

台湾原産キク科およびセリ科薬用植物の
栽培および成分に関する研究

**Study on cultivation and ingredients of the medicinal
plants of Asteraceae and Umbelliferae native to Taiwan**

学位論文
Doctoral Thesis

浅見 祐弥
Yuya Asami

鹿児島大学大学院連合農学研究科
**The United Graduate School of Agricultural Science
Kagoshima University**

2021

目次

第1章	緒言	1
第2章	台湾原産薬用キク属の比較研究	
第1節	台湾原産薬用キク属の生育の比較研究	
2.1.1.	はじめに	8
2.1.2.	材料および方法	8
2.1.3.	結果	10
2.1.4.	考察	15
第2節	台湾原産薬用キク属の頭花のフラボノイド成分含量比較研究	
2.2.1.	はじめに	17
2.2.2.	材料および方法	17
2.2.3.	結果	20
2.2.4.	考察	32
第3節	乾燥温度が台湾原産薬用キク属の頭花のフラボノイド成分含量に 与える影響	
2.3.1.	はじめに	34
2.3.2.	材料および方法	34
2.3.3.	結果	35
2.3.4.	考察	39
第3章	異なる硝酸アンモニウム濃度が野菊の生育および頭花のフラボノイド成分 に与える影響	
第1節	土壌への異なる硝酸アンモニウム濃度が野菊の生育，光合成およ び乾物生産特性に与える影響	
3.1.1.	はじめに	40

3.1.2.	材料および方法	40
3.1.3.	結果	45
3.1.4.	考察	50
第2節	葉面への異なる硝酸アンモニウム濃度が野菊の生育および頭花のフラボノイド成分に与える影響	
3.2.1.	はじめに	51
3.2.2.	材料および方法	51
3.2.3.	結果	54
3.2.4.	考察	62
第4章	湛水処理が野菊の生育および頭花のフラボノイド成分に与える影響	
第1節	湛水処理が土壌体積含水率、溶存酸素量および野菊の生育に与える影響	
4.1.1.	はじめに	64
4.1.2.	材料および方法	64
4.1.3.	結果	67
4.1.4.	考察	73
第2節	湛水処理が野菊の生育および頭花のフラボノイド成分に与える影響	
4.2.1.	はじめに	74
4.2.2.	材料および方法	74
4.2.3.	結果	78
4.2.4.	考察	84
第5章	異なる硝酸アンモニウム濃度が <i>Bupleurum kanoi</i> Liu. の生育および含有成分に与える影響	

第1節 異なる硝酸アンモニウム濃度が <i>Bupleurum kaoi</i> Liu.の生育および乾物生産特性に与える影響	
5.1.1. はじめに	86
5.1.2. 材料および方法	86
5.1.3. 結果	88
5.1.4. 考察	92
第2節 異なる硝酸アンモニウム濃度が <i>Bupleurum kaoi</i> Liu.の成分含量に与える影響	
5.2.1. はじめに	93
5.2.2. 材料および方法	93
5.2.3. 結果	94
5.2.4. 考察	99
第6章 総合考察	100
引用文献	107
謝辞	117
摘要	118
Summary	121
図表リスト	125

第1章 緒言

漢方医学は中国起源の医学を基に、日本独自の発展を遂げた伝統医学である（川越ら，2000）。それに対し，明治以降から西洋医学が普及し，その西洋薬は精製された純粋な単一な薬物であり，標的臓器に対し一つの薬理作用を表す特徴がある。また漢方薬の特徴として，天然素材の植物を乾燥させたものなどを用いる（西田・佐藤，2008）。近年統合医療の観点から漢方医学が注目を浴びているが，一般的には認知度が低いことが現状である（高山ら，2019）。2018年における国内医薬品生産金額は約6兆6,239億円であり，その内漢方製剤は約1,626億円と全体の約2.5%程度である（日本漢方生薬製剤協会，2019）。医療現場での漢方製剤の有用性評価の高まりなどを背景として，医療用漢方製剤等は近5年間において約1.6%増加し，OTC（Over The Counter）医薬品においても約7%増加している。その漢方製剤の原料，生薬の主要調達先は中国であり，約77%に上る。中国において原料生薬の需要が高まっており，年間で約20%生産総額が増加している。一方，日中生薬の購入価格において，2006年には3.6倍開きがあったが，2016年には1.9倍と依然として価格優位性は中国産にあるものの，上昇速度の違いから，価格差は縮小傾向にある（日本漢方生薬製剤協会，2019）。また，中国では，物価上昇に伴う生薬価格の高騰や生薬需要の増加に伴う野生植物資源の枯渇などが懸念されている。このように，今後，中国からの生薬の輸入が制限される可能性があるなか，生薬を安定的に供給するためには，品質，収量性，病虫害耐性などに優れた新品種を育成することが必要である。さらに，栽培地域の環境特性に対応した栽培技術を確立していく必要がある。

新品種育成を可能にする育種素材を確保することに加えて，環境適応性に優れた品種・系統を見つけ出すためには，まず様々な可能性を持った未利用植物資源を収

集することが重要である（杉村，2013）．植物は極寒の地域などごく一部を除けば地球上のいたるところに見られ，その分布種の数膨大で約 30 万種と考えられている．その約 1 割の約 3 万種の植物が薬用として利用可能と推定されており，多くの国々が重要な治療薬として現在も利用している（薬用植物資源研究センターNIBIO，2010）．しかし近年，森林伐採や自然環境の変化などの影響を受けて，熱帯性，亜熱帯性の植物資源の減少が目立ってきている．減少が著しいこれらの地域における薬用・有用植物の遺伝資源の確保は，早急に取り組むべき重要な課題と考えられる．熱帯亜熱帯地域における台湾では約 4500 種の原生種が存在し，その半数が薬用として利用されている（張同呉，2004）．しかし多くは野生品が採取され，市場に出回っているが，資源の枯渇が懸念され，早急に保護や栽培化を図ることが求められている．これより本実験では台湾における生薬原料の栽培方法の確立に焦点を当てた．さらに生薬に用いられる作物部位には花，葉，根などが主であり，花部においては一般的に身近で漢方薬として目にする生薬キクカ（*Chrysanthemum Flower*），また根部においては柴胡桂枝湯，柴胡桂枝乾姜湯および柴胡加竜骨牡蛎湯など多くの漢方薬製品がある生薬サイコ（*Bupleurum Root*）に注目し，本実験の供試品種として用いた．

キク属（*Chrysanthemum spp.*）はキク科キク属の植物で，主要分布は東アジアの日本，中国，韓国，シベリアおよび台湾であり，台湾原産のキク科植物は全 84 属 221 種ある（Bremer and Humphries, 1993; Iwatsuki *et al.*, 1997; Oberprieler *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 1998; Shih and Fu, 1983）．台湾原産キク属では，これまで頭花をお茶として多く利用されてきた（Huang, 2016）．また各国においては茶，酒に加え様々な料理が作られてきた．韓国ではもち米で作ったキクの花チヂミや日本では花弁を蒸し，伸ばして干した「きくのり」は漬物として昔から食べられてきた（中野ら，2003）．日

本における 2015 年のキクカ使用量は 16 t に達するが多くは中国から調達されている。また台湾においてもキクカの年間使用量は約 300~400 t であり，そのうち 2 割は国内生産をしているが，8 割は中国からの輸入に依存している（經濟部国際貿易局，2018）．キクカの頭花には，クロロゲン酸（Chlorogenic acid），ケルセチン（Quercetin），アピゲニン（Apigenin），ミリセチン（Myricetin），ルテオリン（Luteolin）などの有効成分が含まれる．これらの有効成分は，解熱，鎮痛，眼精疲労の改善，解毒，消炎薬として釣藤散，杞菊地黄丸などに応用される生薬である（原島，2017）．キク属の野生種にはフラボンのみを含む種，フラボンおよびフラバノンを含む種，フラボン，フラバノンおよびフラボノールを含む種に分類される（中野ら，2019）．またキク属の主要成分であるルテオリン（Luteolin）およびアピゲニン（Apigenin）はフラボンに分類され，ミリセチン（Myricetin）およびケルセチン（Quercetin）はフラボノールに分類される．特にルテオリンは抗肥満・抗糖尿病・抗炎症作用を持ち，重要な成分の一つである（原島，2017）．

現在，台湾では栽培種である杭菊（*C. morifolium*）のほかに，野生種である野菊（*C. indicum*）は生薬の原料として利用されているが，台湾原産野生種である阿里山油菊（*C. arisanense*），新竹油菊（*C. boreale*）および森氏油菊（*C. morii*）の 3 種は民間薬として一部利用されているのみである．野生種は栽培種に比べストレス耐性に強く，遠縁交雑による栽培種の耐性育種に重要な研究材料として注目を集めている（Huang，2016）．これまで上記のキク属の採取，遺伝的分類による研究が報告されており，遺伝的には台湾原産キク属は新竹油菊および阿里山油菊グループと野菊および森氏菊グループに分類される．しかし野生種の栽培方法および頭花の薬用成分に関する報告は少なく，台湾原産野生キク属の多様性と有効性は食品，健康製品および医薬品への発展に大きな可能性を秘めている（王ら，2013；趙ら，2007）．

台湾におけるキク属の海拔分布は大きく2つに分類できる。野菊、杭菊および新竹油菊では海拔 0~500 m の低海拔地域で採取および栽培が行われており、阿里山油菊および森氏油菊では 500~3200 m の高海拔地域で採取されている (Huang, 2016) 。これまでの各種の生育特性は各自生地で採取した報告のものであり、同一環境条件の栽培研究報告はない。さらに新竹油菊は絶滅危惧種とされており、阿里山油菊においても絶滅危惧種候補として挙げられている (特有生物研究保育中心, 2019) 。そのため野生種の採取だけでなく、種保存を視野に入れた栽培方法確立の必要性がある。また熱帯地域に属する台湾南部の平地では比較的広大な土地があるため栽培が期待されている。そのため同一環境条件下でキク属の生育および含有成分について明らかにすることが急務である (Huang, 2016) 。

窒素は植物の生育において最も重要な元素のひとつである。またキク (*C. morifolium*) は窒素要求量が高い植物であることも知られている (Lunt and Kofranek, 1958) 。しかし熱帯地域の栽培環境は比較的栄養価に乏しい土壌が分布していることが多い (Baligar and Bennett, 1986) 。キクにおいて土壌への適切な窒素施肥は葉面積、葉の乾物および花の開花数を増加させることが報告されている (Dorajeerao *et al.*, 2012) 。また薬用のキク (*C. morifolium*) 栽培では、尿素 134 kg ha^{-1} 、過リン酸 577 kg ha^{-1} 、塩化カリウム 124 kg ha^{-1} が基肥として使用される (張ら, 2013) 。しかし野菊では適切な窒素施肥量および熱帯地域での栽培研究報告は少ない。

また葉面における窒素吸収は土壌の根圏からの窒素吸収に比べ、植物の生育に容易に影響を与えることが明らかにされている (Sparks, 2009) 。窒素葉面散布には土壌への窒素施肥に比べ、少量で即効性がみられ、根圏の窒素吸収の補填が可能となることが報告されている (Sugimoto *et al.*, 1989) 。葉面散布は、農作物の商品としての品質向上、葉色向上、花卉の開花促進および草勢回復等に効果があるとされている。

る。また生理障害の予防，養分不足による生育不良の早期回復，病虫害，風水害，干害などの早期回復や日照不足・温度不足のカバーなどがあげられる（小野寺ら，2014）。さらに窒素の葉面散布は作物の湿害対策として効果があるとされている（Sugimoto *et al.*, 1989）。特に，過湿による根腐れ，根障害などによる養分吸収低下時の応急措置として効果がある。ダイズおよびキクは水田の転換作物として利用され，根圏の発達不良が起こることがある。ダイズでは発達不良の解決策として窒素葉面散布の研究が報告されているが，キクでは窒素葉面散布の研究報告は未だ少ない。キクは開花前における水分吸収および栄養吸収が最も高まることが知られており，開花前後の窒素吸収量を高めるために葉面へ窒素溶液を散布することは収量および成分含量に大きく関係すると考えられる（Turley *et al.*, 2001）。

台湾の自然湛水は主に台風、梅雨等の集中豪雨によるものである。台湾の河川は一般に河川延長が短いのに対して高低差があり，急流が多いという特徴を有する。しかも流域には急斜面が多いこともあって，流域内に降った雨が短時間に下流域に集中し，河川そのものや流域内施設の排水機能を上回り，各地で洪水による湛水被害が頻発している。湛水に対する改善策として，土手の堤防整備が重要であるが，貯水池の放水のタイミングも下流域で湛水被害を起こす可能性が指摘（高木・呉，2015）されており，貯水施設の運用にも留意すべきである。謝（1986）は、過去 20 年間で台湾の 4 つの主要な気象災害について議論してきたが，台湾の台風による年間の災害損失は最も大きく，降雨による損失は 2 番目である。過去 10 年間の自然災害による農業損失の統計によると、台湾の自然災害による農業損失の合計額は 624 億元と高く，そのうち 70.25%は台風によるものである（Hsiao *et al.*, 2020; Zhu and Li, 2007）。台湾は，北西太平洋の台風発生 の 主要経路に位置しており，中央気象局によると，台湾は過去 100 年間で年間平均 3~4 台の台風に見舞われている（何ら，

2017) . また台湾ではキクカの栽培において水田転換畑を多く利用しているため、土壌の保水性が高く、生育阻害がしばしば発生している (林学誌, 2007) . さらに夏季の豪雨や台風の湛水により根部が浸水し、減収量の原因の一つとなっている (Hou, 2013) . 土壌の低酸素状態は直接的に根へ影響を与え、間接的に炭酸同化作用および光合成作用が抑制されることにより地上部へ影響する. 一般的に主なキク属の栽培品種の大部分は湛水による被害を受けやすく、最初にしおれ、次に黄変し、そして最終的には枯死する (Yin *et al.*, 2009) . こうしたキク属における湛水の影響は品種間差、生育、遺伝を中心に報告されてきた. しかしながら湛水がキク属の成分含量に与える報告例は少ない.

サイコ (*Bupleurum spp.*) はセリ科ミシマサイコ属の多年生草本で、生薬として根が用いられる (Pistelli *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2000) . 生薬柴胡は食欲不振、胃炎、中耳炎、解熱、鎮痛、解毒および抗炎症などの治療のために漢方薬として広く使用されている (Ma *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 2000) . サイコ属は世界に約 150 種存在し、非常に多様であり、サイコの成分含量の差も大きい. 近年台湾において台湾固有種である *Bupleurum kanoi* Liu. (*B. kanoi*) が栽培され始めている (Liu, 2006) . サイコは温帯地域での栽培が中心であり、熱帯、亜熱帯地域である台湾において、多くのサイコは野生種の採取や輸入に偏っていた. しかしサイコの需要増大などから安定供給が不安視されるため熱帯、亜熱帯地域における栽培化の確立が急務である (兼子ら, 2013) . また熱帯地域の栽培環境は比較的栄養価に乏しい土壌が分布していることが多い (Baligar *et al.*, 1986) . サイコの利用部位は根であり、土壌の栄養状態が直接的に成分に影響するため施肥量が重要であると考えられる (高谷, 1985; Zhu *et al.*, 2007) . 窒素は植物の生育において最も重要な元素の一つであるため、適切な窒素施肥量は、*B. kanoi* の生育および成分含量の両方を増加させることが期待できる.

これまでの研究報告より、サイコの主要成分として SSa, d (サイコサポニン: SS) ならびにマイナーサイコサポニンである SSb1, b2 および c などがサイコ属の根から単離された (Morinaga *et al.*, 2006) . SSa および d は薬理的な活性物質として特に知られている. これら 2 つの成分は抗アレルギー作用, 鎮痛剤作用, 抗炎症作用, 血漿中コレステロール低下作用及び肝障害に対する作用などがあることが報告されている (Yamamoto *et al.*, 1975; Kita *et al.*, 1980; Katakura *et al.*, 1991) . 近年 SSb1, b2 が主に肝疾患者に使用され, SSb2 は肝臓ターゲティング効果を強化するのに重要な働きをする可能性があるとして期待されている (Zhao *et al.*, 2019) . しかし *B. kanoi* において, これらマイナーサポニンの分析を行ったという報告はない. また熱帯地域での栽培において一年生 *B. kanoi* の SSa, c, d 総含量はミシマサイコ (*B. falcatum* L.) の 2~3 倍, マンシュウミシマサイコ (*B. chinese* DC.) の根の約 10 倍であると報告されている. よって熱帯地域におけるサイコの生産は *B. kanoi* が最良な種であると考えられる (Yen *et al.*, 1991; Pan, 2006) .

以上より本研究では生薬栽培方法の確立を目的とし, 台湾原産キク属における生育, 乾物生産特性および頭花のフラボノイド成分より栽培化可能な種の選抜を行った. また選抜された種により施肥管理, 特に窒素に着目した土壌への窒素施肥および葉面散布を行い, 生育, 乾物生産特性および頭花のフラボノイド成分より最適な窒素施肥濃度を明らかにした. さらに熱帯地域で頻発する湛水ストレスによるキクカの生育, 乾物生産特性および頭花のフラボノイド成分へ与える影響について調査を行った. 根部を用いる生薬の代表であるサイコでは熱帯地域の栽培方法の確立に向け, 重要元素となる窒素の施肥管理に着目し, 生育, 乾物生産特性および根のサイコサポニン含量から最適窒素施肥濃度を明らかにした.

第2章 台湾原産薬用キク属の比較研究

第1節 台湾原産薬用キク属の生育の比較研究

2.1.1. はじめに

台湾では野菊 (*Chrysanthemum indicum*) , 阿里山油菊 (*C. arisanense*) , 新竹油菊 (*C. boreale*) および森氏油菊 (*C. morri*) など薬用のキク属が自生している. これらキク属は野生品の採取を行い生薬原料や民間薬として使用され, その中には絶滅危惧種として認定されている種も存在する. しかし台湾原産の薬用キク属の生育特性に関する研究報告は少ない. したがって本研究では台湾原産薬用キク属の栽培化へ向け, 台湾南部の熱帯低海拔の平地の同一環境条件下で4種の台湾原産の薬用キク属および栽培種の栽培を行い, 乾物生産特性の比較研究を行った.

2.1.2. 材料および方法

1) 栽培方法および栽培環境

本研究は台湾屏東県にある台湾屏東科技大学内網室 (緯度 22°38'N, 経度 120°36'E, 海拔高 64 m) で行った. 野生種である野菊 (*C. indicum*) , 阿里山油菊 (*C. arisanense*) , 新竹油菊 (*C. boreale*) および森氏油菊 (*C. morri*) と栽培種である杭菊 (*C. morifolium*) を挿し木にて繁殖させ実験材料として供試した. なお, 各苗は台湾屏東科技大学森林学科の系統保存より分与されたものである. 6月12日に各種の茎を2節ごとに切断したものをピートモス, 砂 (3:1, v v⁻¹) の混合土に挿し木し, 1カ月間育苗を行った. 7月12日に風乾して篩 (2×2 mm) を通した畑土, ピートモス, 砂を3:2:1 (v v⁻¹) の比率の混合土2.5 kgを充填したプラスチックポット (直径21

cm, 高さ 26.5 cm) に移植した. 各種の株高が約 10 cm となったものを定植した. 定植後, 各種キク属の栽培を 2019 年 7 月 12 日から 11 月 29 日にかけて行った. 灌水は毎日 1 度十分に行い, 施肥はホーグランド溶液を定植後週 1 回 500 mL pot⁻¹ 与え, 肥料成分の組成は, 10 mM NH₄NO₃, 2 mM K₂SO₄, 2 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄ · H₂O, 25 μM H₃BO₃, 10 μM MnSO₄ · H₂O, 2 μM ZnSO₄ · 7H₂O, 0.5 μM CuSO₄ · 5H₂O, 0.5 μM H₃MoO₄ および 0.1 mM FeC₆H₅O₇ とした.

2) 台湾原産薬用キク属の生育比較

生育調査は定植後から 2 週に 1 度行い, 草高, 葉数, 茎径 (SM-112, TECLOCK 社製) および SPAD (Model 502, Minolta 社製) の項目を各種 5 個体ずつ測定した. 茎径は最大展開葉およびその上位葉との節間を測定し, SPAD 値は最大展開葉とその上下にある葉の計 3 枚の平均値とした.

3) 台湾原産薬用キク属の乾物生産特性の比較

サンプリングは 2019 年 9 月 24 日および 12 月 3 日の 2 度行い, 各種 5 個体ずつ葉, 葉柄, 茎および根乾物重と根長を調査した. 乾物重は植物体を採取後, 葉, 葉柄, 茎および根に分解し, 50°C の乾燥機にて 72 時間乾燥させ, 重量の測定を行った. 根長は主根およびひげ根を含む最長部分の測定を行った.

4) 台湾原産薬用キク属のクロロフィル含量の比較

クロロフィル含有量測定はサンプリングに同時に行われ, 採取した 5 個体の植物体より分解した葉から葉片 (1 cm²) を 1 枚ずつ取り出し, 2 mL の 99.7% のメタノールに浸漬させ, 暗所 12°C の環境下で 24 時間抽出を行った. 得られた抽出液について,

分光光度計 (UV-3100, Chrom Tech) を用い, 665.2 と 652.0 nm の吸光度を測定した (Porra, 1989) . 測定値から下記の式でクロロフィル含有量を求めた.

$$\text{Chl a (nmol ml}^{-1}\text{)} = 18.22 \times A^{665.2} - 9.55 \times A^{652.0}$$

$$\text{Chl b (nmol ml}^{-1}\text{)} = 33.78 \times A^{652.0} - 14.96 \times A^{665.2}$$

$$\text{Chl a + b (nmol ml}^{-1}\text{)} = 24.23 \times A^{652.0} + 3.26 \times A^{665.2}$$

$A^{652.0}$ と $A^{665.2}$ はそれぞれ 665.2 と 652.0 nm の吸光度を示す.

5) 統計処理

葉, 葉柄, 茎および根乾物重, 根長, クロロフィル含量の測定では各処理区 5 個体を統計処理に用いた. 結果は Tukey Test により 5% 水準で有意差検定を行った.

2.1.3. 結果

1) 台湾原産薬用キク属の生育の比較

草高は 2019 年 9 月 10 日より阿里山油菊が他の種との差が大きくなった. また野菊, 新竹油菊および杭菊は草高の増加傾向が類似しており, 9 月 24 日まで著しく増加傾向にあったものの, その後草高の増加は緩やかになった. 森氏油菊は 12 月 17 日まで著しく草高の増加が継続された. 生育調査最終日の 2 月 11 日における草高は, 野菊が 84.1 cm, 杭菊が 95.1 cm, 阿里山油菊が 72.9 cm, 新竹油菊が 85.7 cm, 森氏油菊が 107.2 cm であった (Fig. 2-1-1. A) .

野菊および杭菊の葉数は 11 月 5 日まで葉数の差が 0~17 枚と, ほとんど同等な葉数を推移していたが, 11 月 19 日より野菊の葉数が杭菊の葉数と比較して増加傾向に

あった。1月14日における野菊および杭菊の葉数は482および377枚であり、葉数の差は105枚にまで広がった。新竹油菊では9月24日までの野菊および杭菊と類似した傾向を示したが、9月24日から11月19日の間は新竹油菊の葉数は横ばいであった。しかし新竹油菊の葉数は11月19日から1月14日に再度増加し458枚となり、1月14日から2月11日では葉数は減少した。阿里山油菊および森氏油菊の葉数は10月4日まで葉数の差が4~15枚であったが、10月22日より森氏油菊の葉数が阿里山油菊の葉数を上回った (Fig. 2-1-1. B)。

新竹油菊の茎径は10月22日まで野菊および杭菊と比較して細い傾向にあったが、11月5日には杭菊の茎径を上回った。2月11日の茎径は野菊、杭菊および新竹油菊で5.89, 5.03 および 5.21 mm となった。阿里山油菊および森氏油菊の茎径は1.08~3.03 mm の範囲を推移し、2月11日における茎径は阿里山油菊および森氏油菊で2.98 および 2.44 mm となった (Fig. 2-1-1. C)。

SPAD 値は栽培期間を通して、各種で変動が大きかったが、最も変動が激しかったのは野菊であり、最高値および最低値の差が18.7となった。森氏油菊のSPAD 値は8月27日に最も高く、その他の種と比較して最も早い時期にSPAD 値の最高値を示した。また野菊および新竹油菊では、11月5日にSPAD 値が最も高くなり、杭菊は12月3日、阿里山油菊は12月31日にSPAD の最高値を示した (Fig. 2-1-1. D)。

2) 台湾原産薬用キク属の乾物生産特性の比較

9月24日における葉乾物重は野菊および杭菊と阿里山油菊および森氏油菊の間に有意差が生じ、野菊および杭菊で有意に高い値を示した。しかし葉柄乾物重は各種間で有意差は生じなかった。茎乾物重は野菊および杭菊と新竹油菊間で有意に高い値を示した。また新竹油菊と阿里山油菊および森氏油菊では新竹油菊に対し、茎乾

物重が有意に高くなった。根乾物重は野菊および杭菊と新竹油菊，阿里山油菊および森氏油菊の間に有意差が生じ，野菊および杭菊の茎乾物重が有意に高い値を示した。根長は野菊と新竹油菊の間のみで有意差が生じ，他の種と比較して野菊で根長が最も長くなった（Table 2-1-1）。

12月3日における葉乾物重および茎乾物重は野菊および杭菊が有意に高い値を示した。また阿里山油菊および森氏油菊の葉乾物重および茎乾物重は有意に低くなり，野菊および杭菊の半分以下の乾物重量となった。根乾物重は野菊および杭菊と阿里山油菊，新竹油菊および森氏油菊の間に有意差が生じ，根長は新竹油菊で有意に短くなった。根乾物重では阿里山油菊，新竹油菊および森氏油菊が野菊および杭菊と比較して3分の1以下の乾物重量となった。根長は新竹油菊と他の種の間には3.9～7.2 cmの差が生じた（Table 2-1-1）。

3) 台湾原産薬用キク属のクロロフィル含量の比較

9月24日のクロロフィルa含量は阿里山油菊で有意に低い値を示した。またクロロフィルb含量は森氏油菊で有意に低くなり，クロロフィルa+bにおいても森氏油菊で有意に低い値を示した。12月3日のクロロフィルa含量は野菊，杭菊および阿里山油菊がその他の種と比較して有意に高い値を示した。またクロロフィルbおよびa+bにおいても同様の結果となった（Table 2-1-1）。

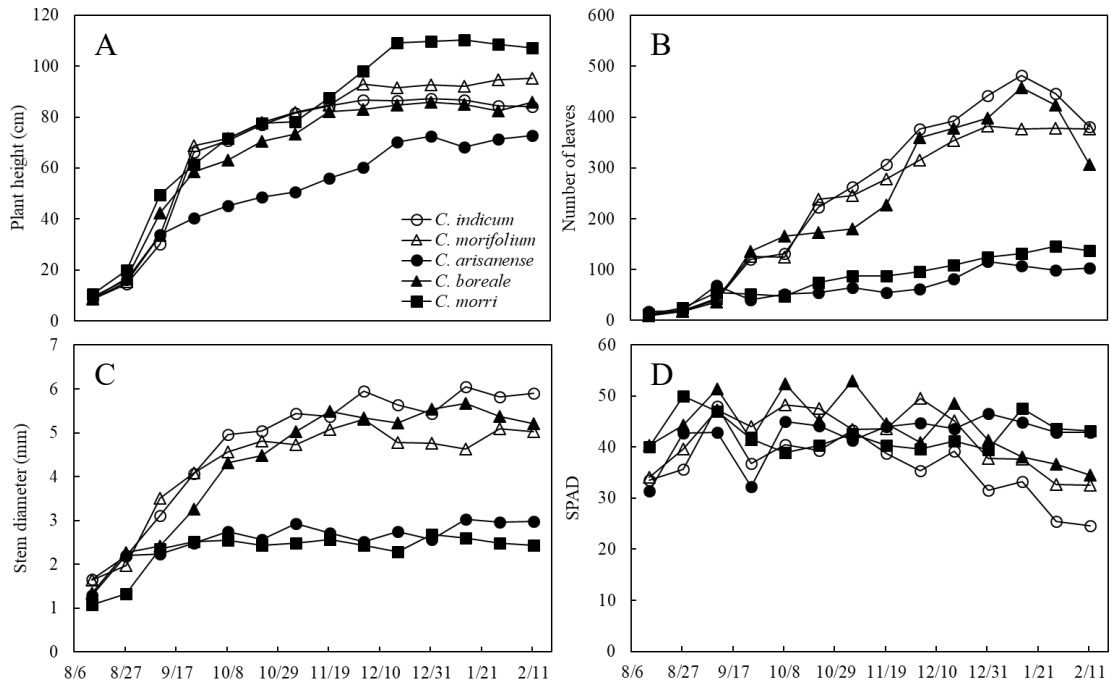


Fig. 2-1-1. Growth characteristics of *Chrysanthemum*.

A) Plant height, B) Number of leaves, C) Stem diameter, D) SPAD.

Table 2-1-1. Dry matter production characteristics and chlorophyll content of different *Chrysanthemum* spp.

Sampling day	Species	Dry weight (g plant ⁻¹)				Root length (cm)	Chlorophyll content (nmol mL ⁻¹)		
		Leaf	Leaf stalk	Stem	Root		a	b	a+b
9/24	<i>C. indicum</i>	2.13±0.84 ^a	0.24±0.15 ^a	5.25±0.91 ^a	7.53±3.77 ^a	28.6±1.84 ^a	32.2±0.80 ^a	21.6±1.55 ^a	53.7±2.32 ^a
	<i>C. morifolium</i>	2.03±0.37 ^a	0.24±0.07 ^a	4.61±0.69 ^a	5.60±1.54 ^a	26.9±2.38 ^{ab}	32.6±0.42 ^a	22.0±1.11 ^a	54.6±1.04 ^a
	<i>C. arisanense</i>	0.76±0.29 ^b	0.06±0.04 ^a	1.17±0.32 ^c	0.97±0.39 ^b	26.7±5.36 ^{ab}	29.8±1.26 ^b	18.5±1.81 ^a	48.3±3.03 ^{ab}
	<i>C. boreale</i>	1.65±0.54 ^{ab}	0.06±0.03 ^a	2.83±1.04 ^b	1.77±0.5 ^b	22.3±2.41 ^b	32.1±0.98 ^a	22.7±2.60 ^a	54.8±3.57 ^a
	<i>C. morri</i>	0.74±0.28 ^b	0.27±0.38 ^a	1.13±0.25 ^c	0.43±0.13 ^b	26.0±2.41 ^{ab}	32.3±0.09 ^a	12.2±1.24 ^b	44.5±1.32 ^b
12/3	<i>C. indicum</i>	7.61±2.61 ^a	0.79±0.21 ^a	12.29±2.35 ^a	8.72±3.31 ^a	29.6±1.46 ^a	31.7±2.06 ^a	20.2±4.07 ^a	52.0±6.10 ^{ab}
	<i>C. morifolium</i>	8.71±1.66 ^a	0.82±0.19 ^a	13.30±2.17 ^a	10.53±2.08 ^a	31.0±1.37 ^a	34.3±0.73 ^a	25.1±1.70 ^a	59.4±2.27 ^a
	<i>C. arisanense</i>	3.08±0.51 ^b	0.35±0.02 ^a	3.30±0.70 ^b	2.19±0.47 ^b	27.7±1.39 ^a	29.9±2.82 ^a	19.0±4.45 ^a	48.9±7.21 ^{ab}
	<i>C. boreale</i>	6.65±0.73 ^{ab}	0.40±0.11 ^a	8.31±3.00 ^{ab}	2.89±0.97 ^b	23.8±0.50 ^b	28.2±0.90 ^b	15.8±0.15 ^b	44.0±0.81 ^b
	<i>C. morri</i>	3.13±0.37 ^b	0.71±0.26 ^a	3.49±0.35 ^b	1.72±0.26 ^b	28.4±1.10 ^a	29.3±0.75 ^b	12.4±1.32 ^b	41.7±0.70 ^b

2.1.4. 考察

キク属は自生する地理的要因により外部形態を変化させ周囲の環境条件に対応してきた（中野ら，2019）．キクの毛じ先端部にはフラボノイド等の紫外線を吸収する物質が含まれており，毛じは紫外線や強日射から未展開葉を保護する機能を有しているとされている（住友ら，2006）．野生種における毛じの密度は，種によって異なることが知られている（北村，1983）．また自生地が気温が低く，高海拔である阿里山油菊および森氏油菊では毛じの密度が高く，紫外線から保護する機能が高い（Kitamura, 1948; Peng *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2008）．本研究においても阿里山油菊および森氏油菊で葉裏の毛じ密度が高いことが確認されており，熱帯地域での栽培において紫外線および強日射から植物体を保護する役割が期待できることが示唆された（データは示さない）．これまで自生地で調査された草高の報告は阿里山油菊が40～100 cm および森氏油菊が30～40 cm であるが，本実験の生育調査の結果では，森氏油菊の草高は2月11日に107.2 cm となり自生したものよりも高い傾向がみられ，阿里山油菊では自生地のもと同等の結果となった（特有生物研究保育中心，2019）．以上より生育に関しては自生地との海拔の違いによる負の影響は受けないと考えられる．乾物生産特性では，2度のサンプリングにおいて葉および茎乾物重は自生地が低海拔である野菊，杭菊および新竹油菊で高い値を示した．しかし新竹油菊の根乾物重および根長は同じ低海拔に自生する野菊および杭菊と比較して有意に低い値を示した．これは新竹油菊が浅根性であり，根の繁茂が低いためであると考えられる（Kitamura, 1943）．また総クロロフィル含量は9月24日のサンプリングにおいて，野菊および杭菊で他の種と比べて有意に高く，12月3日では杭菊が最も高い値を示し，野菊においても他の種と比較して高い傾向を示した（Table 2-1-1）．以上より本研究では4種の台湾原産薬用キク属と栽培種である杭菊の生育，乾物生産特性および

クロロフィル含量の観点から，熱帯地域における大規模な栽培化に野菊が生育において最も適している可能性があることを明らかにした。

第2節 台湾原産薬用キク属の頭花のフラボノイド成分含量比較研究

2.2.1. はじめに

前節では5種のキク属の生育，乾物生産特性およびクロロフィル含量を調査した。低海拔に自生する野菊および杭菊で類似した生育，乾物生産特性およびクロロフィル含量が確認され，他の3種のキク属に比べ有意に高い結果となった。また高海拔に自生する阿里山油菊および森氏油菊は生育，乾物生産特性およびクロロフィル含量が有意に低く，高温ストレスが原因であったと示唆された。前節では生育，乾物生産特性およびクロロフィル含量に加え，生薬原料として使用される頭花の開花特性および頭花のフラボノイド含量に着目し，栽培化に向けた種の選抜を行った。

2.2.2. 材料および方法

1) 台湾原産薬用キク属の開花特性の比較

本研究では，開花調査を2019年12月3日より開始し，各種5個体ずつ週に1度全開した頭花の数量および花の直径を調査した。花の直径について，最も拡大した範囲を測定した。また採取した頭花は50℃の乾燥機にて72時間乾燥し，その後乾物重量を秤量した。総花乾物重および開花数より1花あたりの乾物重を算出した。

2) 台湾原産薬用キク属の頭花のフラボノイド成分含量比較

乾燥重量を測定した頭花を振動式サンプルミル（TI-100, CMT社製）で粉碎し，2 mm²のふるいにかけた。各個体の粉末1 gに100%メタノール100 mLを加え，超音波振とう機（DC400, DELTA社製）により30 min振とうさせた。その後NO.2ろ紙（FILTER PAPER, ADVANTEC社製）でろ過し，濃縮機（B-491, R-210, BUCHI社製）

B403L, FIRSTEK 社製) により濃縮を行い, メタノールを加え 10 mL に定量した. さらに 0.45 μm メンブレンフィルター (XG-IWHA-9909-1304-PK, Bio Tech 社製) でろ過し, 試料溶液とした. Chlorogenic acid (327-97-9, SIGMA 社製), Myricetin (529-44-2, SIGMA 社製), Luteolin (491-70-3, SUNHANK 社製), Quercetin (117-39-5, SIGMA 社製) および Apigenin (520-36-5, SUNHANK 社製) の計 6 種類の標準品を用いた. 標準品溶液の調製のため, Chlorogenic acid, Myricetin, Luteolin, Quercetin および Apigenin を 4, 3, 3, 2 および 2 mg を秤量し, メタノールを加えて溶解し 10 mL に希釈した. 調製濃度は 400, 320, 300, 200, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ である. また検量線作成において標準品溶液をメタノールで希釈を行い, 濃度の異なる一連の標準品溶液の調製を行った. 調製濃度は以下に示す:

Chlorogenic acid :

High concentration : 400, 200, 100, 50, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Low concentration : 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Myricetin : 300, 150, 75, 37.5, 18.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Luteolin : 300, 150, 75, 37.5, 18.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Quercetin :

High concentration : 200, 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Low concentration : 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Apigenin :

High concentration : 200, 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Low concentration : 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 $\mu\text{g mL}^{-1}$

上記の標準液を 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過し、検量線の溶液として使用した。各濃度標準の 20 μL を取り、分析のため HPLC に注入した。y 軸を標準品溶液のピーク面積とし、既知の標準品溶液の濃度を x 軸として、線形回帰分析を行った。また検量線 $y = ax + b$ と相関係数 r の線形回帰方程式を作成した。高速液体クロマトグラフ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) による分析では、

HPLC: 5110 Series (HITACHI 社製)

検出器: 5420 Series (HITACHI 社製)

カラム: 4.6 I.D. \times 250 mm (Inertsil ODS-2, ジーエルサイエンス社製)

カラム温度: 40°C

波長: 280 nm

注入量: 20 μL

流量: 1 mL/min

を用いた。また移動相 A=10% および移動相 B=80% メタノール (pH : 2.8) とし、

HPLC の分析条件を以下のようにした:

0–5 min, 0–5% A ($v v^{-1}$); 5–10 min, 5–20% A ($v v^{-1}$); 10–15 min, 20–30% A ($v v^{-1}$); 15–20 min, 30–45% A ($v v^{-1}$); 20–40 min, 45% A ($v v^{-1}$); 40–50 min, 45–55% A ($v v^{-1}$); 50–60 min, 55–90% A ($v v^{-1}$); 60–65 min, 90–95% A ($v v^{-1}$); 65–75 min, 95–100% A ($v v^{-1}$); 75–80 min, 100–0% A ($v v^{-1}$).

HPLC 分析により測定した頭花 1 g のフラボノイド成分含量と 1 植物体あたりにおける頭花の乾物重量より、1 植物体あたりの頭花のフラボノイド成分含量を算出した。

分析方法の検証試験として同日内テスト (Intra-day test) および異日間テスト (Inter-day test) を行った。低、中、高濃度の 3 つの標準品溶液を取り、同日内テストおよび異日間テストを行った。同日内テストでは 24 時間以内に各濃度の標準品溶

液を HPLC により 3 回連続して分析を行った。異日間テストでは各濃度の標準品溶液を 24 時間以上の間隔で分析を 3 回行い、分析は 7 日以内に終了した。各濃度の標準品溶液の相対標準偏差 (RSD, %) を算出し、HPLC 分析の精度および再現性の確認を行った。

回収率テストでは試料溶液を 1 mL 取り、同量の低、中、高濃度 (C_{low} , C_{medium} , C_{high}) 標準品溶液を加え、均一に混合し、これらを回収率試験溶液とした。分析のために 20 μ L を HPLC に注入し、各試験溶液の分析を 3 回繰り返し行った。分析後、ピーク面積および検量線より各試験溶液の濃度を算出し、それぞれ C1, C2, C3 とし、標準液を添加しないものを C0 とした。上記で得られた結果を下記の公式に代入して回収率を算出した。以下に公式を示す：

$$\text{低濃度回収率} = \left[\frac{C1 - C0}{C_{low}} \right] \times 100\%$$

$$\text{中濃度回収率} = \left[\frac{C2 - C0}{C_{medium}} \right] \times 100\%$$

$$\text{高濃度回収率} = \left[\frac{C3 - C0}{C_{high}} \right] \times 100\%$$

3) 統計処理

1 頭花あたりの乾物重および花の直径の測定では各処理区 5 個体を統計処理に用いた。また 1g あたりの頭花のフラボノイド成分含量および 1 植物体あたりの頭花のフラボノイド成分含量の測定では各処理区 3 個体を統計処理に用いた。結果は Tukey Test により 5% 水準で有意差検定を行った。

2.2.3. 結果

1) 台湾原産薬用キク属の開花特性の比較

野菊、杭菊および新竹油菊では 12 月 3 日より開花がはじまり、新竹油菊で最も著しい開花数の増加がみられた。新竹油菊は 12 月 10 日から 17 日までの間で最も開花数が増加し、12 月 10 日の開花数に比べ 12 月 17 日では 179 も多くなった。2 番目に開花数が多かったのは野菊であり、野菊は 1 月 14 日まで開花が続いた。野菊の開花数は 12 月 24 日から 12 月 31 日にかけての増加が著しく、12 月 31 日の開花数は 12 月 24 日に比べ 92 も多くなった。野菊の総開花数は 282 であり、杭菊の総開花数よりも 60 も多くなった。阿里山油菊は 12 月 31 日に開花がはじまり、2 月 11 日まで継続した。また 2 月 11 日における阿里山油菊の開花数は 144 となり、3 番目に開花数の多い杭菊と比較して 78 も少ない開花数となった。森氏油菊は 1 月 14 日より開花が開始され、2 月 11 日まで継続された。2 月 11 日における開花数は 58 となり、阿里山油菊より 86 も少ない開花数となった (Fig. 2-2-1. A)。総花乾物重は野菊、杭菊、阿里山油菊、新竹油菊および森氏油菊で 7.70, 8.14, 1.66, 8.74 および 1.10 g となった。新竹油菊では開花数および総花乾物重において最も高い値を示した。さらに開花数では野菊が杭菊に対して高い値を示したが、総花乾物重では杭菊が野菊よりも高い値となった。さらに森氏油菊の開花数は阿里山油菊と比較して少なかったものの、総花乾物重は森氏油菊で高い値を示した (Fig. 2-2-1. B)。

野菊、杭菊、阿里山油菊、新竹油菊および森氏油菊の 1 花あたりの乾物重は 2.75, 3.73, 1.48, 2.15 および 5.83 mg となり、森氏油菊が有意に最も高い値を示した。また森氏油菊と杭菊、杭菊と阿里山油菊の間に有意差が生じた (Fig. 2-2-2. B)。花の直径は野菊が 1.86 cm, 杭菊が 2.84 cm, 阿里山油菊が 0.72 cm, 新竹油菊が 1.60 cm, 森氏油菊が 5.34 cm となった。花の直径は各種間に有意差が生じ、森氏油菊、杭菊、野菊、新竹油菊、阿里山油菊の順に大きくなった (Fig. 2-2-2. A; C)。

2) 台湾原産キク属の頭花のフラボノイド成分含量比較

Fig. 2-2-3 に各標準品溶液のピーク時間およびピーク面積を示した。Table 2-2-1 に Chlorogenic acid, Myricetin, Quercetin, Luteolin および Apigenin の校正曲線の線形回帰式 ($y = ax + b$) と相関係数 (r) の分析結果を示した。相関係数 r 値は各成分で 0.995 以上となり、ピーク面積と標準品濃度の間に高い相関関係を示した (Table 2-2-1) 。頭花のフラボノイド含量測定において線形回帰式 ($y = ax + b$) より濃度を算出した。

1 g あたりの頭花のフラボノイド含量において、Chlorogenic acid では各種間に有意な差が生じ、杭菊、新竹油菊、野菊、阿里山油菊、森氏油菊の順に含有量が多くなった。Myricetin においても新竹油菊、野菊、阿里山油菊、森氏油菊、杭菊の順に含有量は有意に高くなった。Quercetin では野菊と阿里山油菊、阿里山油菊と森氏油菊の間に有意差が生じ、野菊で最も高い含有量を示した。Luteolin は野菊で最も高く、次に杭菊で含有量が高くなり、阿里山油菊、新竹油菊および森氏油菊は有意に低い値となった。Apigenin は新竹油菊で有意に高い値を示し、次に野菊、阿里山油菊、杭菊の順に高くなった (Table 2-2-2) 。

1 植物体あたりの頭花のフラボノイド含量において、Chlorogenic acid では杭菊および新竹油菊で有意に高い値を示し、阿里山油菊および森氏油菊で有意に低い値を示した。Myricetin は野菊および新竹油菊で有意に高い値を示し、Quercetin は野菊、杭菊および新竹油菊で有意に高くなった。Luteolin は野菊、杭菊、新竹油菊の順に含有量は有意に高く、阿里山油菊および森氏油菊で有意に低い値を示した。Apigenin 含有量は新竹油菊で最も高く、次に野菊、阿里山油菊および森氏油菊の順に含有量は高い値となった (Table 2-2-3) 。

低、中、高濃度の同日内 (Intra-day) と異日間 (Inter-day) の検証テスト結果では、同日内試験における Chlorogenic acid の RSD 値は 0.18~0.79%、Myricetin は 0.10~

2.26%, Quercetin は 2.90~4.00%, Luteolin は 1.40~4.50%, Apigenin は 0.45~2.57% となった。異日間試験における Chlorogenic acid の RSD 値は 0.30~4.10%, Myricetin は 1.00~3.10%, Quercetin は 1.30~2.30%, Luteolin は 2.50~4.60%, Apigenin は 1.80~4.50% となった。同日内および異日間の各成分の R.S.D.値が 5%未満であり, 分析方法の精度および再現性が良好であることを示した (Table 2-2-4)。

各成分の回収率は Chlorogenic acid が 92.8~96.3%, Myricetin は 91.3~95.2%, Quercetin は 94.3~98.2%, Luteolin は 94.4~97.6%, Apigenin は 94.8~97.1% となった。回収率 (n = 3) の検出値は 90~100% であり, 分析方法の精度が高いことを示した (Table 2-2-5)。

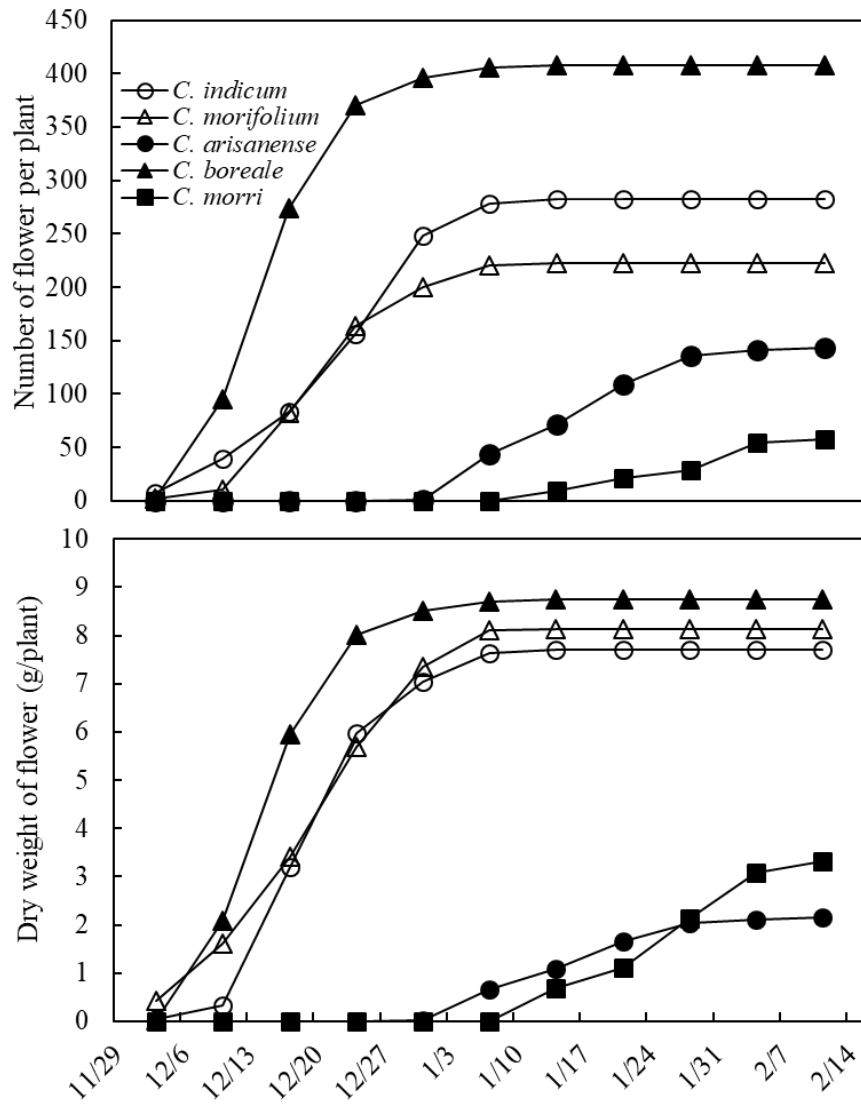


Fig. 2-2-1. Flower number and flower dry weight of Chrysanthemum.

A) Number of flower, B) Dry weight of flower.

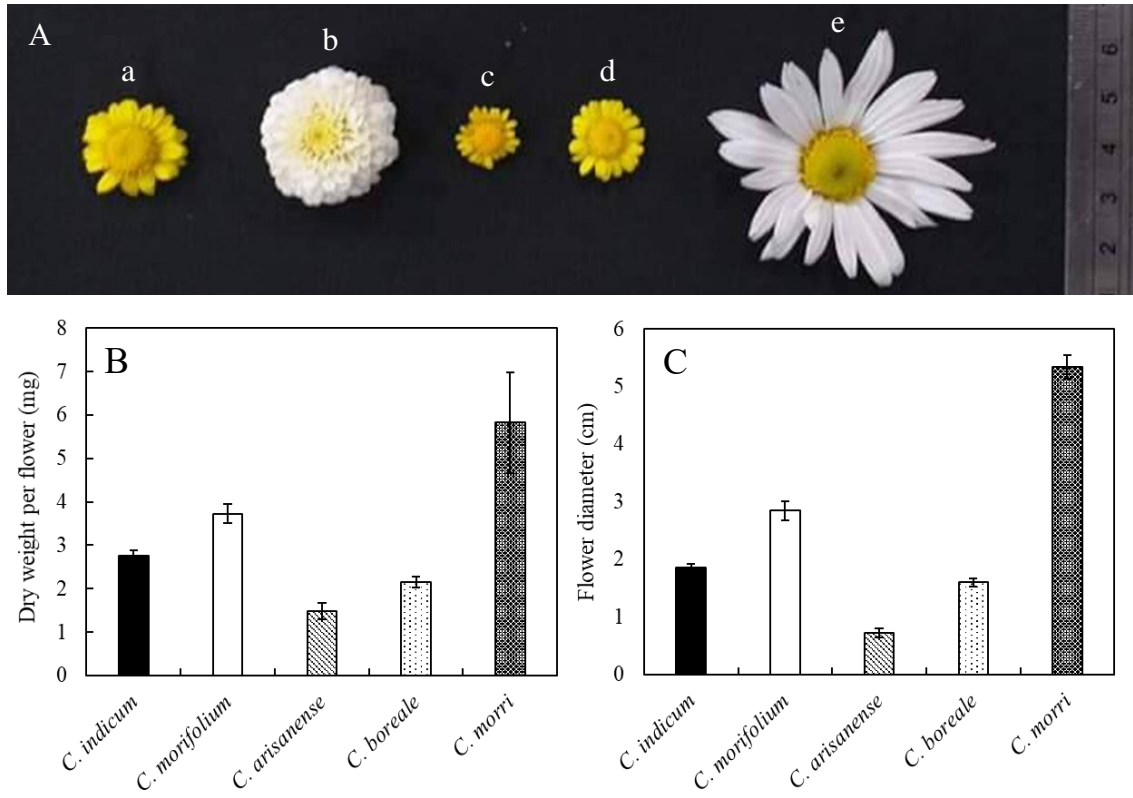


Fig. 2-2-2. Flower head characteristics of *Chrysanthemum*.

A) Appearance of *Chrysanthemum* flower inflorescence, B) Dry weight per flower, C) Flower diameter.

a) *C. indicum*, b) *C. morifolium*, c) *C. arisanense*, d) *C. boreale*, e) *C. morri*.

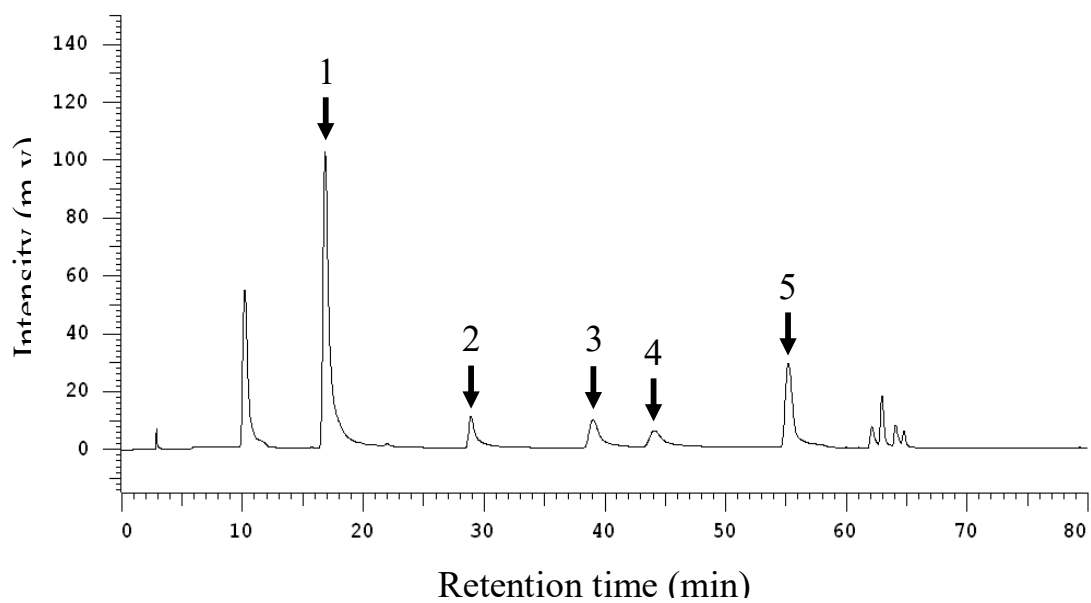


Fig. 2-2-3. HPLC chromatograms of *Chrysanthemum* standard products.

1) Chlorogenic acid, 2) Mrycetin, 3) Quercetin, 4) Luteolin, 5) Apigenin.

Table 2-2-1. Calibration curve of each standard solution.

Compound	Concentration range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Regression equation	<i>r</i>
Chlorogenic acid	High concentration	25~400	$y = 18499x + 159685$	0.9996
	Low concentration	1.56~25	$y = 18499x + 159685$	0.9997
Myricetin		18.75~300	$y = 8350x - 220943$	0.9982
Quercetin		18.75~300	$y = 10110x - 236775$	0.9999
Luteolin	High concentration	12.5~200	$y = 18966x - 76181$	0.9986
	Low concentration	0.78~12.5	$y = 9578x - 8639.9$	0.9970
Apigenin	High concentration	12.5~200	$y = 29731x - 8560$	0.9995
	Low concentration	0.78~12.5	$y = 33116x - 6176.6$	0.9996

Table 2-2-2. The content of flavonoid components of flower of *Chrysanthemum* spp.

Species	Chlorogenic acid	Myricetin	Quecetin (mg g ⁻¹)	Luteolin	Apigenin
<i>C. indicum</i>	2.77 ± 0.16 ^c	3.11 ± 0.09 ^b	1.24 ± 0.01 ^a	1.97 ± 0.08 ^a	0.52 ± 0.02 ^b
<i>C. morifolium</i>	4.63 ± 0.15 ^a	1.33 ± 0.01 ^e	0.96 ± 0.00 ^{bc}	1.51 ± 0.04 ^b	0.30 ± 0.00 ^d
<i>C. arisanense</i>	1.97 ± 0.06 ^d	1.90 ± 0.02 ^c	0.98 ± 0.00 ^b	0.80 ± 0.02 ^c	0.36 ± 0.00 ^c
<i>C. boreale</i>	3.39 ± 0.34 ^b	3.29 ± 0.07 ^a	0.96 ± 0.00 ^{bc}	0.82 ± 0.01 ^c	0.75 ± 0.04 ^a
<i>C. morri</i>	1.59 ± 0.06 ^e	1.53 ± 0.01 ^d	0.95 ± 0.00 ^c	0.74 ± 0.00 ^c	0.35 ± 0.00 ^{cd}

Table 2-2-3. The content of flower components per plant of *Chrysanthemum* spp.

Species	Chlorogenic acid	Myricetin	Quecetin (mg plant ⁻¹)	Luteolin	Apigenin
<i>C. indicum</i>	22.00 ± 0.17 ^b	24.73 ± 0.85 ^a	9.84 ± 0.65 ^a	15.64 ± 0.64 ^a	4.12 ± 0.12 ^b
<i>C. morifolium</i>	37.50 ± 0.33 ^a	10.81 ± 0.33 ^b	7.82 ± 0.20 ^a	12.28 ± 0.61 ^b	2.42 ± 0.08 ^{bc}
<i>C. arisanense</i>	5.08 ± 1.78 ^c	4.89 ± 1.64 ^b	2.51 ± 0.82 ^b	2.07 ± 0.71 ^d	0.91 ± 0.30 ^c
<i>C. boreale</i>	32.25 ± 4.13 ^a	31.72 ± 6.23 ^a	9.26 ± 1.95 ^a	7.89 ± 1.64 ^c	7.24 ± 1.67 ^a
<i>C. morri</i>	5.72 ± 1.27 ^c	5.47 ± 1.06 ^b	3.40 ± 0.65 ^b	2.66 ± 0.50 ^d	1.24 ± 0.23 ^c

Table 2-2-4. Intra-day and inter-day test of each standard component.

Compound	Concentration range ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	R.S.D. (%)	
		intra-day (n=3)	inter-day (n=3)
Chlorogenic acid	200	0.18	0.30
	100	0.79	4.10
	50	0.33	2.10
Myricetin	160	1.51	3.10
	80	2.26	1.00
	40	0.10	3.10
Quercetin	150	4.00	1.30
	75	2.90	1.30
	37.5	3.71	2.30
Luteolin	100	2.40	4.60
	50	1.40	2.50
	25	4.50	3.30
Apigenin	100	0.45	2.20
	50	2.30	4.50
	25	2.57	1.80

Table 2-2-5. Rate of return on Calibration curves of each component in *Chrysanthemum*.

Compound	Concentration range ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recovery
		Mean \pm S. D.* (R. S.D.%)**
Chlorogenic acid	200	92.8 \pm 0.6 (0.65)
	100	93.5 \pm 1.2 (1.28)
	50	96.3 \pm 0.4 (0.42)
Myricetin	160	95.2 \pm 1.0 (1.05)
	80	91.3 \pm 0.3 (0.33)
	40	92.4 \pm 0.2 (0.22)
Quercetin	150	98.2 \pm 0.8 (0.81)
	75	96.5 \pm 0.4 (0.41)
	37.5	94.3 \pm 1.4 (1.48)
Luteolin	100	97.6 \pm 0.4 (0.41)
	50	94.4 \pm 1.0 (1.06)
	25	95.2 \pm 1.1 (1.16)
Apigenin	100	96.3 \pm 0.3 (0.31)
	50	94.8 \pm 0.6 (0.63)
	25	97.1 \pm 0.8 (0.82)

2.2.4. 考察

阿里山油菊の花の直径は、これまでの研究報告によると自生地から採取したものが約 1.6 cm であるのに対し、本研究では 0.72 cm と小さくなる傾向にあった (Hayata, 1919) . これは本栽培期間における屏東県の最高気温が 34.1°C であるのに対し、自生地の最高気温が 24.3°C と気候が異なり、高温障害が生じたことが示唆された (交通部中央気象局, 2019) . また高温障害は含有成分にも影響を与え、高海拔に自生する阿里山油菊の 5 種のフラボノイド含量がそれぞれ有意に低い値となった.

キク属の遺伝的分類では、外部形態および DNA 分析により阿里山油菊および新竹油菊の 2 種の類似性が報告されている (Kitamura, 1943; Huang, 2016) . しかし本研究における調査では、草高、葉数および茎径で新竹油菊が増加傾向にあり、葉および茎乾物重、根長においても新竹油菊で有意に高い値となった. 開花数は新竹油菊で 407 であるのに対し、阿里山油菊では 144 であり、1 花あたりの乾物重および花の直径においても新竹油菊が有意に高い値となった. 新竹油菊の開花数は他の種と比較しても多い傾向にあり、野菊よりも 125 多く、栽培種である杭菊よりも 185 多かった. これは新竹油菊の自生地が低海拔であり、自生地の本栽培期間における最高気温が 36.4°C と屏東県の環境条件と類似していることが起因したと考えられる (交通部中央気象局, 2019) . これよりフラボノイド含量および生育特性は、自生地の環境条件に依存することが示唆された.

キク属はイソギクおよびシオギクに代表される無舌状花系、シマカンギクに代表される黄花系、ノジギクに代表される白花系の 3 つに大別される (中野ら, 2018) . 本研究においては、黄花系として野菊、阿里山油菊および新竹油菊の 3 種、無舌状花系として杭菊、白花系として森氏油菊に分類される. またキク属の特徴の一つは倍数性進化が顕著なことである. それぞれの分類群において 2 倍体から 4, 6, 8, 10 倍

体という高次倍数体が認められ、キク属の進化の過程において高次倍数体化が度々起こったと考えられている（中野，2019）。新竹油菊，阿里山油菊および野菊は2倍体であり，杭菊は6倍体，森氏は8倍体であり，倍数体が高くなると花も大きくなるとされ，熱帯地域下においても森氏油菊が最も大きく本研究結果と一致した（中野，2019）。

日本薬局方においては，キクカの主要成分として **Luteolin** が挙げられるが，同様にフラボンに分類される **Apigenin** の抗酸化作用，抗炎症作用および抗がん作用も漢方薬の重要成分として注目されている（Lin *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2013; 原島, 2017）。本研究では 1 g および 1 植物体あたりにおける **Luteolin** 含量が野菊で有意に高い値を示した。さらに野菊の 1 植物体あたりにおける **Mrycetin** および **Quercetin** の含量も有意に高い値を示しており，熱帯地域の低海拔環境下においても栽培可能であることを示した。また日本漢方生薬製剤協会が掲げる「漢方の将来ビジョン 2040」では，原料生薬の栽培化の提案と推進を進めている（日本漢方生薬製剤協会，2019）。これより野生種である野菊が栽培種である杭菊に代替して，高品質な生薬材料として栽培化できる可能性を示唆した。1 g および 1 植物体あたりにおける **Apigenin** では新竹油菊が有意に高く，絶滅危惧種に指定されている新竹油菊が熱帯地域の低海拔環境下において種保存のための栽培や今後の育種材料として利用可能であることが示唆された。

第 3 節 乾燥温度が台湾原産薬用キク属の頭花のフラボノイド成分含量 に与える影響

2.3.1. はじめに

前節では台湾産キク属を熱帯地域の同一条件下で栽培を行い，生育，乾物生産特性および頭花のフラボノイド含量を比較した．生薬キクカは乾燥させたキクの頭花を漢方原料として用いられる．本研究は，同一環境条件の圃場で栽培した台湾産キク属の頭花を採取し，異なる乾燥温度下で乾燥を行った後，HPLC 分析により頭花のフラボノイド含量を測定した．結果より乾燥温度の違いによる成分含量の変化に着目し，最適な乾燥温度の検証を行った．

2.3.2. 材料および方法

1) 栽培方法および栽培環境

本研究は台湾屏東科技大学内薬研究室圃場（緯度 22°38'N, 経度 120°36'E）にて種保存を行っていた圃場より台湾産キク属の頭花を採取した．2019 年 4 月 16 日より育苗を開始し，育苗方法および苗の分与元は前節と同様である．野菊（*C. indicum*），杭菊（*C. morifolium*），阿里山油菊（*C. arisanense*）および新竹油菊（*C. boreale*）の苗を 5 月 16 日に定植を行い，適宜十分な灌水を行った．また畝間および株間は 60 および 30 cm であり，1 区 2 畝 20 株（2.7 m²）の 2 反復とした．基肥には化成肥料（緑林牌好康 522，緑林生物科技股份有限公司；NH₄NO₃ : P₂O₅ : K₂O = 5:2:2）を使用し，1 畝あたり 5 kg 施肥した．また 3 カ月に 1 度追肥を行い，長効性多功能複合肥料（新好康多一号，台和園芸株式会社；NH₄NO₃ : P₂O₅ : K₂O = 14:11:13）を 1 株 10 g ずつ施

肥を行った。2020年2月25日に野菊、杭菊、阿里山油菊および新竹油菊の各3株より頭花を採取し、供試材料とした。

2) 乾燥温度の違いが台湾原産キク属の頭花のフラボノイド成分含量に与える影響

圃場より採取した野菊、杭菊、阿里山油菊および新竹油菊の頭花を用いて異なる乾燥温度の処理を行った。異なる乾燥温度の処理では乾燥機温度を30、50および70℃に設定を行い、各処理区の頭花含水率が10%以下になった時に、乾燥機から取り出しHPLCを用いて分析を行った。含水率が10%以下となった頭花を随時粉碎し、2mmのふるいにかけて、試料溶液の抽出を行った。HPLC分析では、異なる乾燥温度処理を行った頭花のChlorogenic acid, Mricetin, Quercetin, Luteolin および Apigenin 成分含量を調査した。また試料溶液の抽出方法およびHPLC分析方法は前節と同様である。

3) 統計処理

頭花のフラボノイド成分含量の測定では各処理区3個体を統計処理に用いた。結果はTukey Testにより5%水準で有意差検定を行った。

2.3.3. 結果

1) 乾燥温度の違いが台湾原産薬用キク属の頭花の含水率およびフラボノイド成分含量に与える影響

野菊の頭花の含水率について、30℃の処理では、処理後3日目までに82.1%から23.5%まで低下した。処理後3日目から9日目までは23.5%から9.3%に減少し、9日目以降は1%未満の減少となり含水率の減少は緩慢となった。50℃の処理での含水率

は処理後2日目までに81.7%から4.9%と急激に減少した。処理後3日目の頭花の含水率は4.5%となった。70℃の処理では乾燥開始から6時間後までに83.6%から7.1%に減少した。また24時間後における頭花の含水率は3.2%となった (Fig. 2-3-1)。

野菊および阿里山油菊の Chlorogenic acid 含量は乾燥温度 50℃処理区で有意に高く、30 および 70℃の処理区間では有意な差はなかった。杭菊の Chlorogenic acid 含量は70℃に比べ 30 および 50℃区で有意に高かった。新竹油菊では各処理区間に Chlorogenic acid 含量の有意な差はみられなかった。Mrycetin 含量について、野菊、杭菊および阿里山油菊では乾燥温度の違いによる有意差はみられなかった。しかし新竹油菊では 50℃区で有意に高かった。Quercetin 含量は野菊、阿里山油菊および新竹油菊で乾燥温度の違いによる差は生じなかったが、杭菊では 50℃で有意に高い値を示した。Luteolin 含量は野菊および阿里山油菊では各処理区間に有意な差は生じなかった。また杭菊および新竹油菊では各処理区間に有意差が生じ、50、30、70℃の順に Luteolin 含量が有意に増加した。Apigenin 含量は野菊、杭菊および阿里山油菊において 50℃のとき、有意に成分含量が増加した。また 30 および 70℃の処理区の Apigenin 含量には有意な差は生じなかった。新竹油菊の Apigenin 含量は各処理区間に有意差はなかった (Table 2-3-1)。

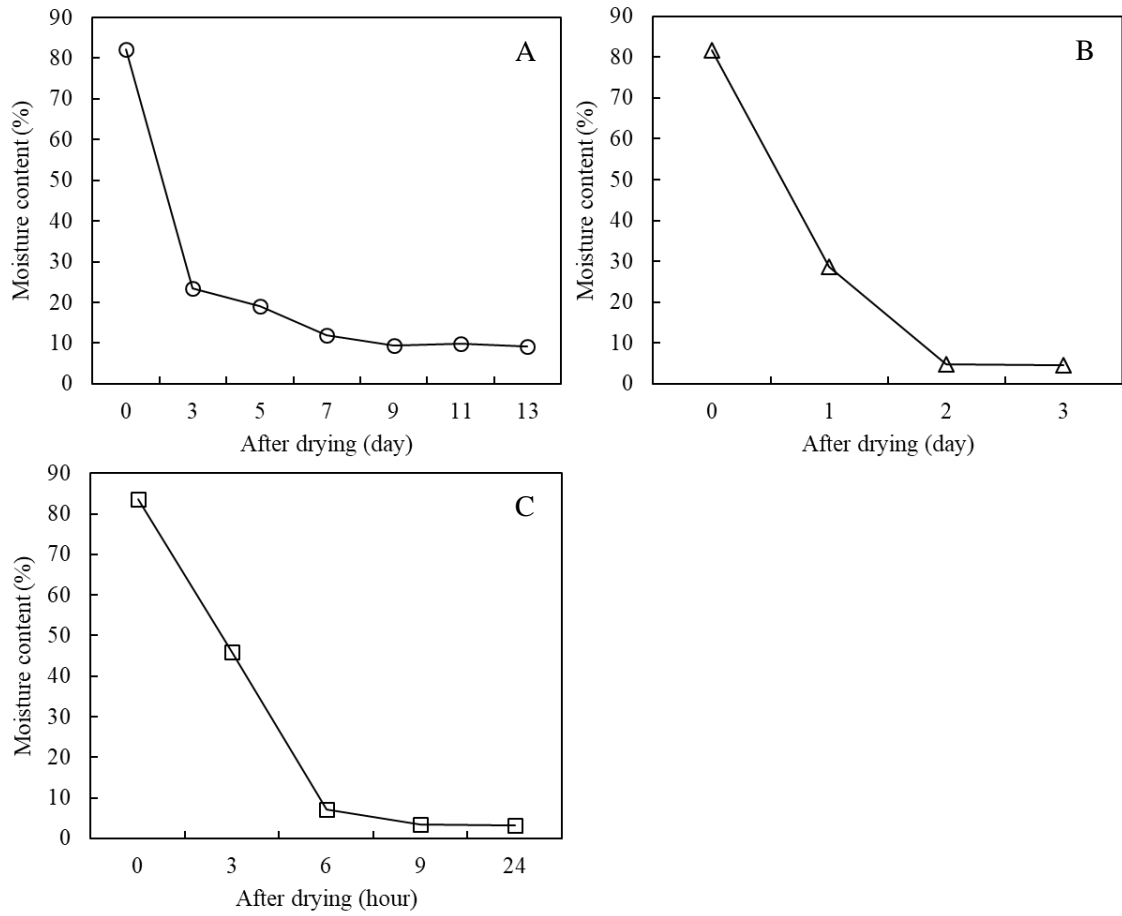


Fig. 2-3-1. The effect of different drying temperatures on the water content of *C. indicum* inflorescence.

A) 30°C, B) 50°C, C) 70°C.

Table 2-3-1. The effect of different drying temperatures on flavonoid content of *Chrysanthemum* spp.

Treatment		Chlorogenic acid	Myricetin	Quecetin	Luteolin	Apigenin
		mg g ⁻¹				
<i>C. indicum</i>	30°C	2.00± 0.08 ^a	1.10± 0.03 ^a	0.96± 0.00 ^a	1.17± 0.03 ^a	0.29± 0.00 ^b
	50°C	6.49± 2.69 ^a	1.95± 0.85 ^a	0.98± 0.02 ^a	2.25± 0.93 ^a	0.31± 0.01 ^a
	70°C	2.18± 0.76 ^a	1.16± 0.09 ^a	0.99± 0.01 ^a	1.15± 0.35 ^a	0.28± 0.00 ^b
<i>C. morifolium</i>	30°C	3.13± 0.29 ^a	3.33± 1.41 ^a	1.98± 0.13 ^a	3.28± 0.10 ^b	0.50± 0.04 ^b
	50°C	2.59± 0.21 ^a	2.95± 0.20 ^a	1.19± 0.04 ^b	4.07± 0.42 ^a	0.50± 0.03 ^b
	70°C	1.45± 0.37 ^b	2.53± 0.84 ^a	1.43± 0.07 ^b	1.92± 0.10 ^c	0.74± 0.10 ^a
<i>C. arisanense</i>	30°C	1.31± 0.13 ^b	1.16± 0.01 ^a	0.98± 0.01 ^a	0.84± 0.03 ^a	0.41± 0.02 ^a
	50°C	1.97± 0.06 ^a	1.14± 0.00 ^a	0.98± 0.00 ^a	0.80± 0.01 ^a	0.35± 0.01 ^b
	70°C	1.36± 0.24 ^b	1.17± 0.01 ^a	0.99± 0.01 ^a	0.84± 0.04 ^a	0.39± 0.03 ^b
<i>C. boreale</i>	30°C	3.14± 0.27 ^a	4.63± 0.40 ^a	1.00± 0.01 ^a	2.11± 0.32 ^b	0.64± 0.04 ^a
	50°C	2.74± 0.79 ^a	2.95± 0.39 ^b	0.97± 0.02 ^a	8.28± 0.12 ^a	0.69± 0.10 ^a
	70°C	2.31± 0.34 ^a	3.03± 0.18 ^b	0.97± 0.00 ^a	0.79± 0.04 ^c	0.81± 0.06 ^a

2.3.4. 考察

生薬の製法における化学過程の解明研究の一環として、乾燥処理における含有成分の変動は重要である（北川・吉川，1992）。薬用キク属は一般的に菊茶や漢方薬原料として乾燥物を利用される場合が多い。本研究結果より乾燥温度が頭花のフラボノイド成分含量に与える影響を解明することで、品質の高い生薬キクカ原料を提供することが可能となる。また乾燥は風乾によるものが多いが、5～10日を要し天候にも左右されるため、機械乾燥で1～2日で仕上げる加工も主流となっている（Capecka *et al.*, 2005）。さらに生薬原料は日本薬局方において60℃以下で乾燥するよう定められている（柚木崎ら，2008）。本研究では乾燥温度50℃において頭花の含水率が10%以下になるまで2日間要し、これは機械乾燥を行った場合に要する日数と一致した。乾燥温度70℃では乾燥後6時間で含水率10%以下となったが、フラボノイド含量は70℃で比較的低い傾向があった（Fig. 2-3-1; Table 2-3-1）。また乾燥温度30℃においては、乾燥開始から13日後に頭花の含水率が10%以下となり、50℃での乾燥に比べ、4倍以上もの時間を要した（Fig. 2-3-1）。さらに杭菊および新竹油菊は、乾燥温度30℃においてLuteolin含量が、50℃の時よりも有意に低い値となった（Table 2-3-1）。生薬原料である人参および紅参では高温60および100℃の乾燥温度において、外環や内部形態に変化が生じ、成分の分解が認められている（吉川ら，1993）。また牡丹皮を高温乾燥させるとpaeonol配糖体が容易に加水分解され、薬効成分が低下した研究報告がある（吉川ら，1992）。本研究においても上記の研究報告と同様な結果となり、高温乾燥によるフラボノイド成分含量の低下を示し、乾燥中に成分が分解されたことが示唆された。したがって本研究では頭花の含水率低下速度および乾燥後における頭花のフラボノイド含量より、50℃での乾燥製法が最適であることが明らかとなった。

第3章 異なる硝酸アンモニウム濃度が野菊 (*Chrysanthemum indicum*) の生育および頭花のフラボノイド成分に与える影響

第1節 土壌への異なる硝酸アンモニウム濃度が野菊 (*Chrysanthemum indicum*) の生育，光合成および乾物生産特性に与える影響

3.1.1. はじめに

野菊の頭花は生薬として用いられるが，野生品を採取したものを使用している．そのため野菊の栽培方法は未だ確立されていない．本研究では野菊の栽培方法の確立に向け，施肥管理に着目した．窒素は植物の生育にとって重要な元素の一つであり，キク科は窒素要求量の高い植物である．したがって本研究では重要元素である窒素の濃度を変化させ，野菊の生育および乾物重に着目し，土壌への最適な硝酸アンモニウム施肥濃度を調査した．

3.1.2. 材料および方法

1) 栽培方法および栽培環境

本研究は台湾屏東科技大学内網室（緯度 22°38'N, 経度 120°36'E）にて行い，野菊 (*C. indicum*) を挿し木にて繁殖させ供試した．なお，野菊の苗は台湾屏東科技大学森林学科の系統保存より分与されたものである．2019年2月26日に野菊の茎を2節ごとに切断したものをピートモス，砂 (3:1, v v⁻¹) の混合土に挿し木し，1カ月間育苗を行った．3月26日に風乾して篩 (2×2 mm) を通した畑土，ピートモス，砂を3:2:1 (v v⁻¹) の比率の混合土 2.5 kg をプラスチックポット (直径 30 cm, 高さ 26.5 cm) に充填した．草高が約 10 cm となったものを定植した．灌水は毎日1度十分に行い，

施肥はホーグランド溶液を定植後週 1 回 500 mL pot⁻¹ 与え、肥料成分の組成は、2 mM K₂SO₄, 2 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄ · H₂O, 25 μM H₃BO₃, 10 μM MnSO₄ · H₂O, 2 μM ZnSO₄ · 7H₂O, 0.5 μM CuSO₄ · 5H₂O, 0.5 μM H₃MoO₄ および 0.1 mM FeC₆H₅O₇ を基本組成とした。土壌への窒素施肥は上記の基本組成に加え、NH₄NO₃ の濃度を 4 段階 (0, 4, 10 および 20 mM) に設定し、0 mM を対照区とした。

2) 土壌への異なる硝酸アンモニウム濃度が野菊の生育に与える影響

生育調査は定植後から週に 1 度行い、草高、葉数、茎径 (SM-112, TECLOCK 社製) および SPAD (Model 502, Minolta 社製) の項目を各種 5 個体ずつ測定した。茎径は最大展開葉およびその上位葉との節間を測定し、SPAD 値は最大展開葉とその上下にある葉の計 3 枚の平均値とした。

3) 土壌への異なる硝酸アンモニウム濃度が野菊のガス交換速度に与える影響

サンプリング前日に野菊における光-光合成曲線の測定を行った。光-光合成曲線測定には携帯型光合成装置 (LC-pro⁺, ADC) を使用し、光強度 0, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 および 1200 μmol m⁻² s⁻¹ を用いて光合成速度 (Ph) を測定した。光合成速度は光強度 800 μmol m⁻² s⁻¹ で飽和した (Fig. 3-1-1)。また今後光合成速度および気孔コンダクタンスの測定では、光強度 800 μmol m⁻² s⁻¹ を使用して測定を行った。

サンプリングは移植後 127 日目 (127 day after transplant (DAT)) に光合成速度および気孔コンダクタンスを各処理 3 個体ずつ測定した。光合成速度および気孔コンダクタンスは、携帯型光合成装置 (LC-pro⁺, ADC 社製) を使用して、9時から15時の

間に光強度を $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定し、光合成速度 (Ph) および気孔コンダクタンス (gs) を測定した。

4) 土壌への異なる硝酸アンモニウム濃度が野菊の乾物生産特性に与える影響

127 DAT に各処理区 5 個体ずつ葉、葉柄、茎および根乾物重を調査した。乾物重は植物体を採取後、各部位に分解し、 50°C の乾燥機にて 72 時間乾燥させ、重量の測定を行った。

5) 土壌への異なる硝酸アンモニウム濃度が野菊のクロロフィル含量に与える影響

クロロフィル含有量測定をサンプリングと同時に行った。採取した 5 個体の植物体より分解した葉から葉片 (1 cm^2) を 1 枚ずつ取り出し、2 mL の 99.7% のメタノールに浸漬させ、暗所 12°C の環境下で 24 時間抽出を行った。抽出液を分光光度計 (UV-3100, Chrom Tech) で、665.2 と 652.0 nm の吸光度を測定した (Porra, 1989)。測定値から下記の式でクロロフィル含有量を求めた。

$$\text{Chl a (nmol ml}^{-1}\text{)} = 18.22 \times A^{665.2} - 9.55 \times A^{652.0}$$

$$\text{Chl b (nmol ml}^{-1}\text{)} = 33.78 \times A^{652.0} - 14.96 \times A^{665.2}$$

$$\text{Chl a + b (nmol ml}^{-1}\text{)} = 24.23 \times A^{652.0} + 3.26 \times A^{665.2}$$

$A_{652.0}$ と $A_{665.2}$ はそれぞれ 665.2 と 652.0 nm の吸光度を示す。

6) 統計処理

葉，葉柄，莖，根乾物重およびクロロフィル含量の測定では各処理区5個体を統計処理に用い，光合成速度および気孔コンダクタンスは各処理区3個体を用いた．結果は Tukey Test により 5%水準で有意差検定を行った．

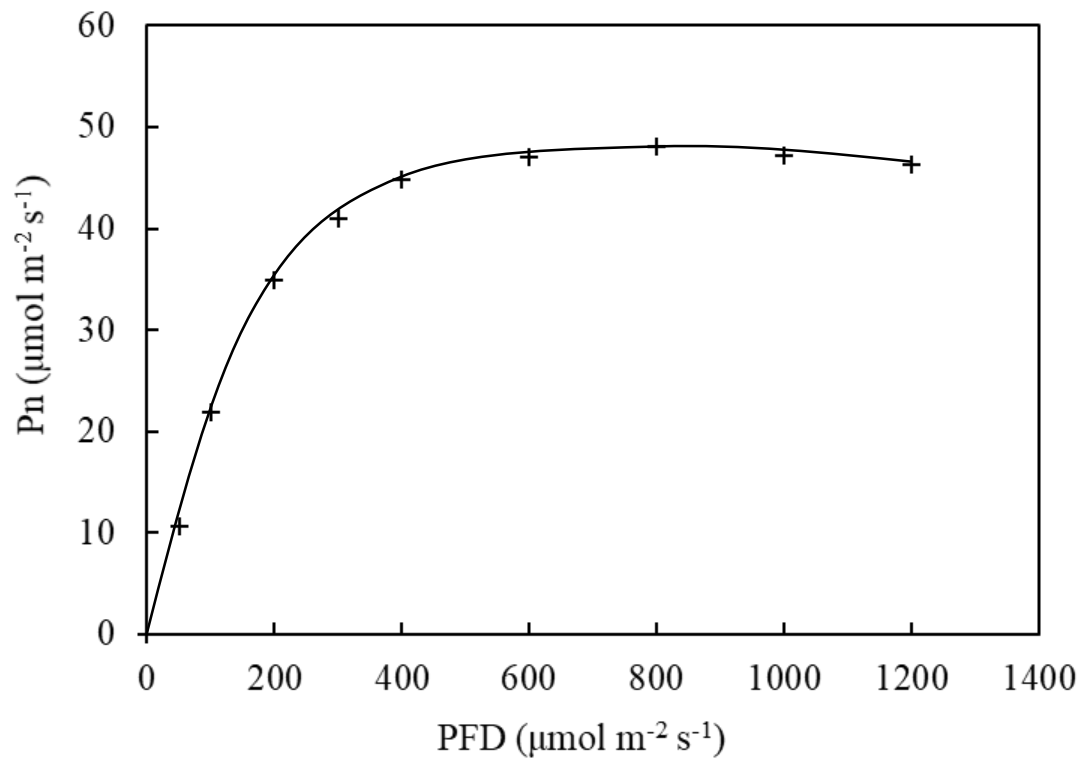


Fig. 3-1-1. The light curve of *C. indicum*.

3.1.3. 結果

1) 土壌への異なる硝酸アンモニウム濃度が野菊の生育に与える影響

草高においては 36 DAT まで各処理区で差は生じなかったが、36 DAT 以降 10 および 20 mM 処理区で著しく増加した。10 および 20 mM 区での草高の差はほとんどなく、2 処理区間の草高の最大差は 4 cm であった。また 10 および 20 mM の次に 4 mM で草高が高い傾向にあり、0 mM で最も草高の増加が小さくなった。127 DAT における草高は、0, 4, 10 および 20 mM で 33.5, 47.7, 61.5 および 62.1 cm となった (Fig. 3-1-2. A)。

葉数は 43 DAT まで 4, 10 および 20 mM で同様な傾向がみられ、それ以降 4 mM で他の 2 処理区と比較して低い傾向がみられた。また 10 および 20 mM は 43 DAT 以降もほとんど同様な葉数となった。0 mM の葉数は 36 DAT に他の 3 処理区と比較して葉数が減少傾向にあった。またその後も葉数の増加は緩やかであり、127 DAT における葉数は 40 枚となった (Fig. 3-1-2. B)。

茎径は全処理区において 22 DAT から 29 DAT の増加が最も著しく、増加が継続された 43 DAT では、0, 4, 10 および 20 mM の茎径は 3.49, 3.88, 4.49 および 4.70 mm となった。全処理区において 43 DAT 以降は茎径の数値は横ばいとなり、茎径の変動はほとんどなかった (Fig. 3-1-2. C)。

SPAD 値は 36 DAT より各処理区間差が大きくなり、0, 4, 10 および 20 mM の SPAD 値は 34.5, 40.8, 45.0 および 43.4 となった。また 36 DAT 以降 0 および 4 mM の SPAD 値は減少傾向となり、127 DAT における 0 および 4 mM の SPAD 値は 26.4 および 31.7 となった。10 および 20 mM の SPAD 値は 15 DAT まで著しく増加した後、15 DAT 以降、数値はほとんど横ばいとなり、大きな増減はみられなかった。また 10

および 20 mM の 127 DAT における SPAD 値は 39.1 および 44.6 となった (Fig. 3-1-2. D) .

2) 土壌への異なる硝酸アンモニウム濃度が野菊のガス交換速度, 乾物生産特性およびクロロフィル含量に与える影響

光合成速度は 0, 4, 10 および 20 mM で 28.8, 34.2, 40.5 および 41.3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となり, 10 および 20 mM と 4 mM, 4 mM と 0 mM 間に有意差が生じた (Fig. 3-1-3. A) .
また気孔コンダクタンスは 0, 4, 10 および 20 mM で 0.49, 0.58, 0.61 および 0.66 $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となり, 0 mM で有意に減少した (Fig. 3-1-3. B) .

葉乾物重は 0 mM と 10 および 20 mM との間に有意差が生じ, 0 mM の葉乾物重は 10 mM の葉乾物重の約 3 分の 1 となった. 葉柄, 茎および根乾物重は 10 および 20 mM で有意に増加し, 0 および 4 mM 間には有意差は生じなかった (Table 3-1-1) .

クロロフィル a 含量は 10 および 20 mM が有意に増加し, また 0 および 4 mM 間にも有意差があり, 0 mM で最も低い値を示した. クロロフィル b および a+b においても同様な結果であり, 10 および 20 mM で有意に高い含量を示した (Table 3-1-1) .

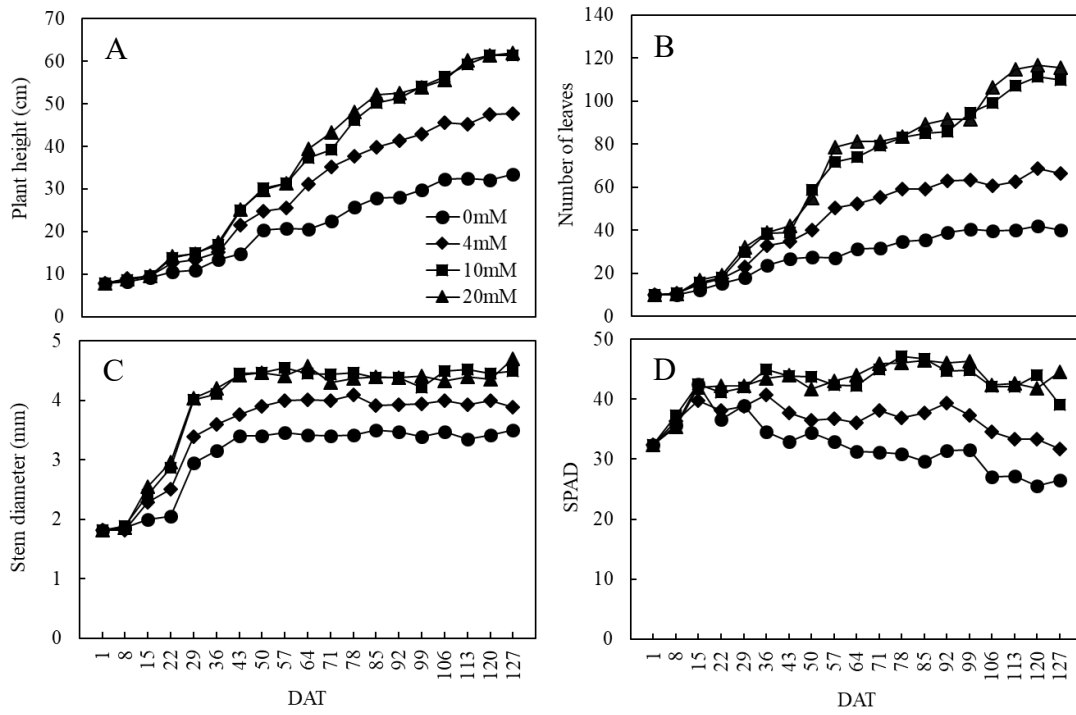


Fig. 3-1-2. The effects of different nitrogen fertilization concentrations on the growth of *C. indicum*.

A) Plant height, B) Number of leaves, C) Stem diameter, D) SPAD.

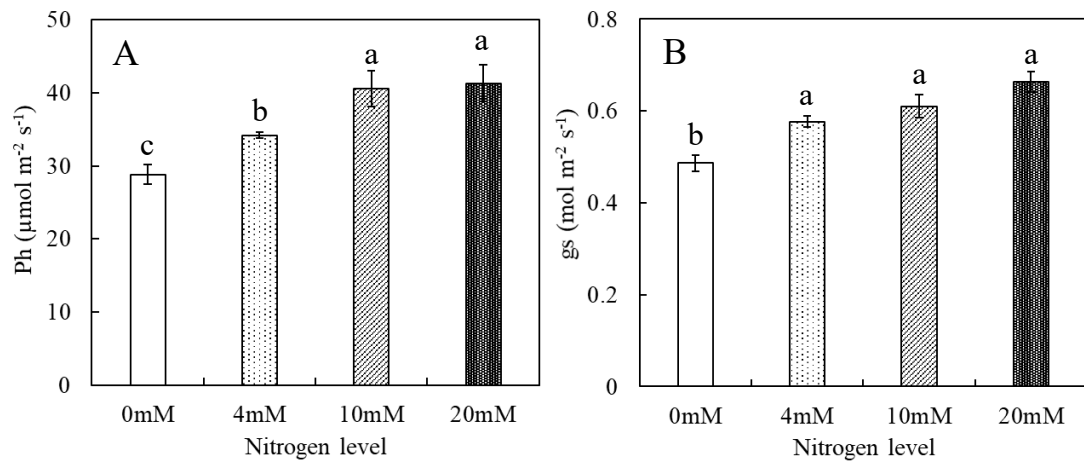


Fig. 3-1-3. The effects of different nitrogen fertilization concentrations on the photosynthesis and stomatal conductance of *C. indicum*.

A) Photosynthesis, B) Stomatal conductance.

Table 3-1-1. The effect of different nitrogen fertilization concentrations on dry matter production characteristics of *C. indicum*.

Date after plant	Treatment	Dry weight (g plant ⁻¹)				Chlorophyll content (µg mg ⁻¹)		
		Leaf	Leaf stalk	Stem	Root	a	b	a+b
127 DAT	0mM	5.23±0.38 ^c	0.16±0.02 ^b	1.22±0.08 ^b	3.50±0.41 ^b	1.96±0.16 ^c	4.05±0.40 ^c	6.02±0.57 ^c
	4mM	8.73±0.47 ^{bc}	0.38±0.04 ^b	2.46±0.23 ^b	5.10±0.25 ^b	2.73±0.28 ^b	5.72±0.62 ^b	8.45±0.91 ^b
	10mM	15.22±0.56 ^b	1.12±0.12 ^a	4.86±0.32 ^a	7.60±0.70 ^a	3.56±0.24 ^a	7.34±0.46 ^a	10.90±0.70 ^a
	20mM	16.65±0.76 ^{ab}	1.20±0.15 ^a	5.08±0.40 ^a	9.40±1.00 ^a	3.68±0.16 ^a	7.58±0.32 ^a	11.25±0.48 ^a

3.1.4. 考察

キクにおいて移植から花芽分化までの生育期間の適切な窒素施肥濃度は、その後の開花数および花の品質に影響すると言われている（景山ら, 1987）。さらに蓄積された茎葉部内の窒素は花へ移行することも報告されている（Woodson *et al.*, 1984）。本研究の結果より、10 mM 以上の処理区において草高および葉数は収穫時まで増加傾向にあり、繁茂が継続されたことを示した。これは収穫時に葉乾物重および茎乾物重が 10 mM 以上の処理区で有意に増加したと一致した（Fig. 3-1-1; Table 3-1-1）。また乾物生産へ直接的に関与する光合成およびクロロフィル含量の結果も 10 mM 以上の処理区で有意に増加し、類似した傾向を示した（Fig. 3-1-2; Table 3-1-1）。現在基準とされているキクの窒素施肥量は基肥と追肥を合わせるとおよそ 1 a 当たり 2.5~3.0 kg であるが、これは本実験の施肥量に換算すると 10 mM の量に相当する（農林水産省, 1999）。さらに本研究では 10 および 20 mM で生育および乾物重が有意に増加したことを示し、基準値よりも 2 倍となる窒素施肥濃度においても生育および乾物重の低下は見られなかった。本研究に用いた土壌は、熱帯地域の比較的肥沃度に乏しい土壌である。熱帯条件下での適用された肥料の利用効率は、窒素が 50% 未満、リンが 10% 未満、カリが 40% 未満と推定されている（Baligar and Bennett, 1986）。特に窒素肥料の損失は主にアンモニアの浸出、流出および揮発性損失によるものと言われている（杉原, 2012）。よって本研究では、使用した土壌が熱帯地域の肥沃度に乏しい土壌だったため、20 mM の高濃度窒素施肥においても生育および乾物収量の低下は見られなかったと考えられる。

第 2 節 葉面への異なる硝酸アンモニウム濃度が野菊 (*Chrysanthemum indicum*) の生育および頭花のフラボノイド成分に与える影響

3.2.1. はじめに

土壌への施肥に比べ、葉面散布は少量で即効性があり、開花前後の葉面散布によって頭花の収穫量増大が期待できる。また前節の結果より土壌へは 10 mM の窒素濃度で生育、光合成および乾物生産特性が飽和し、10 mM の窒素施肥が最適であることが示唆された。本研究では土壌へ 10 mM の窒素施肥を行い、根を正常に生育させ葉面散布を行うことで、葉面散布が野菊の生育および頭花のフラボノイド含量に与える影響について調査した。

3.2.2. 材料および方法

1) 栽培方法および栽培環境

栽培方法および栽培環境は前節と同様であり、本研究は 8 月 18 日に育苗を開始し、1 カ月後の 9 月 18 日に定植を行った。また毎日十分な灌水を行った。栽培期間中地上部にかからないよう土壌へホーグランド溶液を週 1 回 500 mL 与え、肥料成分の組成は、10mM NH_4NO_3 , 2 mM K_2SO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 25 μM H_3BO_3 , 10 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5 μM H_3MoO_4 および 0.1 mM $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ とした。開花前である 86 DAT から葉面散布 (NF) 処理を開始し、 NH_4NO_3 の濃度を 5 段階 (NF0, 1, 2, 4 および 8 mM) に設定し、週に 1 度各ポット 10 mL ずつ散布した。

2) 硝酸アンモニウムの葉面散布が野菊の生育および乾物生産特性に与える影響

86 DAT から生育調査を開始し，草高，葉数，莖径および SPAD を週に 1 度各処理区 5 個体ずつ調査した．前節と同様に，莖径は最大展開葉およびその上位葉との節間を測定し，SPAD 値は最大展開葉とその上下にある葉の計 3 枚の平均値とした．開花終了後の 114 DAT にサンプリングを行い，葉，莖，根乾物重およびクロロフィル含量を各 5 個体ずつ測定した．また葉，莖，根乾物重の合計より総乾物重を算出した．さらに画像解析処理ソフト（ImageJ, National Institutes of Health, USA）を用いて葉面積を測定した．

3) 硝酸アンモニウムの葉面散布が野菊の開花特性に与える影響

開花が開始した 93 DAT より，週に 1 度各 5 個体ずつ開花調査を行った．全開した頭花を採取し，50℃で 72 時間乾燥し，乾物重を測定した．測定した頭花は-20℃で貯蔵した．また 1 植物体あたりの開花数および花乾物重を総開花数および総花乾物重とし，総花乾物重および総開花数より 1 花あたりの乾物重を算出した．

4) 硝酸アンモニウムの葉面散布が野菊の頭花のフラボノイド含量に与える影響

乾燥重量を測定した頭花を振動式サンプルミル（TI-100, CMT 社製）で粉碎し，2 mm²のふるいにかけた．各個体の粉末 1 g に 100%メタノール 100 mL を加え，超音波振とう機（DC400, DELTA 社製）により 30 min 振とうさせた．その後 NO.2 ろ紙（FILTER PAPER, ADVANTEC 社製）でろ過し，濃縮機（B-491, R-210, BUCHI 社製; B403L, FIRSTEK 社製）により濃縮を行い，メタノールを加え 10 mL に定量した．さらに 0.45 μm メンブレンフィルター（XG-IWHA-9909-1304-PK, Bio Tech 社製）でろ過し，試料溶液とした．Chlorogenic acid（327-97-9, SIGMA 社製），Myricetin（529-44-2, SIGMA 社製），7-Methoxycoumarin（531-59-9, SIGMA 社製），Luteolin（491-70-3,

SUNHANK 社製) , Quercetin (117-39-5, SIGMA 社製) および Apigenin (520-36-5, SUNHANK 社製) の計 6 種類の標準品を用いた. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) による分析では,

HPLC: 5110 Series (HITACHI 社製)

検出器: 5420 Series (HITACHI 社製)

カラム: 4.6 I.D.×250 mm (Inertsil ODS-2, ジーエルサイエンス社製)

カラム温度: 40°C

波長: 280 nm

注入量: 20 μ L

流量: 1 mL/min

を用いた. また移動相 A=10%および移動相 B=80%メタノール (pH : 2.8) とし,

HPLC の分析条件は以下に示す :

0–5 min, 0–5% A ($v v^{-1}$); 5–10 min, 5–20% A ($v v^{-1}$); 10–15 min, 20–30% A ($v v^{-1}$); 15–20 min, 30–45% A ($v v^{-1}$); 20–40 min, 45% A ($v v^{-1}$); 40–50 min, 45–55% A ($v v^{-1}$); 50–60 min, 55–90% A ($v v^{-1}$); 60–65 min, 90–95% A ($v v^{-1}$); 65–75 min, 95–100% A ($v v^{-1}$); 75–80 min, 100–0% A ($v v^{-1}$).

また HPLC 分析により測定した頭花 1 g のフラボノイド成分含量と 1 pot あたりにおける頭花の乾物重量より, 1 植物体あたりの頭花のフラボノイド成分含量を算出した.

3) 統計処理

葉, 葉柄, 茎および根乾物重, 総乾物重, 葉面積, クロロフィル含量, 開花数, 総花乾物重および 1 頭花あたりの乾物重は各処理区 5 個体を統計処理に用いた. また

1g および 1 植物体あたりの頭花のフラボノイド成分含量の測定では各処理区 3 個体を統計処理に用いた。結果は Tukey Test により 5%水準で有意差検定を行った。

3.2.3. 結果

1) 硝酸アンモニウムの葉面散布が野菊の生育に与える影響

NF4 および 8 mM の草高は 86 DAT から 93 DAT で著しく増加し、40.2 cm だった草高は、93 DAT に NF 4 mM で 66.7 cm になり、NF 8 mM で 67.5 cm になった。また 93 DAT 以降は増加が慢緩となり、114 DAT における NF 4 および 8 mM の草高は 70.8 および 72.2 cm となった。NF 2 mM の草高は、調査期間中において NF 4 および 8 mM と比べて約 10 cm ほど草高は低くなり、114 DAT では 61.0 cm となった。NF 0 および 1 mM の草高は 86 DAT から 114 DAT までに約 10 cm 増加し、114 DAT の草高は 50.1 および 51.9 cm となった (Fig. 3-2-1. A) .

葉数は NF 4 および 8 mM では 86 DAT から 93 DAT で著しく増加し、その後増加は緩慢になり葉数は横ばいになった。NF 2 mM は 93 DAT から 100 DAT で急激に増加し、その後一定の数値となった。NF 0 および 1 mM の葉数は 107 DAT まで増加し、107 DAT から 114 DAT は増加が緩やかになった。114 DAT における NF 0, 1, 2, 4 および 8 mM の葉数は 101, 104, 110, 116 および 120 枚となった (Fig. 3-2-1. B) .

茎径は NF 2, 4 および 8 mM で 86 DAT から 93 DAT の間に著しく増加し、その後茎径は一定の値を示した。また 114 DAT における NF 2, 4 および 8 mM の茎径は 4.4, 4.4 および 4.6 mm であった。NF 0 および 1 mM の茎径は他の処理区と比較して細い傾向にあり、114 DAT における NF 0 および 1 mM の茎径は 4.0 および 4.1 mm となった (Fig. 3-2-1. C) .

SPAD 値は NF 4 および 8 mM で 86 DAT から 93 DAT まで著しく増加し、93 DAT における NF 4 および 8 mM の SPAD 値は 52.0 および 51.0 となった。93 DAT 以降の SPAD 値は一定の値を示した。NF 1 および 2 mM は 86 DAT から 100 DAT まで増加傾向にあり、その後一定の値となった。114 DAT における NF 1 および 2 mM の SPAD 値は 51.4 および 52.7 となった。NF 0 mM の SPAD 値は 86 DAT から 107 DAT まで増加し、その後一定の値となった。114 DAT の NF 0 mM の SPAD 値は 50.2 となった (Fig. 3-2-1. D)。

2) 硝酸アンモニウムの葉面散布が野菊の乾物生産特性およびクロロフィル含量に与える影響

葉乾物重は NF 4 および 8 mM で有意に増加し、NF 0 および 1 mM の葉乾物重は有意に低い値を示した。茎および根乾物重においては各処理区間に有意な差は生じなかった。総乾物重および葉面積は葉乾物重と同様に NF 4 および 8 mM で有意に増加し、NF 0 および 1 mM で有意に低い値を示した (Table 3-2-1)。

クロロフィル a 含量は NF 0 mM で最も高く、NF 8 mM で有意に減少した。またクロロフィル b では NF 1 mM で有意に低い含有量となり、その他の処理区では有意に高くなった。クロロフィル a+b には有意差は生じなかった (Table 3-2-1)。

3) 硝酸アンモニウムの葉面散布が野菊の開花特性に与える影響

総開花数は NF 8 mM で 231 となり、無処理区に比べ有意に高い数値を示した。次に NF 2 および 4 mM の総開花数が有意に高く、179 および 196 となった (Fig. 3-2-2. A)。NF 0 mM は他の処理区と比較して有意に低く、総開花数は 143 となった。総花乾物重は総開花数と同様に無処理区に比べ、NF 8 mM で有意に高い値となり、次に

NF2 および 4 mM の総開花数が有意に高く、10.6 および 11.7 g となった。NF0 mM では 8.4 g となった (Fig. 3-2-2. B) 。 1 花あたりの乾物重は NF 8 mM で有意に高い値となり、NF0, 1 および 4 mM で有意に減少し、58.4, 56.1 および 59.4 mg となった (Fig. 3-2-2. C) 。

4) 硝酸アンモニウムの葉面散布が野菊の頭花のフラボノイド含量に与える影響

1 g あたりにおける頭花のフラボノイド含量において、Chrologenic acid では NF4 および 8 mM で有意に高く、また NF 0, 1 および 2 mM の処理区間には有意差は生じなかった。Mrycetin では NF 1 および 8 mM と NF 0 mM の間に有意差が生じ、NF 1 および 8 mM で有意に高い値を示した。7-Methoxycoumarin は NF 4 および 8 mM で有意に高く、次に NF 2 mM で有意に高い値を示し、NF 0 mM は他の処理区と比較して最も低い値を示した。Quercetin および Luteolin も同様な結果となり、NF 0 mM で有意に低い値となり、その他の処理区間には有意差は生じなかった。Apigenin は NF 4 および 8 mM で有意に増加し、NF 0 mM で最も低い含有量を示した (Table 3-2-2) 。

1 植物体あたりにおける頭花のフラボノイド含量において、Chrologenic acid では NF 8 mM で有意に高い値を示した。Mrycetin では NF 8 mM で最も高い含有量となり、NF 1 および 4 mM と NF 0 mM 間に有意差が生じた。7-Methoxycoumarin では NF 8 mM で有意に増加し、NF 4 mM と NF 0 および 1 mM 間に有意差が生じた。Quercetin においても NF 8 mM で最も高い含有量となり、NF 4, 1 および 0 mM の間に有意差が生じた。Luteolin は NF 8 mM と NF 1, 2 および 4 mM と NF 0 mM の間に有意差が生じ、順に増加した。Apigenin は NF 8 mM で最も高い含有量を示し、また NF 4 mM および NF 0 mM の間に有意差が生じた (Table 3-2-3) 。

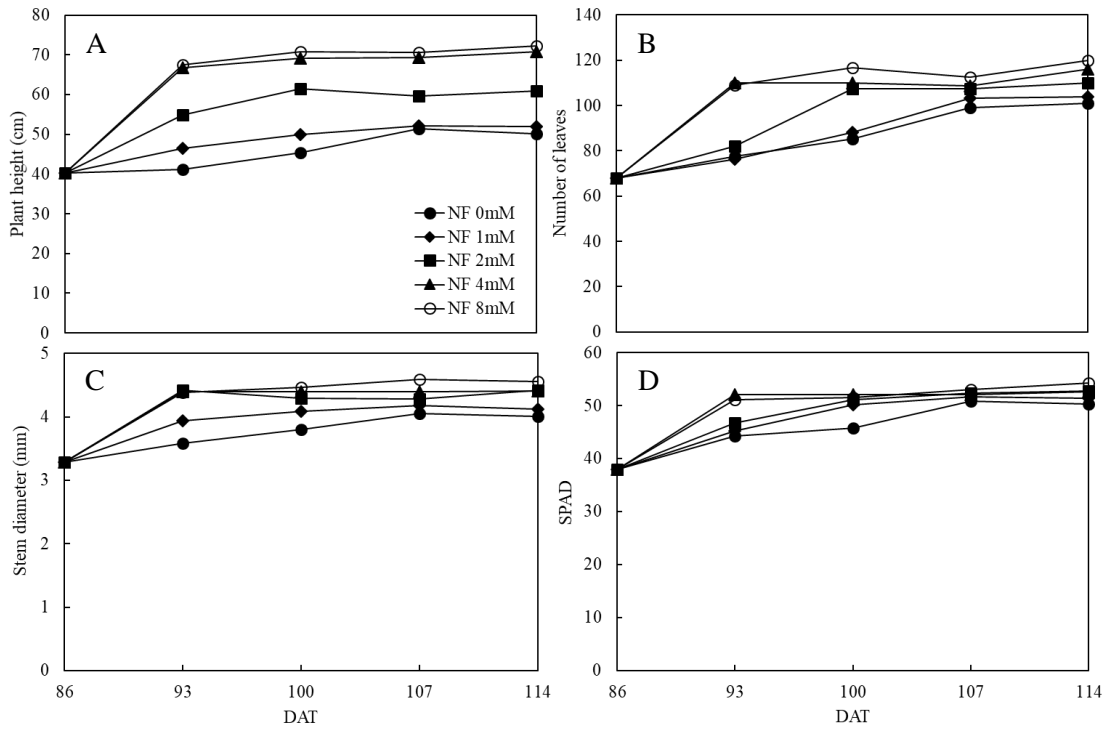


Fig. 3-2-1. The effects of different foliar nitrogen fertilization concentrations on the growth of

C. indicum.

A) Plant height, B) Number of leaves, C) Stem diameter, D) SPAD.

Table 3-2-1. The effect of different foliar nitrogen fertilization concentrations on dry weight and chlorophyll content of *C. indicum*.

Date	Treatment	Dry weight (g plant ⁻¹)				Leaf area (cm ²)	Chlorophyll content (µg mg ⁻¹)		
		Leaf	Stem	Root	Total		a	b	a+b
114 DAT	NF 0mM	8.36 ± 0.76 ^b	10.34 ± 1.76	11.48 ± 6.70	3.25 ± 0.56 ^b	2266.4 ± 205.1 ^b	1.99 ± 0.11 ^a	1.12 ± 0.15 ^a	3.11 ± 0.26
	NF 1mM	7.53 ± 1.12 ^b	8.34 ± 1.82	10.11 ± 2.18	3.54 ± 0.36 ^b	2262.1 ± 304.1 ^b	1.85 ± 0.26 ^{ab}	0.77 ± 0.53 ^b	2.63 ± 0.34
	NF 2mM	9.66 ± 1.67 ^{ab}	11.35 ± 2.40	12.87 ± 6.04	4.29 ± 1.12 ^{ab}	2619.5 ± 453.0 ^{ab}	1.68 ± 0.09 ^{bc}	1.29 ± 0.26 ^a	2.97 ± 0.24
	NF 4mM	10.88 ± 1.48 ^a	12.93 ± 2.60	11.16 ± 2.61	5.64 ± 1.40 ^a	2951.5 ± 400.5 ^a	1.64 ± 0.01 ^{bc}	1.33 ± 0.04 ^a	2.97 ± 0.04
	NF 8mM	10.67 ± 0.67 ^a	12.09 ± 1.75	11.57 ± 5.21	6.56 ± 0.67 ^a	2894.6 ± 181.4 ^a	1.45 ± 0.11 ^c	1.40 ± 0.24 ^a	2.85 ± 0.17

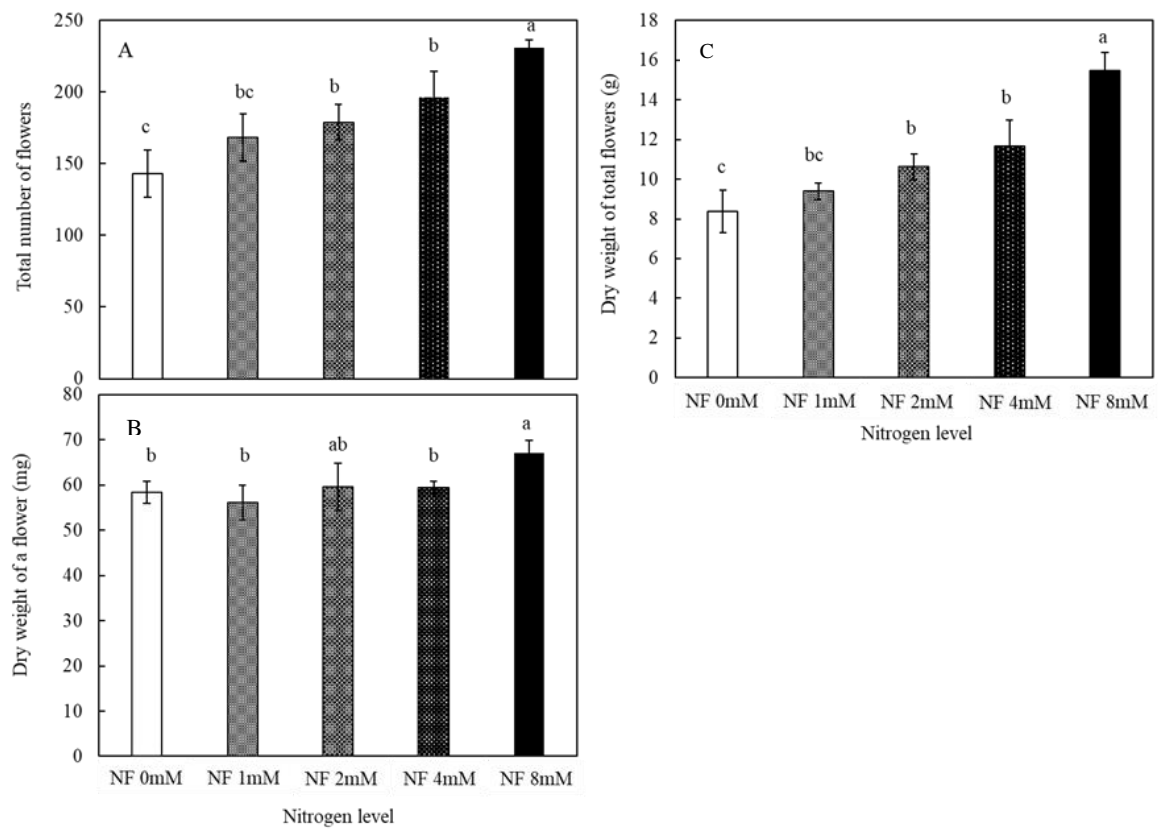


Fig. 3-2-2. The effects of different foliar nitrogen fertilization concentrations on the flowering characteristics of *C. indicum*.

A) Total number of flowers, B) Dry weight of a flower, C) Dry weight of total flowers.

Table 3-2-2. The effect of different foliar nitrogen fertilization concentrations on flavonoid components per flower.

Treatment	Flavonoid components of flower					
	Chrologenic acid	Mrycetin	7-Methoxycoumarin (mg g ⁻¹)	Quercetin	Luteolin	Apigenin (μg g ⁻¹)
NF 0mM	3.98±0.79 ^b	0.15±0.02 ^b	1.64±0.02 ^c	0.36±0.00 ^b	0.62±0.01 ^b	16.73±0.11 ^b
NF 1mM	6.02±0.39 ^b	0.23±0.03 ^a	2.17±0.17 ^{bc}	0.40±0.00 ^a	1.00±0.03 ^a	16.90±0.08 ^{ab}
NF 2mM	5.75±0.42 ^b	0.19±0.02 ^{ab}	2.58±0.31 ^b	0.39±0.01 ^a	0.95±0.10 ^a	17.14±0.09 ^{ab}
NF 4mM	7.62±0.98 ^a	0.20±0.02 ^{ab}	3.59±0.29 ^a	0.39±0.01 ^a	0.98±0.08 ^a	17.76±0.22 ^a
NF 8mM	7.53±0.90 ^a	0.25±0.03 ^a	3.55±0.40 ^a	0.39±0.00 ^a	0.92±0.07 ^a	17.56±0.45 ^a

Table 3-2-3. The effect of different foliar nitrogen fertilization concentrations on flavonoid components per plant.

Treatment	Flavonoid components of flower (mg plant ⁻¹)					
	Chrologenic acid	Mrycetin	7-Methoxycoumarin	Quercetin	Luteolin	Apigenin
0mM	32.69± 10.34 ^c	1.11±0.18 ^c	13.99± 0.14 ^c	2.80± 0.40 ^d	4.73± 0.59 ^c	0.13±0.02 ^d
1mM	56.31± 3.20 ^{bc}	2.19±0.38 ^b	20.26± 1.53 ^c	3.71± 0.06 ^c	9.41± 0.50 ^b	0.16±0.00 ^{cd}
2mM	62.37± 6.52 ^{bc}	2.03±0.17 ^{bc}	27.73± 4.68 ^{bc}	4.16± 0.17 ^{bc}	10.13± 1.06 ^b	0.18±0.00 ^{bc}
4mM	87.05± 12.79 ^b	2.35±0.26 ^b	41.22± 5.76 ^b	4.51± 0.17 ^b	11.20± 0.99 ^b	0.20±0.01 ^b
8mM	122.21± 18.79 ^a	4.07±0.57 ^a	57.10± 8.80 ^a	6.37± 0.09 ^a	14.99± 1.50 ^a	0.28±0.01 ^a

3.2.4. 考察

葉面への窒素散布は少量で即効性があり、多くの植物では窒素を 50% 吸収する場合の葉面吸収速度は 1~6 時間であると報告されている (BSI 生物科学研究所, 2013) . 葉面散布による養分吸収は葉の表面にあるクチクラ層の極微小孔および気孔を介して進入する (宇城, 2015) . 葉に進入した養分は葉肉細胞の細胞膜を通して、細胞内へと取り込まれ、大部分は篩管に入り光合成により生成された糖類と一緒に各組織へと転流され、一次代謝産物および二次代謝産物の合成に使用される (Oosterhuis, 2009) . さらに葉からの窒素供給量はフラボノイド生成酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性と正の相関関係を示し、花のフラボノイド含有量の増加を促進する (Liu *et al.*, 2010) . また葉面散布により吸収された窒素は主にアミノ酸代謝や二次代謝物生成に使用されるが、根からの窒素吸収ではアミノ酸生成・貯蓄および葉への転流に使用され、根と葉における窒素代謝が異なることが報告されている (鳥山・松元, 1986) . 本研究の結果より、草高および葉数は NF4 および 8 mM で増加傾向にあり、これは葉および総乾物重量の結果と一致し、窒素葉面散布は直接的に葉の繁茂に影響を与えることが示唆された (Fig. 3-2-1; Table 3-2-1) . また 93 日目より茎葉の成長は緩やかとなり、開花数および 1 植物体あたりの頭花のフラボノイド含量は 6 成分ともに NF 8 mM で有意に増加したことから、開花後の窒素葉面散布は開花数や総花乾物重の増加およびフラボノイド生成に影響を与えることが示唆された (Fig. 3-2-1; Fig. 3-2-2, Table 3-2-1) . さらに頭花 1 g あたりにおけるフラボノイド含有量では Chrologenic acid および 7-Methoxycoumarin において窒素施肥濃度と比例して増加傾向にあったが、それ以外のフラボノイド成分では NF 0 mM とそれ以上の濃度間での有意差のみであった. これは発蕾後からの窒素葉面散布は開花数を促進し、高濃度の窒素葉面散布を行うことで、開花数の増加がより直接的に 1 植物体あ

たりの頭花のフラボノイド成分含量を有意に増加させる効果があることを示した。

日本薬局方においては、キクカの主要成分として Luteolin が挙げられ、Luteolin は抗炎症作用、抗アレルギー作用および抗がん作用を示し、漢方薬では Luteolin に富む植物を高血圧、炎症および癌などの疾患治療に使用されてきた (Lim *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2008) 。 1 植物体あたりの Luteolin 含量では、NF 8 mM と他の処理区を比較し、1.34～3.17 倍増加したことが示された。以上より生育特性、乾物生産特性およびフラボノイド成分含量の観点から、NF 8 mM が最適であることが示唆された。

第4章 湛水処理が野菊の生育および頭花のフラボノイド成分に 与える影響

第1節 湛水処理が土壌体積含水量，溶存酸素量および野菊の生育に与 える影響

4.1.1. はじめに

前章では野生種である野菊の施肥管理について調査を行ったが，本研究では熱帯地域で頻発する湛水に焦点を当て，1，3，5，10日間の湛水処理区（ws 1d, 3d, 5d, 10d）および通常灌水を行う対照区（ck）の計5処理区を設けた．施肥管理と同様に熱帯地域での野菊の栽培化に向け，湛水ストレスにおける野菊の生育に関する反応を調査した．

4.1.2. 材料および方法

1) 栽培方法および栽培環境

本研究は台湾屏東科技大学内網室（緯度 22°38'N, 経度 120°36'E）にて行われ，野菊（*Chrysanthemum indicum*）を挿し木にて繁殖させ供試した．なお，野菊の苗は台湾屏東科技大学森林学科の系統保存より分与されたものである．2018年10月21日に野菊の茎を2節ごとに切断したものをピートモス，砂（3:1, v v⁻¹）の混合土に挿し木し，1カ月間育苗を行った．11月21日に風乾して篩（2×2 mm）を通した畑土，ピートモス，砂を3:2:1（v v⁻¹）の比率の混合土 6.5 kg をプラスチックポット（直径 30 cm, 高さ 26.5 cm）に充填した．草高約 10 cm の苗を定植し，毎日1度十分に灌水を行った．また施肥はホーグランド溶液を週 1 回 500 mL 与え，肥料成分の組成は，

20mM NH_4NO_3 , 2 mM K_2SO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 25 μM H_3BO_3 , 10 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5 μM H_3MoO_4 および 0.1 mM $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ とした。なお、湛水処理期間中の施肥は中断した。

2) 湛水処理条件

湛水処理は移植後 (DAT) 70 日目の 2019 年 1 月 31 日から 2 月 10 日まで行い、湛水処理開始後から 2 月 23 日まで土壌体積含水量を測定した。湛水処理はポットの底をビニールにより覆い、さらに同型のポットを重ねることで湛水条件下とした。また水位は常に土壌表面から 3 cm となるように設定した。湛水処理期間は対照区 (ck) および 1, 3, 5, 10 日間の湛水処理区 (ws 1d, 3d, 5d, 10d) の計 5 処理区を設けた。さらに対照区は自動灌漑システムを用いて 7:00 および 17:00 の 1 日に 2 回、それぞれ 300 mL 灌水されるよう設定した。湛水処理終了後は覆っていたポットおよびビニールを取り除き、速やかに排水させた。湛水処理後は対照区と同様に自動灌水システムを用いて 1 日に 2 回灌水を行った。

3) 土壌体積含水量および溶存酸素量測定

湛水処理開始から各処理区には、土壌水分センサー (EC-5, DECAGON) を土壌表面下 10 cm に埋設し、2019 年 2 月 1 日から 2 月 23 日まで土壌体積含水量の測定を行った。また土壌体積含水量は 30 分に一度データロガー (Em5b, DECAGON) に記録した。さらに湛水処理開始後より、湛水処理開始日、ws 1d, 3d, 5d および 10d に土壌中の溶存酸素量 (DO 値) の測定を行った。土壌中の溶存酸素量 (DO 値) は DO 測定装置 (7031, EZDO) を用いて測定を行った。DO 値は、DO 測定装置を水面と土壌表面の間に設置し、数値が安定したときに記録を行った。

4) 湛水処理期間における野菊のガス交換速度測定

光合成速度は湛水処理後および対照区は処理開始日，湛水処理 5 日後および 10 日後に測定を行った。光合成速度測定には $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度で，最大展開葉を測定した。また光合成速度の測定には携帯型光合成装置（LC-pro⁺, ADC）を使用し，10 時～14 時の間に測定を行った。

5) 湛水処理期間における野菊のクロロフィル含有量測定

クロロフィル含有量測定では，光合成速度の測定に用いた葉を採取し，さらにその葉から葉片（ 1 cm^2 ）を 3 枚取り出し，2 mL の 99.7% のメタノールに浸漬させ，暗所 12°C の環境下で 24 時間抽出を行った。抽出液は分光光度計（UV-3100, Chrom Tech）を用い，665.2 と 652.0 nm の吸光度を測定した（Porra, 1989）。測定値から下記の式でクロロフィル含有量を求めた。

$$\text{Chl a (nmol ml}^{-1}\text{)} = 18.22 \times A^{665.2} - 9.55 \times A^{652.0}$$

$$\text{Chl b (nmol ml}^{-1}\text{)} = 33.78 \times A^{652.0} - 14.96 \times A^{665.2}$$

$$\text{Chl a + b (nmol ml}^{-1}\text{)} = 24.23 \times A^{652.0} + 3.26 \times A^{665.2}$$

$A^{652.0}$ と $A^{665.2}$ はそれぞれ 665.2 と 652.0 nm の吸光度を示す。

6) 湛水処理期間における野菊の乾物生産特性調査

各処理区は湛水処理後にサンプリングを行い，対照区では処理開始日，湛水処理 5 日後および 10 日後に行った。また各処理区 5 ポットずつサンプリングを行った。採

取した植物体は地上部と根に分解し、50°Cで72時間乾燥させた。また乾燥後は地上部および根の乾物重の測定を行った。

4.1.3. 結果

1) 湛水処理が土壌体積含水量に与える影響

対照区の土壌体積含水量は、測定期間中 $0.34\sim 0.4\text{ m}^3\text{ m}^{-3}$ を推移した。湛水処理後、ws 1d, 3d, 5d および 10d の土壌体積含水量は $0.45\text{ m}^3\text{ m}^{-3}$ 以上であった。ws 1d および 3d は湛水処理後 0.45 および $0.47\text{ m}^3\text{ m}^{-3}$ であったが、湛水処理終了後土壌水分含水量は 0.41 および $0.39\text{ m}^3\text{ m}^{-3}$ となり、急激に低下した。その後は緩やかに減少し、2月23日における ws 1d および 3d の土壌体積含水量は 0.31 および $0.30\text{ m}^3\text{ m}^{-3}$ となり、対照区と同等な値となった。しかし ws5d および 10d では2月23日まで $0.4\text{ m}^3\text{ m}^{-3}$ を超える高い土壌体積含水量を維持した (Fig. 4-1-1)。

2) 湛水処理が土壌中の溶存酸素量に与える影響

湛水処理開始日は 7.08 mg L^{-1} であり、ws 1d では 6.62 mg L^{-1} 、ws 3d は 5.05 mg L^{-1} 、ws 5d は 3.12 mg L^{-1} 、ws 10d は 2.35 mg L^{-1} となり、湛水期間が長くなるにつれて DO 値は減少していった (Fig. 4-1-2)。

3) 湛水処理が野菊の光合成速度、クロロフィル含量、地上部および地下部の乾物生産に与える影響

処理開始日の光合成速度は $46.87\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ であり、ws 1d は $46.37\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 、ws 3d は $40.65\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 、ws 5d は $6.69\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 、ws 10d は $1.12\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ となり、ws 3d から 5d に光合成速度は急激に減少した。また ws 10d には光合成速度は $0\text{ }\mu\text{mol}$

$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ に近い値となり、全体の80%の葉が枯死した。対照区の光合成速度は46.87, 48.26 および $46.20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となり、常に一定の値を示した (Fig. 4-1-3; Fig. 4-1-4. A) .

処理開始日のクロロフィル含量は $48.95 \mu\text{g mL}^{-1}$ であり、ws 1d は $47.97 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、ws 3d は $46.08 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、ws 5d は $40.42 \mu\text{g mL}^{-1}$ 、ws 10d は $33.58 \mu\text{g mL}^{-1}$ となり、ws 3d より減少傾向にあった。また対照区のクロロフィル含量は 48.95, 49.50 および $49.19 \mu\text{g mL}^{-1}$ となり、一定の値を示した (Fig. 4-1-4. B) .

湛水処理開始日における地上部乾物重は 6.39 g であり、ws 1d では 4.55 g となり、ws 3d は 4.71 g、ws 5d は 4.31 g、ws 10d は 3.27 g に減少した。対照区では処理開始日、処理後 5 日目および 10 日目の地上部乾物重は 6.39, 6.84 および 8.13 g となった (Fig. 4-1-4.C) . また地下部乾物重は処理開始日、ws 1d, 3d, 5d および 10d で 1.41, 1.14, 0.76, 0.35 および 0.19 g となり、ws 5d まで急激に減少したものの、ws 5d から 10d では減少が緩やかになった。また対照区は処理開始日、処理後 5 日目および 10 日目の地下部乾物重は 1.41, 1.66 および 2.04 g となり増加傾向にあった (Fig. 4-1-4. D) .

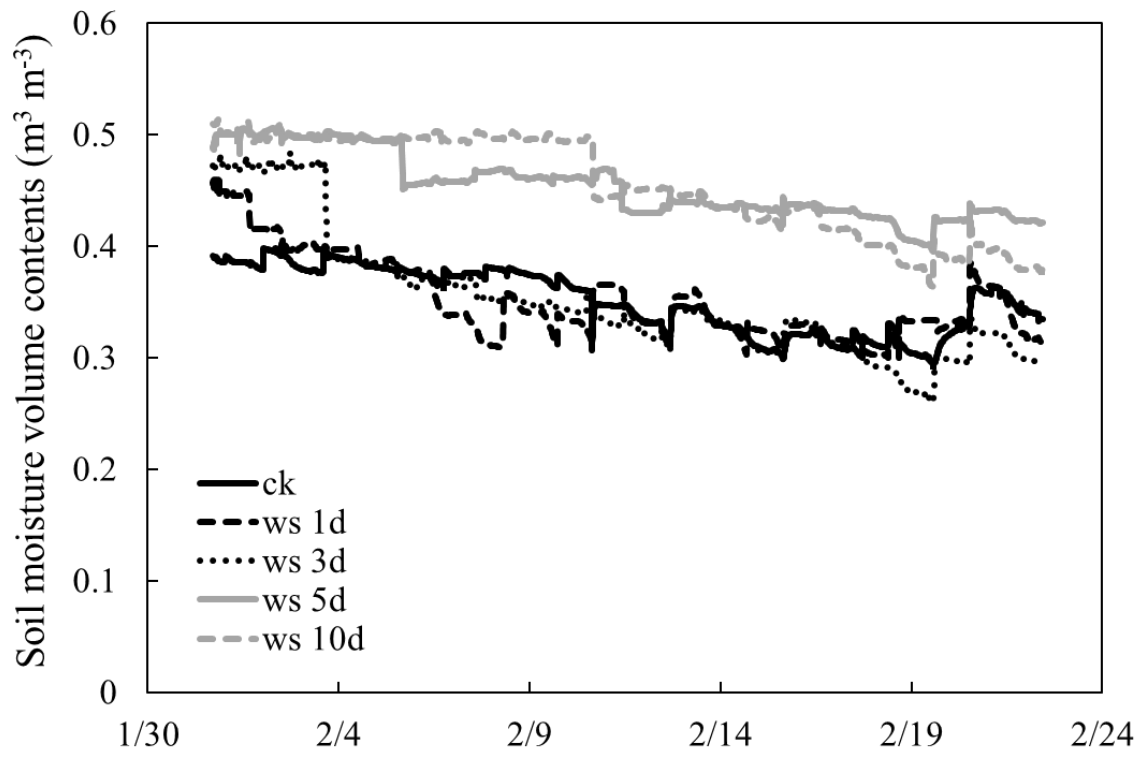


Fig. 4-1-1. The soil moisture volume contents under waterlogging conditions.

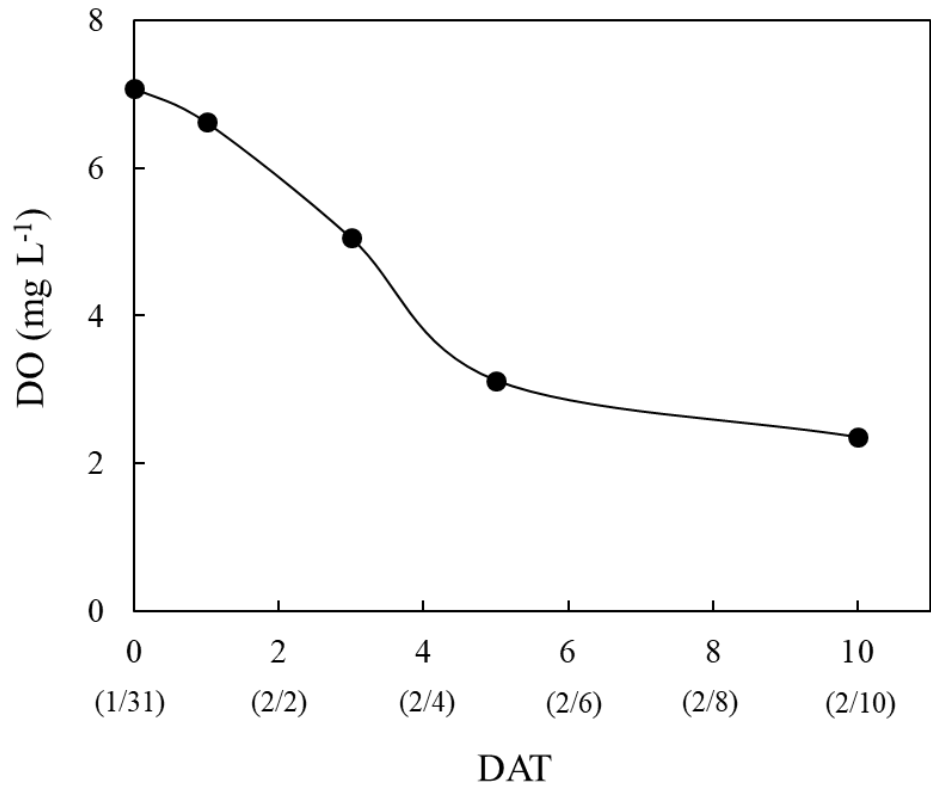


Fig. 4-1-2. The DO value during waterlogging conditions.

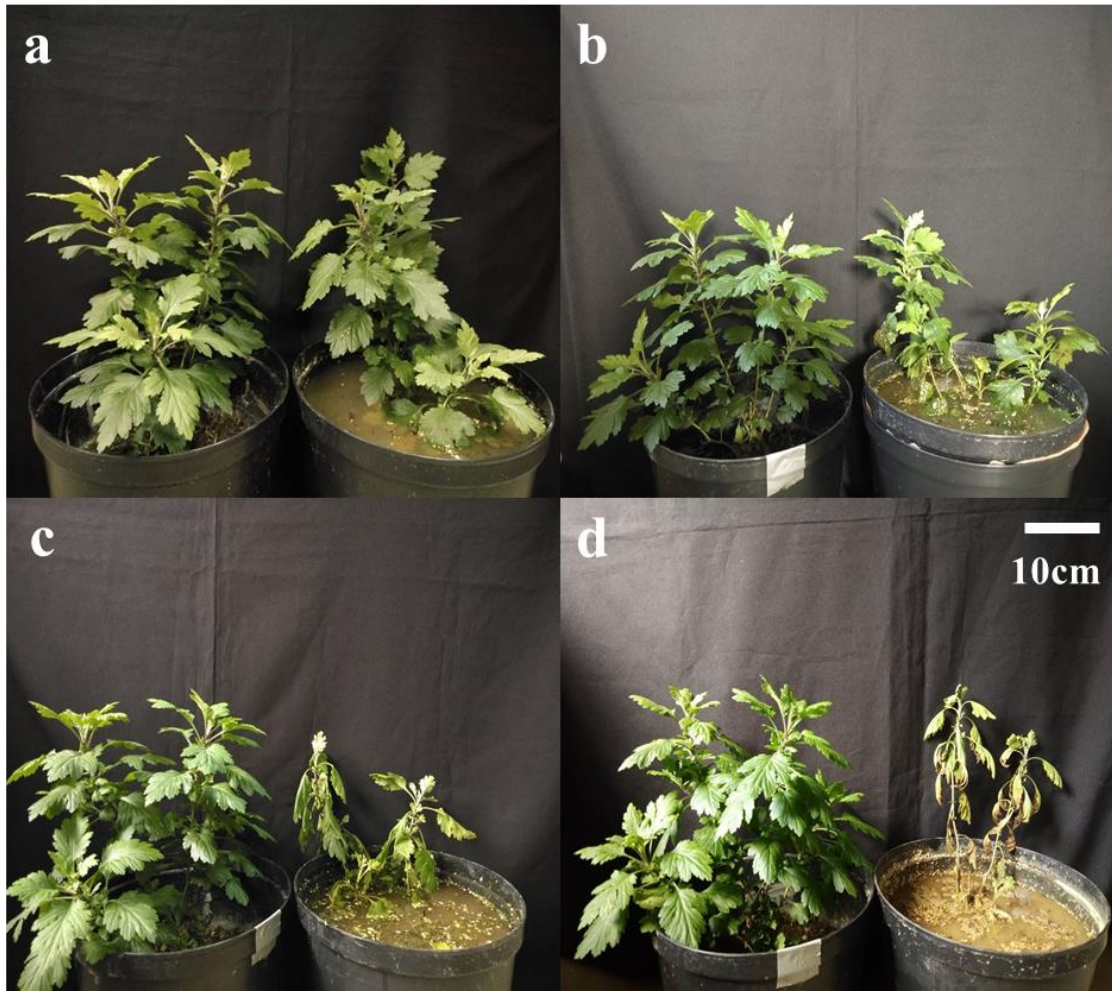


Fig. 4-1-3. The above-ground part of *C. indicum* waterlogging treatment.

*a) ck and ws 1d, b) ck and ws 3d, c) ck and ws 5d, d) ck and ws 10d.

**a) 1st February (71 DAT), b) 3rd February (73 DAT), c) 5th February (75 DAT), d) 10th February (80 DAT).

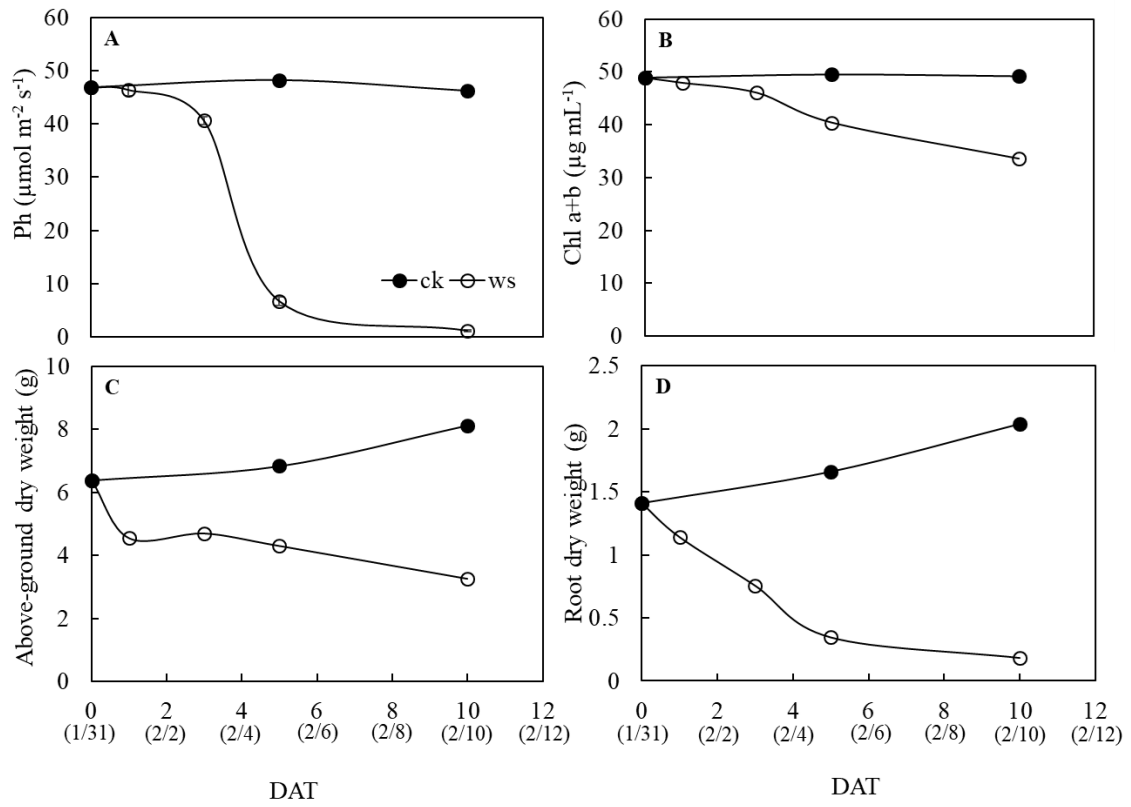


Fig. 4-1-4. The effects of waterlogging on dry weight, photosynthesis and total chlorophyll contents.

A) Photosynthesis, B) Total chlorophyll contents, C) Above-ground dry weight, D) Root dry weight.

4.1.4. 考察

土壌水分含量は一般的に体積含水率約 $0.3 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$ であり、本研究においても対照区の土壌水分含量は $0.3 \sim 0.4 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$ の範囲を推移し、適切な灌水量であると考えられる (Nakamura, 2018) . それに対し湛水処理区の土壌水分含量は約 $0.5 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$ まで上昇し、ポット内における液相の比率が増加したことが考えられる. また湛水条件下の土壌は、気相が多く存在する好氣的な土壌に比べ、大気中から土壌への酸素拡散速度は 320,000 分の 1 程度まで低下する (Armstrong and Drew, 2002) . さらに長期に渡る降雨は土壌中の酸素レベルを低下させ、嫌気性代謝による ATP 生成率はわずか 10% である (Bailey-Serres and Voesenek, 2008) . 長期的な降雨によって引き起こされる土壌の高含水量は、土壌中の酸素供給を阻害し、根は茎葉部からの酸素の転流によって呼吸を行う (Armstrong and Armstrong, 2014) . 本研究における DO 値の結果より、ws 5d までで湛水処理開始前の空气中酸素濃度に対し 56% の減少がみられた. 一般的な作物栽培における DO 値は 5.0 mg L^{-1} 以上が最適とされる. 本実験結果では ws 3d を過ぎると DO 値 5.0 mg L^{-1} を下回り、Yin ら (2009) の結果と同様に ws 5d 及び ws 10d の処理区でしおれやクロロシスの形態的応答がみられた. これまで湛水におけるクロロシスの徴候は多くの作物種において研究され、葉緑素含量、特に光合成効率と根の活動についての関係性が明らかにされてきた (Boru *et al.*, 2001; Cornelious *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013) . 本研究においても、湛水期間中の地上部乾物重は ws 1d で約 29% 減少し、ws 10d では 49% の減少率であった. しかし地下部乾物重は湛水期間を通して 86% の減少率となった. 以上より湛水処理において根の酸素欠乏症により、地上部乾物重の変化がすぐに反応するものの、最終的には地下部の乾物重の減少率は地上部乾物重の減少率を上回り、湛水処理は地下部へ特に影響を与えることが考えられる.

第 2 節 湛水処理が野菊の生育および頭花のフラボノイド成分に与える影響

4.2.1. はじめに

前節では湛水処理 1 日, 3 日, 5 日および 10 日 (ws 1d, 3d, 5d および 10d) , 湛水処理を行わない対照区 (ck) の 5 処理区を設定した. DO 値は湛水期間が長くなるにつれて減少傾向にあり, 光合成速度は ws 5d および 10d で急激に減少した. また湛水期間中における地上部乾物重は ws 1d まで急激に減少し, その後減少は緩やかになった. それに対し地下部乾物重では ws 5d まで急激な減少は継続され, ws 5d から 10 d では緩やかな減少となった. そこで本研究では湛水期間により受けたストレスが野菊のその後の生育および頭花のフラボノイド含量にどのように影響するかに着目した.

4.2.2. 材料および方法

1) 栽培方法および栽培環境

本研究は前節と同様屏東科技大学内網室にて行われ, 湛水処理後の ws 1d, 3d, 5d, 10d および対照区を研究材料として使用した. また各処理終了後から十分に排水をさせた後, 毎日 1 度十分に灌水を行った. 施肥においても処理終了後から週に 1 度 500 mL ずつ行い, 肥料組成は前節と同様である.

2) 湛水処理後における野菊の生育調査

湛水処理後の 2 月 10 日から 4 月 21 日まで週に 1 度各処理区 5 個体ずつ生育調査を行い, 草高, 葉数, SPAD (Model 502, Minolta) および茎径 (SM-112, TECLOCK)

の測定を行った。SPAD 値は、最大展開葉とその上下（合計 3 枚の葉）で測定を行った。茎径は最大展開葉とその上の葉との節間を測定した。しかし、ws 10d では 2 月 24 日の処理終了後すぐに全個体枯死したため、それ以降調査を行うことが出来なかった。

3) 湛水処理後における野菊の乾物生産特性

開花後、各処理区ランダムに 5 個体ずつサンプリングを行い、頭花、葉、茎および根に分解し、50℃の乾燥機で 72 時間乾燥させた。乾燥後は電子天秤にて乾物重量の測定を行い、その後-20℃の冷凍庫にて保存した。根は分解後、茎と切り離れた付け根部分から最も根の長い部分を根長とし測定を行った。

葉面積はサンプリングを行った各個体から大小異なる葉を 10 枚ずつ採取し、画像解析ソフト（Image J, NIH）により葉面積を測定した。葉面積を測定した後、測定した葉を 50℃の乾燥機にて 72 時間乾燥し、乾燥重量を測定した。乾燥重量と画像解析ソフトによる葉面積の検量線より、決定係数が 0.9984 となり、葉乾物重と葉面積との間に高い相関関係がみられた（Fig. 4-2-1）。1 花あたりの乾物重は、総花乾物重から開花数を割った値から算出した。

4) 湛水処理後における野菊の頭花のフラボノイド成分分析

乾燥させた頭花を振動式サンプルミル（TI-100, CMT 社製）で粉碎し、2 mm²のふるいにかけた。各個体の粉末 1 g に 100%メタノール 100 mL を加え、超音波振とう機（DC400, DELTA 社製）により 30 分間振とうさせた。その後 NO.2 フィルター（FILTER PAPER, ADVANTEC 社製）でろ過し、濃縮機（B-491, R-210, BUCHI 社製; B403L, FIRSTEK 社製）により濃縮を行い、メタノールを加え 10 mL に定量した。さ

らに 0.45 μm メンブレンフィルター (XG-IWHA-9909-1304-PK, Bio Tech 社製) でろ過し, 試料溶液とした. Chlorogenic acid (327-97-9, SIGMA 社製), Myricetin (529-44-2, SIGMA 社製), Luteolin (491-70-3, SUNHANK 社製), Quercetin (117-39-5, SIGMA 社製) および Apigenin (520-36-5, SUNHANK 社製) の計 5 種類の標準品を用いた.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) による分析では,

HPLC: 5110 Series (HITACHI 社製)

検出器: 5420 Series (HITACHI 社製)

カラム: 4.6 I.D. \times 250 mm (Inertsil ODS-2, ジーエルサイエンス社製)

カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$

波長: 280 nm, 注入量: 20 μL

流量: 1 mL/min

また移動相 A=10%および移動相 B=80%メタノール (pH : 2.8) とし, HPLC の分析条件は以下に示す :

0–5 min, 0–5% A (v v-1); 5–10 min, 5–20% A (v v-1); 10–15 min, 20–30% A (v v-1); 15–20 min, 30–45% A (v v-1); 20–40 min, 45% A (v v-1); 40–50 min, 45–55% A (v v-1); 50–60 min, 55–90% A (v v-1); 60–65 min, 90–95% A (v v-1); 65–75 min, 95–100% A (v v-1); 75–80 min, 100–0% A (v v-1).

5) 統計処理

頭花, 葉, 茎, 根乾物重, 1 花あたりの乾物重, 根長および葉面積の測定では各処理区 5 個体を統計処理に用いた. 結果は Tukey Test により 5%水準で有意差検定を行った.

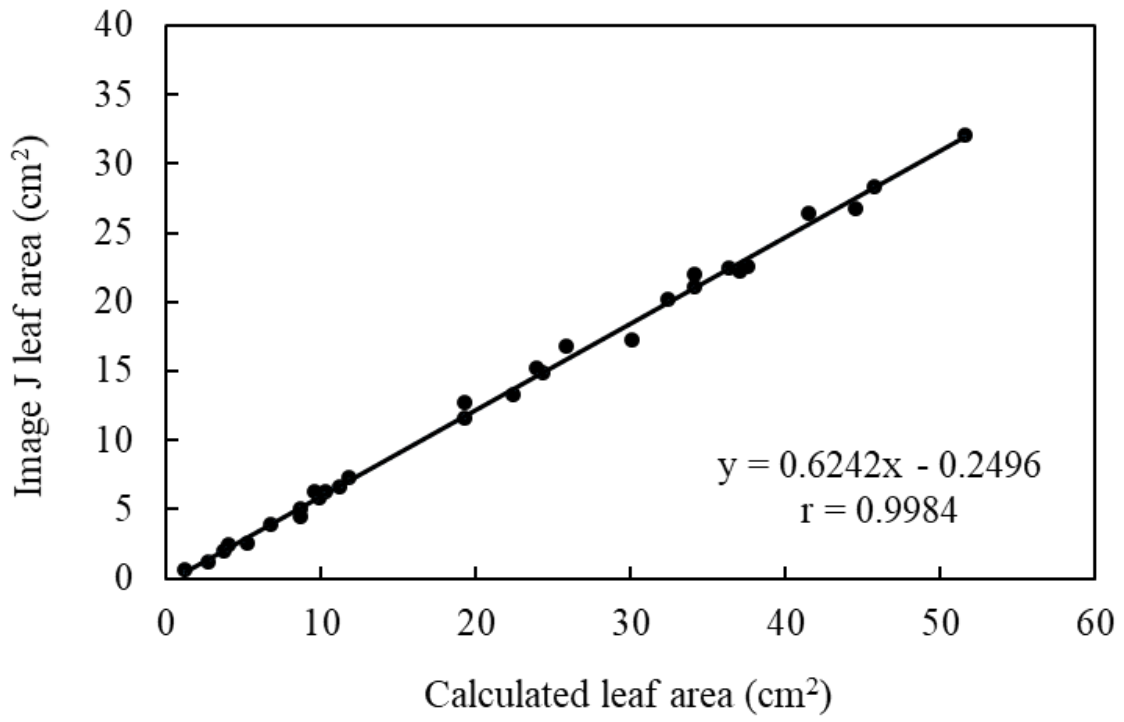


Fig. 4-2-1. The leaf area calibration curve of *C. indicum*.

4.2.3. 結果

1) 湛水処理が野菊の生育に与える影響

対照区の草高は調査開始日に 44.7 cm であり、その後 46.5～50.4 cm の範囲を推移した。ws 1d において初めは 44.6 cm であり、3 月 10 日まで増加傾向にあり 49.5 cm となった。ws 3d は 2 月 10 日から 2 月 17 日の範囲では 40.6 から 46.6 cm まで増加し ws 5d も ws 3d と類似した結果となり、2 月 10 日から 2 月 17 日の範囲では 44.6 から 47.0 cm まで増加した。ws 10d は 2 月 10 日の草高は 41.2 cm あったが、2 月 24 日には 37.6 cm に低下し、それ以降は植物体の枯死により調査を行うことが出来なくなった (Fig. 4-2-2. A)。

対照区の葉数は 2 月 24 日から 3 月 3 日の間に 153 から 295 枚と急激に増加し、その後も緩やかに葉数は増加していった。4 月 21 日には 436 枚となった。ws 1d では 3 月 24 日から 3 月 17 日まで 87 から 270 枚と急激な増加を示し、それ以降も緩やかに増加していき、4 月 21 日には 423 枚となった。ws 3d は 3 月 10 日から 3 月 17 日まで 177 枚から 270 枚へと、急激な葉数の増加がみられたが、3 月 17 日の葉数は ck および ws 1d と比較して少ない傾向にあった。ws 5d の葉数は ck および ws 1d, ws 3d と比較して著しく少ない傾向にあった。4 月 21 日における ws 5d の葉数は 76 枚であった (Fig. 4-2-2. B)。

対照区と ws 1d の茎径は対照区で 4.00～4.81 mm, ws 1d で 3.53～4.73 mm の範囲を推移した。ws 3d は 3.19～4.43 mm を推移し、対照区および ws 1d と比較して茎径が小さい傾向にあった。さらに ws 5d では 2.46～3.56 mm を推移し、これは ws 3d と比較して茎径が小さい傾向を示した。また ws 10d では 2 月 24 日に枯死したことから、2 月 10 日から 2 月 24 日の間は急激に茎径が減少した (Fig. 4-2-2. C)。

SPAD は対照区および ws 1d で類似した傾向があり，2月24日に測定期間中最も高い値を示し，その後緩やかに SPAD 値は減少していった．ws 3d では3月3日に 52.2 と最も高い SPAD 値を示し，その後緩やかに減少し4月21日には 42.7 となった．ws 5d は2月10日から3月3日の間 SPAD 値は 4.8 から 27.2 まで低下した．その後緩やかに SPAD 値は増加し，4月21日の SPAD 値は 38.7 まで回復した．ws 10d の SPAD 値は著しく減少し，44.8 から 17.9 となった (Fig. 4-2-2. D) ．

2) 湛水処理が野菊の乾物生産に与える影響

開花が終了した4月21日時点での葉乾物重は対照区で有意に高く，対照区と ws 3d 間，ws 3d と ws 5d 間に有意差が生じた．茎乾物重では対照区と ws 1d および ws 3d 間に有意差が生じ，対照区で有意に高かった．また ws 5d では有意に低い値を示した．根乾物重は対照区，ws 1d および ws 3d では有意差はなく，ws 5d で有意に低かった．総花乾物重は対照区，ws 1d および ws 3d の各処理区間に有意差が生じ，対照区で最も高い値を示した．また1花あたりの乾物重および根長には各処理区間の有意差はなかった．葉面積では対照区と ws 1d および ws 3d の間に有意差が生じ，対照区で葉面積が最も高い値となった．ws 5d ではその他の処理区と比較して葉面積は有意に低い値となった．

3) 湛水処理が野菊の頭花のフラボノイド成分に与える影響

ws 10d は2月24日に枯死し，ws 5d は開花が認められなかった．対照区，ws 1d および ws 3d の頭花のフラボノイド含量について，Chlorogenic acid および Myricetin では対照区で有意に高い成分含量を示した．また ws 1d と ws 3d の間には有意な差はなかった．Quercetin および Apigenin では対照区および ws 1d と ws 3d の間に有意差が生

じ、ws 3d で有意に低い値を示した。Luteolin では各処理区間に有意差が認められ、対照区、ws 1d、ws 3d の順に成分含量が増加した。

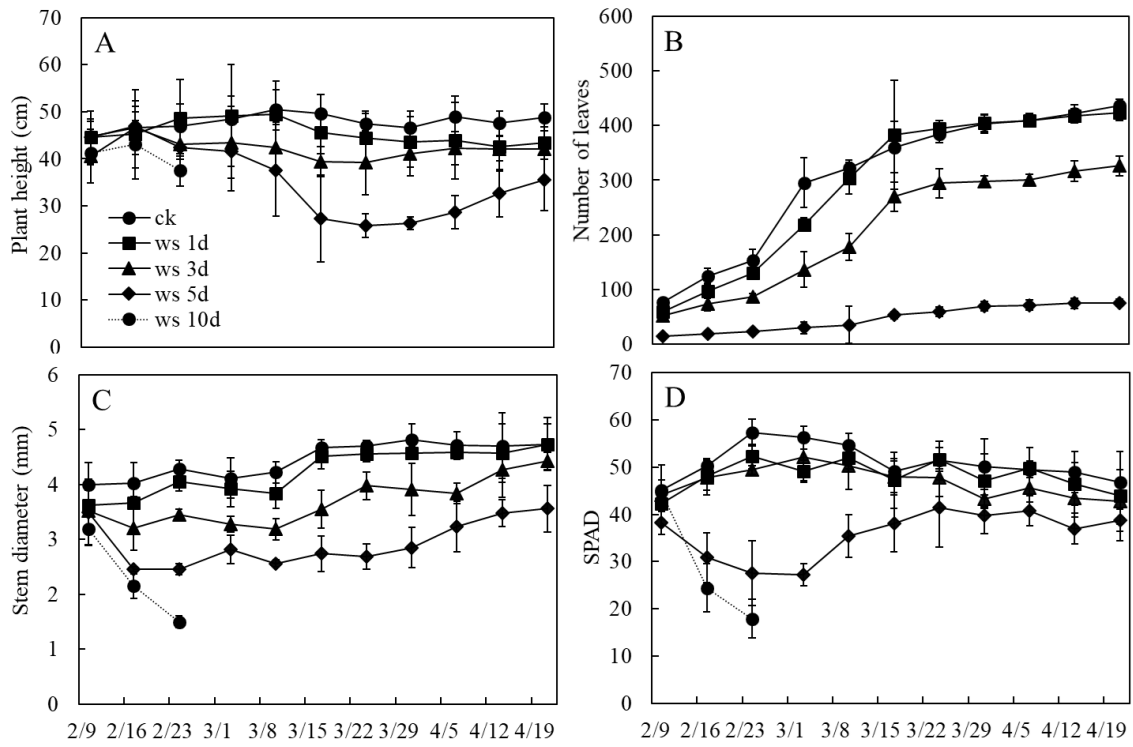


Fig. 4-2-2. Plant height, number of leaves, SPAD and stem diameter after waterlogging.

A) Plant height, B) Number of leaves, C) Stem diameter, D) SPAD.

Table 4-2-1. The effects of waterlogging on dry matter weight and root length.

Treatment	Leaf D.W.	Stem D.W.	Root D.W.	Total flower D.W.	A flower D.W.	Root length	Leaf area
	(g)				(mg)	(cm)	(cm ²)
ck	23.6± 4.45 ^a	17.5± 2.68 ^a	42.8± 7.75 ^a	4.2± 1.36 ^a	21.0± 0.00	54.9± 6.04	8438± 1591 ^a
ws 1d	16.1± 2.60 ^{ab}	10.9± 1.23 ^b	40.2± 11.70 ^a	2.1± 0.91 ^b	17.8± 0.00	52.9± 1.23	5750± 927 ^b
ws 3d	11.8± 2.52 ^b	9.6± 3.12 ^b	28.3± 6.18 ^a	0.9± 0.08 ^c	13.7± 0.00	48.7± 1.66	4223± 900 ^b
ws 5d	6.6± 1.69 ^c	4.1± 1.08 ^c	8.7± 1.77 ^b	-	-	47.4± 6.07	2349± 604 ^c
ws 10d	-	-	-	-	-	-	-

Values are the means of each of the treatment (n =5). Different letters mean significant differences at the 5 % level by the Tukey Test.

D.W. means Dry Weight.

- mean no data.

Table 4-2-2. The effects of waterlogging on flower components.

Treatment	Chlorogenic acid	Myricetin	Quercetin	Luteolin	Apigenin
	(mg g ⁻¹ D.W.)				
ck	26.26 ± 2.10 ^a	55.81 ± 1.16 ^a	2.20 ± 0.08 ^a	4.90 ± 0.19 ^a	0.51 ± 0.02 ^a
ws 1d	16.80 ± 2.69 ^b	40.92 ± 0.94 ^b	1.96 ± 0.08 ^a	4.18 ± 0.17 ^b	0.47 ± 0.01 ^a
ws 3d	20.05 ± 1.87 ^{ab}	39.87 ± 1.79 ^b	1.59 ± 0.08 ^b	3.69 ± 0.08 ^c	0.36 ± 0.03 ^b
ws 5d	-	-	-	-	-
ws 10d	-	-	-	-	-

Values are the means of each of the treatment (n =5). Different letters mean significant differences at the 5 % level by the Tukey Test.

D.W. means Dry Weight.

- mean no data.

4.2.4. 考察

湛水後の生育は草高、葉数、SPAD および茎径において ws 5d および ws 10d で特に減少し、さらに ws 10d は湛水処理後 2 週間の時点で完全に枯死した。ws 3d の葉数は対照区と比べ減少傾向にあるが、SPAD においては同等の結果が得られた。これは古葉から減少したためと考えられる。対照区および ws 1d の葉数は同様に増加傾向にあったが、葉面積は ws 1d で対照区と比較し有意に低い値となった。これは湛水処理により各葉部の葉面積が小さくなったと考えられる。また葉部から花部への養分の転流が減少し、頭花のクロロゲン酸も有意に減少したと示唆された。クロロゲン酸は光合成によって生成されるポリフェノール的一种であり、葉のクロロフィルに密接に関連する成分として知られている (Nakabayashi and Watanabe, 1977)。

また総花乾物重は栄養成長期における湛水期間が長くなるにつれて有意に減少し、ws 5d 以上の処理区では開花せず、湛水処理が開花時期の遅れの原因となったことが示唆された。花の成分含量は Sun ら (2010) と同様な傾向となり、Myricetin, Chlorogenic acid, Luteolin, Quercetin および Apignin の順に成分含量が多くなった。野菊の含有成分は二次代謝産物であり、これらの形成は環境ストレスによって刺激されることで遺伝子の発現量の変異に依存する (Huang and Guo, 2007)。標的酵素に対する遺伝子作用は、二次代謝産物の増加または減少を引き起こす (Ikeda and Omura, 1996)。本研究では、花の乾物重の結果と同様に湛水処理期間長くなるほど花の成分含量が低下した。また頭花のフラボノイド含量は根乾物重の減少により、根から十分な養分吸収が行われなかったと考えられる。

したがって本研究より湛水処理期間が長くなるにつれ、野菊の開花特性および頭花のフラボノイド含量の減少が示された。今後土壌の排水および施肥管理について

さらに研究を行うことで、湛水による回復効果を生育および頭花のフラボノイド含量に基づいて有効性を明らかにする必要がある。

第5章 異なる硝酸アンモニウム濃度が *Bupleurum kaoi* Liu.の生育および含有成分に与える影響

第1節 異なる硝酸アンモニウム濃度が *Bupleurum kaoi* Liu.の生育および乾物生産特性に与える影響

5.1.1. はじめに

Bupleurum kaoi Liu. (*B. kaoi*) は根を生薬として用いられ、近年台湾において台湾固有種である *B. kaoi* が栽培され始めている。また熱帯地域の栽培環境は比較的栄養価に乏しい土壌が分布していることが多く、サイコの利用部位は根であるため、土壌の栄養状態が直接的に成分に影響する。したがって本研究では植物の生育において最も重要な元素である窒素に着目し、*B. kaoi* の栽培において最適な硝酸アンモニウム濃度の解明を行った。

5.1.2. 材料および方法

1) 栽培方法および栽培環境

本研究は台湾屏東科技大学内網室（緯度 22°38'N, 経度 120°36'E）にて行われ、*B. kaoi* の栽培は種子から行った。なお供試した *B. kaoi* は台湾の国家作物種原センターから分与を受けたものである。2018年1月27日に種子を育苗棚にてピートモス、砂（3:1, v v⁻¹）で育苗を開始し、2018年3月27日に畑土、ピートモス、砂（1:1:1, v v⁻¹）の混合土 6.5 kg を充填したプラスチックポット（30(D) × 28 cm(H)）に定植した。灌水は自動灌水システムを利用し、毎日7時および17時の2回に分けて行い、各20分間（300 mL）灌水した。施肥としてホーグランド溶液を週1回500 mL与え、肥料

成分の組成は、2 mM K₂SO₄, 2 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄ · H₂O, 25 μM H₃BO₃, 10 μM MnSO₄ · H₂O, 2 μM ZnSO₄ · 7H₂O, 0.5 μM CuSO₄ · 5H₂O, 0.5 μM H₃MoO₄ および 0.1 mM FeC₆H₅O₇ を基本組成とした。窒素処理は上記の基本組成に加え、硝酸アンモニウム (NH₄NO₃) の濃度を 6 段階 (0, 2, 4, 10, 16 および 20 mM) に設定し、0 mM の NH₄NO₃ を対照区とした。

2) 異なる硝酸アンモニウム濃度が *B. kanoi* の生育および乾物生産特性に与える影響

定植後 2 週に 1 度生育調査を行い、草丈、葉数および SPAD (Model 502, Minolta 社) 値を測定した。SPAD 値は最大展開葉およびその上下位葉を測定し、3 枚の葉の平均値とした。

サンプリングは 2018 年 6 月 19 日 (T1) および 12 月 4 日 (T2) の 2 回に分けて行った。また地上部および地下部に分解し、地下部は総根長を測定後主根およびひげ根に分解した。主根長および最大根径を測定後、分解した部位を 50°C で 72 時間乾燥した。乾燥終了後は地上部乾物重、主根乾物重およびひげ根乾物重を測定した。また T1 および T2 の期間における相対成長率 (relative growth rate: RGR) を算出した。

以下に相対成長率の公式を示す：

$$RGR = (\ln w_{2\text{ root}} - \ln w_{1\text{ root}}) / T2 - T1$$

w_{1 root}, w_{2 root} : T1 および T2 の根乾物重

また地上部乾物重および根乾物重より T/R 比を算出した。以下に公式を示す：

$$T/R \text{ ratio} = \text{Dry Weight of Aerial part} / \text{Dry Weight of root}$$

5.1.4. 結果

1) 異なる硝酸アンモニウム濃度が *B. kaoi* の生育および乾物生産特性に与える影響

草丈は4月24日に各処理区で12~18 cm程度であったが、7月17日には4および10 mMで39.6, 78.5 cmとなった (Fig. 5-1-1. a) . またT1では、10 mM以上の処理区で抽苔がみられ、T2の草丈は10 mM以上の処理区で90 cm以上となった (Fig. 5-1-1. A, Table 5-1-1) . 10, 16および22 mMの処理区における葉数は、T1で25, 26, 31枚、T2で89, 95, 109枚となり、最終調査日まで繁茂が継続されたことを示した (Fig. 5-1-1. b) . また6月5日のSPAD値は、10 mM以上の処理区ですでに45を超える高い値を示した. さらにT2では、10, 16および22 mMで48.2, 49.1, 50.1となり、T1からT2間のSPAD値の増加は緩慢となった (Fig. 5-1-1. c) .

T1およびT2の両期間で地上部乾物重は、4 mM以下の処理区と10 mM以上の処理区間で有意差が認められた (Table 5-1-1) . また地下部乾物重も同様に、両期間において10 mM以上で有意に高い値を示した. これは主根長の結果にも明らかであり、T1およびT2の10 mM以上で有意に長くなった. T1の総根長は4 mM以下の処理区と比較し、10 mM以上で有意に長くなったのに対し、T2では0 mMとその他の処理区との間に有意な差が生じた. T1における根径は、4および10 mMで1.77, 3.61 mmとなり、両処理区間で有意差があった. さらにT2では2および4 mMで5.46, 7.30 mmとなり、両処理区間で有意差があった. T1では4 mM以下および10 mM以上の処理区間で根径に有意な差が生じたのに対し、T2では2 mM以下および4 mM以上の処理区間で有意な差が生じた (Table 5-1-1) . 根の相対成長率はT1およびT2ともに10 mM以上の処理区で有意に増加した. またT/R比はT1において処理区間に有意差

が生じなかったものの，T2では0 mMで最高値を示し，次に10 mMおよび22 mMが有意に高くなった（Table 5-1-1）。

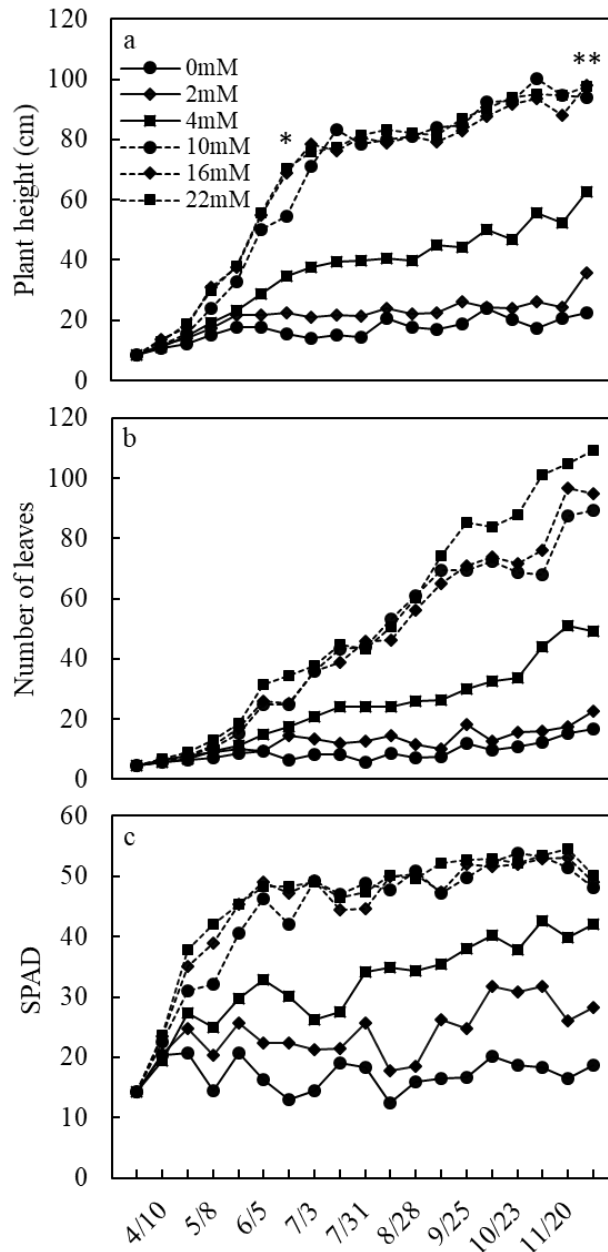


Fig. 5-1-1. Plant height, number of leaves and SPAD value under different nitrogen applied levels.

*: T1, **:T2.

**: a) Plant height, b) Number of leaves, c) SPAD.

Table 5-1-1. Effect of nitrogen levels on root length, maximum root diameter and root dry weight of *B. kanoi*.

Sampling day	Treatment	plant phase	Main root length	Total root length	Maximum root diameter	Dry Weight of Aerial part	Dry Weight of main root	Dry Weight of whole root	RGR of root	T/R ratio
			(cm)	(cm)	(mm)	(g)	(mg)		(mg day ⁻¹)	
T1	0mM	Rossete	2.32 ^c	3.24 ^b	0.96 ^b	0.09 ^b	6.21 ^b	9.03 ^b	0.12 ^b	10.32 ^a
	2mM	Rossete	2.26 ^c	3.64 ^b	1.35 ^b	0.08 ^b	4.65 ^b	8.70 ^b	0.11 ^b	9.73 ^a
	4mM	Rossete	2.58 ^{bc}	5.58 ^b	1.77 ^b	0.19 ^b	11.37 ^b	18.43 ^b	0.24 ^b	10.52 ^a
6/19	10mM	Pinching	5.00 ^a	14.42 ^a	3.61 ^a	0.78 ^a	39.12 ^a	67.83 ^a	0.87 ^a	11.53 ^a
	16mM	Pinching	4.94 ^a	11.54 ^a	3.70 ^a	0.61 ^a	38.55 ^a	58.23 ^a	0.75 ^a	10.42 ^a
	22mM	Pinching	4.70 ^{ab}	11.56 ^a	3.92 ^a	0.74 ^a	40.35 ^{ab}	66.49 ^a	0.85 ^a	11.14 ^a
T2	0mM	Rossete	1.40 ^c	6.45 ^b	0.34 ^c	0.55 ^c	72.51 ^b	23.00 ^c	0.08 ^c	24.06 ^a
	2mM	Pinching	2.45 ^{bc}	12.86 ^a	5.46 ^b	1.32 ^c	145.97 ^b	241.83 ^c	1.34 ^b	5.46 ^c
	4mM	Pinching	2.90 ^b	14.55 ^a	7.30 ^a	2.56 ^{bc}	385.33 ^b	604.78 ^b	3.37 ^b	4.23 ^c
12/4	10mM	Pinching	5.13 ^a	15.58 ^a	10.41 ^a	10.51 ^a	956.10 ^a	1442.32 ^a	7.90 ^a	7.29 ^b
	16mM	Pinching	5.12 ^a	15.51 ^a	11.43 ^a	12.30 ^a	795.42 ^a	1115.48 ^{abc}	6.08 ^a	11.03 ^b
	20mM	Pinching	5.30 ^a	15.52 ^a	12.27 ^a	11.55 ^a	790.43 ^a	1220.38 ^{abc}	6.63 ^a	9.46 ^b

Values represent means ± standard deviation (n=5). Data with different letters are significantly different at P < 0.05.

5.1.5. 考察

本研究において草丈および SPAD は 7 月上旬まで増加傾向にあり、その後収穫時まで高い値を保った。それに対し、葉数は収穫時まで増加傾向にあり、開花後も地上部の繁茂が著しかった (Fig. 5-1-1. c; Table 5-1-1)。1 日当たりの根の乾物重量の増加量は移植後から T1 までよりも T1 から T2 の間で増加傾向にあり、T/R 比は T1 に比べ T2 で減少傾向にあることから、生育前期では地上部の生育が促進されたのに対し、生育後期では地下部の生育が促進されたことが示唆された (Table 5-1-1)。ミシマサイコでは生育後期の窒素欠乏によって節間伸長による抽苔が起こるが、花芽誘導は起こらなかったことが報告されている (南, 1995a)。しかし本研究では全栽培期間において窒素施肥濃度を変化させたため、0 mM では生育初期に地上部の生育不良により抽苔は起こらず、2 mM では抽苔に遅れが出たために、根の生育にも制限がかかったのではないかと考えられる (Table 5-1-1)。以上より、窒素施肥効果は特に生育初期における地上部の生育を促進させ、生育後期では根の乾物重の増加が顕著にみられることが明らかになった。

第2節 異なる硝酸アンモニウム濃度が *Bupleurum kaoi* Liu.の成分含量に与える影響

5.2.1. はじめに

生薬柴胡の根は食欲不振，胃炎，中耳炎，解熱，鎮痛，解毒や抗炎症などの治療のために漢方薬として広く使用されている．前節では土壌へ異なる濃度の硝酸アンモニウム施肥を行い，*B. kaoi*の生育および乾物生産特性について調査を行ったが，*B. kaoi*の品質は根内のサイコサポニン含量が重要となる．したがって本研究では異なる硝酸アンモニウム濃度による *B. kaoi*のサイコサポニン含量を調査し，成分含量より最適な硝酸アンモニウム濃度を解明した．

5.2.2. 材料および方法

1) 異なる硝酸アンモニウム濃度が *B. kaoi*の成分含量に与える影響

T2 に採取し乾燥させた根部を振動式サンプルミル (TI-100, CMT 社) で粉碎し，2 mm²のふるいにかけた．各個体の乾燥根の粉末 1 g にメタノールおよび純水混合液 (1:1) 100 mL を加え，超音波振とう機 (DC400, DELTA 社) により 30 分間振とうさせた．その後 NO.2 フィルター (FILTER PAPER, ADVANTEC 社) でろ過し，濃縮機 (B-491, R-210, BUCHI 社; B403L, FIRSTEK 社) により濃縮を行い，メタノールを加え 10 mL に定量し，遠心分離機 (Z323K, HERMLE 社) で遠心分離し，上澄み液を分取した．さらに 0.45 μm メンブレンフィルター (XG-IWHA-9909-1304-PK, Bio Tech 社) でろ過し，試料溶液とした．サイコサポニンは SSa (HS-0257, SUNHANK 社)，SSb1 (HS-0260, SUNHANK 社)，SSb2 (HS-0261, SUNHANK 社)，SSc (HS-

0258, SUNHANK 社) および SSd (HS-0259, SUNHANK 社) の計 5 種類の標準品を用い、HPLC (High Performance Liquid Chromatography) により以下の分析条件で行った。

HPLC: 5110 Series (HITACHI 社)

検出器: 5420 Series (HITACHI 社)

カラム: 4.6 I.D.×250 mm (Inertsil ODS-2, ジーエルサイエンス社)

カラム温度: 40℃

波長: 210 nm

移動相: 移動相 A=10% および移動相 B=80% アセトニトリル (pH : 2.8)

グラジエント条件: 0分(A : B = 100 : 0)→5.0分(90 : 10)→10分(80 : 20)→20分(75 : 25)
→30分(70 : 30)→40分(70 : 30)→55分(65 : 35)→86分(65 : 35)→110分(60 : 40)→130
分(55 : 45)→140分(50 : 50)→145分(30 : 70)→150分(0 : 100)→160分(100 : 0)

注入量: 流速: 1 mL/min

なお、各 SS は 5 点検量線を作成し、各試料における定量分析を行った。

5.2.3. 結果

1) 異なる硝酸アンモニウム濃度が *B. kaoi* の成分含量に与える影響

HPLC による定量分析において各サイコサポニンにおけるピーク時間は SSa ; 77.0, SSb1 ; 106.3, SSb2 ; 84.7, SSc ; 50.9, SSd ; 128.4 分となった (Fig. 5-2-1) . 各成分における検量線の決定係数は 0.99 以上となり、高い相関関係が得られた (Table 5-2-1) .

定量分析より、10 mM 区における SSb1, SSb2, SSc 含量は、0.28, 0.27, 2.30 mg g⁻¹ であり、4 mM 以下の処理区と 10 mM 以上の処理区間に有意な差があった (Table 5-2-2) . SSb1, SSb2 および SSc のマイナーサポニンにおいては 10 mM で成分含量の

飽和点を示した。また SSa および SSd では 10 mM で 3.59, 3.24 mg g⁻¹, 16 mM で 5.01, 6.37 mg g⁻¹ となり, 両処理区間に有意な差が認められ, SSa および SSd では 16 mM で成分含量の飽和点を示した。しかし総サイコサポニン含量では 10 mM で成分含量の飽和点を示した。

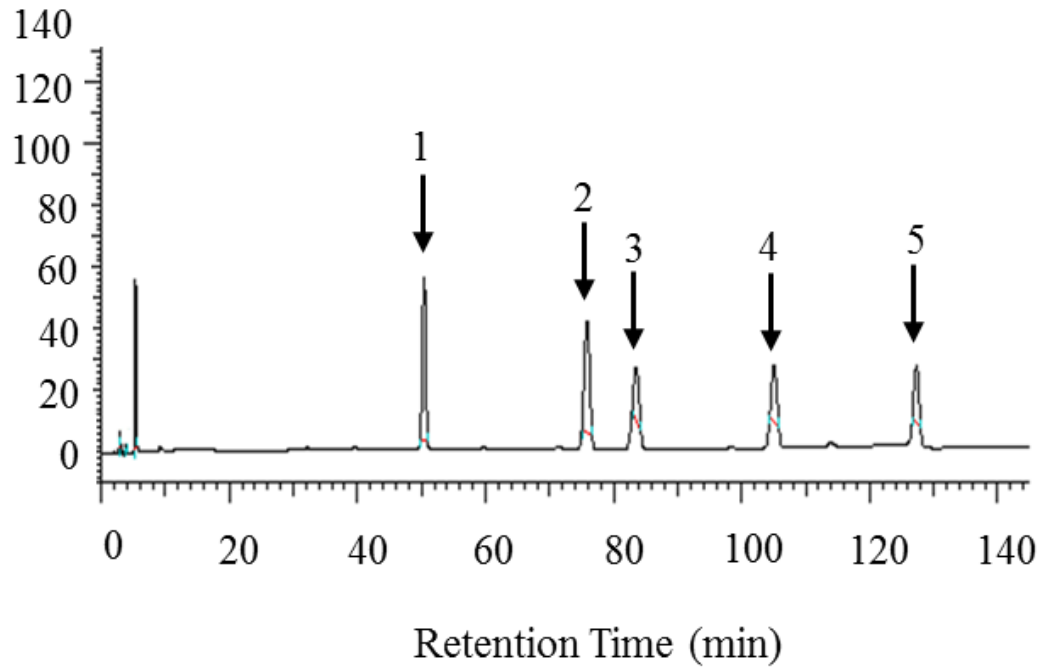


Fig. 5-2-1. HPLC chromatograms in SSa, b1, b2, c and d standard solution.

1:SSc, 2:SSa, 3:SSb2, 4:SSb1, 5:SSd.

Table 5-2-1. Calibration curve of five Saikosaponins.

Standard	Equations	R^2
SSa	$y=0.0007x+147.18$	0.9912
SSb1	$y=0.0007x+37.53$	0.9945
SSb2	$y=0.0011x-29.12$	0.9969
SSc	$y=0.001x-39.61$	0.9977
SSd	$y=0.0005x+40.309$	0.9957

Table 5-2-2. HPLC chromatograms in all parts of *B. kanoi* under different nitrogen supply levels.

Root	SSa	SSb1	SSb2	SSc	SSd	Total SS
	(mg g ⁻¹)					
0mM	2.12 ^e	0.14 ^d	0.21 ^{ab}	0.77 ^c	1.80 ^d	5.04 ^c
2mM	2.75 ^c	0.08 ^e	0.13 ^c	0.26 ^c	2.19 ^c	5.40 ^c
4mM	2.67 ^d	0.15 ^{cd}	0.16 ^{bc}	1.37 ^b	2.28 ^c	6.63 ^b
10mM	3.59 ^b	0.28 ^a	0.27 ^a	2.30 ^a	3.24 ^b	9.68 ^a
16mM	5.01 ^a	0.17 ^{bc}	0.21 ^{ab}	2.35 ^a	6.37 ^a	14.10 ^a
22mM	5.38 ^a	0.18 ^b	0.25 ^a	2.27 ^a	6.30 ^a	14.38 ^a

The results of Tukey test are indicated different letters where values differ significantly at P<0.05.

5.2.4. 考察

サイコサポニン含量は、サイコの品質を決定するための最も重要な要素の1つである (Zhu *et al.*, 2006) . サポニン含量は春と秋には低く、気温が高い夏季にピークに達することが報告されている (Howarth, 1988) . またサポニン構成に関与する主要サポゲニンにおいて、気温が 30°C以上となるときに、最も含量が高くなると報告された (Pecetti *et al.*, 2006) . 温帯地域では9月以降に気温の低下がみられるため、ミシマサイコでは8月からサイコサポニン含量の低下がみられる (南ら, 1995b) . また温帯地域では数年に渡って栽培されることがあり、栽培期間が長いほど高含量のサイコサポニンが得られることが報告されている (伊達ら, 2016) . 本研究では温帯で2~3年栽培されるものと同等のサイコサポニン含量が得られた. 16 mM以上の硝酸アンモニウム濃度において主要とされる SSa および SSd 含量の有意な増加がみられたものの、10 mM以上でマイナーサポニンである SSb1, SSb2 および SSc が有意に増加したことより、総サイコサポニン含量は 10 mM以上で飽和点を示した. これより本実験において 10 mM以上となる硝酸アンモニウム濃度が最適であることが示唆された. また、これまで温帯地域でのサイコ栽培が中心であったが、熱帯地域では9月以降も気温が高いことから、高含量のサイコサポニンを得られたのではないかと考えられる. しかしサイコサポニン含量は生育条件、収穫時期、施肥方法および種など多くの要因が含まれるため、今後検討する必要性がある.

第6章 総合考察

本研究では台湾における生薬栽培方法の確立のため、野生種の採取、窒素施肥管理および環境ストレスの応答について、生育特性、乾物生産特性および成分含量を調査した。本研究は熱帯地域に属する台湾南部にて行ったが、熱帯地域における上記のような研究報告は少ない。試験期間である2018～2020年の気温および降水量のデータを Fig. 6-1 に示した。平均気温は年間を通して20℃以上で、降水量は夏場に1000 mm 近く、熱帯地域特有の気候を示した。また台風は2018および2019年において各1個ずつ台湾本島へ上陸しており、8月の降水量が最も増加していることを裏付けた（中華民国統計资讯网，2019）。

熱帯地域は植物種の多様性が高く、植物資源を確保する上で極めて重要な地域である。熱帯地域に生息する植物種の中には新規薬用素材として利用可能な潜在的な価値を持った未利用植物が未だ多く存在する（杉村，2013）。台湾では潜在的な生薬の原料として野生種キクカに野菊、新竹油菊、阿里山油菊および森氏油菊等が存在する。本研究より野菊、杭菊および新竹油菊では、熱帯地域における栽培環境で類似した生育特性を示し、開花直前まで葉の繁茂が継続した。これは自生地の異なるキクカを、年間を通して気温が20℃前後である熱帯地域で栽培することで、葉が枯死することなく繁茂が継続されたことによることが示唆された。また阿里山油菊および森氏油菊では、自生地で生育したものに比べ草高が高い傾向を示した。これは阿里山油菊および森氏油菊の自生地が高海拔であり、葉裏の毛じ密度が高く、熱帯低海拔地における紫外線および強日射から未展開葉を保護する機能が働いたためと考えられる（住友ら，2006; Kitamura, 1943; Peng *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2008）。よって本研究において生育に関する自生地の海拔の違いは、負の影響を及ぼさなかった。

さらに乾物生産特性は葉および茎乾物重で野菊、杭菊および新竹油菊が有意に高くなったが、根乾物重は新竹油菊で有意に低い値を示した。これら3種は自生地が同じ低海拔地に存在するものの、地下部の乾物生産においては異なる反応を示した。新竹油菊は阿里山油菊と遺伝分類的に類似していることが報告されており、乾物生産特性は自生地の影響も受けるが、遺伝的な影響を大きく受けることが推測された (Kitamura, 1943)。また野菊は栽培キクの起源となる野生種の一つで杭菊と遺伝分類的に類似していることが報告されており、乾物生産特性は強く遺伝分類的影響を受けることが示唆された (Kitamura, 1948; Dai and Chen, 1997; Fukai, 2002)。開花特性については、阿里山油菊で花の直径がこれまでの自生地による調査報告に比べ小さくなる傾向を示した (Hayata, 1919)。阿里山油菊は頭花の5種フラボノイド含量においても低い傾向を示した。これは自生地と栽培を行った台湾南部との気温差に起因すると考えられる (交通部中央気象局, 2019)。しかし阿里山油菊と遺伝的に類似している新竹油菊では熱帯地域での栽培においても開花数、花の直径および頭花の5種フラボノイド含量において減少はみられず、熱帯低海拔地域での栽培化の可能性が高いことが示唆された (Kitamura, 1943; Huang, 2016)。また新竹油菊は絶滅危惧種として挙げられており、今後種保存や新生薬原料として熱帯低海拔地での栽培化が期待できる。日本薬局方ではキクカの主要成分として Luteolin が収載されている。本研究の結果より 1 g および 1 植物体あたりの頭花の Luteolin 含量は野菊で他種に比べ有意に高い値を示した。このことから熱帯低海拔地における野生種野菊の栽培化は生育、乾物生産特性および頭花のフラボノイド含量の知見から可能であることが示唆された。また現在主に中国から輸入されている杭菊に代替して熱帯地域の新生薬原料として野菊の栽培化が期待できる。

薬用キク属は乾燥物を漢方原料として使用されるが、生薬製法の重要工程である乾燥処理温度の違いにより品質が左右されることがある。本研究では 70℃区で最も早く含水率 10%以下となったが、5種のフラボノイド含量では最も低い値となった。また野菊の Luteoin 含量は 50℃での乾燥において有意に高い値となり、30および70℃に比べ約 2 倍となった。これまでの研究より、他生薬において 60 および 100℃の乾燥温度では、外環や内部形態を変化させ、含有成分が分解されたことが報告されている（吉川ら、1993）。キクカの頭花採取後の乾燥製法では、50℃で高品質な生薬原料として使用されることが可能となる。

熱帯地域でキクカ、特に野菊を栽培するにあたり窒素は最も重要な元素である。よって野菊の栽培化の確立を行うため、施肥濃度を変化させ最適な硝酸アンモニウム濃度の解明を行った。キクは窒素要求量の高い植物であり、開花前後で最も高まる（Lunt and Kofranek, 1958）。本研究の結果より硝酸アンモニウム濃度 10 mM で生育およびガス交換速度が飽和したことを示した。またこれは現在キク栽培において基準とされている施肥量と比較すると、本研究の 10 mM の量と一致した（農林水産省、1999）。ガス交換速度が 10 mM 以上で飽和したことより、クロロフィル含量においても同様な結果が得られ、10 mM 以上でクロロフィル a, b および a+b 含量が有意に増加した。一般的に植物は茎葉部に蓄積された窒素を開花時に花部へ転流を行うことが報告されている（Woodson *et al.*, 1984）。また乾物生産は葉柄、茎および根乾物重において 10 mM 以上で飽和し、20 mM の硝酸アンモニウム濃度において窒素過多は生じず正常に生育した。これは熱帯地域の比較的肥沃度の乏しい土壌が起因しており、本研究においても 20 mM で生育および乾物生産に減少はみられなかった（Baligar and Bennett, 1986）。しかし土壌および地下水環境への窒素負荷量など環境

汚染が問題視されるため、本研究では 10 mM の硝酸アンモニウム濃度が野菊の最適な施肥管理方法として期待できる。

葉面への窒素散布は少量で即効性があり、開花前後の窒素要求量の高い時期に土壌への窒素施肥量の補填を行い、開花特性および頭花のフラボノイド含量増加において効果的であると考えられる。本研究の結果より硝酸アンモニウムの葉面散布 (NF) 8 mM で開花数、総花乾物重および 1 花あたりの乾物重が有意に増加した。また 1 植物体あたりの頭花のフラボノイド含量においても NF 8 mM で有意に増加し、硝酸アンモニウムの葉面散布では NF 8 mM 以上の濃度が最適であることが示唆された。葉面へ散布された窒素は、葉肉細胞を經由し細胞内へ取り込まれ、光合成産物である糖類と一緒に各組織へ転流され、二次代謝物の合成に使用される (Oosterhuis, 2009)。葉面散布により吸収された窒素は主にアミノ酸代謝や二次代謝物生成に使用されるが、根からの窒素吸収ではアミノ酸生成・貯蓄および葉への転流に使用され、根と葉における窒素代謝が異なることが報告されている (鳥山・松元, 1986)。したがって土壌へ 10 mM の硝酸アンモニウム施肥を行い、開花前後における 8 mM の硝酸アンモニウムの葉面散布は、頭花の高収量かつ高品質な生薬原料の生産が期待できる。

熱帯地域では頻発する湛水被害が農作物の生産減少に大きく影響を及ぼす。特に台湾南部では夏場に発生する台風の湛水被害が深刻であり、野菊の栄養成長期に相当する。また湛水被害は、特に窒素肥料の損失であるアンモニアの浸出、流出および揮発性損失を引き起こすことが報告されている (杉原, 2012)。本研究の結果より DO 値が 5.0 mg L^{-1} 以下で、野菊の生育、光合成および乾物生産特性に負の影響を及ぼすことが示唆された。ws 5d の葉、茎および根乾物重、葉面積は ck の 3 分の 1 以下となった。また ws 5d では収穫まで開花は観測されず、ws 10d は湛水処理直後に枯死

した。植物が長期的な土壌の過湿状態に適応するためには、比較的酸素濃度が高く維持される地表面付近に新たに根系を構成するか、大気と接する茎葉部から根端部へと酸素を供給することが不可欠となる。植物は酸素輸送を能動的に制御する機構をもたないため、呼吸に必要な酸素の茎葉部から根端部への輸送は拡散に依存するしかない (Armstrong and Armstrong, 2014)。したがって、まず茎葉部からの酸素輸送が途絶え根腐れが生じ、その後 ws 10 d では茎葉部の枯死が観察されたと推測された。また頭花のフラボノイド含量も同様に、湛水期間が長期化するにしたがって成分含量の減少が見られた。今後湛水被害における収量および品質低下を軽減させるため、湛水により根からの養分吸収が制御された際、葉面への窒素散布により生育の回復を図ることができる可能性がある。また湛水処理後の回復効果について生育調査や成分の定量分析から評価を行う必要性がある。

熱帯地域の肥沃度の乏しい土壌において生薬栽培を行う上で、施肥管理は重要な栽培指針の一つである。さらにサイコは根を生薬原料とし、土壌の栄養状態が直接的に根の生育および成分含量に影響する (高谷, 1985; Zhu *et al.*, 2007)。本研究の結果より主根長は 10 mM 以上の処理区に比べ、4 mM 以下の処理区では半分以下となり、主根およびひげ根乾物重は 10 mM 以上の処理区がその他の処理区と比較して約 2 倍以上の乾物重となった。*B. kanoi* の薬効成分には SSa, b1, b2, c および d があり、SSb1 および SSb2 はマイナーサポニンとして近年注目されている成分である。サイコは温帯地域で数年に渡り栽培を行い収穫を行う。栽培期間が長くなるほどサイコサポニン含量が増加することが報告されている (伊達ら, 2016)。しかしサポニン構成に関与する主要サポゲニン気温が 30°C 以上となる時に最も含量が高くなることが知られており、熱帯地域でのサイコ栽培の可能性が示唆された (Pecetti *et al.*, 2006)。SSa および d は 16 mM 以上で有意に高い成分含量を示し、SSb1, b2 および

cは10 mM以上で成分含量が増加傾向にあった。したがって熱帯地域におけるサイコ栽培では、乾物生産特性およびサイコサポニン含量から10 mMの硝酸アンモニウム濃度が最適であることが示唆された。また本研究ではこれまで報告が少なかった、HPLCによる5種サイコサポニンの一斉分析技術を確立させた。さらにこれまでの研究報告ではキクカおよびサイコの薬効成分分析において特定の成分含量の調査のみであったが、本研究ではフラボンやマイナーサポニンの成分含量を網羅的に解析した。

熱帯地域の安定かつ高品質な生薬生産は不可欠な課題となるだろう。本研究では台湾の生薬栽培における種の選抜、施肥管理および環境ストレス応答を明らかにした。得られた知見では、これまで野生種採取および温帯地域で行われていた生薬栽培について台湾南部の栽培方法の指標を示したことから、今後他の熱帯地域における生薬栽培に貢献する情報を提供できる可能性がある。日本は漢方原料の輸入を主に中国から行っていたが、近年の中国における物価上昇および生薬資源枯渇が懸念されるため、栽培地域の拡大および移行の必要があると考えられる。熱帯地域での生薬栽培技術は、これまでプランテーション農業や稲作中心に行っていた東南アジアの農業の発展に応用できると思われる。また高品質で付加価値の高い生薬は、熱帯地域の発展途上国における第一次産業の活性化および農家の貧困率の低下の鍵になるかもしれない。本研究は熱帯地域の生薬栽培の基盤となり、応用研究における根源的な問いに助力できると考えられる。さらに、今後環境ストレス後の回復に向けた施肥管理やストレス耐性を持つ種の選抜も視野に入れ研究を行っていきたいと考える。

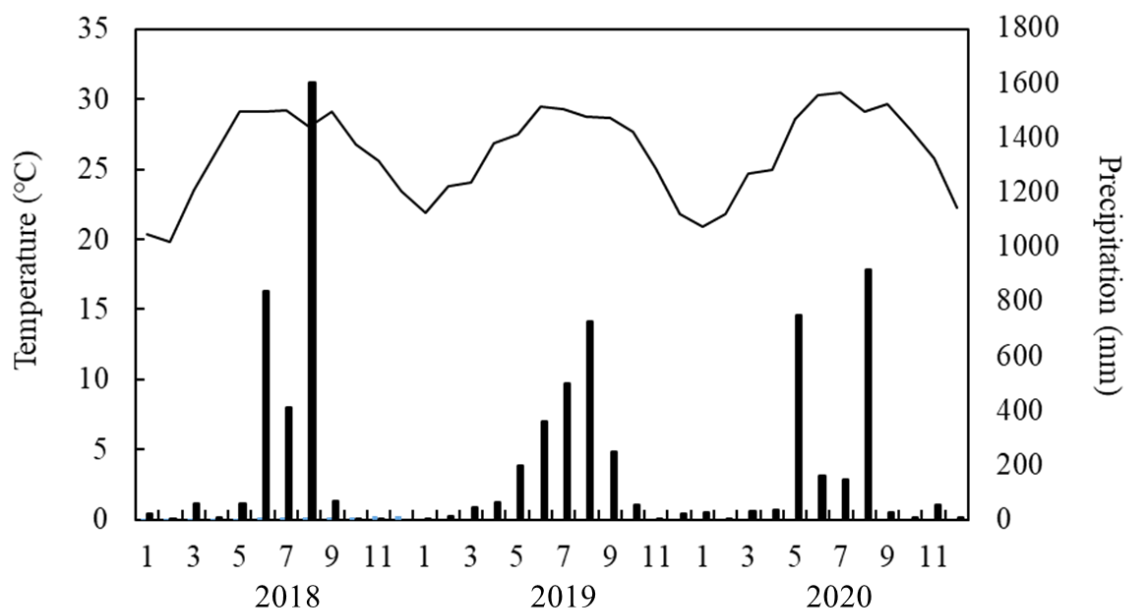


Fig. 6-1. Temperature and precipitation in southeastern Taiwan.

出典：中華民國統計資訊網

引用文献

- Armstrong, W. and J. Armstrong 2014. Plant Internal Oxygen Transport (Diffusion and Convection) and Measuring and Modelling Oxygen Gradients. In. *Low-Oxygen Stress in Plants* (Berlin) pp. 267-297.
- Armstrong, W. and M. C. Drew 2002. Root Growth and Metabolism under Oxygen Deficiency. In *Plant Roots*. 3: 1139-1187.
- Bailey-Serres, J. and L. A. C. J. Voesenek 2008. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 313-339.
- Baligar, V. C., and O. L. Bennett 1986. Outlook on fertilizer use efficiency in the tropics. *Fertilizer Res.* 10: 83-96.
- Boru, G., M. V. Ginkel, W. Kronstad, and L. Boersma 2001. Expression and Inheritance of Tolerance to Waterlogging Stress in Wheat. *Euphytica*. 117: 91-98.
- Bremer, K., and C. J. Humphries 1993. The generic monograph of the Asteraceae–Anthemideae. *Bulletin of the British Museum (Natural History). Botany* 23: 71-177.
- BSI 生物科学研究所 2013. 葉面散布と葉による養分吸収. [Online] http://bsikagaku.jp/f-knowledge/knowledge36.pdf?fbclid=IwAR086bKJkOog9uJ3B-u1015y6D9Or6XW_jR0ZJng1J1XHgdauDqRyc620zM (browsed on August 15, 2020)
- Capecka, E., A. Mareczek and M. Leja 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food chemistry* 93: 223-226.
- 中華民國統計資訊網 2019. 氣象統計. [Online] <https://www.stat.gov.tw/ct.asp?xItem=15263&CtNode=3597&mp=4> (browsed on December 16, 2020)
- Cornelious, B., P. Chen, Y. Chen, L. N. De, J. G. Shannon, and D. Wang 2005. Identification of QTLs Underlying Water-logging Tolerance in Soybean. *Mol. Breed.* 16: 103-112.

- Dai, S. L., J. Y. Chen 1997. Cladistic study on some *Chrysanthemum* spp. J. Wuhan Bot. Res. 15: 27-34.
- 伊達英代・中島安基江・平本春絵・井原紗弥香, 新井清・高尾信一・甲村浩之 2016. 日本薬局方「サイコ」の5種サイコサポニン含量の実態調査. 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告 24: 27-31.
- Dorajeerao, A. V. D., A. N. Mokashi, V. S. Patil, C. K. Venugopal, S. Lingaraju, and R. V. Koti 2012. Effect of graded levels of nitrogen and phosphorus on growth and yield of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.). Karnataka J. Agric. Sci. 25: 224-228.
- Fukai, S. 2002. Dendranthema species as chrysanthemum genetic resources. Acta. Horticulturae 620: 223-230.
- Guo, Y., T. Matsumoto, Y. Kikuchi, T. Ikejima, B. Wang, and H. Yamada 2000. Effects of a pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. on interleukin 6 production of murine B cells and B cell lines. Immunopharmacology 49: 307-316.
- 原島広至 2017. 生薬単. 丸善雄松堂 (東京) pp. 68-69.
- Hayata, B. 1919. Chrysanthemum LINN. Icon. Pl. Formos. 8: 61-62.
- 何瑞益・李光敦・黄琇蔓・李清勝 2017. 結合系集降雨預報之淺層崩塌預警模式. 農業工程學報 63: 79-95.
- Hou, F. 2013. Hangju Cultivation and Management. [Online]
<http://www.mdais.gov.tw/ws.php?id=4770> (browsed on 2nd April, 2020)
- Howarth, R. E. 1988. Antiquality factors and nonnutritive chemical components. NWISRL (Southampton) pp. 493-514.

- Hsiao, S. C., H. Chen, H. L. Wu, W. B. Chen, C. H. Chang, W. D. Guo, and L. Y. Lin 2020. Numerical simulation of large wave heights from super typhoon nepartak (2016) in the eastern waters of taiwan. *J. Marine Sci. Engineer.* 8: 210-217.
- Huang, L. Q. and L. P. Guo 2007. Secondary Metabolites Accumulating and Geoherb Formation under Enviromental Stress. *China J. Chinese Materia Medica.* 32: 277-280.
- Huang, M. H. 2016. Taxonomic Study of *Dendranthema* (Compositae) in Taiwan. *Academic Bulletin of the National Pingtung University of Science and Technology.* (Pingtung) pp. 1-119.
- Ikeda, H. and S. Omura 1996. Production of Useful Substances by Functional Modification of Microbial Secondary Metabolite Biosynthesis. *Biosci. Biotech. Bioch.* 34: 761-771.
- Iwatsuki, K., Y. Takasi, E. B. David, and O. Hideaki 1997. *Flora of Japan. III. Angiospermae Dicotyledoneae Sympetalae (b).* Kodansha Ltd., Tokyo. Sneath, P. H. A., and R. R. Sokal (1962) *Numerical Taxonomy.* *Nature* 193: 855-860.
- 景山詳弘・林孝洋・小西国義 1987. 窒素濃度がキクの初期生育に及ぼす影響. *園芸学会雑誌* 56: 79-85.
- 兼子まや・塚越覚・藤瀬茜・池上文雄 2013. ロックウール耕における培養液濃度がミシマサイコ (*Bupleurum falcatum* L.) の生育, サイコサポニン濃度と無機成分濃度に及ぼす影響. *植物環境工学* 25: 83-89.
- Katakura, M., T. Kimura, and I. Endo 1991. Production of saikosaponins by tissue culture of *Bupleurum falcatum* L. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 7: 97-100.
- 川越宏文・盛岡頼子・久米由美・佐藤弘・代田文彦・田中朱美 2000. わが国の全国医学部における東洋医学教育の実態調査. *医学教育* 31: 55-59.
- 經濟部國際貿易局 2018. 進出口貿易統計・菊花乾燥. [Online]
<https://cus93.trade.gov.tw/FSC3210F/FSC3210S> (browsed on August 20, 2020)
- Kita, T., T. Hata, E. Itoh, and R. Yoneda 1980. Analgesic and other

- pharmacologic actions of saiko-saponin in repeated cold stressed (SART stressed) animals. J. Pharmacokinet. Pharmacodyn. 3: 269-280.
- 北川勲・吉川雅之 1992. 漢方薬その医薬学的研究の最先端. 代謝第 29 卷臨時増刊号. 奥田拓道・木村正康・宮本昭正・和田博編. 中山書店（東京） pp. 68-98.
- Kitamura, S. 1943. Supplementa et Emendanda ad Compositas Japonicas I. Acta Phytotax. Geobot 12: 99-106.
- Kitamura, S. 1948. Chrysanthemum. Encyclopedia Hortic. 25: 17-29.
- 北村四郎 1983. 日本の野生ギク. 新花卉 119: 54-59.
- 交通部中央気象局 2019. 最新天気. [Online]
- https://www.cwb.gov.tw/V8/C/W/OBS_Map.html (browsed on February 10, 2021)
- Kumar, P., M. Pal, R. Joshi, and R. K. Sairam 2013. Yield, Growth and Physiological Responses of Mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] Genotypes to Waterlogging at Vegetative Stage. Physiol. Mol. Biol. Plants. 19: 209-220.
- Li, H., R. Vaillancourt, N. J. Mendham, and M. Zhou 2008. Comparative Mapping of Quantitative Trait Loci Associated with Waterlogging Tolerance in Barley (*Hordeum vulgare* L.). B. M. C. Genom. 9: 401.
- Lim, S. H., S. K. Jung, S. Byun, E. J. Lee, J. A. Hwang, S. G. Seo, and H. J. Lee 2013. Luteolin suppresses UVB-induced photoageing by targeting JNK1 and p90RSK2. J. Cell. Mol. Med. 17: 672-680.
- 林学詩 2007. 蔬菜農業氣象災害與因應策略. 作物,環境與生物資訊 4: 23-34.
- Lin, Y., R. Shi, X. Wang, and H. M. Shen 2008. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. Curr. Cancer Drug Targets 8: 634-646.
- Liu, S. Y. 2006. GAP cultivation model and quality evaluation of *Bupleurum* spp. China. Med. Pharmacy 24: 395-414.

- Liu, W., D. W. Zhu, D. H. Liu, M. J. Geng, W. B. Zhou, W. J. Mi, and D. Hamilton 2010. Influence of nitrogen on the primary and secondary metabolism and synthesis of flavonoids in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. J. Plant Nutri. 33: 240-254.
- Lunt, O. R., and A. M. Kofranek 1958. Nitrogen and potassium nutrition of chrysanthemums. Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci. 72: 487-497.
- Ma, L. B., Y. Z. Jin, G. Z. Tu, H. S. Luo, Y. Y. Zhao, C. F. Hu, and Y. Q. Tang 1996. The structure study of a new saikosaponin. Acta. Chem. Sin. 54: 1200-1208.
- 御影雅幸・木村正幸 2013. 『伝統医薬学・生薬学』南江堂（東京）pp. 106-110.
- 南基泰 1995a. 繁用生薬ミシマサイコの発育生理. 根の研究 4: 52-55.
- 南基泰・杉野守・定岡麻衣子・芦田馨・尾垣光治 1995b. ミシマサイコ(*Bupleurum falcatum*)の生育量及び Saikosaponin 類の含有率の季節推移. 薬学雑誌 115: 145-155.
- Morinaga, O., S. Zhu, H. Tanaka, and Y. Shoyama 2006. Visual detection of saikosaponins by on-membrane immunoassay and estimation of traditional Chinese medicines containing *Bupleuri radix*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 346: 687-692.
- Nakabayashi, T. and C. Watanabe 1977. Chemical Studies on the Quality of Coffee Part IV. Formation of Brown Pigments from Chlorogenic Acid by Roast. Food Sci. Technol. Res. 3: 124-129.
- Nakamura, K. 2018. Soil Physical Properties. [Online] soilphysics.com/downloads/pdf/138053.pdf (browsed on 22nd Jan, 2020)
- 中野明正・中野有加・野上雅弘 2003. こんな根どうだ根. 根の研究 12: 15-18.
- 中野道治・谷口研至・草場信 2018. キク属遺伝資源の多様性とキクタニギクモデル系統の開発. 農業および園芸 93: 582-587.
- 中野道治・増田優・谷口研至・草場信 2019. キク属モデル系統の開発と植物多様性研究への展開. 植物科学最前線 10: 148-157.

- 中野進 2019. マダラテントウ族 (*Epilachnini*) の食草, 分布, 生態について 1. 中国, 台湾, 韓国のマダラテントウ. 人間環境学研究, 17: 129-181.
- 日本漢方生薬製剤協会 2019. 漢方薬の国内需要動向と中国の状況. [Online]
<https://www.maff.go.jp/j/seisan/tokusan/yakuyou/attach/pdf/190130sinnpojiumu-13.pdf>
(browsed on February 10, 2021)
- 西田清一郎・佐藤広康 2008. 漢方薬の循環器系への作用: 基礎薬理と臨床応用. 日本薬理学雑誌 132: 280-284.
- 農林水産省 1999. 主要作物の施肥基準 : 花き. [Online]
https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen_type/h_sehi_kizyun/miy01.html (browsed on August 22, 2020)
- Oberprieler, C., R. Vogt, and L.E. Watson. 2006. The Families and Genera of Vascular Plants VIII. Flowering plants. pp. 342-374.
- 小野寺政行・板垣英祐・古館明洋・木谷祐也・日笠裕治 2014. 移植タマネギにおける葉面散布およびポット内施肥を用いたリン酸減肥技術. 日本土壤肥料学雑誌 85: 245-249.
- Oosterhuis, D. 2009. Foliar fertilization: mechanisms and magnitude of nutrient uptake. Fluid Fertilizer Foundation 2: 15-17.
- Pan, S. L. 2006. *Bupleurum* species: scientific evaluation and clinical applications. CRC Press (UK) pp. 210-223.
- Pecetti, L., A. Tava, M. Romani, M. G. D. Benedetto, and P. Corsi 2006. Variety and environment effects on the dynamics of saponins in lucerne (*Medicago sativa* L.). Eur. J. Agron. 25: 187-192.
- Peng, C. I., H. L. Li, and K. F. Chung 1998. Flora of Taiwan, Second edition Vol. 4, National Science Council of Republic of China, Editorial Committee of the Flora of Taiwan. Epoch publishing, Taipei. pp. 1224-1227.

- Pistelli, L., A. Bertoli, A. R. Bilia, and I. Morelli 1996. Minor constituents from *Bupleurum fruticosum* roots. *Phytochemistry* 41: 1579-1582.
- Porra, R. J. 1989. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Res.* 73: 149-156.
- Sánchez, S. C., A. M. Dáz-Lanza, and M. Bernabé 2000. Four New Triterpenoid Saponins from the Roots of *Bupleurum rigidum*. *J. Nat. Prod.* 63: 1479-1482.
- Shih, C., and G. X. Fu 1983. Angiospermae, Dicotyledoneae, Compositae (3) Anthemideae, Angiospermae. *Flora Republicae Popularis Sinicae*, 76: 15-22.
- Sparks, J. P. 2009. Ecological ramifications of the direct foliar uptake of nitrogen. *Oecologia* 159: 1-13.
- 杉原創 2012. サブサハラ・アフリカにおける土壌肥料学研究の最前線: 3. 半乾燥熱帯アフリカの畑作地において土壌微生物バイオマスが土壌-作物間の窒素動態に果たす役割. *日本土壌肥料学雑誌* 83: 60-68.
- Sugimoto, H., T. Sato, S. Nishihara, and K. Naruyasu 1989. Excess Moisture Injury of Soybeans Cultivated in an Upland Field Converted from Paddy: III. Foliar application of urea as countermeasure against excess moisture injury. *Jpn. J. Crop Sci.* 58: 605-610.
- 杉村康司 2013. 熱帯、亜熱帯性薬用・有用植物資源の収集、保存、育成. *特産種苗* 16: 18-21.
- 住友克彦・西島隆明・小野崎隆・柴田道夫 2006. キク属野生種と栽培ギクの葉身における毛じの密度, 長さならびに発達について. *園芸学研究* 5: 351-356.
- Sun, Q. L., S. Hua, J. H. Ye, X. Q. Zhen, and Y. R. Liang 2010. Flavonoids and volatiles in *Chrysanthemum morifolium* Ramat flower from Tongxiang County in China. *African J. Biotech.* 9: 3817-3821.

- 高木泰士・呉文潔 2015. 日本南方海域を通過する台風の最大風速半径の推定手法. 土木学会論文集 B3 (海洋開発) 71: 1-6.
- 高谷好一 1985. 『東南アジアの自然と土地利用』 勁草書房 (東京) pp. 170-174.
- 高山真・中永士師明・中村東一郎・三瀦忠道 2019. 第 71 回日本東洋医学会学術総会 特別企画『次世代に継ぐ卒前卒後漢方医学教育』のご案内. 医学教育 50: 592-593.
- 特有生物研究保育中心 2019. 台湾野生植物資料庫. [Online]
<http://plant.tesri.gov.tw/plant106/WebPlantDetail.aspx?tno=539026020> (browsed on February 10, 2021)
- 鳥山光昭・松元順 1986. チャに対する尿素の葉面散布が施肥窒素の吸収, 同化および転流に及ぼす影響. 日本土壤肥料学雑誌 57: 237-242.
- Turley, D. B., R. Sylvester-Bradley, and P. M. R. Dampney 2001. Foliar-applied nitrogen for grain protein and canopy management of wheat. *Home Grown Cereals Authority* 47: 1-32.
- 宇城正和 2015. 葉面で本当に吸収できるのか. [Online] https://www.axxion.jp/wp/wp-content/themes/axxion/img/column/pdf/col_gm_150310.pdf (browsed on December 16, 2020)
- 王江民・陳素梅・滕年軍・陳發棣・房偉民・管志勇 2013. 基於形態性狀的菊屬與亞菊屬植物親緣關係研究. *植物遺傳資源學報* 14: 1031-1037.
- Woodson, W. R., F. B. Negm, and J. W. Boodley 1984. Relationship between nitrate reductase activity, nitrogen accumulation, and nitrogen partitioning in chrysanthemum. *J. American Soc. Hortic. Sci.* 109: 491-494.
- Wu, Q., Y. Zou, and Y. Huang 2013. The Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Diversispora spurca* ameliorates Effects of Waterlogging on Growth, Root System Architecture and Antioxidant Enzyme Activities of Citrus Seedlings. *Fungal. Ecol.* 6: 37-43.

- 謝信良 1986. 人工増雨技術研発評価計画. 台湾大学大気資源及災害研究中心 pp. 80-101.
- 薬用植物資源研究センターNIBIO 2010. 外国産未利用植物資源の開発に関する研究.
[Online] <http://www.wts9.nibiohn.go.jp/gaikoku.html> (browsed on February 10, 2021)
- Yamamoto, M., A. Kumagai, and Y. Yamamura 1975. Structure and actions of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum* LI Anti-inflammatory action of saikosaponins. *Arzneim. Forsch.* 25: 1021-1023.
- Yen, M. H., C. C. Lin, C. H. Chuang, and S. Y. Liu 1991. Evaluation of root quality of *Bupleurum* species by TLC scanner and the liver protective effects of “xiao-chai-hu-tang” prepared using three different *Bupleurum* species. *J. Ethnopharmacol.* 34: 155-165.
- Yin, D., S. Chen, F. Chen, Z. Guan, and W. Fang 2009. Morphological and Physiological Responses of Two Chrysanthemum Cultivars Differing in their Tolerance to Waterlogging. *Environ. Exp. Bot.* 67: 87-93.
- 吉川雅之・福田陽一・畠山祥子・村上啓寿・山原條二・谷山登志男・北川勲 1993. 人參 (*Ginseng Radix*) 及び紅參 (*Ginseng Radix Rubra*) の乾燥過程における成分変動. 遠赤外線を用いた加工調製. *薬学雑誌* 113: 460-467.
- 吉川雅之・内田英美子・松岡敏郎・山原條二・福田陽一・谷山登志男・北川勲 第21回生薬分析討論会, 大阪. 1992年11月講演要旨集 p. 93.
- 柚木崎千鶴子・酒井美穂・小坂妙子・堂園眞澄・窄野昌信・福田亘博 2008. レモンバーム葉のラジカル消去活性に及ぼす乾燥温度の影響. *日本食品科学工学会誌* 55: 293-298.
- 張訓堯・朱盛祺・蔡正賢・林惠虹 2013. 杭菊栽培及管理. 苗栗区農業改良場專刊 pp. 1-25.

- 張同吳 2004. 台灣常見保陰植物之栽培及利用. 國際藥用植物產業發展研討會專刊 pp. 157-174.
- 趙宏波 · 陳發棣 · 郭維明 · 繆恆彬 · 李暢 · 房偉民 2007. 菊屬與亞菊屬屬間雜種的鑑定及其分類學意義. 植物分類學報 45:661-669.
- Zhao, Y., L. Feng, L. Liu, and R. Zhao. 2019. Saikosaponin b2 enhances the hepatotargeting effect of anticancer drugs through inhibition of multidrug resistance-associated drug transporters. *Life sci.* 231: 272-280.
- Zhou, M., H. Li, and N. J. Mendham 2007. Combining Ability of Waterlogging Tolerance in Barley. *Crop Sci.* 47: 278-284.
- Zhu, D. Y., and L. Li 2007. Near inertial oscillations in shelf-break of northern South China Sea after passage of typhoon Wayne. *J. Trop. Oceanogr* 26: 1-7.
- Zhu, S. H., O. Morinaga, S. Shimokawa, T. K. Shon, S. C. Lee, Y. Shoyama, and H. Tanaka 2007. Eastern blotting and use of anti-saikosaponin a monoclonal antibodies for detection of saikosaponins. *J. Nat. Med.* 61: 178-183.
- Zhu, S., S. Shimokawa, Y. Shoyama, and H. Tanaka 2006. A novel analytical ELISA-based methodology for pharmacologically active saikosaponins. *Fitoterapia*, 77: 100-108.

謝辞

本研究を進めるにあたり，多くの方々にご指導ご鞭撻を賜りました．指導教官の嬉野健次教授からは，懇切なご指導と丁寧なご高閲を賜ったことを謹んで感謝申し上げます．また台湾での研究を遂行するにあたり，終始暖かく見守って下さった琉球大学井上章二副学長に深く感謝申し上げます．琉球大学モハメド アムザド ホサイン教授，佐賀大学農学部鈴木章弘教授，一色司郎教授および鹿児島大学山本雅史教授には論文の作成にあたって貴重なご助言をいただきました．これらの方々には深甚なる感謝の意を表します．

台湾屏東科技大学中草薬研究室の頼宏亮教授には，科学部専門研究のプロジェクトや科研費申請からプロジェクトの進行や研究活動に多大なるご指導をいただきました．心から感謝いたします．同大学林資哲助教授には，研究を遂行するにあたり叱咤激励をいただくとともに研究以外の面でも多くのことを学ばせていただきました．特に所属研究室の藍瓊玉さん，鳥谷亜紗子さん，陳憬致さん，李昆宏さんや学生各位には試料材料の準備，調査の補助および圃場管理など試験の実施において多大なるご協力，ご支援に謹んで心からの感謝の意を表します．

また学位審査会に集中できるようご尽力いただきました，社内の近藤健児部長ならびに一木宏之課長にはお礼申し上げます．

最後にここまで私を支えてくれた家族にも感謝の意を表したいと思います．

皆様ありがとうございました．

浅見 祐弥

摘要

本研究では台湾原産キクカおよびサイコにおける熱帯地域での栽培化を目的として、野生種の採取・収集、施肥管理および環境ストレスに対する影響について研究を行い、以下のような知見を得た。

1. 野菊および杭菊の頭花は生薬の原料として利用されているが、その他の台湾原産のキク属は一部民間薬として利用されているのみである。またその生育特性や含有成分についての研究報告は少ない。したがって本研究では、野菊、杭菊、阿里山油菊、新竹油菊および森氏油菊の5種のキク属の生育、乾物重および花の成分含量を調査した。野菊、杭菊および新竹油菊の葉数、茎径、葉乾物重、茎乾物重およびクロロフィル含量は他の野生種と比較して有意に高い値を示した。また開花数および花乾物重においても野菊、杭菊および新竹油菊で比較的高い数値となった。キクカにおいて特に重要成分である Luteolin では1 g および 1 pot あたりの成分含量は野菊で栽培種の杭菊よりも有意に高い値を示した。また同様にフラボンに分類される Apigenin もキクカの重要成分として注目されており、Apigenin では1 g および 1 植物体あたりの成分含量が新竹油菊で有意に高い値を示した。野生種野菊および新竹油菊は自生地が低海拔地域であり、熱帯地域の低海拔条件下の栽培においても生育、乾物特性および花の成分含量へ負の影響がみられなかった。したがって本研究より野生種である野菊が大規模な栽培化実現の可能性を示唆し、また新竹油菊が種保存および育種材料として利用可能であることが示唆された。

2. 野菊の頭花は生薬として用いられる。野菊は野生品を用いられ、栽培方法が確立していないため、適切な窒素濃度の施肥および熱帯地域における栽培研究報告は少ない。また窒素葉面散布には土壌への窒素施肥に比べ、少量で即効性がみられ、収

量増大が期待できる．そこで本研究では，まず異なる窒素濃度 0, 4, 10 および 20 mM の 4 段階で土壌への最適な窒素施肥濃度を調査した後，異なる窒素葉面散布 (Nitrogen Foliar Spray: NF) 濃度 0, 1, 2, 4 および 8 mM の 5 段階に設定し，生育，乾物重および花の成分含量を調査した．土壌への窒素施肥では生育および光合成速度の結果より，10 mM 以上の時増加傾向にあった．さらに乾物重およびクロロフィル含量も同様に 10 mM で飽和した．次に土壌へ 10 mM の窒素施肥に加え，窒素葉面散布を行った結果では，NF 2 mM 以上で葉乾物重および葉面積を有意に増加させた．総開花数および総花乾物重では，NF 8 mM で有意に高い値を示した．また 1 株あたりの頭花の総成分含量は 6 種の成分において，ともに NF 8 mM で有意に高い値を示した．以上より，土壌への窒素施肥は 10 mM で飽和し，開花前後では NF 8 mM の濃度が最適であることが示唆された．

3. 湛水は土壌環境に大きな変化をもたらす．水中での酸素の拡散速度は低下し，湛水した土壌は数センチメートル以上の深さで急速に無酸素状態を発生させる．土壌中の酸素欠乏は根系の発達に負の影響を与え，根は成長を停止し最終的には枯死する可能性がある．本実験では湛水处理 1, 3, 5 および 10 日間 (ws 1, 3, 5, 10 d) の 5 処理を設定し，野菊の生育，乾物生産特性および頭花のフラボノイド含量に与える影響を調査した．湛水处理後の土壌含水量の結果より，湛水状態の土壌含水量は $0.45 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$ 以上であることが示された．溶存酸素量 (DO 値) が 5.0 mg L^{-1} 未満となった湛水ストレス (ws) 5 および 10 d の地上部および根乾物重は有意に減少した．湛水处理後，ws 5 および 10 d の生育は緩慢となり，ws 10d は湛水处理 2 週間後には完全に枯死した．さらに，ws 5d は湛水处理が長期化したため開花が遅延され，収穫時まで開花が行われなかった．したがって湛水期間が長期化すると，花乾物重は著しく減少し，ws 3d は ck と比較して花乾物重が 80% 減少した．同様に頭花のフラボノ

イド成分は、湛水処理期間が最長であった ws 3d で有意に減少した。これは ck と比較して、ws 3d の頭花 5 種フラボノイド成分含量は 24~29%減少した。

4. 窒素施肥濃度の違いが *Bupleurum kaoi* Liu. (*B. kaoi*) の生育および成分含量に与える影響を明らかにすることを目的とした。供試した *B. kaoi* は、生薬として根が用いられる台湾固有種である。本研究は硝酸安の濃度を変えたホーグランド溶液を 0, 2, 4, 10, 16, 22 mM の 6 段階に設定し、週に 1 度施肥を行った。また乾物生産特性および根の成分含量を明らかにした。成分分析は、サイコサポニン(SS)a, b1, b2, c および d の 5 種類の定量分析を行った。*B. kaoi* の生育及び乾物生産特性の結果は、草丈、葉数および SPAD で 10 mM 以上のとき、増加傾向にあった。さらに地上部および地下部の乾物重も同様に 10 mM 以上で有意に高い値を示した。10 mM 以上の処理区において、生育および乾物生産の有意差はなかった。主成分である SSa および SSd においては 16 mM 以上で有意に増加した。また SSb1, SSb2, SSc においては 10 mM 以上で有意に成分含量が高いことを示し、10 mM 以上で総サイコサポニンが有意に増加した。以上の結果から、窒素施肥濃度 10 mM 以上で根の乾物重および成分含量は飽和点に達し、最適窒素施肥濃度の指標となる可能性が示唆された。

Summary

Present study was conducted to evaluate fertilizer effect and environmental stress on growth characteristics, yield and medicinal components of Kikuka and Psycho native to Taiwan for developing cultivation method in tropical region. This study obtained the following findings.

1. The flower heads of *Chrysanthemum indicum* (*C. indicum*) and *C. morifolium* are used as the ingredients of herbal medicines, whereas only a few of other *Chrysanthemum* species native to Taiwan are solely used for folk medicines. However, research information on the growth characteristics and chemical components of the plant species is limited. Therefore, present study investigated the growth characteristics, biomass production and chemical components in flowers of five *Chrysanthemum* species: *C. indicum*, *C. morifolium*, *C. arisanense*, *C. boreale* and *C. morri*. *Chrysanthemum indicum*, *C. morifolium* and *C. boreale* demonstrated significantly high values in leaf number, stem diameter, biomass production and chlorophyll as compared to other wild species. *C. indicum*, *C. morifolium* and *C. boreale* further manifested relatively higher values in number and biomass of flowers. Concentration (per gram) and total amount (per plant) of luteolin, one of the most important components of *Chrysanthemum*, were significantly higher in *C. indicum* than those in *C. morifolium*, a cultivated *Chrysanthemum* species. Similarly, concentration and total amount of apigenin, which is classified as flavone and considered to be one

of the most essential components, were quite higher in *C. boreale*. *C. indicum* and *C. boreale* are wild species grown in areas of low altitude; therefore, growth, drymass and components of flower were not negatively affected during the cultivation in the study area where the altitude is low in the tropical climate. Thus, the results of this research revealed that the mass production of a wild species *C. indicum* could be viable, and *C. boreale* could be an important species for conservation and breeding proposes.

2. *Chrysanthemum indicum* flower is used as herbal medicines. Since *Chrysanthemum indicum* is a wild species and the cultivation method is not established, effect of nitrogen fertilizer concentration on the plant was evaluated for sustainable production in tropical region. It is expected that nitrogen foliar application (NF) could result increased yield of the plant compared to soil fertilization. Therefore, in this study, nitrogen concentrations of 0, 4, 10 and 20 mM were evaluated on growth and yield of the plant to clarify the optimum level of soil nitrogen fertilization. In addition, foliar nitrogen fertilizer concentrations of 0, 1, 2, 4 and 8 mM were investigated on growth, biomass production and flower components. The result of nitrogen fertilization to soil showed that the growth and photosynthetic rate of *C. indicum* increased when the NF was higher than 10 mM. Furthermore, the dry weight and chlorophyll content were maximum with the 10 mM. The results of NF in addition to 10 mM soil nitrogen fertilization showed that leaf dry weight and leaf area increased significantly with above NF 2 mM. Total number and dry weight of flowers were significantly higher with the

NF 8 mM. Total components (6 different components) of flowers in plant was significantly higher with NF 8 mM. It was suggested that soil nitrogen fertilization was optimum at 10 mM, and NF 8 mM nitrogen concentration was optimum during the reproductive growth period of the plant.

3. Waterlogging changes the soil environment. The excessive amount of water in soil inhibits oxygen supply to the roots, by developing anoxic conditions at the depth of a few centimeters from the soil surface. Lack of oxygen inhibits growth of plants, occasionally leading to the death of the whole plant. This study investigated the individual and combined effects of waterlogging on *Chrysanthemum indicum* (*C. indicum*) growth and its flower components, using a pot experiment in a greenhouse with four different waterlogging stress treatments (ws): 1, 3, 5 and 10 days waterlogging stress (ws 1, 3, 5 and 10d) and normal watering: control (ck). For ws 5d and 10d, both the above-ground dry weight and roots decreased at DO values below 5.0 mg L⁻¹. Growth of the plant was inhibited for the waterlogging treatment of ws 5d and 10d, and the plant died completely after two weeks of waterlogging condition. Moreover, the flowering of the ws 5d was delayed due to waterlogging, making it impossible to harvest the flowers. As the period of waterlogging became longer, the dry weight of the flowers decreased. Flowers of ws 3d significantly also decreased by 80% compared with ck. Similarly, the components of the flowers became remarkably less for ws 3d. Finally, this study showed that the dry weight and flower components were significantly decreased under waterlogging stress for 3 days or more.

4. *Bupleurum kaoi* Liu. (*B. kaoi*) is a perennial herb native to Taiwan, and its roots are used for herbal medicines. The objective of this study was to evaluate the effects of six different concentrations of nitrogen on growth and medicinal components of *B. kaoi*. The fertilizer of Hoagland solution was applied to *B. kaoi* plant only one time per week. Six different Hoagland solutions contained different amounts of NH_4NO_3 : 0, 2, 4, 10, 16 and 22 mM. Dry mass production and the proportion of components in the roots were measured. The analysis of components in *B. kaoi* was conducted by using five types of Saikosaponins (SS): a, b1, b2, c and d. Plant length, leaf number and SPAD value of the plant tended to increase with the fertilizer of above 10 mM. Similarly, the dry mass of the plant both above and underground increased with the fertilizer of above 10 mM. During the late growth stage, the root (underground) growth continued with the fertilizer of above 10 mM. There was no significant difference in growth parameters and dry matter production among the treatments of above 10 mM. Growth parameters, dry mass production, and main components, SSa and SSd, increased significantly with the fertilizer of above 16 mM. On the other hand, the rate of components and the total amount of Saikosaponins, Sb1, SSb2 and SSc, elevated with the fertilizer of above 10 mM. These results indicate that nitrogen fertilizer concentration-rate over 10 mM is optimum for higher yield and medicinal ingredients in the roots of *B. kaoi*.

図表リスト

第2章

第1節

Fig. 2-1-1. Growth characteristics of *Chrysanthemum*.

Table 2-1-1. Dry matter production characteristics and chlorophyll content of different *Chrysanthemum* spp.

第2節

Fig. 2-2-1. Flower number and flower dry weight of *Chrysanthemum*.

Fig. 2-2-2. Flower head characteristics of *Chrysanthemum*.

Fig. 2-2-3. HPLC chromatograms of *Chrysanthemum* standard products.

Table 2-2-1. Calibration curve of each standard solution.

Table 2-2-2. The content of flavonoid components of flower of *Chrysanthemum* spp.

Table 2-2-3. The content of flower components per plant of *Chrysanthemum* spp.

Table 2-2-4. Intra-day and inter-day test of each standard component.

Table 2-2-5. Rate of return on Calibration curves of each component in *Chrysanthemum*.

第3節

Fig. 2-3-1. The effect of different drying temperatures on the water content of *C. indicum* inflorescence.

Table 2-3-1. The effect of different drying temperatures on flavonoid content of *Chrysanthemum* spp.

第3章

第 1 節

Fig. 3-1-1. The light curve of *C. indicum*.

Fig. 3-1-2. The effects of different nitrogen fertilization concentrations on the growth of *C. indicum*.

Fig. 3-1-3. The effects of different nitrogen fertilization concentrations on the photosynthesis and stomatal conductance of *C. indicum*.

Table 3-1-1. The effect of different nitrogen fertilization concentrations on dry matter production characteristics of *C. indicum*.

第 2 節

Fig. 3-2-1. The effects of different foliar nitrogen fertilization concentrations on the growth of *C. indicum*.

Fig. 3-2-2. The effects of different foliar nitrogen fertilization concentrations on the flowering characteristics of *C. indicum*.

Table 3-2-1. The effect of different foliar nitrogen fertilization concentrations on dry weight and chlorophyll content of *C. indicum*.

Table 3-2-2. The effect of different foliar nitrogen fertilization concentrations on flavonoid components per flower.

Table 3-2-3. The effect of different foliar nitrogen fertilization concentrations on flavonoid components per plant.

第 4 章

第 1 節

Fig. 4-1-1. The soil moisture volume contents under waterlogging conditions.

Fig. 4-1-2. The DO value during waterlogging conditions.

Fig. 4-1-3. The above-ground part of *C. indicum* waterlogging treatment.

Fig. 4-1-4. The effects of waterlogging on dry weight, photosynthesis and total chlorophyll contents.

第 2 節

Fig. 4-2-1. The leaf area calibration curve of *C. indicum*.

Fig. 4-2-2. Plant height, number of leaves, SPAD and stem diameter after waterlogging.

Table 4-2-1. The effects of waterlogging on dry matter weight and root length.

Table 4-2-2. The effects of waterlogging on flower components.

第 5 章

第 1 節

Fig. 5-1-1. Plant height, number of leaves and SPAD value under different nitrogen applied levels.

Table 5-1-1. Effect of different nitrogen applied levels on part of root length, maximum root diameter and part of dry weight of *B. kanoi*.

第 2 節

Fig. 5-2-1. HPLC chromatograms in SSa, b1, b2, c and d standard solution.

Table 5-2-1. Calibration curve of five Saikosaponins.

Table 5-2-2. HPLC chromatograms in all parts of *B. kanoi* under different nitrogen supply levels.