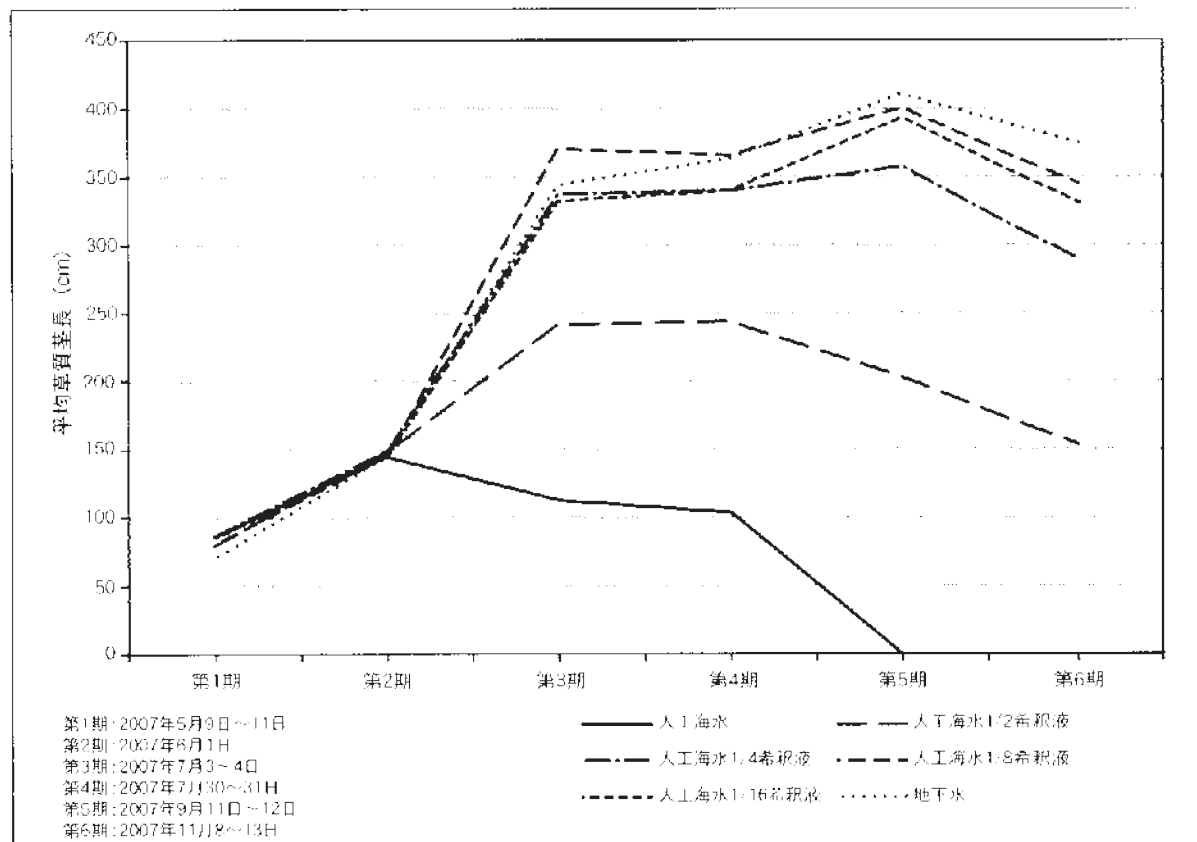


Fig. 1 湛水液の塩分濃度とシナマオウの平均草質茎長（実験一年目）

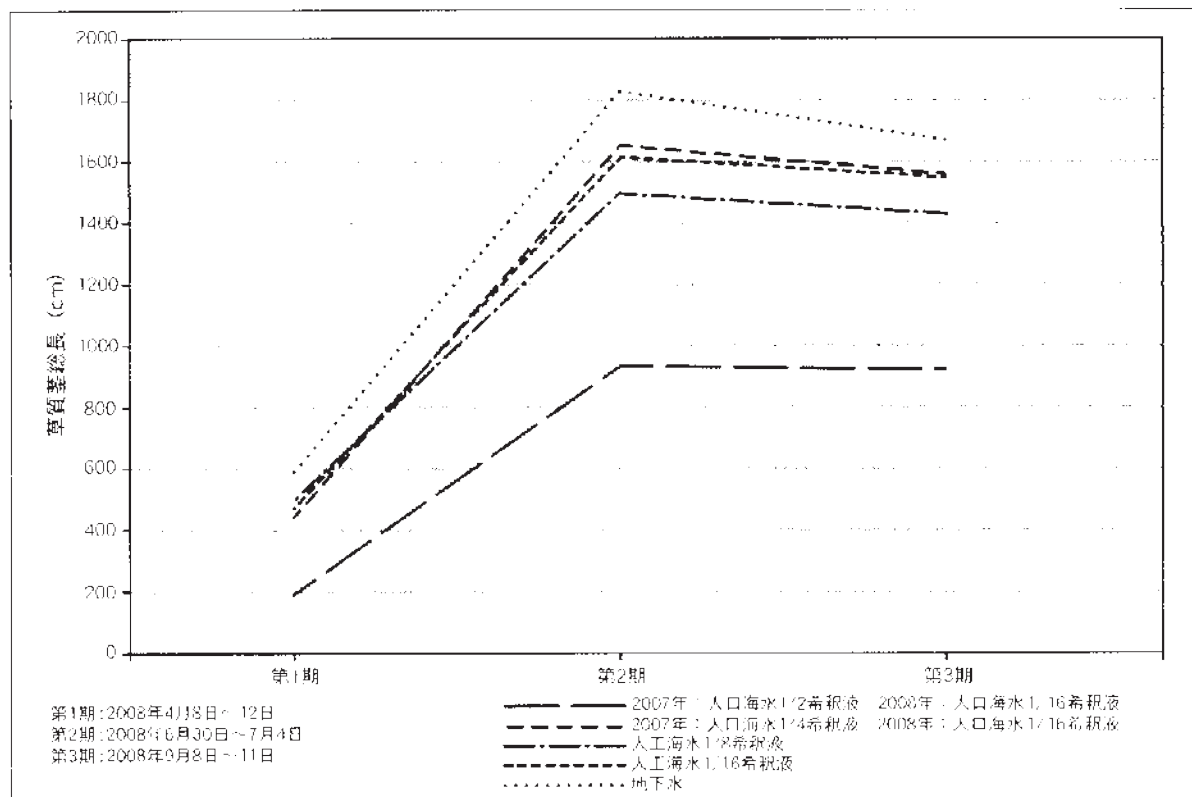


Fig. 2 湛水液の塩分濃度とシナマオウの平均草質茎長（実験二年目）

長不良は認められなかった。

チガヤについては、無希釈の人工海水を灌水した群ではすべての株が枯死した。1/2希釈群では明らかな生長阻害が見られ、葉の総長は地下水群の30%程度であった。1/4希釈群以下では有意な阻害は認められなかった。

ヤブマメについては、1/16希釈以上の人工海水濃度では全て第1期には生存していたが、実験終了までには全株が枯死した。

以上、ヤブマメは最も耐塩性が低く、ヨモギはヤブマメに次いで耐塩性が低く、チガヤは耐塩性が比較的高く、シロザが最も耐塩性が高いことが明らかになった。

実験二年目のシナマオウの灌水液の塩分濃度別の平均草質茎長をFig. 2に示す。一年目に人工海水1/2希釈液を、二年目に人工海水1/16希釈液を灌水した群の平均草質茎総長はブランクの半分程度であったが、それ以外の群の平均草質茎長はブランクとほぼ同等であった。ブランクの平均草質茎総長は7月に最大となり、その値は約1800cmであった。

塩分濃度がシナマオウのアルカロイド含量に及ぼす影響

異なる塩分濃度の人工海水を灌水した実験一年目のマオウ草質茎の平均アルカロイド含量をFig. 3に示す。人工海水1/16希釈液を灌水した群の平均アルカロイド含量は約0.70%であり、ブランクの約1.7倍であった。人工海水1/2、1/4及び1/8希釈液を灌水した群の平均アルカロイド含量はブランクよりも低く、いずれも0.3%前後であった。

実験二年目の9月11日に採取した草質茎のアルカロイド含量をTable 1に示す。人工海水1/16希釈液を灌水した群の平均アルカロイド含量は $0.845 \pm 0.35\%$ であり、ブランクの約1.2倍であった。人工海水1/8希釈液を灌水

した群の平均アルカロイド含量はブランクより低く、約0.48%であった。2007年に人工海水1/2及び1/4希釈液を、2008年に人工海水1/16希釈液を灌水した群の平均アルカロイド含量はそれぞれ約0.54及び0.58%と、ブランクには劣るものの、人工海水1/8希釈液を灌水した群よりも高かった。

結論および考察

1. シナマオウは人工海水1/4希釈液以下の塩濃度においてほぼ正常に生育できることが明らかになった。また、シナマオウの耐塩性はヤブマメ、ヨモギに勝り、チガヤと同程度であり、シロザに劣っていた。以上、人工海水1/4希釈液を灌水して栽培を行えば、シナマオウを正常に生長させ、ヤブマメやヨモギの生長を抑え、除草の省力化が期待できると判断できる。しかし、この条件ではチガヤとシロザの生長を抑えることはできなかった。とくにチガヤは地下に根茎を蔓延して繁殖するため、除草作業により根絶させることは困難である。中国の麻黄栽培地においても根茎を引いて増殖するイネ科植物の除草に苦勞しており、有害雑草はできる限り早期に除草する必要がある。なお、人工海水1/4希釈液を灌水した群の土壤中塩分濃度を塩分計(Salt Tester II, EUTECH INSTRUMENTS)を用いて測定した結果、表面において0.80%、深部において0.08%を超えることはなかったことから、この土壤中塩分濃度がシナマオウが正常に生長できる限界の濃度であると判断された(測定法、データ等省略)。

2. 灌水液中の塩分濃度がシナマオウのアルカロイド含量に及ぼす影響に関しては、人工海水1/16希釈液を灌水した群の平均アルカロイド含量が最も高く、一年目がブランクの約1.7倍、二年目が約1.2倍であった。これま

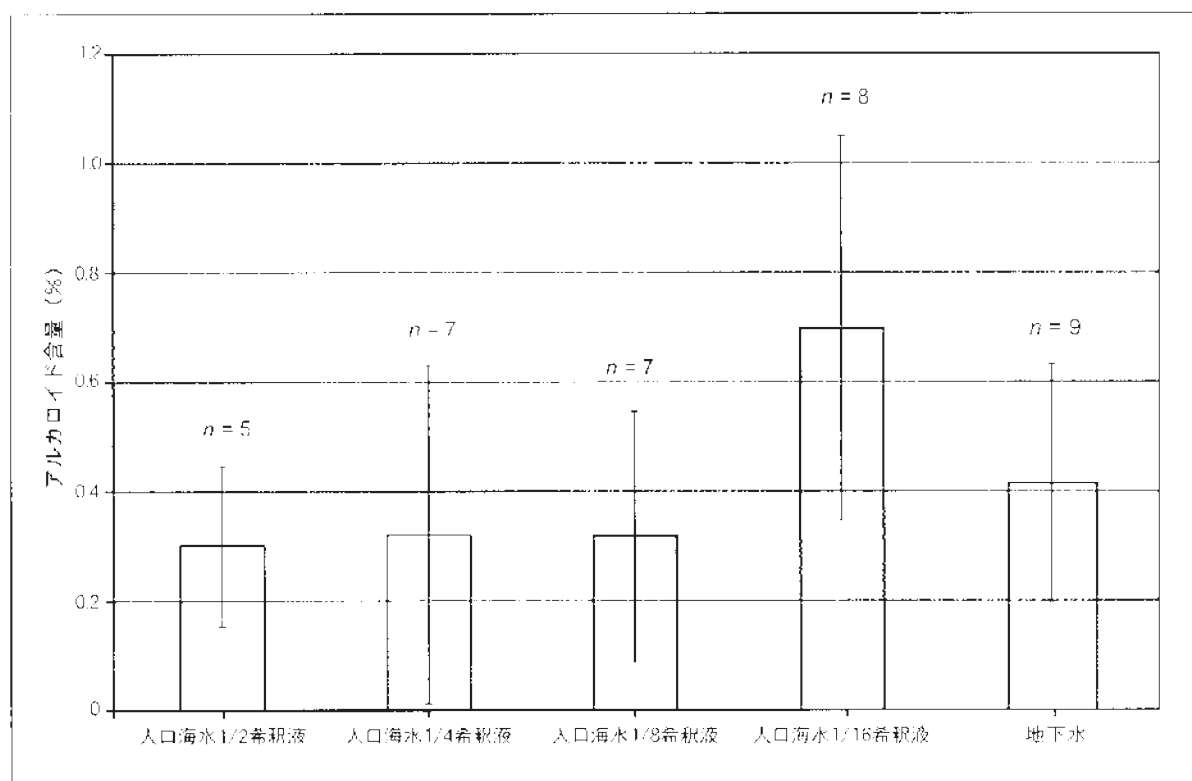


Fig. 3: 灌 waters の塩分濃度とシナマウ草葉中総アルカロイド含量の相関 (2007年11月13日採取)

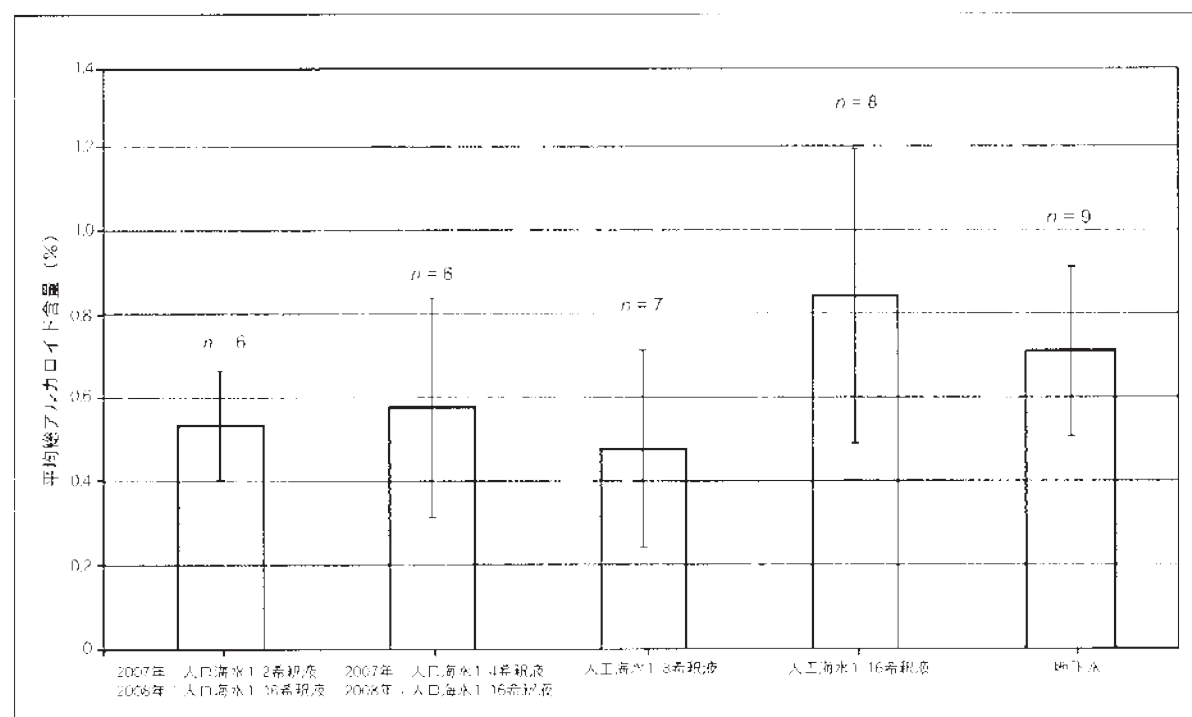


Fig. 4: 灌 waters の塩分濃度とシナマウ草葉中総アルカロイド含量の相関 (2008年9月11日採取)

Table 1 灌水中塩分濃度とシナマオウ草質茎中のアルカロイド含量の関係 (2008年9月11日採取)

株ID	灌水中塩分濃度	アルカロイド含量 (%)			(平均E+PE) ±SD
		E	PE	E+PE	
No.212	2007年 人工海水1/2希釈液 2008年 人工海水1/16希釈液	0.092	0.318	0.410	0.538±0.13
No.222		0.400	0.296	0.696	
No.223		0.007	0.691	0.698	
No.231		0.029	0.417	0.446	
No.232		0.286	0.171	0.457	
No.233		0.009	0.530	0.539	
No.311		0.191	0.143	0.334	
No.321		0.087	0.228	0.315	
No.322		0.010	0.797	0.807	
No.323		0.236	0.260	0.496	
No.332	2007年 人工海水1/4希釈液 2008年 人工海水1/16希釈液	0.352	0.369	0.722	0.577±0.27
No.333		0.014	0.866	0.880	
No.411		0.031	0.198	0.250	
No.412		0.251	0.137	0.388	
No.413		0.005	0.243	0.248	
No.421		0.486	0.393	0.879	
No.431		0.223	0.136	0.359	
No.432		0.473	0.175	0.648	
No.433		0.017	0.571	0.588	
No.511		0.004	0.360	0.364	
No.512	人工海水1/16希釈液	0.007	0.812	0.819	0.845±0.35
No.513		0.032	1.067	1.099	
No.521		0.460	0.528	1.008	
No.523		0.109	0.380	0.489	
No.531		0.374	0.439	0.813	
No.532		0.126	0.560	0.686	
No.533		0.386	1.094	1.480	
No.611	地下水	0.114	0.796	0.911	0.709±0.20
No.612		0.347	0.200	0.545	
No.613		0.029	0.599	0.627	
No.621		0.383	0.655	1.038	
No.622		0.056	0.571	0.626	
No.623		0.039	0.386	0.425	
No.631		0.116	0.623	0.739	
No.632		0.280	0.272	0.552	
No.633		0.228	0.698	0.926	

での本園内における *Ephedra* 属植物の栽培では、アルカロイド含量が概ね0.3~0.4%と低かったが、今回の結果から、人工海水1/16液希釈液を灌水することによりアルカロイド含量の高いシナマオウを栽培生産できる可能性が示唆された。なお、人工海水1/16希釈液を灌水した群における土壤中塩分濃度は表面で0.08~0.32%、深部で0.02~0.04%であったことから、この程度の塩分濃度がアルカロイド含量の高いシナマオウを育成させるに最適な土壤中塩分濃度であると考えられる。

3. 実験一年目は、設定した塩分濃度が異なる6群のいずれにおいても平均アルカロイド含量は0.7%に及ばなかったが、二年目には人工海水1/16液希釈液群とブランク群で0.7%を超え、日局に適合した。他の群も一年目より増加したことは、株の生長によるもの

と考えられ、実際、一年目には開花株がなかったが、二年目には開花する株が見られた。また、一年目に人工海水1/2及び1/4希釈液を灌水し、二年目に人工海水1/16希釈液を与えた群の平均アルカロイド含量がブランクより低かったことは、一年目に高濃度の希釈人工海水が与えられたことにより、株の生長が抑制された結果であると考えられる。なお、各群ともにアルカロイド含量の変異幅が大きいのは、株の生長程度（成熟度）が異なるためと考えられるが、これまでの経験から、株の生長度を均一にそろえることは困難である。本研究では一群の数を8株としたが、今後は1群の数をさらに増やすことや、挿し木増殖したクローン株を利用して再検討する予定である。また一方で、同一株では生長するに従いアルカロイド含量が上昇する傾向が見られ

たので、株の年齢とアルカロイド含量との相関についても検討する必要がある。

4. 実験二年目の11月14日に草質茎を採取した3株の平均アルカロイド含量は、前年同期よりは増加していたが、本報で示した同年9月11日よりやや低下していた（ラテータ略）。このことは秋期に採集することが望ましいことを示唆しているが、現地では11月に採集するのが良いとする意見もあり、最適採集時期については更なる検討が必要である。

引用文献

- 1) 前報(*The Japanese Journal of Medicinal Resources*, 34(2), 1-6(2012))を第1報とする。
- 2) Mikage M., Takahashi A., Chen H., Li Q., Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 1. On the Resources of *Ephedra* Plants in China, *Natural Medicines*, 57 (5), 202-208, (2003). Mikage M., Kondo N., Yoshimitsu M., Nakajima I., Cai S., Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 2. On the Current Situation of the Cultivation of *Ephedra* Plants in China, *Natural Medicines*, 58 (6), 312-320, (2004).
- 3) Yang Z., Wang J., Mao D., A Research of *Ephedra* Cultivation in Saline-Alkali Land, *Acta Bot. Boreali-Occident. Sin.*, 22 (1), 141-145, (2002).
- 4) Mikage M., Motomura H., Yoshimitsu M., Yonekura K., Chen H., Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 3. The Weed Control Problem in *Ephedra* Cultivated Field in China, *Natural Medicines*, 59 (3), 125-128 (2005).

●大宮 規弘（おおとみ・のりひろ）●

三重県出身

2009年 金沢大学薬学部卒業

2011年 金沢大学大学院自然科学研究科
（博士前期課程）修了
薬学修士

●野村 幸宏（のむら・ゆきひろ）●

神奈川県出身

1990年 帝京大学薬学部卒業

2012年 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科
（博士後期課程）社会人学生

●井田 達也（いで・たつや）●

長野県出身

2004年 金沢大学薬学部卒業
薬学士

●大野 剛史（おおの・たけし）●

富山県出身

2008年 金沢大学薬学部卒業
薬学士

●毛利 千香（もうり・ちか）●

石川県出身

1996年 金沢大学薬学部卒業
2002年 金沢大学大学院自然科学研究科修了
薬学博士

●御影 雅幸（みかげ・まさゆき）●

大阪府出身

1973年 所蔵大学薬学部卒業
1975年 富山大学大学院薬学研究科修了
1984年 薬学博士

マオウ属植物の栽培研究（第3報）¹⁾

シナマオウの株分け及び木質茎の挿し木による種苗生産の検討

野村行宏，佐々木陽平，三宅克典，御影雅幸*

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科創薬科学専攻資源生薬学研究室

〒920-1192 石川県金沢市角間町

Studies of Cultivation of Ephedra Plants (part 3).

Multiplication from divisions and woody stem cuttings of *Ephedra sinica* Stapf

Yukihiro Nomura, Yohei Sasaki, Katsunori Miyake and Masayuki Mikage*

Laboratory of Herbal Medicine and Natural Resources, Division of Pharmaceutical

Sciences, Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University.

Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192 Japan

2013年9月 日受付

要 旨

日本薬局方に収載され、また中国で一般に栽培されている漢方生薬「麻黄」の1原植物である*Ephedra sinica* Stapfを栽培する際の苗を得る目的で、株分けおよび木質茎の挿し木法を検討した。その結果、根茎を引いて生育している株は根茎部を切り分けることで容易に増殖することができた。また、非効率的であるが、まだ根茎を引いていない播種後4年生株からも株分けで1株あたり2～3株の新苗を得ることができた。また、挿し木法では、挿し穂基部を水平切りして挿し、人工気象器内で保管することにより、5割の苗が活着した。マオウ属植物の草質茎の挿し木は木質茎より困難であるとされており、草質茎の挿し木法については次報で述べる。

Summary

We investigated the multiplication from divisions and woody stem cuttings of *Ephedra sinica* Stapf, which is prescribed as one of the botanical origins of Ephedrac Herba in the Japanese Pharmacopoeia 16th. The results are as follows: The plantlets obtained by dividing an old stock grown by underground rhizomes took root easily; The plantlets obtained by cutting woody stem longitudinally with roots also took root easily, though it was inefficient; About a half of cuttings obtained from woody stems with enough herbal stems took root in a biotron, and the success rate was higher than that of *E. altissima* Desf. ever reported. The multiplication from cuttings of herbal stems of *Ephedra* plants will be reported in the next paper.

漢方生薬「麻黄」の栽培は中国で1980年代から盛んになり、現在では主として *Ephedra sinica* Stapf が栽培され、苗の確保は主として種子繁殖に依っている。一方、現時点では我が国でマオウ種子の生産は行なわれておらず、苗の確保のためには他の手法をも検討する必要がある。また、種子繁殖では遺伝的形質が一定ではない。そこで、筆者らはクローン株が得られる株分け法ならびに挿し木法などを検討することにした。これまでにマオウ属植物の挿し木法による繁殖については、藤田ら⁹⁾による『日本薬局方』に収載されていない *E. altissima* Desf. 及び *E. distachya* L. を用いた研究があり、木質茎を挿し穂とした場合の活着率は *E. altissima* で約40%、*E. distachya* で15%であったが、草質茎を挿し穂とした場合には、*E. altissima* では活着率が約10%と低く、*E. distachya* では全く活着しなかったと報告されている。また、『第十六改正日本薬局方』³⁾ 収載種としては、旧国立衛生試験所春日部薬用植物栽培試験場が導入した *E. sinica* 株 (Ep-13) について、株分けや根挿しが有効であると報告されている¹⁰⁾ が、Ep-13は我々が保有する *E. sinica* とは繁殖能力が大幅に異なり、筆者ら¹¹⁾ はDNAを解析した結果 *E. sinica* ではなく、別種の交雑種である可能性を示した。そこで、本研究では金沢大学が保有する *E. sinica* を用いて、株分けおよび木質茎の挿し木による繁殖法を検討した結果について報告する。

1. 株分けによる繁殖

1) 根茎で増えた株を利用する方法

富山県薬用植物指導センターから株分けにて譲り受けた *Ephedra sinica* を、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にてワグネルポット (1/2000a) または11号

駄温鉢で5年間育てた2株 (A株、B株)、地下部に多数の根茎を延ばし、子株が増殖している株 (写真1)。

2013年6月中旬に、適度に根が残るように根茎をA株は10苗に、B株は9苗に切り分け (写真2)、市販栽培用土 (プランターの土：秋本大産物) を用い、ロングポット (深さ20cm) に植え付けた。

活着の評価を2013年8月12日に行なった結果、全株が活着していた。

2) 木質茎基部を切り分ける方法

Ephedra sinica : 2株 (C株、D株)、2株ともに、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内の株から採取した種子



写真1 根茎を引いて増殖した株



写真2: 根茎を引いて増殖した株を切り分けた状態 (一部分)。

を播種（2004年春）して得られた実生苗を育てた4年生株で、基部は木質化し、径約8mmで、地下に引く根茎は認められなかった。

2008年3月22日に、実験材料を鉢から取り出し、水中でよく土を落とし、鋭利なナイフで、それぞれの子株に適度な根が残るように、C株は4分割（縦割：写真3）、D株は3分割し、ワグネルポット（1/5000a）に市販栽培用上（プランターの土：秋本天産物）を用いて定植し、日当りの良い屋外に保管した。なお、3月は中国において麻黄の植え替えに適した時期とされている。

活着の評価を2008年9月25日に行なった結果、C株は4苗のうち2株（C-2, 4）が生存し、他の2株（C-1, 3）が枯れた。D株は、全3株が生存していた。



写真3：2縦割した状態。さらに2縦割して4株とした。

2. 木質茎の挿し木による繁殖

1) 実験材料

*E. sinica*の園内継続栽培株。

2) 挿し穂の調製方法

調製条件：木質茎は数カ所の節から多数の草質茎が出た状態で、挿し穂は各節のすぐ上で切断して得た。次いで、木質茎基部の切り口を水平切り（軸に対して垂直）と返し切り（水平切りした部分の約半分に更に斜めに切り込み）の2群に分け、それぞれの群を発根剤（ルートン：石原産業株式会社）塗布と塗布無しの、合計4群に分け、各群5株を準備した（表1）。草質茎は全て残した。

3) 植え付けおよび管理方法

用土として鹿沼土を用い、硬質ポリポット（直径9cm）に2～3cmの深さに挿した。

培養環境条件：人工気象器（日本医化器械製作所：LPH-200RDSMP）。温度25℃、湿度70%、光照射：15時間（25,000～30,000ルクス）

4) 実験期間

2006年11月28日、29日に挿し木し、2007年9月26日（10ヶ月後）に評価した。

5) 評価方法

生存しているものは土壌表面からの地上部の長さ、茎の数、根の長さを測定し、根の量を目視的に観察した。枯死したものについては、切り口のカルス形成の有無、根があれば長さを測定し、根の量を目視的に観察した。

結果（表1、写真4）

返し切りした条件1、2では、発根剤の有無にかかわらず、10検体すべてが枯死したが、発根剤を塗布した群はカルスの形成並びに根の伸長がよかった。水平切りの条件3、4については、条件3（発根剤無し）で5検体中3検体が活着し、条件4（発根剤有り）で5検体中2検体が活着し、発根率や活着率については発根剤の顕著な効果は認められなかった。

表1 挿し木条件と結果

条件・ 資料番号	生 存 株				枯 死		
	地上部長(cm)	茎数(本)	根長(cm)	根の量	カルス形成	根長(cm)※※	根の量
条件1 1	—	—	—	—	無し	—	—
2	—	—	—	—	無し	—	—
3	—	—	—	—	有り	0	—
4	—	—	—	—	有り	8	少
5	—	—	—	—	有り	5	少
条件2 1	—	—	—	—	無し	—	—
2	—	—	—	—	有り	0	—
3	—	—	—	—	有り	3	少
4	—	—	—	—	有り	10	多
5	—	—	—	—	有り	13	多
条件3 1	—	—	—	—	無し	—	—
2	—	—	—	—	有り	3	少
3	7.0	1	9	少	—	—	—
4	6.5	1	16	中	—	—	—
5	13.0, 7.0	2	15	多	—	—	—
条件4 1	—	—	—	—	無し	—	—
2	—	—	—	—	有り	0	—
3	—	—	—	—	有り	0.8	少
4	8.5, 5.5	2	9	多	—	—	—
5	15.7	1	21	多	—	—	—

条件1：返し切り、発根剤（ルートン）塗布なし

条件2：返し切り、発根剤（ルートン）塗布あり

条件3：水平切り、発根剤（ルートン）塗布なし

条件4：水平切り、発根剤（ルートン）塗布あり

※：—は枯死したことを意味する。

※※：0 (cm) はカルスの形成が認められたが、根が伸張しなかったものを示す。

結論および考察

1. *Ephedra sinica* 栽培株の株分け実験において、地下に根茎を引いて繁殖した株では作製した全ての育苗が活着し、好成績であった。一方、根茎を引かない株の木質化した根元の株分けによる繁殖に関しては、2株から得られた7つの小苗のうち5苗（71.4%）について活着させることができた。結果としては十分な成績であるが、発芽後4年以上経過した *E. sinica* でも茎はあまり太くならないため、個体数を多く得る事が出来ないこと、播種してから親株として株分けに供することができるまでに時間がかかりすぎることで、得られる小苗が少ない



写真4：挿し木後10ヶ月後の状態（条件2）
（左から、条件2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-1。
草質茎の多くはすでに枯死脱落している）

ので失敗した場合のリスクが高すぎることなどの短所がある。なお、*E. sinica* は日局収載の他の2種 (*E. intermedia*, *E. equisetina*)

に比して根茎を引いて増殖する性質が強いので、本研究の結果からは、十分生長して根茎を引いた株を親株として株分けするのが適していると判断される。一方、同じ *E. sinica* でも株によって根茎を延ばす性質が強いものと弱いものがある可能性があり、今後の検討課題である。なお、Ep-13については、株分け時期は3月中旬～4月中旬頃と10月上旬から11月中旬頃が適期であると紹介されているが、本研究では少なくとも6月中旬までは可能であることが明らかになった。ただし、株分け後の年内の生長を考慮すると、新芽が動き出す前が適切であると判断される。

2. *E. sinica* の木質茎の挿し木による繁殖実験に関しては、水平切り苗、返し切り苗ともに約半数が発根したが、活着率は水平切り苗では50%、返し切り苗では0%であった。活着率から判断すると水平切りが適しているが、返し切り苗でも発根後早期に植え替えるなど適切な管理により活着する可能性がある。また、すべての条件（苗）において、カルス形成が認められたが、その後枯死したものが多く、その原因に不適切な灌水（給水不足）が考えられ、適切な灌水量についても検討する余地がある。また、発根剤の塗布に関しては、発根促進効果は認められなかったが、発根後の根の生長に関しては有効であると判断された。以上、日局収載種の *E. sinica* において挿し穂の基部を水平切りし人工気象器内で管理することにより、藤田らが *E. altissima* で報告した活着率をやや上回る成績が得られた。なお、ここにはデータを示さなかったが、予備の実験として蒸散を押さえるために草質茎を半分以下に切り詰めた株ではすべて枯死したことから、挿し穂には十分な草質茎を残

す必要がある。

3. *Ephedra* 属植物は灌木であるが、*E. sinica* については、冬に氷点下をかなり下回る自生地では地上部が根頭部を残して全て枯れるので、挿し穂として利用できるような木質茎が得られない。一方、比較的暖かい地域ではわずかに地上部が残り、次年度以降に木質化する。金沢では冬期にかなりの積雪があり、その下では *E. sinica* の地上部の大半は枯死せず、一部が木質化する。今回の研究で利用した木質茎はそうしたものである。なお、いずれにせよ大量の木質茎を得ることはできないので、活着率が悪いが多量に得られる草質茎の挿し木を検討する必要がある。次報で述べる。

文献

- 1) 第2報：大富規弘，野村行宏，井出達也，大野剛史，毛利千香，御影雅幸，マオウ属植物の栽培研究（第2報），海水がシナマオウの生長およびアルカロイド含量に及ぼす影響，薬用植物研究，35（1），1-8（2013）
- 2) 藤田早苗之助，栗原孝吾，衛生試験所報告，85，112-114（1967）
- 3) 第十六改正日本薬局方，厚生労働省，2012，p.1589.
- 4) 薬用植物栽培・品質評価指針作成検討委員会編，『薬用植物 栽培と品質評価』Part9，薬事日報社，東京，2000，pp.67-78.
- 5) 御影雅幸，北岡文美代，松本昌士，安藤広和，佐々木陽平，杉村康司，飯田修，旧国立衛生試験所が導入し保存してきたマオウ属植物Ep-13に関する新知見，薬用植物研究，投稿中。

