

略 号

畜草研研報

Bull NARO Inst Livest  
Grassl Sci

ISSN:1347-0825  
CODEN:CSKKCS



# Bulletin of NARO Institute of Livestock and Grassland Science



第13号〈No.13〉平成25年3月 -March2013-

**NARO Institute  
of Livestock and  
Grassland Science  
(NILGS)**

Ibaraki, Japan

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

**畜産草地研究所**

---

---

畜産草地研究所編集委員会  
Editorial Board

所 長  
Director-General

土 肥 宏 志  
Hiroshi DOHI

草地研究監  
Director, Grassland Research

梨 木 守  
Mamoru NASHIKI

編集委員長  
Editor-in-Chief

竹 中 昭 雄  
Akio TAKENAKA

副編集委員長  
Deputy Editor

浦 川 修 司  
Shuji URAKAWA

編集委員  
Associate Editor

小 迫 孝 実  
Takami KOSAKO

間 野 吉 郎  
Yoshiro MANO

吉 田 信 代  
Nobuyo YOSHIDA

山 本 嘉 人  
Yoshito YAMAMOTO

手 島 茂 樹  
Shigeki TEJIMA

平 子 誠  
Makoto HIRAKO

長谷川 三 喜  
Sanki HASEGAWA

野 村 将  
Masaru NOMURA

---

---

# 畜産草地研究所研究報告

第13号 (平成25年3月)

## 目次

### 原著論文

- サイレージ用トウモロコシ一代雑種親自殖系統「Na71」の育成とその特性  
..... 佐藤 尚・井上康昭・門馬榮秀・濃沼圭一・加藤章夫・  
村木正則・伊東栄作・黄川田智洋 ..... 1
- シバ品種「朝駆」および「朝萌」の育成  
..... 小林 真・蝦名真澄・春日重光・奥村健治・高井智之・  
荒谷 博・鶴見義朗・中川 仁 .....11
- サトウキビ野生種 (*Saccharum spontaneum* L.) 系統 “Glagah kloet” のカルスからの  
植物体再生 (英文)  
..... 高橋 亘・高溝 正 .....23
- 耕作放棄地放牧に用いた冬作飼料作物をリビングマルチとするダイズ栽培法  
1. イタリアンライグラスを用いた方法  
..... 手島茂樹・池田哲也・進藤和政・山田大吾 .....33
- カリウムと窒素の同時制御による泌乳牛の尿量低減化  
..... 大谷文博・樋口浩二・小林洋介・野中最子・矢用健一・須藤まどか .....41
- 昼間帯および夜間帯のL-トリプトファン連続静脈内投与がホルスタイン種雄子牛の  
メラトニン分泌に及ぼす効果  
..... 新宮博行・櫛引史郎・伊藤文彰・林 征幸・守谷直子・  
小林寿美・山地佳代子・甫立孝一 .....53

BULLETIN OF  
NARO INSTITUTE OF  
LIVESTOCK AND GRASSLAND SCIENCE

No.13 (March2013)

CONTENTS

Research Papers

- Hisashi SATO, Yasuaki INOUE, Eihide MONMA, Keiichi KOINUMA, Akio KATO, Masanori MURAKI,  
Eisaku ITO and Tomohiro KIKAWADA :  
Development and Characteristics of New Inbred Line “Na71” of Silage Maize ..... 1
- Makoto KOBAYASHI, Masumi EBINA, Shigemitsu KASUGA, Kenji OKUMURA, Tomoyuki TAKAI,  
Hiroshi ARAYA, Yoshiro TSURUMI and Hitoshi NAKAGAWA :  
Breeding of Japanese Lawngrass “Asagake” and “Asamoe” ..... 11
- Wataru TAKAHASHI and Tadashi TAKAMIZO:  
Plant Regeneration from Embryogenic Calli of the Wild Sugarcane (*Saccharum spontaneum* L.) clone  
‘Glagah Kloet’ ..... 23
- Shigeki TEJIMA, Tetsuya IKEDA, Kazumasa SHINDO and Daigo YAMADA :  
Soybean Cultivation Using a Living Mulch of Winter Crops Used for Grazing on Abandoned Cultivated  
Lands. 1. Italian Ryegrass aftermath ..... 33
- Fumihito OHTANI, Kouji HIGUCHI, Yousuke KOBAYASHI, Itoko NONAKA,  
Kenich YAYOU and Madoka SUTOH :  
Simultaneous Control of Potassium and Nitrogen to Reduce Urine Volume in Lactating Dairy Cows ... 41
- Hiroyuki SHINGU, Shiro KUSHIBIKI, Fumiaki ITOH, Masayuki HAYASHI, Naoko MORIYA,  
Hisami KOBAYASHI, Kayoko YAMAJI and Koichi HODATE :  
Effects of Diurnal and Nocturnal Intravenous Infusions of L-tryptophan on Melatonin Secretion in Male  
Holstein Calves ..... 53

## サイレージ用トウモロコシ一代雑種親自殖系統「Na71」の育成とその特性

佐藤尚・井上康昭<sup>a</sup>・門馬榮秀<sup>a</sup>・濃沼圭一<sup>b</sup>・加藤章夫<sup>c</sup>・村木正則<sup>d</sup>・伊東栄作<sup>b</sup>・黄川田智洋<sup>b</sup>

農研機構畜産草地研究所 飼料作物研究領域, 那須塩原市, 329-2793

## 要 約

優良一代雑種品種を育成するための親自殖系統として「Na71」を育成し、2010年に品種登録出願した。

「Na71」は「Na7×Na23」を自殖したF<sub>2</sub>集団を母材として育成された。1987年から育成を開始し、1995年にS<sub>7</sub>世代となり、1996年に組合せ能力検定試験で有望と認められたことから、固定系統番号「Na71」を付した。

粒質は「デント」、早晚性は「やや晩生」に属する。ごま葉枯病抵抗性は「強」、すす紋病抵抗性は「強」、紋枯病抵抗性は「中」、黒穂病抵抗性は「強」である。稈長は「やや長」、着雌穂高は「やや高」、草型は「セミアップライト型」である。粒列数は14列で、採種量は30.0 kg/aである。プリント種との組合せ能力は平均的である。

「Na71」を種子親として、耐倒伏性、耐病性に優れる多収の単交配一代雑種品種「タカネフドウ」（とうもろこし農林交68号）が長野県野菜花き試験場（旧とうもろこし育種指定試験地）にて育成された。

キーワード：トウモロコシ、自殖系統、デント、組合せ能力、ごま葉枯病

## 緒 言

トウモロコシの栽培品種は、雑種強勢を利用した一代雑種、いわゆるF<sub>1</sub>品種が主流であり、そのためには親系統として優秀な自殖系統が不可欠である<sup>1)</sup>。わが国の公的育種機関のトウモロコシ育種では、米国デント種起源の自殖系統と日本在来フリント種起源の自殖系統との間で高い組合せ能力が発現することが明らかになっており、デント種×フリント種の組合せを基本としてF<sub>1</sub>品種および自殖系統の育成を進めている<sup>2)</sup>。当初は米国等の公的機関で育成されたデント種自殖系統も利用していたが、それだけではわが国の気象条件に適応する優良F<sub>1</sub>品種の育成は難しいことが認識され、現在ではデント種についても国産の自殖系統の利用が主流となっている。わが国の公的育種機関では、トウモロコシ育種の効率化を図るため1987年よりトウモロコシ育種単位の間で互いに育種素材や育成した自殖系統について交換

を進めており、各場所でのF<sub>1</sub>品種育成に利用している。その結果、これまでに国産の自殖系統を用いたデント種×フリント種の組合せによるF<sub>1</sub>品種として、「ナスホマレ」<sup>2)</sup>、「ゆめそだち」<sup>5)</sup>、「ゆめちから」<sup>9)</sup>、「タカネスター」<sup>25)</sup>などが育成されている。

「Na71」はデント種の自殖系統で、日本在来カリビア型フリント種の自殖系統との組合せ能力が平均的で、ごま葉枯病などの耐病性についても実用レベルに達している。「Na71」を種子親とし、長野県野菜花き試験場（旧とうもろこし育種指定試験地）が日本在来カリビア型フリント種に属する集団「NF98」から育成した自殖系統「CHU68」<sup>17)</sup>を花粉親として、長野県野菜花き試験場が「タカネフドウ」（とうもろこし農林交68号）を育成したことにより、親系統としての能力が認められたため、「Na71」を品種登録出願した。そこで本稿では本品種の育成経過および特性の概要等を報告する。

2012年9月26日受付，2012年11月22日受理

<sup>a</sup> 退職

<sup>b</sup> 現 農研機構北海道農業研究センター

<sup>c</sup> 現 京都府立大学

<sup>d</sup> 現 農研機構九州沖縄農業研究センター

## 育成経過

早中生から中晩生の F<sub>1</sub> 品種の親としての利用に適し、ごま葉枯病抵抗性および組合せ能力に優れる系統の育成を育種目標とした。

「Na7」<sup>8)</sup> を種子親とし、「Na23」<sup>1)</sup> を花粉親とした単交配を育種母材とした。「Na7」は米国パイオニア社育成の複交配品種「P3424」を母材として、草地試験場（現畜産草地研究所）が1988年に育成を完了した耐倒伏性とごま葉枯病抵抗性に優れるデント種の親自殖系統であり<sup>8)</sup>、1991年に品種登録が行われ（登録番号2690）、その後民間種苗会社育成の F<sub>1</sub> 品種の片親として利用された。「Na23」は「Oh43Ht×H84」の F<sub>1</sub> に「H84」を1回戻交配した集団を母材として、草地試験場が1988年に自殖・選抜を完了したごま葉枯病抵抗性および紋枯病抵抗性に優れるデント種の親自殖系統であり<sup>1)</sup>、長野県中信農業試験場（現長野県野菜花き試験場）が育成した「タチタカネ」<sup>27)</sup> の花粉親として利用するため品種登録出願を行い、2002年に品種登録された（登録番号9919）。

1987年に「Na7」を種子親、「Na23」を花粉親として交配を行い F<sub>1</sub> 種子を採種し、1987年の冬期に温室で自殖を行い F<sub>2</sub> 種子を採種して、これを S<sub>0</sub> 世代とした。この後毎年、耐病性、耐倒伏性、草型等に関して系統および個体選抜と、自殖による固定化を図った。

育成経過の概要を表1に示した。系統育成圃場におけ

る選抜方法は、各世代1系統13個体を栽植し、自然発生条件下での各種病害罹病程度、倒伏個体割合あるいは根の張り具合、草型、および雌穂特性に基づいて、系統および系統内個体選抜と自殖を行い、次世代用種子とした。1995年に S<sub>7</sub> 世代となり、その後は兄妹交配により系統維持を行うとともに、1996年に組合せ能力検定試験を行った結果、有望と認められたため、1997年に「Na71」と命名した。1997年以降、各種試験に供試するとともに、長野県中信農業試験場をはじめとする国内育種場所へ配布され、各場所で育種試験に供された。

これらの試験の結果、本系統の優秀性が認められ、2010年5月に品種登録出願した。

## 試験方法

### 1. 「Na71」に関する試験

試験方法を表2に示した。試験は畜産草地研究所（栃木県那須塩原市千本松768、1997年は前身の草地試験場）で行った。比較系統としてアメリカで育成された代表的な自殖系統である「Mo17Ht」<sup>14)</sup>、「H84」、畜産草地研究所育成の「Na65」<sup>14)</sup>、九州農業試験場（現九州沖縄農業研究センター）育成の「Mi29」<sup>6)</sup> を供試した。これら比較系統はいずれもデント種に属する。

特性評価試験は1区1畦反復なしで熟期や耐病性、耐倒伏性の評価を行い、特性分類試験は1区2畦2反復で、熟期や耐病性、耐倒伏性に加えて形態的特性、採種関連

表1. 育成経過

年次	'87夏	'87冬	'88	'89	'90	'91	'92	'93	'94	'95	'96	'97	'08	'09
世代	F <sub>1</sub> 作成	F <sub>2</sub> 作成	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	→ 兄妹交配により維持			
栽植系統数			1	5	2	2	1	2	2	1	→ Na71			
選抜系統数			1	2	2	2	1	2	1					
選抜個体数			5	2	2	1	2	2	1					
特性評価試験													○	○
特性分類試験													○	○
ごま葉枯病抵抗性検定試験												○		
組合せ能力評価試験											○			○

表2. 「Na71」に関する試験の方法

試験名	年次	播種日 (月・日)	栽植密度 (本/a)	栽植様式 畦間×株間 (cm)	反復数	1区個体数
特性評価試験	2008	5.12	444	75×30	1	13
	2009	5.11	444	75×30	1	13
特性分類試験	2008	5.12	444	75×30	2	26
	2009	5.13	444	75×30	2	26
ごま葉枯病抵抗性検定試験	1997	5.24	533	75×25	2	12

特性、固定度について調査した。ごま葉枯病抵抗性検定試験では、2畦おきに栽植したごま葉枯病罹病性の合成系統「BSSS」にごま葉枯病罹病葉粉末懸濁液を接種して罹病程度を調査した。熟期や各種耐病性の強弱判定は、比較系統の品種登録時に行われた抵抗性の強弱判定をもとに行った。

## 2. 「Na71」をF<sub>1</sub>親とする単交配組合せに関する試験

試験方法を表3に示した。試験は畜産草地研究所(1996年は前身の草地試験場)において、各年とも1区2畦6.0 m<sup>2</sup>で行った。1996年は「P3358」、2009年は「34B39」をそれぞれ比較品種として供試した。施肥量等は畜産草地研究所の慣行により、調査方法は飼料作物系統適応性検定試験実施要領<sup>23)</sup>に準じた。

## 3. 「Na71」を種子親とする単交配F<sub>1</sub>品種「タカネフドウ」に関する試験

試験方法を表4に示した。試験は畜産草地研究所において、各年とも1区4畦12.0 m<sup>2</sup>で行った。比較品種に「KD777」、「32K61」を供試した。施肥量等は畜産草地研究所の慣行により、調査方法は飼料作物系統適応性検定試験実施要領<sup>23)</sup>に準じた。

## 試験成績

### 1. 粒質および早晩性

粒質および早晩性を表5に示した。粒質はデントであった。2ヶ年4試験の平均で、「Na71」の雄穂開花期は8月2日、絹糸抽出期は7月30日であった。やや晩生に属する「Mo17Ht」、「H84」より雄穂開花期は遅いものの絹糸抽出期はほぼ同じであることから、「Na71」の早晩性は関東では「やや晩生」に属すると判定した。

### 2. 病害抵抗性

ごま葉枯病の罹病程度を表6に示した。「Na71」の罹病程度の2ヶ年4試験の平均値は2.4で、これまでに抵抗性「強」と判定された比較系統並であったことから、「Na71」のごま葉枯病抵抗性は「強」と判定した。

すす紋病の罹病程度を表7に示した。「Na71」の罹病程度の2ヶ年4試験の平均値は3.1で、これまでに「極強」と判定された「H84」よりやや高く、「強」と判定された「Mi29」並であったことから、「Na71」のすす紋病抵抗性は「強」と判定した。

紋枯病の罹病株率を表8に示した。「Na71」の罹病株率の2ヶ年4試験の平均値は50.7%で、これまでに「中」

表3. 組合せ能力検定試験の方法

試験名	年次	播種日 (月・日)	栽植密度 (本/a)	栽植様式 畦間×株間 (cm)	反復数	1区個体数
組合せ能力評価試験	1996	6.5	667	75×20	2	38
	2009	5.8	667	75×20	2	38

表4. 「Na71」を種子親とする単交配F<sub>1</sub>品種「タカネフドウ」の生産力試験に関する方法

年次	播種日 (月・日)	栽植密度 (本/a)	栽植様式 畦間×株間 (cm)	反復数	1区個体数
2006	5.9	667	75×20	3	76
2008	5.7	667	75×20	3	76
2009	5.7	667	75×20	3	76

表5. 粒質および早晩性<sup>1)</sup>

系統名	粒質	雄穂開花期 (月・日)					絹糸抽出期 (月・日)					早晩性
		2008A	2008B <sup>2)</sup>	2009A	2009B <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>	2008A	2008B <sup>2)</sup>	2009A	2009B <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>	
Na71	デント	8.3	8.3 a	7.31	7.31 a	8.2 a	8.1	7.31	7.29	7.29 a	7.30	中生の晩
Mo17Ht	デント	7.28	7.26 d	7.25	7.24 c	7.26 b	7.28	7.28	7.26	7.26 b	7.27	中生の晩
H84	デント	7.30	7.28 cd	7.26	7.25 c	7.27 b	7.30	7.30	7.28	7.26 b	7.29	中生の晩
Na65	デント	8.1	7.29 bc	7.27	7.28 b	7.29 b	8.1	7.30	7.28	7.29 a	7.30	中生の晩
Mi29	デント	7.30	7.30 b	7.25	7.28 b	7.28 b	7.29	7.30	7.26	7.27 ab	7.28	中生の晩

1) A: 特性評価試験(反復なし), B: 特性分類試験(反復あり)

2) 特性分類試験(B)の異文字間にTukey検定で5%水準の有意差あり

3) 平均の有意差検定は各試験を反復として算出

表6. ごま葉枯病罹病程度<sup>1)</sup>

系統名	罹病程度 (1: 無～9: 甚)					平均 <sup>3)</sup>	抵抗性
	1997	2008A	2008B <sup>2)</sup>	2009A	2009B <sup>2)</sup>		
Na71	4.6	2.5	3.0 a	2.0	2.0 a	2.4	強
Mo17Ht	5.0	3.5	5.6 b	2.0	3.5 b	3.7	強
H84	4.2	2.0	5.1 ab	3.0	2.0 a	3.0	強
Na65	5.4	3.5	4.2 ab	2.0	2.0 a	2.9	強
Mi29	—	3.5	6.0 b	3.0	3.0 ab	3.9	強

- 1) 1997年のごま葉枯病抵抗性検定試験, Elliottらの罹病指数(引用文献3)によって調査を行い, 1-9の評点に換算。2008～2009年のA: 特性評価試験(反復なし) B: 特性分類試験(反復あり)  
 2) 特性分類試験(B)の異文字間にTukey検定で5%水準の有意差あり  
 3) 平均の値は1997年を除き, 有意差検定は各試験を反復として算出(有意差なし)

表7. すず紋病罹病程度<sup>1)</sup>

系統名	罹病程度 (1: 無～9: 甚)					抵抗性
	2008A	2008B <sup>2)</sup>	2009A	2009B <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>	
Na71	1.0	5.0 b	3.5	3.0 abc	3.1	強
Mo17Ht	2.0	4.8 b	2.0	2.5 ab	2.8	強
H84	1.0	2.0 a	3.0	2.0 a	2.0	極強
Na65	2.5	2.5 a	4.0	4.0 bc	3.3	強
Mi29	1.0	2.5 a	4.0	4.5 c	3.0	強

- 1) A: 特性評価試験(反復なし), B: 特性分類試験(反復あり)  
 2) 特性分類試験(B)の異文字間にTukey検定で5%水準の有意差あり  
 3) 平均の有意差検定は各試験を反復として算出(有意差なし)

表8. 紋枯病罹病株率<sup>1)</sup>

系統名	罹病株率 (%)					抵抗性
	2008A	2008B <sup>2)</sup>	2009A	2009B <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>	
Na71	46.2	56.1 b	61.5	39.1 b	50.7	中
Mo17Ht	69.2	85.1 b	25.0	24.3 ab	50.9	中
H84	44.4	11.3 a	7.7	22.0 ab	21.4	強
Na65	18.2	40.8 b	15.4	7.7 a	20.5	強
Mi29	46.2	34.3 b	27.3	39.2 b	36.8	やや強

- 1) A: 特性評価試験(反復なし), B: 特性分類試験(反復あり)  
 2) 特性分類試験(B)の異文字間にTukey検定で5%水準の有意差あり  
 3) 平均の有意差検定は各試験を反復として算出(有意差なし)

表9. 黒穂病罹病株率<sup>1)</sup>

系統名	2008A		2008B <sup>2)</sup>		2009A		2009B <sup>2)</sup>		平均 <sup>3)</sup>		抵抗性
	罹病株率 (%)	雌穂罹病株率 (%)	罹病株率 (%)	雌穂罹病株率 (%)	罹病株率 (%)	雌穂罹病株率 (%)	罹病株率 (%)	雌穂罹病株率 (%)	罹病株率 (%)	雌穂罹病株率 (%)	
Na71	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 a	0.0	0.0	0.0	強
Mo17Ht	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 a	0.0	0.0	0.0	強
H84	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 a	0.0	0.0	0.0	強
Na65	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.7 b	1.9	1.4	0.5	中
Mi29	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 a	0.0	0.0	0.0	強

- 1) A: 特性評価試験(反復なし), B: 特性分類試験(反復あり)  
 2) 特性分類試験(B)の異文字間にTukey検定で5%水準の有意差あり  
 3) 平均の有意差検定は各試験を反復として算出(有意差なし)

と判定された「Mo17Ht」並であったことから, 「Na71」の紋枯病抵抗性は「中」と判定した。

黒穂病の罹病株率を表9に示した。2ヶ年4試験の結果, これまでに「中」と判定された「Na65」でわずかに罹病株が認められたものの, 「強」と判定された他の比較系統同様に本系統は罹病が認められなかったことから, 「Na71」の黒穂病抵抗性は「強」と判定した。

### 3. 耐倒伏性

比較系統はこれまで「中」あるいは「強」と判定されているが, 調査年次を通じて全系統に倒伏の発生は認め

られず, 耐倒伏性の判定はできなかった(データ省略)。

### 4. 採種特性

放任受粉下の採種量と花粉飛散程度を表10に示した。「Na71」の放任受粉下での2ヶ年平均の採種量は42.6 kg/aで, 「Na65」, 「H84」より少なく, 「Mo17Ht」並であった。雌雄畦比3:1のF<sub>1</sub>採種栽培での種子親としての利用を想定した算出値は32.0 kg/aで, F<sub>1</sub>採種栽培での採算の目安である30 kg/aに達していることから, 「Na71」は一定の採種性を有していると判断された。花粉の飛散程度は比較系統並であった。

表 10. 採種特性<sup>1)</sup>

系統名	採種量 A (kg/a) <sup>2)</sup>			採種量 B (kg/a) <sup>2)</sup>			花粉飛散程度 (1 ~ 9) <sup>3)</sup>		
	2008 <sup>4)</sup>	2009 <sup>4)</sup>	平均 <sup>5)</sup>	2008 <sup>4)</sup>	2009 <sup>4)</sup>	平均 <sup>5)</sup>	2008 <sup>4)</sup>	2009 <sup>4)</sup>	平均 <sup>5)</sup>
Na71	42.6 b	42.6 b	42.6 b	32.0	32.0	32.0	7.0	6.0	6.5
Mo17Ht	47.9 b	35.6 b	41.8 b	35.9	26.7	31.3	8.0	5.0	6.5
H84	66.5 a	58.4 ab	62.4 ab	49.9	43.8	46.8	7.5	5.0	6.3
Na65	71.2 a	68.2 a	69.7 a	53.4	51.2	52.3	7.0	5.3	6.2
Mi29	57.4 ab	50.7 ab	54.1 ab	43.1	38.0	40.5	7.0	6.0	6.5

- 1) 特性分類試験の結果
- 2) 採種量 A は実収量, 採種量 B は雌雄畦比 3 : 1 の F<sub>1</sub> 採種栽培での種子親としての利用を想定した算出値
- 3) 花粉飛散程度は 1 : 不良 ~ 9 : 極良による評点値
- 4) 異文字間に Tukey 検定で 5% 水準の有意差あり
- 5) 平均の有意差検定は各試験を反復として算出

表 11. 一般特性<sup>1)</sup>

系統名	初期生育 (cm)			稈長 (cm)			着雌穂高 (cm)			稈径 (mm)		
	2008 <sup>2)</sup>	2009 <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>	2008 <sup>2)</sup>	2009 <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>	2008 <sup>2)</sup>	2009 <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>	2008 <sup>2)</sup>	2009 <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>
Na71	39.8	95.4	67.6	204	222 a	214	91	107 a	99	17	18	17
Mo17Ht	39.0	86.8	62.9	205	204 c	204	83	87 b	85	16	17	17
H84	41.6	97.6	69.6	229	224 a	226	83	88 b	86	18	18	18
Na65	38.8	90.3	64.6	202	219 ab	210	86	97 ab	92	15	17	16
Mi29	43.4	86.9	65.2	205	208 bc	207	86	90 ab	89	14	17	16

系統名	葉角度 (°)			全葉数 (枚)			葉長 (cm)			葉幅 (cm)		
	2008 <sup>2)</sup>	2009 <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>	2008 <sup>2)</sup>	2009 <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>	2008 <sup>2)</sup>	2009 <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>	2008 <sup>2)</sup>	2009 <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>
Na71	14	20 ab	17	19.2 a	20.8 a	20.0 a	86 a	83 ab	85 a	9.9 b	10.2 b	10.0 b
Mo17Ht	30	32 d	31	16.5 b	16.8 b	16.7 b	70 c	67 c	69 b	9.6 b	9.9 b	9.7 b
H84	38	24 bc	31	19.0 a	19.1 a	19.1 ab	76 b	80 b	78 ab	9.1 b	9.6 b	9.3 b
Na65	42	28 cd	36	18.4 a	19.4 a	18.9 ab	83 a	87 a	85 a	11.5 a	11.9 a	11.7 a
Mi29	24	17 a	21	18.9 a	19.2 a	19.1 ab	76 b	80 b	78 ab	9.5 b	10.2 b	9.9 b

- 1) 特性分類試験の結果
- 2) 異文字間に Tukey 検定で 5% 水準の有意差あり
- 3) 平均の有意差検定は各試験を反復として算出

## 5. 一般生育特性および雌穂・粒の特性

一般生育特性を表 11 に示した。「Na71」の初期生育は比較系統並であった。「Na71」の稈長の 2 ヶ年平均値は 214 cm で、「Na65」並であり、着雌穂高の 2 ヶ年平均値は 99 cm で、比較系統よりやや高く、稈径の 2 年平均は 17 mm で、比較系統並であった。「Na71」の葉角度の 2 ヶ年平均値は 17° であり、「Mi29」並で「セミアップライト型」と判断されたが、葉の先端は垂れていた (図 1)。「Na71」の全葉数の 2 ヶ年平均値は 20.0 枚で比較系統より多く、葉長の 2 ヶ年平均値は 85 cm で、他の比較系統よりやや長く、葉幅の 2 ヶ年平均値は 10.0 cm で、「Na65」以外の比較系統並であった。

雌穂および粒の特性を表 12 に示した。「Na71」の雌穂長の 2 ヶ年平均値は 17.8 cm で、比較系統並で、雌穂径の 2 ヶ年平均値は 4.1 cm で、「Mo17Ht」並であった。「Na71」の粒列数の 2 ヶ年平均値は 14.1 列で、「H84」, 「Na65」並であり、一列粒数の 2 ヶ年平均値は 25.2 粒



図 1. Na71 草姿



図2. Na71 雌穂

で比較系統より少なかった。「Na71」の百粒重の2ヶ年平均値は32.8 gで、「Mi29」以外の比較系統並であった。「Na71」の雌穂は「円筒型」(図2)で、子実は「黄色」で、粒型は「中～やや楔」であった。

## 6. 固定度

固定度の値を表13に示した。「Na71」の稈長、着雌穂高、稈径、全葉数、葉長、葉幅の変動係数は、いずれも比較系統並であったことから、既存の自殖系統並の固定度に達していると判定した。

表12. 雌穂および粒の特性<sup>1)</sup>

系統名	雌穂長 (cm)			雌穂径 (cm)			粒列数		
	2008 <sup>2)</sup>	2009 <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>	2008 <sup>2)</sup>	2009 <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>	2008 <sup>2)</sup>	2009 <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>
Na71	15.5	20.1 a	17.8	4.0 ab	4.1 b	4.1 b	14.4 b	13.9 c	14.1 b
Mo17Ht	17.1	17.6 ab	17.4	3.9 b	3.8 c	3.9 b	10.8 c	10.9 d	10.9 c
H84	17.1	17.7 ab	17.4	4.6 ab	4.7 a	4.7 a	16.2 b	16.2 b	16.2 b
Na65	17.0	17.0 ab	17.0	5.1 a	4.9 a	4.9 a	16.2 b	16.4 b	16.2 b
Mi29	14.2	16.8 b	15.4	4.5 ab	4.5 a	4.6 a	20.8 a	19.0 a	19.9 a
系統名	一粒粒数			百粒重 (g)			粒色	粒型	
	2008 <sup>2)</sup>	2009 <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>	2008 <sup>2)</sup>	2009 <sup>2)</sup>	平均 <sup>3)</sup>	'08~'09	'08~'09	
Na71	24.1 b	26.4 b	25.2 c	31.9	33.7 a	32.8 a	黄	中～やや楔	
Mo17Ht	34.2 a	34.7 a	34.5 a	32.2	30.7 b	31.4 a	黄	中	
H84	36.7 a	36.2 a	36.4 a	29.5	30.4 b	30.0 ab	橙	楔	
Na65	35.8 a	34.5 a	35.0 a	30.9	31.3 ab	31.1 a	橙	強く楔	
Mi29	29.6 ab	30.3 ab	30.0 b	27.3	26.9 c	27.1 b	橙	楔～強く楔	

1) 特性分類試験の結果

2) 異文字間に Tukey 検定で5%水準の有意差あり

3) 平均の有意差検定は各試験を反復として算出

表13. 固定度調査<sup>1) 2)</sup>

系統名	稈長		着雌穂高		稈径		全葉数		葉長		葉幅	
	2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009	2008	2009
Na71	4.1	3.6	9.6	5.3	7.8	5.1	3.9	2.1	2.4	4.5	7.0	8.1
Mo17Ht	6.1	3.3	8.7	8.8	10.5	4.7	2.9	2.4	5.1	6.9	9.7	6.3
H84	5.4	4.7	15.1	9.9	12.0	5.5	4.2	3.6	4.0	5.3	9.4	5.9
Na65	6.0	3.8	11.4	9.9	8.8	3.9	2.4	3.9	5.6	3.4	5.0	4.8
Mi29	10.7	4.7	14.7	8.2	7.3	4.1	2.9	3.1	9.0	4.2	9.9	3.2

1) 特性分類試験の結果

2) 値は変動係数 (%)

表14. 「Na71」を片親とする単交配 F<sub>1</sub> 組合せの特性平均値

試験年次	品種・系統名	組合せ数	絹糸抽出期 (月・日)	ごま葉枯病 <sup>2)</sup> (1-9)	紋枯病 <sup>3)</sup> (%)	倒伏 (%)	乾物収量 (kg/a)	同左比 (%)	乾雌穂重 割合 (%)
1996	単交配 <sup>1)</sup>	3	8.12	1.7 **	20.2	40.1	170.8	86	47.2 **
	P3358	-	8.13	2.1	15.9	39.2	198.7	100	53.2
2009	単交配 <sup>1)</sup>	7	7.21	2.3 **	20.7	0.0	186.9	96	48.7 **
	34B39	-	7.19	4.5	13.8	0.0	195.6	100	55.2

1) 「Na71」を片親とするフリント種との単交雑 F<sub>1</sub> 系統の平均値

2) 1: 無～9: 甚の評点, ただし1996年の値は0: 無～5: 甚で評点したものを1: 無～9: 甚に置き換えた値

3) 罹病株率

4) \*\*: 1%で有意差あり

表 15. 「Na71」を種子親とする単交配 F<sub>1</sub> 品種「タカネフドウ」の特性

年次	品種名	絹糸抽出期 (月.日)	稈長 (cm)	着雌穂高 (cm)	ごま葉枯病 <sup>1)</sup> (1-9)	紋枯病 <sup>2)</sup> (%)	倒伏 (%)	乾物収量 (kg/a)	同左比 (%)	乾雌穂重 割合 (%)	乾物率 (%)
2006	タカネフドウ	7.31	272	152	4.3	32.5	0.4	188.7	101	49.2	27.6
	KD777	8. 1	253	137	4.1	45.7	0.9	187.2	100	52.4	25.2
	32K61	7.29	258	133	5.7	18.3	0.0	172.3	92	53.9	29.3
	LSD <sub>.05</sub>	1. 8	ns	8.5	ns	11.7	ns	ns	ns	3.4	0.8
2008	タカネフドウ	7.26	312	162	1.7	39.5	1.3	204.0	114	50.9	28.0
	KD777	7.28	296	157	1.0	34.1	1.3	178.9	100	51.4	26.2
	32K61	7.26	319	154	2.3	17.6	1.8	188.2	105	52.0	27.5
	LSD <sub>.05</sub>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2009	タカネフドウ	7.20	327	167	1.7	36.3	2.7	215.2	118	51.1	24.2
	KD777	7.20	298	152	1.7	54.5	0.4	182.9	100	48.7	22.8
	32K61	7.19	313	145	3.7	39.2	0.4	189.5	104	52.6	24.7
	LSD <sub>.05</sub>	ns	ns	11.6	1.2	ns	ns	19.2	ns	ns	ns
平均	タカネフドウ	7.25	304	160	2.6	36.1	1.5	202.6	111	50.4	26.6
	KD777	7.26	282	149	2.3	44.8	0.9	183.0	100	50.8	24.7
	32K61	7.24	297	144	3.9	25.0	0.7	183.3	100	52.8	27.2
	LSD <sub>.05</sub>	ns	11.5	6.7	0.6	ns	ns	ns	ns	ns	ns

1) 1:無～9:甚の評点

2) 罹病株率

## 7. 組合せ能力

「Na71」を片親とするフリント種自殖系統との単交配 F<sub>1</sub> 組合せの特性平均値を表 14 に示した。「Na71」を片親とする単交配 F<sub>1</sub> 組合せの乾物収量の平均値は、1996 年の組合せ能力検定試験では比較品種「P3358」比で 86%、2009 年の組合せ能力検定試験では比較品種「34B39」比で 96% であった。ごま葉枯病罹病程度および乾雌穂重割合は 1996 年、2009 年ともそれぞれ比較品種である「P3358」, 「34B39」より有意に低かった。したがって、「Na71」のフリント自殖系統との一般組合せ能力は平均的な水準と判定した。

また、「Na71」を種子親, 「CHU68」を花粉親とした単交配 F<sub>1</sub> 品種「タカネフドウ」の畜産草地研究所における特性を表 15 に示した。「タカネフドウ」は同熟期の「KD777」, 「32K61」に比べて乾物収量は高く、ごま葉枯病罹病程度は低かった。

## 考 察

「Na71」の由来は「Na7」<sup>8)</sup> と「Na23」<sup>1)</sup> の単交配であるが、「Na7」は民間会社育成の市販 F<sub>1</sub> 品種の親自殖系統として、また「Na23」は「タチタカネ」<sup>27)</sup> の親自殖系統としてそれぞれ利用された実績がある。しかし、両 F<sub>1</sub> 品種とも「デント種×デント種」の F<sub>1</sub> 品種であり、フリント種との組合せによる市販 F<sub>1</sub> 品種は育成されていない。しかし、「Na7」の組合せ能力は平均的な水準

にあること<sup>8)</sup>、また「Na23」についてはフリント種との組合せで能力が高いとされている<sup>1)</sup>。これらを母材として育成された「Na71」は一般組合せ能力が平均的な水準と判定されたものの、「Na71」を種子親とし、フリント種である「CHU68」<sup>17)</sup> を花粉親として長野県野菜花き試験場が育成した「タカネフドウ」<sup>16)</sup> は東北南部から関東・東山地域に適した中生品種で、同熟期の標準品種「KD777」, 「32K61」より 8～9% 多収であり、高い収量性を示した。しかし、アメリカのトウモロコシ単収は現在も子実生産では年間 2 kg/a、率にして 1～2% 増加しており<sup>29)</sup>、トウモロコシは今後も育種による収量増加は進むと考えられる。そのため、我が国のトウモロコシ単収の向上のためにも、一般的な水準の組合せ能力ではなく、より高い組合せ能力を持つ優良な親自殖系統を開発する必要がある。

トウモロコシの重要な形質の一つとして耐倒伏性があげられる。今回の「Na71」の特性調査を行った 2ヶ年の試験では倒伏の発生は認められず、耐倒伏性の判定を行うことはできなかった。倒伏は台風などの強い風雨によって発生するため、必ずしも毎年発生するとは限らない。このため耐倒伏性を的確に評価するには、通常、数年間の試験を要する。耐倒伏性の評価を行う方法として、倒伏の発生を助長する晩播・密植下での検定法<sup>7)</sup>、根の引抜き抵抗、重心高、および生体重の 3 形質から判別関数値を算出する検定法<sup>12)</sup>、基部固定による引倒し力、稈長、および着雌穂高を測定し、それから指標値を算出

する検定法<sup>15)</sup>などが提案されている。しかし、近年の親自殖系統は全体に耐倒伏性が向上したことも影響していると推察されるが、晩播・密植法でも倒伏の発生頻度は高くないことから、畜産草地研究所では晩播・密植法は実施していない。また、引抜き抵抗値を用いた判別閾値による方法は労力がかかるなど育種の現場で行うには限界がある。さらに、引倒し力を用いた指標値による親自殖系統の耐倒伏性の評価は系統×年次の交互作用が大きく、F<sub>1</sub>系統ほど精度が高くないことが問題として残っている<sup>15)</sup>。このため「Na71」の耐倒伏性を評価するための検定試験については実施をしなかった。しかし、「Na71」の構成由来となった「Na7」の引抜き抵抗力は、耐倒伏性が強いランクに属するF<sub>1</sub>品種並に強く、「Na7」を用いた複数のF<sub>1</sub>組み合わせでも耐倒伏性が優れた結果を示している<sup>8)</sup>。また、1996年に行った「Na71」を用いたF<sub>1</sub>組合せ能力検定試験での倒伏の発生割合も耐倒伏性に強い市販F<sub>1</sub>品種と同程度であったこと(表14)、「Na71」を用いたF<sub>1</sub>品種「タカネフドウ」も標準品種より「やや強い」と判定されている<sup>16)</sup>ことから、「Na71」を用いたF<sub>1</sub>組合せについて、実用品種と同程度以上の耐倒伏性は期待できるものと考えられる。

温暖地や暖地で高頻度に発生するごま葉枯病に罹病すると、収量の低下だけでなく、病斑部の細胞が病害による被害を受けることによって高消化性成分である可溶性糖類等が流出し、総体的に高消化性成分の割合が低下するため、茎葉の消化率およびTDN含量が減少する<sup>13)</sup>。そのため、ごま葉枯病抵抗性は温暖地および暖地向けのサイレージ用トウモロコシ育種では非常に重要な特性である。これまで温暖地や暖地向けに育成された親自殖系統はそのほとんどがごま葉枯病抵抗性が「強」以上であり、今回育成した「Na71」についても、「Na71」および「Na71」を片親とした単交配F<sub>1</sub>組合せともにごま葉枯病抵抗性は強かった(表6, 表14)。ごま葉枯病は畜産草地研究所において自然発病のみで十分に選抜できる状況であることから、抵抗性が強い親自殖系統を選抜できたものと考えられ、今後ともごま葉枯病抵抗性については高いレベルの親系統育成が期待できるものと思われる。

近年、トウモロコシにおいて、家畜への毒性が問題となる赤かび病<sup>2,18,19,20,24)</sup>や茎内部が空洞化し、個体全体が枯れ上がる根腐病<sup>10,28,30)</sup>などの病害が問題となっている。これらの病害については抵抗性検定法の確立と抵抗性の系統間差異の把握に取り組んでいる段階であるが、「Na71」についてこれらの病害に対する抵抗性がどのレベルに位置するのか、今後明らかになるとと思われる。

これまで草地試験場時代も含めて畜産草地研究所が育成した親系統を利用して公的機関が育成したF<sub>1</sub>品種には草地試験場が育成した「ナスホマレ」<sup>22)</sup>のほか、長野県中信農業試験場が育成した「タチタカネ」<sup>27)</sup>、「タカネスター」<sup>25)</sup>、九州沖縄農業研究センターが育成した「ゆめそだち」<sup>5)</sup>、「なつむすめ」<sup>26)</sup>がある。このうち「ナスホマレ」については、草地試験場で育成した親自殖系統を両親に用いたF<sub>1</sub>品種である<sup>22)</sup>が、他の品種はもう一方の親自殖系統はそれぞれF<sub>1</sub>品種を育成した試験場で育成したものである<sup>5,25,26,27)</sup>。このように育成機関の間で、それぞれが育成した親自殖系統を相互に交換を行うことで、多くのF<sub>1</sub>組合せを作成することが可能となる。その結果として、優良F<sub>1</sub>品種が育成される可能性がより高まることが期待できる。そのため、親自殖系統の育成を行い、その親自殖系統を他機関のF<sub>1</sub>品種育成に利用してもらうことも、F<sub>1</sub>品種の育成と同様に意義のあることと考える。今後は親自殖系統の利用先を公的育成機関だけでなく、民間種子会社にも広げることも重要であると考えられる。

以上のように「Na71」は、組合せ能力は平均的であるものの、ごま葉枯病、すす紋病などの病害抵抗性に優れるため、親親自殖系統としての利用価値は高く、本系統を利用することにより実用的な水準のF<sub>1</sub>品種を育成することが可能であると考えられる。

## 引用文献

- 1) 大同久明・井上康昭・門馬榮秀・加藤章夫・村木正則・濃沼圭一・望月昇(2001). サイレージ用トウモロコシ一代雑種親自殖系統「Na23」の育成とその特性, 草地試研報, 60, 25-31.
- 2) 江原靖博・三木一嘉・岡部郁子(2011). 飼料用とうもろこしF<sub>1</sub>の赤かび病抵抗性検定における病原菌接種時期の検討, 日草誌, 57(別), 94.
- 3) Elliott, C. and Jenkins, M.T. (1946). *Helminthosporium turcicum* leaf blight of corn, *Phytopathology*, 36, 660-666.
- 4) Fisher, D.E., Hooker, A.L., Lim, S.M. and Smith, D.R. (1976). Leaf infection and yield loss caused by four *Helminthosporium* leaf diseases of corn, *Phytopathology*, 66, 942-944.
- 5) 池谷文夫・濃沼圭一・伊東栄作(1998). サイレージ用トウモロコシの新品種「ゆめそだち」の育成とその特性, 九州農試報告, 35, 49-69.
- 6) 池谷文夫・濃沼圭一・伊東栄作・井上康昭・野崎國

- 彦・藤田勝見・望月昇 (1999). サイレージ用トウモロコシ F<sub>1</sub> 親自殖系統「Mi29」の育成とその特性, 九州農試報告, 35, 71-83.
- 7) 井上康昭・岡部俊 (1981). 密植・晩播によるトウモロコシの耐倒伏性評価, 北海道農試研報, 129, 17-23.
- 8) 井上康昭・望月昇・濃沼圭一・加藤章夫 (1991). トウモロコシ耐倒伏性 F<sub>1</sub> 親系統 Na7 の育成とその特性, 草地試研報, 45, 43-51.
- 9) 伊東栄作・池谷文夫・濃沼圭一・江口研太郎 (2004). サイレージ用トウモロコシの新品種「ゆめちから」の育成とその特性, 九沖農研報, 43, 1-25.
- 10) 伊東栄作・佐藤尚・黄川田智洋 (2009). F<sub>1</sub> 組合せでの発病個体率に基づくトウモロコシ親自殖系統の根腐病抵抗性の評価, 日草誌, 55 (別号), 194.
- 11) Hallauer, A.R., Russel, W.A. and Lamkey, K.R. (1988). Corn breeding, in Corn and corn improvement 3 rd ed, 463-469, ASA, CSSA and SSSA Madison, Wisconsin, USA.
- 12) 石毛光雄・山田実・志賀敏夫 (1983). 判別関数を用いた耐倒伏性の評価とその計量遺伝的検討, 農技研報, D35, 125-152.
- 13) 伊澤弘一 (1983). 病害による牧草・飼料作物の質的被害に関する研究 III. ヘルミントスポリウム病菌に感染した飼料作物の飼料成分の変化, 草地試研報, 24, 41-55.
- 14) 黄川田智洋・井上康昭・門馬榮秀・大同久明・加藤章夫・濃沼圭一・村木正則・伊東栄作 (2011). サイレージ用トウモロコシ一代雑種親自殖系統「Na65」の育成とその特性, 畜草研報, 11, 11-18.
- 15) 濃沼圭一・池谷文夫・伊東栄作 (1998). 引倒し力によるトウモロコシ転び型倒伏抵抗性の非破壊・計量的検定法, 日草誌, 43, 424-429.
- 16) 三木一嘉・江原靖博・矢ヶ崎和弘・袖山栄次・澤野史・佐藤尚 (2011). 耐倒伏性, 多収のサイレージ用中生とうもろこし品種「タカネフドウ」の育成, 北陸作物学会報, 46, 9-13.
- 17) 三木一嘉・江原靖博・矢ヶ崎和弘・袖山栄次・澤野史・佐藤尚・重盛勲・前島秀和 (2010). サイレージ用トウモロコシ一代雑種新規自殖系統「CHU68」, 畜産草地研究成果情報, 9, 78.
- 18) 三木一嘉・江原靖博・岡部郁子・月星隆雄 (2010). サイレージ用トウモロコシ F<sub>1</sub> におけるかび毒含量の品種間差異と年次変動, 日草誌, 56 (別), 84.
- 19) 湊啓子・飯田憲司・山川政明・吉田昌幸 (2010). 2009年北海道十勝管内で栽培した飼料用トウモロコシ8品種における赤かび病の発生とデオキシニバレノール, 日草誌, 56 (別), 198.
- 20) 湊啓子・山川政明・飯田憲司 (2011). 飼料用トウモロコシ用赤かび病菌 (*Fusarium graminearum*) 接種のための器具作成とその実用, 日草誌, 57 (別), 191.
- 21) 望月昇 (1982). 最近のトウモロコシ品種と育種事情[3]海外の育種と日本の育種(2), 農業および園芸, 57, 1109-1114.
- 22) 村木正則・門馬榮秀・井上康昭・加藤章夫・濃沼圭一 (1999). トウモロコシ (*Zea mays* L.) 茎葉高消化性早生品種「ナスホマレ」の育成, 草地試研報, 58, 1-15.
- 23) 農林水産技術会議事務局・農業技術研究機構畜産草地研究所・家畜改良センター (2001). 飼料作物系統適応性検定試験実施要領 (改訂5版), 飼料作物特性検定試験実施要領 (改訂3版), 飼料作物地域適応性検定試験実施要領, 農業技術研究機構畜産草地研究所, 59p., (畜草研資料, 平成13-1)
- 24) 岡部郁子・三木一嘉・江原靖博・平岡久明・菅原幸哉・月星隆雄 (2011). 赤かび病有傷接種による飼料用トウモロコシ品種のフモニシン蓄積抵抗性評価と自然感染による評価の差異, 日草誌, 57 (別), 194.
- 25) 佐藤尚・澤野史・重盛勲・前島秀和・三木一嘉 (2008). サイレージ用トウモロコシ品種「タカネスター」の育成とその特性, 長野中信農試報, 18, 11-24.
- 26) 澤井晃・村木正則・伊東栄作・江口研太郎 (2008). 南方さび病に強く TDN 多収の晩播・夏播き用トウモロコシ新品種「なつむすめ」, 畜産草地研究成果情報, 7.
- 27) 重盛勲・三木一嘉・前島秀和・西牧清・高松光生 (1998). 飼料用とうもろこし品種「タチタカネ」の育成とその特性, 長野中信農試報, 14, 51-69.
- 28) 菅原幸哉・黄川田智洋・月星隆雄・玉置宏之・三ッ橋昇平 (2011). トウモロコシ品種・系統の根腐病発病程度の幼病検定と圃場検定での比較, 日草誌, 57 (別), 92.
- 29) Troyer, A.F. (2006). Adaptedness and heterosis in corn and mule hybrids, Crop sci, 46, 528-543.
- 30) 月星隆雄・菅原幸哉・米田正彦・佐藤尚・岡部郁子 (2011). トウモロコシ根腐病菌としての *Pythium arrhenomanes* の病原追加およびリードカナリーグラスの葉枯症状の病原解明, 日草誌, 57 (別), 93.

## Development and Characteristics of New Inbred Line “Na71” of Silage Maize

Hisashi SATO, Yasuaki INOUE<sup>a</sup>, Eihide MONMA<sup>a</sup>, Keiichi KOINUMA<sup>b</sup>, Akio KATO<sup>c</sup>,  
Masanori MURAKI<sup>d</sup>, Eisaku ITO<sup>b</sup> and Tomohiro KIKAWADA<sup>b</sup>

Forage Crop Research Division,  
NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Nasushiobara, 329-2793 Japan

### Summary

A new maize inbred line “Na71” was developed at the NARO Institute of Livestock and Grassland Science. “Na71” was applied for a registration of the Seed Protection Law controlled by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries in 2010.

“Na71” was developed from the single cross “Na7 x Na23”. Inbred “Na7” is derived from “P3424”, a hybrid introduced from United States and inbred “Na23” was developed from “(Oh43Ht x H84) x H84”. Both “Na7” and “Na23” belong to a dent group in the United States. Selection and selfing were carried out continuously for six generations.

“Na71” is classified into the medium-late maturity group in the Honshu region in Japan. “Na71” shows high level resistance to southern leaf blight (*Cochliobolus heterostrophus*), northern leaf blight (*Setosphaeria turcica*), smut (*Ustilago maydis*), and medium level resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*). “Na71” has a medium-long stalk length, semi-upright leaves, and tall ear height, and nearly 14 kernels rows on each ear. The seed yield is about 30 kg/a. “Na71” shows medium combining ability with flint inbred lines.

“Na71” is the seed parent of a single-cross hybrid cultivar “Takanefudo” which was developed at the Nagano vegetable and ornamental crops experiment station.

**Key words:** *Zea mays* L., inbred line, dent, combining ability, southern leaf blight

---

<sup>a</sup> Retired

<sup>b</sup> Present address: NARO Hokkaido Agricultural Research Center, Sapporo, 062-8555 Japan

<sup>c</sup> Present address: Kyoto Prefecural University, Kyoto, 606-8522 Japan

<sup>d</sup> Present address: NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, Miyakonojo, 885-0091 Japan

## シバ品種「朝駆」および「朝萌」の育成

小林真・蝦名真澄・春日重光<sup>a</sup>・奥村健治<sup>b</sup>・高井智之<sup>c</sup>・荒谷博<sup>d</sup>・鶴見義朗<sup>e</sup>・中川仁<sup>f</sup>

農研機構畜産草地研究所 飼料作物研究領域, 那須塩原市, 329-2793

## 要 約

高知県で収集した生態型「南国9」を元に栄養系選抜によって品種を育成し、「朝駆」として2002年に品種登録した。また、山口県で収集した生態型「方便山4」を元に栄養系選抜によって品種を育成し、「朝萌」として2004年に品種登録した。「朝駆」は匍匐茎の伸長性と春の草勢に優れ葉幅が広いことが特徴であり、傾斜地に立地し機械作業が困難であるため栽植密度を高く設定できない放牧地の造成を想定して、京都府淀高原総合牧場、高知県畜産試験場、家畜改良センター長野牧場および同センター熊本牧場における地域適応性試験および、宮崎県畜産試験場における放牧適性特性検定試験に供試し、それぞれの栽培環境における特性を明らかにした。「朝萌」は匍匐茎の伸長性に優れ、葉長・葉幅が大で初期生育に優れるほか、匍匐茎の密度・芝密度が大であるなどの特性を有する。これらの特徴から「朝萌」は芝生利用を想定して、主に夏期に利用されるスポーツグラウンドのポット苗による造成・管理試験に供試し、通常の張芝施工による造成より年数がかかるものの、大幅な低コスト化を達成できた。

キーワード：シバ, 朝駆, 朝萌, 放牧, 芝生

## 緒 言

シバ (*Zoysia japonica* Steud.) は我が国を含む東アジアを原産地とし、アジア大陸東部から我が国にかけて自生域が分布しており、我が国では北海道南部が北限、小笠原諸島・大隅諸島が南限とされている。コウシュンシバ (*Z. matrella* (L) Merr.) は我が国の九州からミクロネシア、ニューギニア島、マダガスカル島北部に達し、インドを経て東南アジアに至るまでの広大な地域の沿岸部に分布している。コウライシバ (*Z. tenuifolia* Willd.) は中国東部沿岸からハワイ諸島・ソロモン諸島に至る地域に分布している。

我が国の *Zoysia* 属植物は、東北以南では、古くから放牧地において自生の地域在来系統が飼料資源として利用されているほか、主要な芝草として庭園・公園等で利

用されている。しかし、特性が明確で安定した品種が育成され品種登録されるのは1995年以降であり、それまでは産地の名称や茎葉の大きさによって在来系統として区分され流通していた<sup>4)</sup>。しかし遺伝的な純度が確保されていない系統や特性が明確にされていない系統もあり、優秀な品種を育成し種苗を安定的に供給することが求められていた。

畜産草地研究所では、草地試験場当時の1991年から全国の公立試験研究機関・普及機関の協力を得てシバ遺伝資源の収集を行い<sup>10)</sup>、優れた特性を有する系統の選抜を行った。この中で栄養系選抜によって「朝駆」および「朝萌」を育成したのでその経過と特性の詳細を報告する。

2012年9月28日受付, 2012年12月7日受理

<sup>a</sup> 現 信州大学

<sup>b</sup> 現 農研機構北海道農業研究センター

<sup>c</sup> 現 農研機構九州沖縄農業研究センター

<sup>d</sup> 現 明治大学

<sup>e</sup> 退職

<sup>f</sup> 現 国際農林水産業研究センター

## 材料および方法

### 1. 「朝駆」の育成および特性調査

1991年から1992年にかけて全国の公立試験研究機関等の協力を得て収集したシバ遺伝資源について形態・生理・生態的特性の調査を行った<sup>10)</sup>。この調査で、高知県南国市で収集したエコタイプ「南国9」（後に「朝駆」と付名）は、匍匐茎の伸長性や葉身の大きさにおいて明確な区別性を示したため、種苗法に基づく品種登録に向けて特性調査を開始した。

特性調査には「朝駆」と品種登録の標準品種である「Emerald」・「Meyer」を供試した。「Emerald」はアメリカ合衆国において朝鮮半島原産のシバにグアム原産のコウライシバを交雑して1955年に育成された品種であり、「Meyer」は朝鮮半島北部の生態型から栄養系選抜され、1951年にアメリカ合衆国で育成された品種である<sup>1)</sup>。両標準品種とも匍匐茎の伸長性や葉長・葉幅が小さい園芸用品種であり、「朝駆」との比較として十分でないため、生育旺盛な芝草品種としての評価が定まっている「みやこ」（品種登録第4300号、育成：株式会社ジェイター）も比較品種として供試した。

試験方法は「昭和57年度種苗特性分類調査報告書」に準じて畜産草地研究所試験圃場（栃木県那須塩原市）で行い<sup>11)</sup>、1997年7月7日に各品種3節程度の茎葉を挿苗法で定植し、1998年11月まで実施した。試験は2m間隔に5個体/系統を栽植し形態的形質を調査する個体植え区と、1.5m四方の試験区内に15cm間隔の格

子状に100個体/区栽植し病害抵抗性や芝生形質を調査する密植区で行い、いずれも3反復で試験区を設けた。

### 2. 「朝駆」の地域適応性試験

育成地以外の地域における適応性を評価するため、1999年から2001年まで地域適応性試験を行った。地域適応性試験実施要領は、系統適応性検定試験に準じて定められた<sup>6)</sup>、草高の低いシバの刈取収量は、地面の凹凸・刈取方法・刈高・刈取頻度に大きく影響され、これら刈取条件を統一して評価するのは困難であるため、収量に係る項目は設けなかった（表1）。このほか、調査方法は試験機関の意向により変更可能とした。

地域適応性検定試験は、京都府嵯高原総合牧場（現：京都府農林水産技術センター畜産センター嵯高原牧場、京丹後市）、高知県畜産試験場（高岡郡佐川町）、家畜改良センター長野牧場（現：茨城牧場長野支場、佐久市）、同熊本牧場（玉名郡横島町）で実施した。試験区は1区0.8m四方に、畜産草地研究所が育苗・提供した5cm角のポット苗を0.2m間隔で定植し、「朝駆」・「Meyer」・「みやこ」の供試を原則としたが、試験機関の意向により変更可能とした。

施肥基準として、基肥はN:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O同量で3~5g/m<sup>2</sup>を定植苗活着後に散布し、追肥は同量を上限と定めたが、検定試験地の標準施肥法に準じて改変可能とした。堆肥・石灰・熔成燐肥などの土壌改良材は施用不要とした。

京都府嵯高原総合牧場においては、「朝駆」・「笠山系」

表1. シバ地域適応性試験の調査項目と調査方法

項目	調査基準	表示法	区分	備考
定着の良否	定植後30~60日頃の生育程度を観察	1:極不良~9:極良	A	定植年のみ調査
初期生育	定着後茎葉が伸長し始める頃に生長程度を観察	1:極不良~9:極良	B	定植年のみ調査
秋の草勢	紅葉前の草勢を観察	1:極不良~9:極良	B	定植年から毎年調査
紅葉の早晩	茎葉の半分が褐色化した時期を観察	月/日	B	定植年から毎年調査
緑化の早晩	区全体に茎葉の伸長が認められた時期を観察	月/日	B	定植翌年以降毎年調査
越冬性	越冬後の枯死程度を観察	1:極不良~9:極良	B	定植翌年以降毎年調査
春の草勢	晩春頃の出穂前の草勢を観察	1:極不良~9:極良	B	定植翌年以降毎年調査
匍匐茎長	地上匍匐茎の伸長程度を観察	1:極不良~9:極良	B	定植翌年以降、最初の刈払前に調査
草高	草冠の高さを6カ所/区測定	0.1cm	A	区の周辺部を避けて刈払前に測定
被度	試験区面積に占めるシバの割合を観察	%	A	定植翌年以降、最初と最後の刈払後に調査

その他検定試験地が必要と認めた事項

注:Aは必須調査項目、Bは品種・系統間差が認められた場合に調査する。なお、B区分の項目において品種間差が認められなかった場合は、その旨試験報告書に記載し欠測でないことを明らかにする。

観察評価は相対評価とするため、年次間・検定場所間の比較には注意が必要である。

(同牧場内自生系統)・「西ノ島系」(島根県隠岐郡由来)・「吾妻山系」(広島県比婆郡由来)・「高知系」(高知県畜産試験場由来)の1ヶ月育苗したセルトレイ苗を供試して、1999年6月28日に1m四方の試験区に1本/区の密度・3反復で定植した。

高知県畜産試験場においては、「朝駆」および「在来系統」(同場由来)を供試して挿苗法(1m四方の試験区に匍匐茎6本を定植)および張芝法(1m四方の試験区中央に30cm四方のソッド1枚を定植)で1999年6月4日に定植した。挿苗法では両品種・系統とも3反復としたが、張芝法では「朝駆」のみ3反復で「在来系統」は1反復とした。

家畜改良センター長野牧場においては、「朝駆」・「Meyer」・「みやこ」を供試して1999年6月9日に5cm角のポット苗を16個体ずつ、1m<sup>2</sup>の試験区に定植し3反復で試験を行った。

家畜改良センター熊本牧場においては、「朝駆」・「Meyer」・「みやこ」を供試して1999年6月10日に5cm角のポット苗を16個体ずつ、0.64m<sup>2</sup>(0.8m四方)の試験区に定植し、3反復で試験を行った。

### 3. 「朝駆」の放牧適性特性検定試験

放牧適性特性検定試験は、宮崎県畜産試験場(西諸県郡高原町)において1999年から2002年に放牧適性特性検定試験実施要領に準じて実施した(表2)。試験面積は1区面積を20m<sup>2</sup>とし、畜産草地研究所が提供した5cm角のポット苗を1999年9月20日に1本/m<sup>2</sup>の密度

で定植し、「朝駆」、「Meyer」および「みやこ」を供試した。放牧処理はホルスタイン乾乳牛6頭から9頭をシバの生育に合わせて放牧した。

### 4. 「朝萌」の育成および特性調査

「朝駆」と同じく収集した遺伝資源<sup>10)</sup>の中で、山口県阿武郡旭村で収集したエコタイプ「方便山4」(後に「朝萌」と付名)は芝生密度が高く匍匐茎の伸長性も「朝駆」に次いで良好であったため、種苗法に基づく品種登録に向けて特性調査を開始した。

特性調査は、「朝萌」・「Emerald」・「Meyer」・「みやこ」を供試して行った。試験方法は「昭和57年度種苗特性分類調査報告書」に準じて行い、1998年7月8日に9cm径ポリポット苗を定植し、1999年11月まで実施した。試験は2m間隔に5個体/品種を栽植し形態的形質を調査する個体植え区と、1.5m四方の試験区内に15cm間隔の格子状に100個体/区栽植し病害抵抗性や芝生形質を調査する密植区で行い、いずれも3反復で試験区を設けた。

### 5. 「朝萌」のグラウンド造成実証試験

栃木県那須郡那須町の民宿所有のグラウンド(約100m四方の1ha、標高415m)で芝生造成および管理の現地試験を行った。このグラウンドは利用が夏期に集中するため、シバの全面被覆を目的とするが、通常の張芝施工では1haの芝生化に10,000m<sup>2</sup>(べた張り)から5,000m<sup>2</sup>(市松張りまたは筋張り)のソッド(マット状のシ

表2. 放牧適性特性検定試験の調査項目と調査方法

項目	調査基準	表示法	区分	備考
定着の良否	定植後30～60日頃の生育程度を観察	1:極不良～9:極良	A	定植年のみ調査
初期生育	定着後茎葉が伸長し始める頃に生長程度を観察	1:極不良～9:極良	B	定植年のみ調査
秋の草勢	紅葉前の草勢を観察	1:極不良～9:極良	B	定植年から毎年調査
紅葉の早晚	茎葉の半分が褐色化した時期を観察	月/日	B	定植年から毎年調査
緑化の早晚	区全体に茎葉の伸長が認められた時期を観察	月/日	B	定植翌年以降毎年調査
越冬性	越冬後の枯死程度を観察	1:極不良～9:極良	B	定植翌年以降毎年調査
春の草勢	晩春頃の出穂前の草勢を観察	1:極不良～9:極良	B	定植翌年以降毎年調査
匍匐茎長	地上匍匐茎の伸長程度を観察	1:極不良～9:極良	B	定植翌年以降、最初の放牧直前に調査
放牧前草高	草冠の高さを10カ所/区測定	0.1cm	A	各放牧ごとに測定
放牧前草量	地上部草量を観察	1:極不良～9:極良	A	各放牧ごとに測定
残食草高	草冠の高さを10カ所/区測定	0.1cm	A	各放牧ごとに測定
残食草量	地上部草量を観察	1:極不良～9:極良	B	各放牧ごとに測定
草高利用率	(放牧前草高-残食草高)÷放牧前草高	%	A	
採食程度	可食部分の採食された程度を観察	1:極不良～9:極良 または%	A	各放牧の途中または放牧後に調査
被度	試験区面積に占めるシバ・雑草・裸地の割合を観察	%	A	定植翌年以降、最初の放牧前と最終放牧後に調査
その他検定試験地が必要と認めた事項				

バ苗)が必要であり,種苗代だけで数100万円に達する。低コスト化を図るため,播種による早期造成が容易だが越夏性・永続性に劣る寒地型芝草と,越夏性・匍匐茎の伸長性に優れるシバが補完し合う方法として,寒地型芝草の播種とシバ「朝萌」のポット苗定植を併用する方法で試験を行った。

グラウンドの既存植生である在来シバおよび雑草を撤去・整地した後,シバ定植に先行して1999年10月にトールフェスクおよびケンタッキーブルーグラスの芝草品種を播種した。播種量は芝草としての推奨量(トールフェスク:300~500 kg/ha,ケンタッキーブルーグラス:150~200 kg/ha)より大幅に少ない各50 kg/haとした。2000年5月に南東側半分の50 a (50 m×100 m)において,トールフェスクおよびケンタッキーブルーグラス立毛間に「朝萌」の7.5 cm径ポリポット苗を平均0.6個体/m<sup>2</sup>のごく低い密度で定植した。シバの定植を50a部分に限ったのは,シバの定植密度を維持して部分的であっても早期に芝生化するためである。

芝生の管理は1ha全面について,4月から10月の間に月2回の頻度で芝刈・集草する計画を立てたが,刈幅0.7 mの乗用ロータリモアしか使用できなかった2000年および2001年は月1回以下の芝刈・無集草に留まった。2002年からは刈幅1.5 mのロータリモアと集草機を装備した20馬力の芝生管理用トラクタを導入し,計画通

りの芝刈・集草を達成した。

調査は,2001年から2005年にかけて,「朝萌」を定植した南東側の50 aにおいて行った。調査の都度,長辺に平行なトランセクト(調査基準線)2本を設置して,各トランセクト上に5 m間隔で(2001年は10 m間隔)調査区を設けた。各調査区では50cm角のコドラートを2点隣接して置き,目視調査によりコドラート内の植生をシバ・トールフェスク・ケンタッキーブルーグラス・雑草(前記3草種以外)・裸地の5分別として被覆率を記録した。コドラート2点の平均値を調査区のデータとした<sup>5)</sup>。単一な芝生の仕上がりを望む民宿経営者の意向のため,複数のシバ品種や造成・管理条件の比較は行わなかった。

## 結 果

### 1. 「朝駆」の特性調査

特性調査の結果,「朝駆」は多くの形質において標準品種「Emerald」・「Meyer」および比較品種「みやこ」との間に有意差が認められた。特に匍匐茎の長さ(定植3ヶ月後:62.9 cm,定植13ヶ月後:146.7 cm)は他の3品種より顕著に長く,葉幅が4.8 mmと広い特徴があった(表3~表4)。なお,1997年7月から1998年11月までの試験期間中には「朝駆」は出穂しなかったため,穂・

表3. 「朝駆」の特性調査結果(畜産草地研究所, 個体植えでの調査項目)

品種	草型	匍匐茎の長さ(cm)		葉長(cm)	葉幅(mm)	葉色	初期生育	春秋の出穂の有無	晩秋の緑度
	極直立:1~ 極匍匐:9	定植 3ヶ月後	定植 13ヶ月後						
朝駆	5.9 n.s.	62.9 a	146.7 a	8.8 a	4.8 a	4.3 b	6.1 a	1	3.3 c
Emerald	7.1	18.6 bc	28.8 c	3.8 c	1.9 d	5.2 a	4.2 b	2	5.0 b
Meyer	5.8	10.0 c	19.7 c	4.4 bc	3.2 c	6.1 a	4.9 ab	2	2.4 c
みやこ	6.8	36.8 b	60.1 b	7.6 ab	4.2 b	3.9 b	6.1 a	4	6.3 a

注:Tukeyの多重比較の結果,異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

表4. 「朝駆」の特性調査結果(畜産草地研究所, 密植での調査項目)

品種	春の草勢	秋の草勢	再生の良否	シバさび病 抵抗性	緑化の早晩	紅葉の早晩	越冬の良否	越夏の良否
	極不良:1~ 極良:9	極不良:1~ 極良:9	極不良:1~ 極良:9	極弱:1~ 極強:9	4月1日 起算日数	11月1日 起算日数	極不良:1~ 極良:9	極不良:1~ 極良:9
朝駆	6.3 a	6.7 b	3.7 b	5.0 b	9.3 b	26.0 b	7.7 a	8.0 n.s.
Emerald	2.3 b	3.3 c	6.0 a	5.0 b	15.3 a	17.3 c	3.7 b	8.0
Meyer	3.0 b	3.3 c	5.0 a	3.3 c	11.3 ab	17.3 c	4.7 b	8.0
みやこ	5.3 a	8.0 a	3.7 b	6.3 a	8.0 b	38.0 a	7.7 a	8.0

注:Tukeyの多重比較の結果,異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

小穂・種子に関する形質は調査できなかった。

以上の結果から、「朝駆」は標準品種および比較品種に対して区別性があると判断した。種苗法に定める品種登録の要件である均一性・安定性は栄養繁殖であるため確保できており、未譲渡性も問題ないため、1999年3月15日に出願し2002年9月4日に第10487号として登録された。

2. 「朝駆」の地域適応性試験

1) 京都府碓高原総合牧場

1999年10月に1区を400分割した升目（5cm四方）における匍匐茎の有無で判定した被度では、「朝駆」は61.5%であり、「高知系」（81.9%）、「吾妻山系」（75.0%）、「笠山系」（72.3%）より低く、「西ノ島系」（55.4%）より高かった。草高は、1999年10月では「朝駆」は6.6cmであり、「高知系」（10.9cm）より5%水準で有意に低く、2000年9月では6.1cmと「吾妻山系」（8.1cm）・「高知系」（8.0cm）より有意に低かったほか、2000年10月までの5回の調査では供試品種・系統の中で概ね低く推移した。その他の生育特性は、定着の良否・初期生育・秋の草勢（1999年9月）・紅葉期・越冬性は中庸程度、春の草勢（2000年5月）は「朝駆」は2.8、「笠山系」・「吾妻山系」・「高知系」は4.3、秋の草勢（2000年9月）は「朝駆」は3.2、「高知系」は6.0と低い値を示した<sup>3)</sup>。

2) 高知県畜産試験場

草丈は挿苗法では1999年は「在来系統」が10.4～12.6cmと「朝駆」（8.3～12.0cm）より高く、2000年は夏期に「朝駆」が11.2～11.9cmと「在来系統」よりやや高い値を示した他はほぼ同程度であった。張芝法

では1999年は朝駆が7.9～24.7cmと「在来系統」より高く、2000年は5月と刈取後の9月に「在来系統」がそれぞれ23.2cm・19.6cmと高い値を示したほかは、「朝駆」が7.8～24.7cmと高く推移した（表5）。張芝法での葉身の緑度（SPAD値）は、2000年11月において「朝駆」は27.8と「在来系統」より低く、初冬の緑度が低下しやすい傾向があった（表6）。張芝法において2000年8月に刈り取った乾物収量は、「朝駆」が81.2g/m<sup>2</sup>と「在来系統」の1.5倍を示した。

3) 家畜改良センター長野牧場

「朝駆」は緑化の早晩では19.0と「Meyer」・「みやこ」より遅く、匍匐茎長では52.6cmと「Meyer」・「みやこ」より長く、草高では7.1cmと「Meyer」より高く、これらの形質については5%水準で有意差が認められた（表7～8）。

4) 家畜改良センター熊本牧場

「朝駆」は定着の良否（8.3）・初期生育（8.3）でそれぞれ「Meyer」および「みやこ」より優れ、緑化の早晩では2000年は24.0と「Meyer」・「みやこ」より遅であった（表9）<sup>7)</sup>。春の草勢は7.0と「Meyer」・「みやこ」より優れ、匍匐茎長では1999年7月は7.7と「Meyer」・「みやこ」より、2000年5月は8.3と「みやこ」より長かった。草高では2000年6月の8.5cm・2000年10月の6.9cmと「Meyer」より高く、被度では2000年5月では92.3%と「Meyer」・「みやこ」より低かった（表10）<sup>7)</sup>。これらはいずれも5%水準で有意であった。

以上の結果から、高知県畜産試験場における張芝法、家畜改良センター長野牧場および同熊本牧場において、育成地である畜産草地研究所とほぼ同様に草丈・草高・

表5. 草丈 (cm) の推移 (高知県畜産試験場)

	年 月	1999					2000							
		8	9	10	11	12	4	5	6	7	8	9	10	11
挿苗法	朝駆	8.3	9.9	12.0	11.1	9.7	4.0	7.3	9.2	11.9	11.2	10.8	10.5	8.9
	在来系統	10.4	11.8	12.6	11.8	11.5	4.6	7.7	9.3	10.0	9.7	10.0	10.0	10.5
張芝法	朝駆	7.9	20.2	24.7	23.6	20.3	7.8	20.2	24.7	23.6	20.3	13.9	18.0	15.0
	在来系統	6.0	14.4	14.6	14.5	14.4	6.0	23.2	14.6	14.5	14.4	19.6	12.0	8.5

張芝法では2000年8月の調査後に刈取調査を実施した。

表6. SPAD 値の推移 (高知県畜産試験場)

	年 月	1999				2000						
		9	10	11	12	5	6	7	8	9	10	11
朝駆		32.8	32.8	26.2	20.8	31.1	25.9	28.1	29.9	33.1	31.7	27.8
在来系統		32.8	31.1	26.3	25.8	28.5	26.9	28.8	25.2	31.9	31.2	30.7

ミノルタ葉緑素計 SPAD-502 を使用した。

表7. 地域適応性試験結果 (家畜改良センター長野牧場, その1)

品種	定着の良否		初期生育		秋の草勢		紅葉の早晚		緑化の早晚		越冬性		春の草勢	
	1999年7月2日		1999年7月14日		1999年10月13日		1999年10月1日		2000年5月1日		2000年5月25日		2000年5月30日	
							起算日数		起算日数					
朝駆	7.7	n.s.	5.0	n.s.	5.0	n.s.	26.3	n.s.	19.0	a	6.0	n.s.	4.7	n.s.
Meyer	8.7		4.7		5.0		27.3		10.0	c	6.0		5.7	
みやこ	8.0		5.3		5.3		23.0		15.0	b	6.0		4.3	

注: Tukey の多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

表8. 地域適応性試験結果 (家畜改良センター長野牧場, その2)

品種	匍匐茎長 (cm)		草高 (cm)		シバ被度 (%)	
	2000年6月1日		2000年6月1日		2000年6月1日	
朝駆	52.6	a	7.1	a	58.3	n.s.
Meyer	30.5	b	4.4	b	70.0	
みやこ	36.2	b	6.7	a	53.3	

注: Tukey の多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

表9. 地域適応性試験結果 (家畜改良センター熊本牧場, その1)

品種	定着の良否		初期生育		秋の草勢		紅葉の早晚		緑化の早晚					
	1999年7月12日		1999年7月12日		1999年11月12日		1999年11月1日		2000年4月1日					
						起算日数	起算日数	起算日数	起算日数	起算日数				
朝駆	8.3	a	8.3	a	6.0	n.s.	7.3	ab	10.3	n.s.	24.0	a	19.0	n.s.
Meyer	4.3	b	4.3	b	5.7		4.0	b	4.3		17.7	b	15.0	
みやこ	5.0	b	4.3	b	5.3		10.7	a	4.3		16.0	b	18.7	

注: Tukey の多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

表10. 地域適応性試験結果 (家畜改良センター熊本牧場, その2)

品種	越冬性		春の草勢		匍匐茎長 (cm)		草高 (cm)		被度 (%)							
	2000年4月10日		2000年5月8日		1999年7月21日		2000年5月22日		2000年6月9日							
朝駆	9.0	n.s.	7.0	a	7.7	a	8.3	a	8.5	a	6.9	a	92.3	b	96.7	n.s.
Meyer	9.0		5.0	b	4.3	b	5.7	ab	4.6	b	3.5	b	96.3	a	97.3	
みやこ	9.0		5.7	b	4.3	b	4.3	b	6.9	ab	6.9	a	97.0	a	99.0	

注: Tukey の多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

匍匐茎長が大である特性が明らかになった。京都府碓高原総合牧場において他の供試系統より低いと同程度の生育を示した要因は明らかでないが、日本海側の積雪地という環境が何らかの影響を及ぼした可能性がある。高知県畜産試験場で挿苗法では草丈が低い傾向があった結果は、芝密度が低く匍匐茎が密に繁茂するまでは葉が密生しない「朝駆」の特性を反映したものと考える。

### 3. 「朝駆」の放牧適性特性検定試験

1999年から2000年の試験では、「朝駆」は初期生育が9.0で「Meyer」・「みやこ」より有意に優れ、紅葉の早晚は27.0で「みやこ」より有意に早く、春の草勢は7.0で「Meyer」より有意に優れるが「みやこ」より有意に

劣った。匍匐茎長は1999年10月では20.7 cmと「Meyer」より、2000年5月では45.6 cmと「Meyer」・「みやこ」より有意に長かった (表11)。放牧試験は2000年5月・6月・7月に行ったが、5月および6月の放牧時にはメヒシバが試験圃場全体を覆っている状態であり、草高の変化から利用率を判定することは困難であった (表12)<sup>2)</sup>。7月の放牧では有意差はなかったものの、草高利用率は「朝駆」31.1%、「Meyer」17.1%、「みやこ」28.6%と草勢の強い品種が高い傾向を示した (表13)<sup>2)</sup>。

2001年の試験では、匍匐茎長 (1: 極不良~9: 極良) が「朝駆」は9.0で「Meyer」(3.0)・「みやこ」(8.0)より優れ、乾物生産量は「朝駆」は270 kg/aと「みやこ」(391 kg/a)に劣った。6回行った放牧試験のうち除草を目的

表 11. 放牧適性特性検定試験結果（宮崎県畜産試験場，その1）

品種	定着の良否		初期生育		紅葉の早晩		緑化の早晩		越冬性		春の草勢		匍匐茎長 (cm)			
	1999年10月4日		1999年10月4日		1999年11月1日		2000年3月1日		2000年3月21日		2000年4月7日		1999年10月29日 2000年5月22日			
					起算日数		起算日数									
朝駆	5.0	n.s.	9.0	a	27.0	b	21.0	n.s.	7.0	n.s.	7.0	b	20.7	a	45.6	a
Meyer	5.0		5.0	c	24.8	b	17.0		7.0		4.8	c	8.1	b	17.4	c
みやこ	5.0		7.5	b	30.0	a	17.0		7.0		9.0	a	18.4	a	27.4	b

注：Tukey の多重比較の結果，異なる文字間には 5%水準で有意差が認められる。

表 12. 放牧適性特性検定試験結果（宮崎県畜産試験場，その2）

品種	放牧前草高 (cm)		残食草高 (cm)		草高利用率 (%)		放牧前草量	
	2000年6月15日		2000年6月16日				2000年6月15日	
朝駆	12.6	n.s.	12.3	n.s.	1.6	n.s.	5.0	b
Meyer	10.7		10.4		1.7		3.0	c
みやこ	13.0		11.9		8.2		6.5	a

注：Tukey の多重比較の結果，異なる文字間には 5%水準で有意差が認められる。

表 13. 放牧適性特性検定試験結果（宮崎県畜産試験場，その3）

品種	放牧前草高 (cm)		残食草高 (cm)		草高利用率 (%)		放牧前草量	
	2000年7月21日		2000年8月1日				2000年7月12日	
朝駆	13.8	ab	9.4	n.s.	31.1	n.s.	5.0	n.s.
Meyer	11.6	b	9.6		17.1		5.0	
みやこ	16.2	a	11.6		28.6		7.0	

注：Tukey の多重比較の結果，異なる文字間には 5%水準で有意差が認められる。

とした1回を除く5回の平均では，草高利用率では「朝駆」は31.0%と「みやこ」(31.3%)とほぼ同等であったため，放牧適性は「Meyer」より優れるが「みやこ」と同程度か僅かに劣ると判定された<sup>8)</sup>。

2002年の試験では，匍匐茎長が「朝駆」は8.0で「Meyer」(5.0)・「みやこ」(7.0)より大で，被度では「Meyer」より優れるが「みやこ」に劣った。4～10月に月1回・刈高3cmで刈り取った乾物生産量合計値でも，「朝駆」が53.8 kg/aと「Meyer」(13.9 kg/a)より優れるが「みやこ」(74.1 kg/a)より劣った。5～10月平均の草高利用率は，「朝駆」が45.6%と「Meyer」(25.3%)・「みやこ」(37.4%)を上回った<sup>9)</sup>。

放牧適性特性検定試験の結果から，雑草として自生するシロクローバ・メヒシバ等よりシバの嗜好性は低いが，これら雑草がない状況ではシバの採食も多いこと，品種間では草高が高い「みやこ」の嗜好性が「朝駆」より優れていることが示唆された。

#### 4. 「朝萌」の特性調査

個体植え試験においては，「朝萌」は匍匐茎の長さが182.0 cmと他の3品種より有意に長く，匍匐茎の密

度が7.5と他の3品種より有意に密で，葉長が5.1 cmと「Emerald」・「Meyer」より有意に長く，葉幅が4.9 mmと他の3品種より有意に大きく，初期生育は6.1と「Emerald」・「Meyer」より有意に優れた(表14)。出穂茎の太さは1.42 mmと「Meyer」・「みやこ」より有意に太く，穂長が51.4 mmと「Meyer」・「みやこ」より有意に長かった(表15)。小穂幅は1.25 mmと「Meyer」・「みやこ」より有意に広く，小穂数が46.9と「Meyer」・「みやこ」より有意に多く，種子重(g/1000粒)が0.73と「Meyer」・「みやこ」より有意に重く，穂数が6.2と他の3品種より有意に多かった(表16)。

密植試験においては，「朝萌」は春の草勢・秋の草勢がそれぞれ4.7・5.0と「Emerald」・「Meyer」より有意に優れ，越冬の良否が7.0と「Emerald」・「Meyer」より有意に優れ，シバさび病抵抗性が6.0と「Meyer」・「みやこ」より有意に強かった(表17)。

以上の結果から，「朝萌」は標準品種および比較品種に対して区別性があると判断した。種苗法に定める品種登録の要件である均一性・安定性は栄養繁殖であるため確保できており，未譲渡性も問題ないため，2000年12月11日に願し2004年3月3日に第11724号として登

表 14. 「朝萌」の特性調査結果 (畜産草地研究所, 個体植えでの調査項目, その1)

品種	草型		匍匐茎の長さ (cm)		匍匐茎の密度		匍匐茎の太さ (mm)		葉長 (cm)		葉幅 (mm)		葉色		初期生育	
	極直立:1~ 極匍匐:9	n.s.	定植 13ヶ月後	極疎:1~ 極密:9	極不良:1~ 極良:9	極不良:1~ 極良:9										
朝萌	4.0	n.s.	182.0	a	7.5	a	1.65	a	5.1	a	4.9	a	4.7	n.s.	6.1	a
Emerald	7.0		67.5	b	4.9	b	1.17	b	3.0	b	2.0	d	5.2		3.9	b
Meyer	6.0		78.9	b	3.6	c	1.62	a	2.8	b	3.3	c	4.6		4.1	b
みやこ	7.0		92.8	b	5.1	b	1.65	a	4.4	a	4.1	b	5.9		4.8	ab

注: Tukeyの多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

表 15. 「朝萌」の特性調査結果 (畜産草地研究所, 個体植えでの調査項目, その2)

品種	出穂茎の太さ (mm)		出穂茎の長さ (cm)		穂長 (mm)		穂色		出穂始		春秋の出穂の有無	
	極少:1~ 極多:9	1999年5月1日 起算日数	1999年5月1日 起算日数	春・秋不出穂:1, 春のみ:2, 秋のみ:3, 春も秋も出穂:4	春・秋不出穂:1, 春のみ:2, 秋のみ:3, 春も秋も出穂:4							
朝萌	1.42	a	13.1	a	51.4	a	6.1	a	17.5	b	2	2
Emerald	-		-		-		-		-		1	1
Meyer	0.84	b	7.7	b	26.8	b	5.2	a	22.4	b	2	2
みやこ	0.95	b	9.9	ab	28.6	b	2.9	b	30.4	a	2	2

注: Tukeyの多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

注: 「Emerald」は試験期間中出穂しなかった。

表 16. 「朝萌」の特性調査結果 (畜産草地研究所, 個体植えでの調査項目, その3)

品種	小穂長 (mm)		小穂幅 (cm)		小穂数		脱穎性		種子重 (g/1000粒)		穂数	
	極少:1~ 極多:9	極少:1~ 極多:9	極少:1~ 極多:9	極少:1~ 極多:9	極少:1~ 極多:9	極少:1~ 極多:9	極不良:1~ 極良:9	極不良:1~ 極良:9	極少:1~ 極多:9	極少:1~ 極多:9	極少:1~ 極多:9	極少:1~ 極多:9
朝萌	3.52	a	1.25	a	46.9	a	3.0	n.s.	0.73	a	6.2	a
Emerald	-		-		-		-		-		1.0	c
Meyer	3.17	b	0.94	b	28.1	b	3.0		0.55	b	2.7	b
みやこ	3.40	ab	1.06	b	23.3	b	3.0		0.56	b	3.0	b

注: Tukeyの多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

注: 「Emerald」は試験期間中出穂しなかった。

表 17. 「朝萌」の特性調査結果 (畜産草地研究所, 密植での調査項目)

品種	春の草勢		秋の草勢		再生の良否		緑化の早晚		紅葉の早晚		越冬の良否		越夏の良否		シバさび病抵抗性		シバ被度 (%)	
	極不良:1~ 極良:9	極不良:1~ 極良:9	極不良:1~ 極良:9	極不良:1~ 極良:9	極不良:1~ 極良:9	極不良:1~ 極良:9	1999年4月1日 起算日数	1999年4月1日 起算日数	1999年11月1日 起算日数	1999年11月1日 起算日数	極不良:1~ 極良:9	極不良:1~ 極良:9	極不良:1~ 極良:9	極不良:1~ 極良:9	極弱:1~ 極強:9	極弱:1~ 極強:9	無除草での試験 区中シバが占める 面積の割合	無除草での試験 区中シバが占める 面積の割合
朝萌	4.7	a	5.0	ab	6.7	a	6.7	a	6.0	n.s.	7.0	a	8.0	n.s.	6.0	a	95.0	a
Emerald	2.3	c	3.3	b	6.0	ab	5.3	a	12.7		3.3	c	8.0		6.0	a	38.3	b
Meyer	2.7	bc	4.7	b	4.3	b	5.0	a	9.3		4.7	b	8.0		3.3	c	75.0	a
みやこ	4.3	ab	6.7	a	5.0	ab	2.0	b	9.0		7.3	a	8.0		5.0	b	88.3	a

注: Tukeyの多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

録された。

## 5. 「朝萌」のグラウンド造成実証試験

全調査区の平均値で示すと, トールフェスク・ケンタッキーブルーグラスの被覆率は2001年11月にそれぞれ

33.7%・41.8%であったが, 2002年10月にはそれぞれ13.1%・15.8%, 2003年9月にはそれぞれ1.8%・7.6%, 2004年9月にはそれぞれ0.0%・0.7%と夏を経るごとに低下した。一方, 「朝萌」は2001年11月の2.2%から2002年8月の28.4%, 2003年9月の66.1%, 2004年9

月の83.4%，2005年11月の96.7%へと徐々に被度を拡大し、特に計画的な芝刈・集草を励行しトールフェスクによるシバの被陰が回避できた2002年以降、顕著であった<sup>5)</sup>。

造成工事やトラクタ・作業機のリース・レンタルを含む役務費、資材費および、人件費（すべての作業について一律に1万円/8時間で試算）を集計すると、重機による整地を行った1999年は217万円を要したが、以後は2004年まで9万円から145万円の幅に収まった。この試算では芝生管理用トラクタや作業機のリース・レンタル料を全額計上しているが、稼働時間は年間90時間程度であったため、複数のグラウンドや複数の事業者で共用することにより大幅に低減可能である。校庭芝生化において排水のための透水層を施工した上でシバまたはコウシュンシバを張芝施工するには、造成費が5300万円/ha、年間管理費が350万円/ha必要とする報告もあるが、この試験では個人事業者が負担可能な金額に収めることができた<sup>5)</sup>。

この結果から、夏期に重点的に利用されるスポーツグラウンドにおいては、一定の利用条件下では低コスト・省力的な造成方法を採用して「朝萌」を適用できることが示された。2005年11月に調査を打ち切って試験を終了したが、以後も経営者によって芝生管理が継続されている。南東側にのみ定植した「朝萌」は年々被度を拡大し、現在は北西側の半分を含む1ha全面が「朝萌」の芝生として使用されている。

## 考 察

上記試験で得た結果を踏まえ、「朝駆」は主に放牧地造成や土壌保全など、匍匐茎の伸長性を活かせる利用場

面への適応が可能である。放牧地造成では作業機械が入れない傾斜地での作業を効率化・省力化するため、ソッドまたはポット苗を1～2点/m<sup>2</sup>という低密度で定植せざるを得ず、匍匐茎の伸長による早期被覆が重要な課題である。道路法面・河川堤防・水田畦畔等の土壌保全でも、目地張りによる張芝または裁断した匍匐茎の吹き付け施工が想定され、匍匐茎の伸長による早期被覆が必要とされる点は同じである。さらに、これらの利用場面では蹄傷や土壌浸食による植生の損傷が起こりうるが、植生の回復の点でも匍匐茎の伸長性は必要性が高い。一方、「朝駆」は芝生の密度が低く（図1）、過繁茂時に斑葉葉巻病に罹病しやすい欠点があるため、芝生としての利用には必ずしも適していない。

放牧適性特性検定試験で「朝駆」の評価が高くなかった原因として、試験の規模と採食期間の影響が考えられる。「朝駆」は品種登録を出願後に供試したが、放牧適性特性検定試験は一般的に出願前の品種候補系統を供試することを想定して設計されているため、大面積の試験草地造成は不可能で、ほぼ平坦な圃場を用いて20 m<sup>2</sup>という小面積で行う短期間の採食試験である。このため、採食後の再生や蹄傷からの回復、排糞による不食過繁地が植生に及ぼす影響など、傾斜地で定置放牧されることの多いシバ草地の実用的な課題に十分に対応したものではない。シロクロバ・メヒシバ等の雑草の方が嗜好性が高く、草高の高い品種が多く採食されたことは、短期間の採食試験では家畜にとっての食べやすさが大きく影響した結果と考える。

「朝萌」は匍匐茎の密度が密で葉長・葉幅が大きい特性があり（図2）、適正な管理条件下で密度が高くクッション感に優れる芝生を形成しやすい。さらに匍匐茎の伸長性にも優れるため、市松張り・筋張り・ポット苗移



図1. 「朝駆」の草姿



図2. 「朝萌」の草姿

植法等の低密度定植によっても芝生造成が可能であり、低コスト造成・管理の事例も示されている<sup>5)</sup>。こうした芝生としての特性を活かし、スポーツグラウンド・校庭・公園などでの利用が可能である。

「朝駆」・「朝萌」とともに収集した生態型からの栄養系選抜であり、両品種の育成を通じて我が国に存する遺伝資源の有用性を再認識する結果となった。2012年9月末現在、我が国で品種登録されたシバ属品種は育成者権が既に消滅した品種を含め41品種あるが、このうち28品種が収集遺伝資源の栄養系選抜または収集遺伝資源を直接母材とした交雑・自殖後代の選抜によって育成されていることから、シバ属育種における遺伝資源の重要性は広く認識されていると考えられる。一方で、シバ属植物には特性を区別する鍵となる形質が少なく、栄養体で容易に増殖できることもあり、育種の効率化や育成者権保護のために、遺伝情報に基づく選抜や品種識別が重要である。Tsuruta<sup>12)</sup>は「朝駆」のゲノムDNAから識別能の高いSSRマーカーを開発し、品種および遺伝資源の識別と遺伝的近縁性の解析が可能であることを示した。さらに「朝駆」の葉緑体DNAから開発したSSRマーカーを使用し、*Zoysia*属の種間および*Zoysia*属と主要イネ科牧草・芝草が属する属との間の遺伝的近縁性を検討した<sup>13)</sup>。品種育成、遺伝資源の多様性研究および育成者権保護などの目的において、今後、DNAマーカーが重要なツールとなると考える。

シバは畜産草地研究所の研究では低投入持続型飼料資源として位置付けられることが多いが、緑化目的の芝草としての社会需要も多く、緑化・芝生に関する技術相談も多く寄せられている。芝生の利用場面は畦畔・法面の土壌保全、庭園・公園の芝生、屋上緑化、スポーツターフなどと多様であり、利用場面に応じて造成・施工方法、芝刈頻度・施肥量・病虫害防除の要否など栽培管理方法が大きく異なる。スポーツターフに限っても対象とする競技の種類および、プレーヤー層がアマチュアかプロかによって求められる芝生の品質が異なり、利用頻度や管理体制によっても適切な芝草の草種・品種は大きく変わる。こうした利用場面で育成品種の普及を図るためには、想定される栽培管理条件下で育成系統の評価を行うことが不可欠であり、造成・施工・管理技術を有する企業と共同研究を行い、ハードウェア（品種・施工資材）とソフトウェア（施工・管理技術）を組み合わせた技術として普及を進めることが重要である。

今後は、交雑による変異の拡大だけでなく、遺伝子組換えによる有用形質の導入も見込まれる。食用作物・飼料作物では遺伝子組換えに対する社会的受容性は十分に

ないが、花卉類では遺伝子組換えによる新規変異の創出が好意的に報道されることもあり、芝草類でも一定の条件下では受容される可能性が高いと考える。社会の需要・受容性や関連企業の動向に注意を払いつつ、我が国の環境に最も適した芝草であるシバ属品種の育成と普及を進めたい。

## 謝 辞

地域適応性試験地各位には、予算配分を伴わず、既往の知見が少ない状況にも拘わらず御協力頂いた。担当して頂いた諸氏のお名前を記し、御協力に深謝する。

京都府淀高原総合牧場 井上巖夫・太田典宏  
高知県畜産試験場 生永治彦・岡野英樹・徳弘令奈  
家畜改良センター長野牧場 厨子屋明・上原健太郎・佐分淳一・甘利和男・梶原美紀・吉村 力・辻 佳秀・塩沢道明・大浦康子・山時丈昌  
家畜改良センター熊本牧場 藺田明廣・山口和成・吉村 力・牧野雄二

宮崎県畜産試験場各位には、精力的に放牧適性特性検定試験を実施して頂いた。担当して頂いた諸氏のお名前を記し、御協力に深謝する。

古澤邦夫・小畑 寿・藤井真理・鈴木淑恵・溝辺敬美

## 引用文献

- 1) Agricultural Research Service, USDA (1972). *Zoysia japonica* Steud., Japanese lawngrass and *Zoysia japonica* × *Z. tenuifolia* Willd. ex Trin., In: Grass varieties in the United States, 115-116, U. S. Government Printing Office, Washington, D. C.
- 2) 古澤邦夫・藤井真理・須崎淑恵 (2001). 放牧適性検定試験, 宮崎県畜産試験場研究報告, 14, 132-134.
- 3) 井上巖夫・太田典宏 (2002). シバの地域適応試験, 京都府総牧試研報, 93-98.
- 4) 北村文雄 (1970). 日本芝の園芸的分類および成立に関する研究, 東京大学農学部附属園芸研究所研究報告, 3, 1-60.
- 5) 小林真・蝦名真澄・霍田真一・高原学・稲福政史・中川仁 (2006). シバと寒地型芝草を組み合わせた芝生グラウンドの低コスト造成技術, 芝草研究, 第35 (1), 28-34.
- 6) 農林水産技術会議事務局・農業技術研究機構畜産草

- 地研究所・家畜改良センター (2001). 飼料作物系統適応性検定試験実施要領 (改訂5版)・飼料作物特性検定試験実施要領 (改訂3版)・飼料作物地域適応性等検定試験実施要領, 農業技術研究機構畜産草地研究所, 59p., (畜草研資料, 平成13-1).
- 7) 農林水産省家畜改良センター熊本牧場 (2001). 平成12年度飼料作物種子関係調査成績, 18-19.
- 8) 小畑寿・鈴木淑恵・藤井真理・溝辺敬美 (2002). 放牧適性検定試験, 宮崎県畜産試験場研究報告, 15, 97-100.
- 9) 小畑寿・鈴木淑恵・藤井真理・溝辺敬美 (2003). 放牧適性検定試験, 宮崎県畜産試験場研究報告, 16, 104-109.
- 10) 奥村健治・高井智之・中嶋絃一 (1992). シバ属自生植物の収集 (全国), 植物遺伝資源探索導入調査報告書, 通巻8, 17-21.
- 11) 社団法人日本飼料作物種子協会 (1983). 昭和57年度種苗特性分類調査報告書.
- 12) Tsuruta, S., Hashiguchi, M., Ebina, M., Matsuo, T., Yamamoto, T., Kobayashi, M., Takahara M., Nakagawa, H. and Akashi, R. (2005). Development and characterization of simple sequence repeat markers in *Zoysia japonica* Steud., Grassland Science, 51, 249-257.
- 13) Tsuruta, S., Hosaka, S., Otabara, T., Hashiguchi, M., Yamamoto, T. and Akashi, R. (2008). Genetic diversity of chloroplast DNA in *Zoysia* and other warm-season turfgrasses, Grassland Science, 54, 151-159.

## Breeding of Japanese Lawngrass “Asagake” and “Asamoe”

Makoto KOBAYASHI, Masumi EBINA, Shigemitsu KASUGA<sup>a</sup>, Kenji OKUMURA<sup>b</sup>,  
Tomoyuki TAKAI<sup>c</sup>, Hiroshi ARAYA<sup>d</sup>, Yoshiro TSURUMI<sup>e</sup> and Hitoshi NAKAGAWA<sup>f</sup>

Forage Crop Research Division,  
NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Nasushiobara, 329-2793 Japan

### Summary

Cultivar “Asagake” is selected from ecotype “Nankoku 9” which is collected in Kochi prefecture, Japan and registered in 2002 by The Plant Variety Protection and Seed Act. Cultivar “Asamoe” is selected from ecotype “Houbenzan 4” which is collected in Yamaguchi prefecture, Japan and registered in 2004 by The Plant Variety Protection and Seed Act. Since “Asagake” has superior character of high stolon elongation and vigor in spring, evaluation test was conducted in Kyoto Prefectural Ikari Highland Livestock Experiment Station, Kochi Prefectural Livestock Experiment Station, National Livestock Breeding Center (NLBC), Nagano Station, NLBC Kumamoto Station, and Miyazaki Prefectural Livestock Experiment Station. Since “Asamoe” has traits to form dense turf, test for turf establishment and management was conducted in sports ground in Nasu town, Japan. In consequence of these tests, it is considered that “Asagake” is adaptable to grazing grassland and soil conservation, and “Asamoe” is suitable for turf use such as in sport ground and schoolyard.

**Key words:** Japanese lawngrass, Asagake, Asamoe, grazing, turf

---

<sup>a</sup> Present address: Shinshu University, Minamiminowa, 399-4598 Japan

<sup>b</sup> Present address: NARO Hokkaido Agricultural Research Center, Sapporo, 062-8555 Japan

<sup>c</sup> Present address: NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, Miyakonojo, 885-0091 Japan

<sup>d</sup> Present address: Meiji University, Kawasaki, 214-8571 Japan

<sup>e</sup> Retired

<sup>f</sup> Present address: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, 305-8686 Japan

# Plant Regeneration from Embryogenic Calli of the Wild Sugarcane (*Saccharum spontaneum* L.) Clone ‘Glagah Kloet’

Wataru TAKAHASHI and Tadashi TAKAMIZO

Forage Crop Research Division,  
NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Nasushiobara, 329-2793 Japan

## Abstract

A wild sugarcane clone, *Saccharum spontaneum* ‘Glagah Kloet’, is utilized as breeding material for development of high-yielding sugarcane cultivars. In the present study, we established a plant regeneration system for this clone to increase its potential for use in molecular breeding of sugarcane with a transformation system in the future. Although embryogenic callus was not induced with the medium containing 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) alone that has been used commonly for callus induction of sugarcane, we obtained embryogenic calli when apical meristems aseptically isolated from shoots were cultured on callus induction medium containing both 0.01 mg L<sup>-1</sup> benzyladenine (BA) and 5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D. This finding indicates that BA is positively effective for induction of embryogenic calli of ‘Glagah Kloet’. The embryogenic calli produced shoots when cultured on medium containing 0.3 mg L<sup>-1</sup> gibberellic acid or on hormone-free medium supplemented with 3 g L<sup>-1</sup> activated charcoal (AC). The morphology of the shoots clearly differed between the regeneration media. The shoots formed on medium containing gibberellic acid were finer and softer, and the leaf color was lighter compared with those formed on the hormone-free medium containing AC, thus more healthy shoots were regenerated.

**Key words:** activated charcoal, benzyladenine, plant regeneration, tissue culture, wild sugarcane

## Introduction

Sugarcane is a tall perennial grass that is cultivated in tropical and subtropical regions of the world. Notably, this grass stores a high concentration of sucrose in the stem. Approximately 65–70% of global sugar production in the form of sucrose is derived from sugarcane<sup>8)</sup>. Sugarcane belongs to the genus *Saccharum*. Although six polyploid species are recognized within *Saccharum*<sup>11,29)</sup>, modern cultivars for sugar production are mostly derived from interspecific hybridization between *S. officinarum* and *S. spontaneum*<sup>11,22)</sup>. Of the other four species, *S.*

*robustum*, *S. barberi*, and *S. sinense* have also provided minor contributions to the breeding of some modern sugarcane cultivars<sup>6)</sup>.

*Saccharum spontaneum* is an important breeding resource because of its high dry matter yield, good ratooning ability, and possession of some tolerance against biotic and abiotic stresses in spite of a relatively low sugar content. In the late nineteenth century, a spontaneous hybrid group called Kassoer derived from a cross between *S. officinarum* and Glagah—the wild Javan form of *S. spontaneum* from Indonesia—was used as breeding material, and the progenies have given rise to many cultivars, such

as POJ2722, POJ2725, POJ2875, and POJ2878, by backcrossing with *S. officinarum*<sup>5,16,26</sup>. In particular, POJ2878 was an excellent clone and was called 'Java Wondercane' because it showed 35% higher sugar productivity than that of the previously best cultivars<sup>19,26</sup>. Glagah still has potential as an important breeding resource for development of cultivars with high biomass, high ratooning ability, and improved stress tolerance for production of sugar and/or bioenergy in the future.

In Japan, sugarcane breeders also employed the wild sugarcane species to introduce the above-mentioned agronomically important traits to their breeding system. They have succeeded in developing the two most recent distinctive forage cultivars 'KRf093-1'<sup>24,27</sup> and 'Shimanoushie'<sup>27</sup> (as of November 8th, 2012, an application for seedling registration in Japan is pending as application number 25824). In addition, Japanese breeders have developed a prominent cultivar, 'KY01-2044', with 1.5 times the total biomass yield and 1.3 times the total sugar yield than the major Japanese sugar-producing cultivars<sup>2,10,27,30</sup>. Interestingly, the above-mentioned three cultivars were derived from a common clone, 'Glagah Kloet', which was the male parent of 'KRf093-1' and a grandparent of 'Shimanoushie' and 'KY01-2044'. 'Glagah Kloet' is one of the clones belonging to the wild species group Glagah.

Thus, we focused on 'Glagah Kloet' and decided to further expand the potential of this clone for use in molecular breeding of sugarcane with a transformation system in the future. A transformation system requires plant regeneration via callus culture, which is indispensable for selection of transformed cells. To the best of our knowledge, only two previous reports have focused on development of a plant regeneration system for *S. spontaneum*. Sobhakumari and Mathew<sup>25</sup> reported hybrid vigor in their plant regeneration system and found that the hybrid parents, *S. spontaneum* and *S. officinarum*, have lower potential for tissue culture compared with that of the hybrids. Fitch and Moore<sup>9</sup> succeeded in achieving plant regeneration via green organogenic calli with picloram, but did not obtain embryogenic callus of *S. spontaneum*, and quantitative data on the

regeneration system were not presented.

In contrast, numerous reports of a plant regeneration system for many hybrid sugarcane cultivars have been published, of which most have focused on the auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), but sometimes other synthetic auxins, such as picloram and 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba), were used, with or without the cytokinins benzyladenine (BA), 1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl) urea, or kinetin<sup>12,13,28,29</sup>. In addition to the plant hormones, a combination of carbon sources composed of 1.5% (w v<sup>-1</sup>) each of sucrose and sorbitol, and addition of casein hydrolysate to the regeneration medium were reported to have a positive effect on plant regeneration from protoplast-derived calli<sup>14,15</sup>. Furthermore, effects of exogenous amino acids such as glycine, arginine, and cysteine on embryogenic callus formation have been observed. Incorporation of these amino acids in culture media significantly induced somatic embryogenesis and promoted plant regeneration<sup>1,18</sup>. Genotypic differences in responses to tissue culture conditions were observed in these studies reflecting the outcrossing reproductive system of sugarcane, which indicated that tissue culture conditions must be optimized for individual cultivars and genotypes<sup>29</sup>.

In the present study, we aimed to optimize tissue culture conditions for callus induction and plant regeneration from callus of 'Glagah Kloet'. We observed the effect of BA on callus induction in the presence of 2,4-D, and the effect of different media on the manner of plant regeneration and morphology of the regenerants. We report here the development of a plant regeneration system from embryogenic calli induced by a low concentration of BA in the presence of 2,4-D for 'Glagah Kloet'.

## Materials and Methods

### Plant materials

A wild sugarcane clone, *S. spontaneum* L. 'Glagah Kloet', registered as JP 172015 in the National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS) GeneBank, Japan, was used in this study. In addition, a Japanese commercial hybrid cultivar, 'KRf093-1' (a

*Saccharum* spp. hybrid), was used as a reference. Tillers of the plants were transplanted into soil in pots and grown in a glasshouse maintained at 30°C. For clonal propagation, axillary buds on cut stem sections were planted in soil in pots and cultured in the glasshouse maintained at 30°C. Shoots that sprouted from the buds were used as donors for provision of explants for tissue culture.

### Culture media

Components of the culture media are listed in Table 1. In callus induction medium (CIM) 2 and CIM3, 750 mg L<sup>-1</sup> of additional MgCl<sub>2</sub> was added, whereas other macro- and micro-nutrients of all media used were based on MS medium<sup>17)</sup> containing 3% (w v<sup>-1</sup>) sucrose, adjusted to pH 5.8, and solidified with 0.25% (w v<sup>-1</sup>) Gelrite (Wako, Osaka, Japan). Vitamins of CIM1 were the same components as those of N6 medium<sup>7)</sup>, whereas vitamins of CIM2, CIM3, regeneration medium (RM) 1, and RM2 were the same components as those of MS medium.

### Callus induction

Leaf sheaths of shoots each including an apical meristem were washed in 70% ethanol for 1 min, surface-sterilized in 30% (v v<sup>-1</sup>) sodium hypochlorite solution (3% available chlorine) for 20 min, and rinsed twice in sterile distilled water. Apical meristems each

covered with one or two small leaves were aseptically isolated from shoots under a stereomicroscope. The isolated tissues were placed on callus induction media (Table 1) in Petri dishes and were cultured in the dark at 25°C. For ‘Glagah Kloet’, meristems were cultured on CIM1, CIM2, and CIM3, whereas those of ‘KRFO93-1’ were cultured on CIM1 as a reference. The induced calli were subcultured every month onto the same fresh medium prior to plant regeneration experiments. In the present study, each culture was derived from one explant and was maintained as a single culture line.

### Plant regeneration from calli

For plant regeneration, calli were divided into small pieces (5 mm in diameter) and transferred onto plant regeneration media (Table 1) and were cultured under continuous fluorescent light (40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) at 25°C. For ‘Glagah Kloet’, independently induced calli were cultured on both regeneration media, RM1 and RM2, whereas calli of ‘KRFO93-1’ were cultured on RM2 as a reference.

### Statistical analysis

Data on the culture responses (percentage of non-callused explants and callus formation frequency) of ‘Glagah Kloet’ were obtained in each experiment, and mean values were analyzed by analysis of

Table 1. Components of culture media for callus induction and plant regeneration

Media	Components <sup>a)</sup>
Callus induction medium (CIM)	
CIM1	0.25 mg L <sup>-1</sup> benzyladenine (BA) 4 mg L <sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) N6 vitamins
CIM2	5 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D 25 mM L <sup>-1</sup> Proline 750 mg L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O MS vitamins
CIM3	CIM2 medium + 0.01 mg L <sup>-1</sup> BA
Regeneration medium (RM)	
RM1	0.3 mg L <sup>-1</sup> gibberellic acid MS vitamins
RM2	3 g L <sup>-1</sup> activated charcoal MS vitamins

a) Other macro- and micro-nutrients in all media not shown here were based on MS medium containing 3% (w v<sup>-1</sup>) sucrose, adjusted to pH 5.8, and solidified with 0.25% (w v<sup>-1</sup>) Gelrite (Wako, Osaka, Japan) (see Materials and Methods).

variance (ANOVA) and Tukey contrasts in R v. 2.15.2 software<sup>23)</sup> using plant hormones, proline,  $MgCl_2$ , and vitamins as factors.

## Results

### Callus induction

A summary of the callus induction data is presented in Table 2. Soon after culture initiation, most meristems were expanded in both 'KRF093-1' and 'Glagah Kloet'. In 'KRF093-1', although most cultured tissues exuded a black substance that

stained the culture medium around the tissues, callus appeared from 1 month after culture initiation (Fig. 1A), and on average 87.9% of cultured explants produced embryogenic calli and underwent somatic embryogenesis (Table 2, Fig. 1B). In 'Glagah Kloet', most tissues cultured on CIM1 died without forming callus (Fig. 2A) or turned brown soon after callus formation (Fig. 2B) during 1 month of culture (Table 2). However, some tissues cultured on CIM2 and CIM3 continued to grow and we observed two types of calli—watery and embryogenic—on their surface (Fig. 2C–F). The watery calli were induced on both

Table 2. Effects of culture media on induction of different types of calli

Clone/Cultivar	Culture medium	Experiment	No. of explants	Non-callused explants (%)	Formation of each callus type (%)		
					Browning*	Watery	Embryogenic
Glagah Kloet	CIM1	1	2	100.0	0.0	0.0	0.0
		2	5	80.0	20.0	0.0	0.0
		3	3	100.0	0.0	0.0	0.0
		Mean $\pm$ SD <sup>†,‡</sup>		93.3 $\pm$ 11.5a	6.7 $\pm$ 11.5a	0.0a	0.0a
	CIM2	1	3	0.0	0.0	100.0	0.0
		2	5	40.0	20.0	40.0	0.0
		3	3	0.0	0.0	100.0	0.0
		4	3	0.0	33.3	66.7	0.0
	Mean $\pm$ SD		10.0 $\pm$ 20.0b	13.3 $\pm$ 16.3a	76.7 $\pm$ 29.1b	0.0a	
	CIM3	1	7	0.0	28.6	14.3	57.1 (42.9) <sup>§</sup>
		2	3	33.3	33.3	0.0	33.3
		Mean $\pm$ SD		16.7 $\pm$ 23.6b	31.0 $\pm$ 3.4a	7.1 $\pm$ 10.1a	45.2 $\pm$ 16.8b
KRF093-1	CIM1	1	14	7.1	7.1	0.0	85.7
		2	10	10.0	0.0	0.0	90.0
	Mean $\pm$ SD		8.6 $\pm$ 2.0	3.6 $\pm$ 5.1	0.0	87.9 $\pm$ 3.0	

\* Callused explants that died after callus formation.

† SD: Standard deviation.

‡ Mean values for 'Glagah Kloet' in each column followed by the same letter are not significantly different at  $P < 0.01$  based on Tukey contrasts.

§ Value in parentheses is the frequency of embryogenic calli that partially contained watery callus.

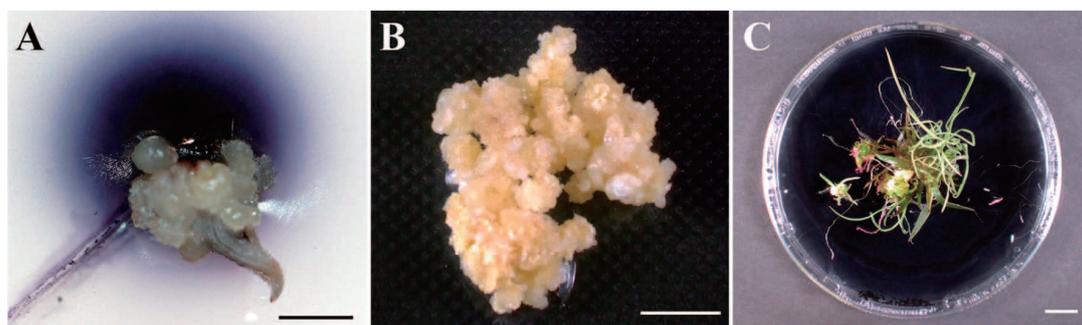


Fig. 1. Embryogenic callus formation and plant regeneration from callus in 'KRF093-1'.

(A) Black substance surrounding a callused meristematic tissue cultured on CIM1, (B) embryogenic callus induced on CIM1, (C) shoot formation from embryogenic callus on RM2. Bar = 0.5 mm in (A), and 1 cm in (B) and (C).

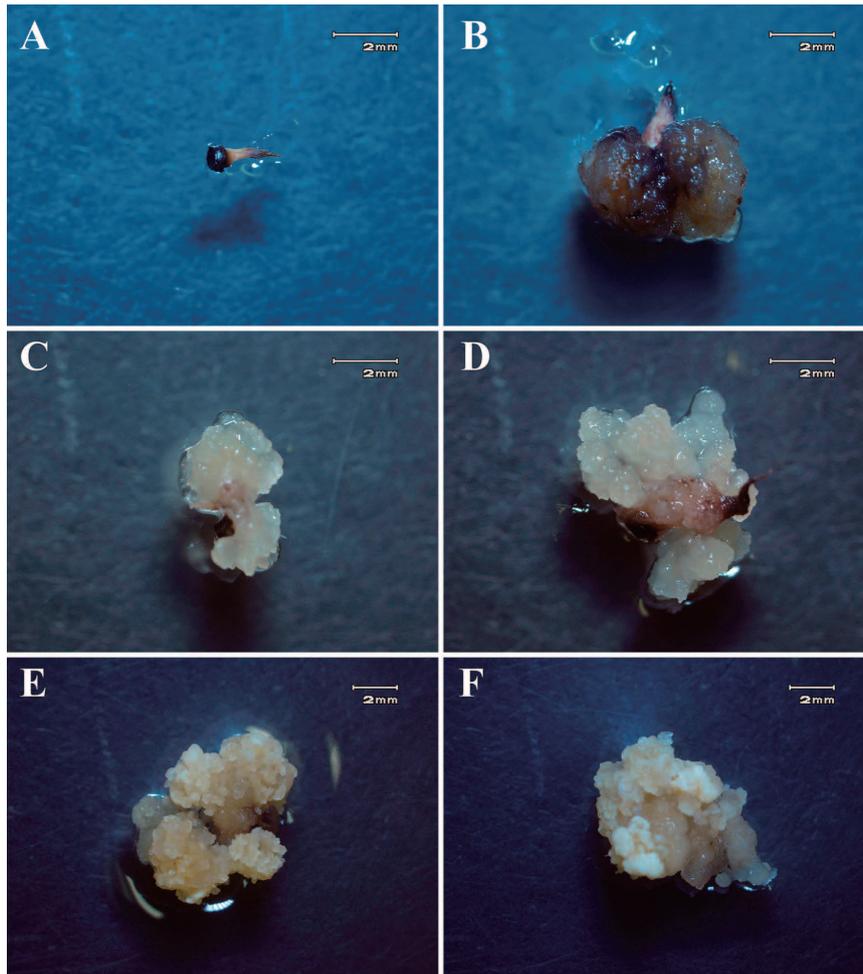


Fig. 2. Types of calli induced by different culture media in ‘Glagah Kloet’. (A) Non-callused explant cultured on CIM1, (B) browning callus induced on CIM1, (C, D) watery callus induced on CIM2, (E) embryogenic callus induced on CIM3, (F) embryogenic callus also containing watery callus. Bar = 2 mm.

CIM2 and CIM3, but their growth was extremely slow even after subculturing (Table 2, Fig. 2C and D). Five embryogenic calli were independently induced from on average 45.2% of cultured explants only on CIM3 in ‘Glagah Kloet’ (Table 2, Fig. 2E and F). In three of the five instances embryogenic callus induction was accompanied by watery callus induction but the embryogenic parts of the calli grew well during tissue culture (Fig. 2F). ANOVA revealed that for ‘Glagah Kloet’ BA concentration significantly influenced the frequencies of watery callus and embryogenic callus formation ( $P < 0.01$ , Table 2). We used the embryogenic calli for the following plant regeneration experiments.

#### Plant regeneration

After 3 months of callus culture initiation,

embryogenic calli were subjected to plant regeneration experiments. In ‘KRF093-1’, five randomly selected calli were cultured on RM2. We observed shoot formation from all of the transferred calli 1 month after the transfer (Fig. 1C). In ‘Glagah Kloet’, three of the five independently induced calli were cultured on both RM1 and RM2. Growth of the calli after transfer to RM1 was vigorous and subsequent formation of shoot primordia occurred 12 days after transplanting, whereas shoots formed from calli on RM2 after about 1 month. However, during culture for shoot formation, calli cultured on RM1 partially turned brown and occasionally died (#2 callus in Fig. 3). The morphology of the shoots clearly differed between regeneration media. The shoots formed on RM1 were finer and softer, and their leaf color was lighter compared with

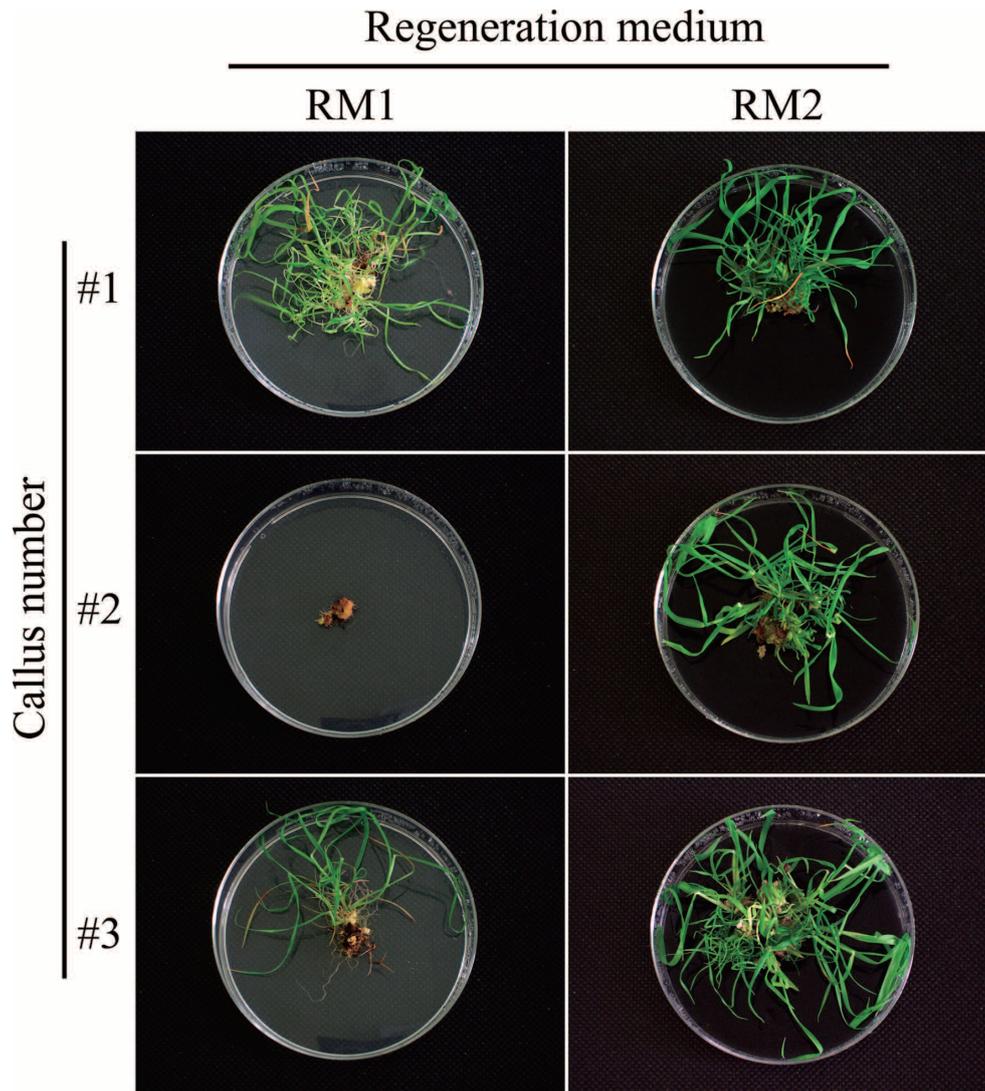


Fig. 3. Morphological differences of shoots regenerated on RM1 and RM2 in 'Glagah Kloet'. Shoots regenerated on RM1 were finer and softer, and the leaf color was lighter than in those formed on RM2. Results of three independently induced calli are shown.

those formed on RM2 (Fig. 3). Each of the three calli produced shoots on RM2 (Fig. 3). All regenerated shoots on RM1 and RM2 were established in soil, after washing their roots to remove culture media, without the need for acclimatization treatment.

### Discussion

In the experiment with the commercial hybrid cultivar 'KRFO93-1', which was used as a reference, we obtained embryogenic calli from apical meristems on CIM1 with a high frequency (87.9% on average; Table 2, Fig. 1B). In 'Glagah Kloet' severe tissue-browning of explants was observed during tissue culture, and

most cultured tissues (93.3% on average) did not produce any callus on CIM1 (Fig. 2A and B). However, the problem of tissue browning was almost eliminated with CIM2 and CIM3, and calli were induced on both media (Fig. 2C–F). Although direct evidence was not obtained because of differences in the vitamin components and the different concentration of  $MgCl_2$  between CIM1 and the other two media, the presence of proline in CIM2 and CIM3 might be a major factor in preventing tissue-browning because proline is well known to prevent tissue-browning caused by oxidized phenolic compounds that result from polyphenol oxidase activity in cultured cells<sup>20</sup>.

Most published research on induction of

regenerable embryogenic callus in sugarcane has focused on auxins such as 2,4-D and picloram<sup>9,13</sup>). In the present study, however, a low concentration of BA in the CIM3 medium promoted callus growth, whereas calli induced on the CIM2 medium without BA were watery and did not grow well. Eventually, embryogenic calli were significantly induced on CIM3 ( $P < 0.01$ , Table 2), which indicated that a low concentration of BA ( $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ ) was effective for induction of embryogenic calli in ‘Glagah Kloet’, although a somewhat higher concentration of BA ( $0.25 \text{ mg L}^{-1}$ ) in the CIM1 medium possibly prevented callus induction. To the best of our knowledge, in sugarcane tissue culture this response to BA of callus growth might be specific to this clone. Overall, embryogenic calli with regeneration potential were only induced on the CIM3 medium (Table 2, Fig. 2E and F). In *Miscanthus sinensis*, a relative of sugarcane, a low concentration of BA was recently reported to have a positive effect on induction of embryogenic calli, although a high concentration of BA caused tissue browning<sup>31</sup>). These findings are consistent with a previous report on *Ranunculus asiaticus* in which addition of kinetin—like BA one of the most important cytokinins—to a culture medium containing 2,4-D promoted the formation and growth of regenerable callus<sup>4</sup>).

For plant regeneration from embryogenic calli, we prepared two types of media (Table 1). Subsequently, we obtained shoots from calli with both RM1 and RM2 in ‘Glagah Kloet’, but some obvious differences in shoot morphology were observed (Fig. 3). These differences might reflect the presence of gibberellic acid in RM1 and activated charcoal (AC) in RM2. Gibberellic acid in RM1 might promote fine shoot elongation and callus browning, which seems to be detrimental for further growth of developed shoots on the calli. A similar effect of gibberellic acid on shoot elongation has been reported for one other sugarcane cultivar<sup>3</sup>). The presence of AC in RM2 medium might prevent callus browning by absorbing oxidized phenolic compounds exuded from the calli because AC in culture media adsorbs aromatic compounds such as phenolics and their oxidates<sup>21</sup>). This allowed the calli to grow well and promoted subsequent healthy shoot

formation from the calli. On the basis of these results, the RM2 medium is considered to be suitable for plant regeneration in ‘Glagah Kloet’, although both RM1 and RM2 media can be used for plant regeneration in ‘Glagah Kloet’ because shoots obtained on both media were readily established in soil in pots.

In conclusion, we established a plant regeneration system for the wild sugarcane clone ‘Glagah Kloet’. This clone clearly requires a low concentration ( $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ ) of BA for induction of regenerable embryogenic calli in the presence of 2,4-D. This distinctive response might be specific to this clone. The optimal conditions for plant regeneration in ‘Glagah Kloet’ comprised use of CIM3 and RM2 (Table 1) for induction of embryogenic calli and plant regeneration from the calli, respectively. It remains to be examined whether the present system is applicable to other sugarcane cultivars and wild relatives. Given that ‘Glagah Kloet’ might be a valuable genetic resource for development of high-yielding cultivars for forage and bioethanol production as well as sugar production, the present plant regeneration system is applicable for genetic transformation of ‘Glagah Kloet’, and is likely to contribute to the molecular breeding of high-yielding sugarcane in the future.

### Acknowledgments

We express our gratitude to NIAS GeneBank, Japan, for providing the wild sugarcane clone ‘Glagah Kloet’ (JP 172015). We gratefully thank Mr Y. Terajima (Japan International Research Center for Agricultural Sciences) for kindly providing the Japanese cultivar ‘KRF093-1’. We also thank Ms S. Sasaki (NARO Institute of Livestock and Grassland Science) for technical assistance with tissue culture.

### References

- 1) Asad, S., Arshad, M., Mansoor, S. and Zafar, Y. (2009). Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), *Afr. J. Biotechnol.*, 8, 1214-1218.
- 2) Asia Biomass Office (2010). To expand domestic biofuel production in Japan, available online:

- [http://www.asiabiomass.jp/english/topics/1005\\_02.html](http://www.asiabiomass.jp/english/topics/1005_02.html) [accessed 7 November 2012].
- 3) Ather, A., Khan, S., Rehman, A. and Nazir, M. (2009). Optimization of the protocols for callus induction, regeneration and acclimatization of sugarcane cv. Thatta-10, Pak. J. Bot., 41, 815-820.
  - 4) Beruto, M., Curir, P. and Debergh, P. (1996). Callus growth and somatic embryogenesis in thalamus tissue of *Ranunculus asiaticus* L. cultivated *in vitro*: Cytokinin effect and phenol metabolism, In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 32, 154-160.
  - 5) Bremer, G. (1961). Problems in breeding and cytology of sugar cane, Euphytica, 10, 59-78.
  - 6) Cheavegatti-Gianotto, A., de Abreu, H.M.C., Arruda, P., Bessalho Filho, J.C., Burnquist, W.L., Creste, S., di Ciero, L., Ferro, J.A., de Oliveira Figueira, A.V., de Sousa Filgueiras, T., Grossi-de-Sá, M.d.F., Guzzo, E.C., Hoffmann, H.P., de Andrade Landell, M.G., Macedo, N., Matsuoka, S., de Castro Reinach, F., Romano, E., da Silva, W.J., de Castro Silva Filho, M. and César Ulian, E. (2011). Sugarcane (*Saccharum × officinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil, Tropical Plant Biol., 4, 62-89.
  - 7) Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y. and Bi, F.Y. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources, Sci. Sin., 18, 659-668.
  - 8) FAO (2003). Important commodities in agricultural trade: sugar, available online: <http://www.fao.org/docrep/005/y4852e/y4852e11.htm> [accessed 7 November 2012].
  - 9) Fitch, M.M. and Moore, P. (1990). Comparison of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures of sugarcane, Plant Cell Tiss. Organ Cult., 20, 157-163.
  - 10) Hattori, T., Terajima, Y., Terauchi, T. and Sakaigaichi, T. (2010). Characteristics of photosynthesis in single leaf of large biomass sugarcane line "KY01-2044", Proc. 229th Meeting of the Crop Science Society of Japan, March 30-31, Utsunomiya, Japan, 326-327. (in Japanese).
  - 11) Henry, R.J. (2010). Basic information on the sugarcane plant, In Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane (Eds. Henry, R. and Kole, C.), 1-7, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
  - 12) Ho, W.-J. and Vasil, I.K. (1983). Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos, Protoplasma, 118, 169-180.
  - 13) Lakshmanan, P. (2006). Somatic embryogenesis in sugarcane - An addendum to the invited review 'Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities,' In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 41(4): 345-363; 2005, In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 42, 201-205.
  - 14) Matsuoka, M. and Sugimoto, A. (1997). Plant regeneration from protoplast-derived callus of sugarcane, Breed. Sci., 47, 301-305.
  - 15) Matsuoka, M., Terauchi, T., Kobayashi, M. and Nakano, H. (1995). Plant regeneration from suspension cultures in sugarcane (*Saccharum* spp.), Plant Tiss. Cult. Lett., 12, 193-196. (in Japanese).
  - 16) Ming, R., Moore, P.H., Wu, K.K., D'Hont, A., Glaszmann, J.C. and Tew, T.L. (2006). Sugarcane improvement through breeding and biotechnology, Plant Breed. Rev., 27, 15-118.
  - 17) Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., 15, 473-497.
  - 18) Nieves, N., Sagarra, F., González, R., Lezcano, Y., Cid, M., Blanco, M.A. and Castillo, R. (2008). Effect of exogenous arginine on sugarcane (*Saccharum* sp.) somatic embryogenesis, free polyamines and the contents of the soluble proteins and proline, Plant Cell Tiss. Organ Cult., 95, 313-320.
  - 19) Office of the Gene Technology Regulator (2011). The biology of the *Saccharum* spp. (Sugarcane), Australian Government, available online: <http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/riskassessments-1> [accessed 20 November 2012].
  - 20) Öztürk, L. and Demir, Y. (2002). *In vivo* and

- in vitro* protective role of proline, Plant Growth Regul., 38, 259-264.
- 21) Pan, M.J. and van Staden, J. (1998). The use of charcoal in *in vitro* culture – A review, Plant Growth Regul., 26, 155-163.
  - 22) Piperidis, G., Piperidis, N. and D'Hont, A. (2010). Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane, Mol. Genet. Genomics, 284, 65-73.
  - 23) R Core Development Team (2012). R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, available online: <http://www.R-project.org/> [accessed 26 November 2012].
  - 24) Sakaigaichi, T. and Terajima, Y. (2008). Development and extension of the sugarcane cultivar as a forage crop 'KRF093-1', J. Agric. Sci. (Nougyou gijutsu), 63, 24-29. (in Japanese).
  - 25) Sobhakumari, V.P. and Mathew, S.D. (2009). Effect of hybrid vigor on callus induction and regeneration of sugarcane, Cytologia, 74, 71-77.
  - 26) Sreenivasan, T.V., Ahloowalia, B.S. and Heinz, D.J. (1987). Cytogenetics, In Sugarcane Improvement through Breeding (Ed. Heinz, D.J.), 211-253, Elsevier, Amsterdam.
  - 27) Sugimoto, A., Terajima, Y., Terauchi, T., Ponragdee, W., Ohara, S., Tagane, S., Sansayawichai, T., Ishida, T., Ando, S., Matsuoka, M., Yasuhara, T., Hattori, T., Fukuhara, S., Sakaigaichi, T., Ishikawa, S. and Tarumoto, Y. (2012). Developing new types of sugarcane by hybridization between commercial sugarcane cultivars and wild relatives, In Plant Genetic Resources for Food and Agriculture in Asia and the Pacific: Impacts and Future Directions, Proc. NIAS-FAO International Symposium, FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand, 11-24.
  - 28) Suprasanna, P., Patade, V.Y. and Bapat, V.A. (2008). Sugarcane biotechnology - A perspective on recent developments and emerging opportunities, In Advances in Plant Biotechnology (Eds. Rao, G.P., Zhao, Y., Radchuk, V.V. and Bhatnagar, S.K.), 313-342, Studium Press, Houston, Texas, USA.
  - 29) Takahashi, W. and Takamizo, T. (2012). Molecular breeding of grasses by transgenic approaches for biofuel production, In Transgenic Plants - Advances and Limitations (Ed. Ozden Çiftçi, Y.), 91-116, In Tech, Rijeka, Croatia.
  - 30) Terajima, Y., Terauchi, T., Sakaigaichi, T., Hattori, T., Fujisaki, N., Teruya, H., Naitou, T., Daiku, M., Matsuoka, M., Ohara, S., Irei, S., Ujihara, K. and Sugimoto, A. (2010). Productivities of a large biomass sugarcane line "KY01-2044" in Nansei islands, Proc. 229th Meeting of the Crop Science Society of Japan, March 30-31, Utsunomiya, Japan, 124-125. (in Japanese).
  - 31) Wang, X., Yamada, T., Kong, F.J., Abe, Y., Hoshino, Y., Sato, H., Takamizo, T., Kanazawa, A. and Yamada, T. (2011). Establishment of an efficient *in vitro* culture and particle bombardment-mediated transformation systems in *Miscanthus sinensis* Anderss., a potential bioenergy crop, GCB Bioenergy, 3, 322-332.

## サトウキビ野生種 (*Saccharum spontaneum* L.) 系統 “Glagah Kloet” の カルスからの植物体再生

高橋 亘・高溝 正

農研機構畜産草地研究所 飼料作物研究領域, 那須塩原市, 329-2793

### 摘 要

サトウキビ野生種 (*Saccharum spontaneum* L.) 系統 “Glagah Kloet” はサトウキビの高収量品種開発のための育種材料としてその利用が期待される。本研究では、遺伝子組換え技術を軸とした分子育種において本系統の利用を図るため、本系統のカルス培養からの再分化系確立を試みた。当初、これまでに多くのサトウキビ品種・系統のカルス培養系で利用されてきた2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)  $5 \text{ mg L}^{-1}$ を単独で含むカルス誘導培地に、幼苗から摘出した茎頂分裂組織を置床したが、体細胞不定胚形成カルスを得るに至らなかった。しかし、同培地にさらに低濃度 ( $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ ) のベンジルアデニン (BA) を添加した培地を使用することでカルス形成が促進され、体細胞不定胚形成カルスを得ることができた。このことから、本系統の体細胞不定胚形成カルスの誘導には培地へのBA添加が有効であることが明らかとなった。得られた体細胞不定胚形成カルスを  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  ジベレリン (GA) を添加した培地あるいは  $3 \text{ g L}^{-1}$  活性炭を加えたホルモンフリー培地に置床することで植物体を再生させることができた。シュートには再生時に使用した培地間で形態的な差が認められ、GA添加培地上で形成されたシュートは葉の色が薄く、細長い形態を示し、軟弱であった。一方、活性炭を添加したホルモンフリー培地上では健全なシュートが多数形成された。このことから本系統の植物体再生には活性炭を添加したホルモンフリー培地が適していることが示唆された。

キーワード：活性炭, サトウキビ野生種, 植物体再生, 組織培養, ベンジルアデニン

# 耕作放棄地放牧に用いた冬作飼料作物をリビングマルチとするダイズ栽培法

## 1. イタリアンライグラスを用いた方法

手島茂樹・池田哲也<sup>1</sup>・進藤和政・山田大吾

農研機構畜産草地研究所 草地管理研究領域, 御代田町, 389-0201

<sup>1</sup> 農研機構畜産草地研究所 企画管理部, 那須塩原市, 329-2793

### 要 約

耕作放棄地での小規模移動放牧に用いたイタリアンライグラス再生草をリビングマルチとして利用するダイズの不耕起栽培法を開発するため、早晩性の異なるイタリアンライグラス2品種の放牧利用後に不耕起播種されたダイズの出芽・定着、初期生育、子実収量等を明らかにした。6月中旬に放牧終了後、フレールモアで刈り払った2つのイタリアンライグラス(IR)草地(早生IR区、晩生IR区)において、イタリアンライグラスを枯殺せずにダイズを不耕起播種した。ダイズの定着は、残草が多かった2006年は低かったが、残草が少なかった2008年は高かった。雑草の発生量は、前植生をダイズの播種前に除草剤処理した対照区より多かったが、ダイズの初期生育にはほとんど影響しなかった。また、雑草の発生量は、晩生IR区が早生IR区に比べて低かった。ダイズの子実収量は、早生IR区、晩生IR区とも対照区と同程度であった。これらの結果、イタリアンライグラスのリビングマルチ利用は、ダイズの不耕起栽培における一層の省力化、低コスト化につながる技術であり、その際に用いる品種は、晩生品種が適していることが示唆された。

**キーワード：**イタリアンライグラス、ダイズ、リビングマルチ栽培、不耕起播種、放牧

### 緒 言

近年、過疎化と高齢化が進む中山間地域を中心に耕作放棄地が増加傾向にあり、農地の荒廃だけでなく農村集落の崩壊にもつながりかねない状況になりつつある。このような中、耕作放棄地を利用した小規模移動放牧<sup>1)</sup>は、耕作放棄地の解消手段の一つとして注目され、全国的に普及が進みつつある。今後、中山間地における農村集落の崩壊を防ぐためには、耕作放棄地等の放牧利用を集落全体の土地利用計画に組み込んだ省力・低投入型の土地利用技術を中心とした継続的な利用方法を構築していく必要がある。このためには、放牧と耕種作物との輪作による農畜産物の持続的安定生産システムを開発する必要があると考えた。このシステムの構築に必要な技術としては、基点となる小規模移動放牧を行っている農地が、元来耕作が放棄されるような状況であることから、投入

する資材と労力を少なくできる技術、加えて、耕作意欲を回帰させるために生産物の付加価値を高めることができる技術があげられる。そこで、不耕起栽培等の省力栽培法が検討されているダイズ(*Glycine max* Merr.)に着目し、これを基幹とした小規模移動放牧とダイズの輪作技術について検討することとした。

我が国における不耕起栽培研究は、2000年頃からイネ、ムギ、ダイズで研究が進められた結果、いくつかの専用播種機が開発され不耕起栽培技術とともに普及しつつある。その一つであるダイズの不耕起狭畦栽培<sup>3)</sup>は、転作田における麦作との輪作技術として開発され、播種前の播種床整備と播種後の雑草管理を割愛できることから省力・低コスト栽培技術として期待されている。

一方、農産物の付加価値を高める方法として、無農薬、減農薬栽培が研究されている。近年、圃場面を被覆する植物(カバークロープ)をあらかじめ栽培し、その中に

作物の種子を播種することにより、作物の初期生育時の雑草発生を抑えるリビングマルチ栽培が飼料作物栽培等で報告されている<sup>7,8,9)</sup>。ダイズにおいても越夏性の低いオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) を用いた方法が検討されている<sup>4)</sup>。

本研究では、オオムギと同様に越夏性が低いイタリアンライグラス (*Lolium multiflorum* Lam. 以下 IR) と耐寒性が強いライ麦 (*Secale cereale* L.) をカバークロップとして用いる方法を検討することとし、第1報となる本報告では、イタリアンライグラスを放牧利用した後カバークロップとして用い、同時に不耕起狭畦栽培を行うダイズの減農薬栽培について検討した。また、本栽培方法では、ダイズの生育初期に IR が雑草を抑制するだけでなく、ダイズの生育に伴って IR 自身は枯死し、植生が入れ替わることが望まれる。IR は、早晚性の違いによって草型や越夏性が異なることから、ダイズのリビングマルチ栽培に適した品種を選定するため、IR の早晚性についても検討を行った。

## 材料および方法

### 1. 試験圃場

長野県北佐久郡御代田町内の野菜作跡の耕作放棄地 (75 m × 24 m) を試験圃場として用いた。試験圃場は、浅間山火山灰を基とする黒ボク土壌で、1997年にオーチャードグラス (*Dactylis glomerata* L.) とペレニアルライグラス (*Lolium perenne* L.) を混播し、翌年から2002年まで夏季の放牧試験に用いた後、本試験を実施する前年までの2年間は、毎年9月に耕起して IR を播種し、冬季放牧を行った。

### 2. ダイズ播種前までの圃場管理

ダイズ播種の前年(2005年9月5日, 2007年9月27日)に、IRリビングマルチ区として早晚性が異なる IR2 品種「タチワセ」(早生)、「エース」(晩生)を、慣行の不耕起播種区(対照区)としてライ麦1品種「ハルミドリ」を播種した。播種量は、いずれの草種・品種ともに6 kg/10aとした。両年とも試験圃場を1区11 m × 17 mの区画に9分割し、3処理(早生 IR 区, 晩生 IR 区, 対照区)・3反復をラテン方面に配置した。なお、区画間に電気牧柵等の分離柵は設けなかった。また、2005年の IR の播種時には、基肥として N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O: 10-7.5-5 kg/10a を施用したが、2007年は無施肥とした。

2006年は、黒毛和種繁殖雌牛2頭(平均体重450 kg)

を、3月2日から28日の約1ヶ月間放牧した(260頭・日/ha(体重500 kg換算))。また2回目の放牧を6月5日-26日の3週間、放牧頭数を3頭にして行った(331頭・日/ha(体重500 kg換算))。さらに、放牧終了と同時に IR とライ麦の残存草をフレールモアで刈り払った。2008年も同様に、4月9日-5月7日(311頭・日/ha(体重500 kg換算))および6月2日-18日(178頭・日/ha(体重500 kg換算))の2回、黒毛和種繁殖牛2頭(平均体重500 kg)を放牧した。また、2回目の放牧終了後もライ麦だけは残存量が多かったため、フレールモアで刈り払った後、試験区外に搬出した。

### 3. ダイズ栽培

2006年は6月27日に、2008年は6月24日に、不耕起播種機(松山株式会社ニプロ NSV600B)を用いてダイズを播種した。ダイズの品種は、長野県で一般的に栽培されている加工用品種のナカセンナリで、株間13 cm, 畦間30 cm, 1粒播きの設定で播種した。2006年は、同時に施肥(N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O: 3-12-6 kg/10a)を行ったが、2008年は無施肥とした。なお、ダイズ栽培時の管理作業用トラクタの走行帯を圃場の外縁から内側に3-5 mの幅で設けたため、それぞれの試験区のダイズ播種面積は、当初より狭まり、各区96-187 m<sup>2</sup>(平均123 m<sup>2</sup>)となった。IRを播種した部分は、ダイズ播種前後の除草剤処理は一切行わなかったが、ライ麦部分は対照区として、不耕起狭畦栽培の工程<sup>3)</sup>通り、ダイズ播種前に除草剤(グリホサートアンモニウム塩)を処理し、播種後に土壌処理除草剤(ベンチオカーブ・ペンディメタリン・リニュロン乳剤)の処理を行った。ダイズ播種前の除草剤処理は、2006年が6月27日、2008年が6月20日であった。

ダイズ生育期間中は、中耕・培土ならびに除草剤による雑草防除は行わなかったが、2006年は8月29日に、2008年は9月4日に雑草の調査を実施した際、広葉雑草を抜き取った。病虫害の防除は、両年とも1回だけ行い、2006年は9月8日、2008年は9月1日に、殺虫剤と殺菌剤の混用散布を全試験区で行った。使用した薬剤のうち、殺菌剤は両年ともチオファネートメチル剤を用いたが、殺虫剤は、2006年が MEP 剤、2008年がエトフェンブロックス剤であった。

収量調査を行った後、汎用コンバイン(ヤンマー GS360C)により収穫した。調査日と収穫日は、2006年がそれぞれ11月8日と9日、2008年が11月7日と13日であった。2006年の収穫時は、各試験区の子実を区別なくコンバインにより収穫したが、2008年の収穫時は、各草種・品種毎に別々に収穫した。さらに収穫した

子実は、乾燥調製の後、選粒機（ヤンマー YBS500G）により夾雑物を除去し精選粒の重量を測定した。この作業は、2006年11月13日と2008年11月26日に行った。

#### 4. 調査方法

ダイズ播種時に、実際に機械が播種した粒数を、機械に装填したダイズ種子の重量と播種後に残った種子量および播種ダイズの100粒重から求めた。また、収量調査時に単位面積当たりのダイズの個体数を求め、これを播種粒数で除して残存率とした。

2008年のダイズ栽培において、ダイズの主茎長とIRの草高を、ダイズ播種時からIRの生育個体が確認できなくなるまで約2週間間隔で調査した。ダイズ主茎長、IR草高ともに、1回の調査でそれぞれ1反復区当たり7個体ずつ、1草種・品種あたり21個体を調査した。

2006年の雑草調査は、反復区毎にダイズと同程度以上の大きさの個体数を抜き取りにより数えた。2008年の調査では、広葉雑草を種毎に数え、イネ科雑草は被度を測定した。

2006年のダイズの収量調査は、各反復区内に任意の2個体を決め、この個体と同一畦上で連続する10個体および、この個体の隣の畦上の個体から連続する10個体について、それぞれ10個体間の長さを計測した後、各個体を地上5cmの高さで刈り取った。単位面積あたりのダイズ個体数は、刈り取った10個体の畦長から単位面積あたりの個体数を逆算して求めた。また、単位面積あたりの子実収量は、その個体数に個体あたりの子実収量を乗じて単位面積あたりの子実収量を算出した。2008年の調査では、各反復区内に任意の2個体を決め、この個体と同一畦上で連続する20個体について、同様に20個体間の長さを測定し、個体を刈り取った。単位面積あたりのダイズ個体数と単位面積あたりの子実収量は、刈り取った20個体の畦長から、2006年と同様に算出した。刈り取った個体は、それぞれ主茎長、分枝数、総節数を

記録した。また、自然乾燥あるいは20℃以下で通風乾燥した後、同一調査地点の20個体毎に脱粒し、総子実数、不良子実数、総子実重、100粒重を測定した。総子実重と100粒重は、高周波容量式穀物水分計（静岡製機MGMT-1）により測定した水分値を用いて、水分15%での重量に補正した。

ダイズの主茎長、分枝数、子実収量、100粒重ならびに不良子実率は、Tukeyの方法により分散分析を行った<sup>10)</sup>。なお、ダイズの主茎長と不良子実率は、角変換を行った後に分析を行った。

### 結果および考察

#### 1. ダイズ播種と定着

ダイズ栽培中の気象状況を表1に示した。平均気温は、両年とも平年に比べて高い傾向にあり、積算降水量も11月を除き概ね平年より高い傾向にあった。積算日照時間は、2006年の6-7月は、平年に比べて少なく、2008年の7月は平年に比べて多かったが、その他の月は平年並みであった。

ダイズの播種粒数と収穫時の個体数から求めた残存率は（表2）、2006年栽培時が58-69%、2008年栽培時が78-90%であり、2006年栽培時の残存率は2008年栽培時に比較して10%以上低い値であった。後述するように、両年とも、ダイズの生育に影響を及ぼす雑草の発生は少なく、前植生を枯殺した対照区においても2006年の残存率が低い値となっていることから、こうした低い残存率はIRの有無が影響したものではないと考えられる。ここで収穫時個体数が、ほぼ出芽・定着個体数と考えると、2006年栽培時の残存率が低かった最も大きな要因として、出芽個体数の低下、すなわち播種精度が低かったことが考えられる。2006年栽培では、1回目の放牧から2回目の放牧までの休牧期間が長かったため、2回目の放牧開始時の再生草量は、IR、ライ麦ともに高く、

表1. 栽培期間中の気象状況

		6月	7月	8月	9月	10月	11月
平均気温 (°C)	2006	16.0	19.4	21.1	16.0	11.5	5.7
	2008	15.2	20.7	20.3	16.6	10.9	4.6
	平年	15.4	19.3	20.3	15.9	9.6	4.2
積算降水量 (mm)	2006	112.5	394.5	70.0	152.5	196.0	79.5
	2008	169.5	120.0	220.5	131.0	68.5	44.0
	平年	124.7	134.3	158.6	110.1	140.1	153.9
積算日照時間 (h)	2006	101.0	86.9	174.6	116.0	150.2	154.3
	2008	123.3	173.1	146.4	113.2	159.4	137.5
	平年	124.7	134.3	158.6	110.1	140.1	153.9

表2. ダイズ播種粒数と残存率

処 理 <sup>i)</sup>	2006年			2008年		
	播種粒数 <sup>ii)</sup> (個/10a)	収穫時個体数 (本/10a)	残存率 (%)	播種粒数 (個/10a)	収穫時個体数 (本/10a)	残存率 (%)
早生 IR 区	21,536	12,539	58	26,673	20,916	78
晩生 IR 区	21,536	14,930	69	26,673	23,952	90
対 照 区	21,536	13,145	61	26,673	23,420	88

i) 各処理区のダイズ播種前の植生は、イタリアンライグラス品種タチワセ（早生 IR 区）

イタリアンライグラス品種エース（晩生 IR 区）、ライ麦品種ハルミドリ（対照区）

ii) 播種粒数：(播種機装填時重量 - 播種後残存重量) / 1 粒重

出穂して草丈も高かったため、踏み倒しなどによる残草量が多かった。このため、退牧後に掃除刈りを行ったが、刈り倒した草が大量に堆積した。今回用いた不耕起播種機は、逆転ロータリによって作った溝にダイズ種子を落としていく方式であったが、堆積した刈草がロータリの刃や回転軸に巻き付いたことや種子落下口周辺に挟まったことにより、ダイズ種子の溝内への落下や覆土が妨げられ、播種精度を低下させたものと思われる。これに対して2008年栽培の放牧では、休牧期間を短縮し、再生草量を低下させたため、IRを地際付近まで採食させることができた。しかしライ麦は、IRに比べ嗜好性が劣り残食草量が多かったため、2006年栽培の様な播種精度の低下を防ぐ目的で、掃除刈りと堆積した草の除去を行った。これらの結果2008年は、堆積した草が播種作業に及ぼす影響は低減され、残存率が2006年に比べ高かったものと思われる。

一方、ダイズの出芽始めは、2006年が7月3日、2008年が7月1日で、播種から出芽までの日数は、ほとんど変わらなかった。しかし、2008年は、翌日には出芽揃いになったのに対し、2006年の出芽揃いは遅く、前述のようなIRやライ麦の堆積草の影響は、播種精度の低下だけでなく、出芽揃いにも影響を及ぼしていたといえる。このため、放牧に用いたIRをカバークロップとして用いるリビングマルチ栽培では、残存草の影響が出ないように、ダイズ播種前の放牧において十分に採食させることが重要と思われる。

## 2. ダイズの生育とIRの影響

次にリビングマルチとして用いたIRの再生についてみてみると、2006年栽培では、ダイズの生育を抑制するほどの草勢はなかったものの、秋以降も早生IR区及び晩生IR区（以下両IR区）ともにIRの生育個体が多く見られた。これに対し2008年栽培では、早生IR区は8月下旬以降、晩生IR区は9月上旬以降、IRの生

育個体はほとんど見られなかった。ここで、両年の7-9月の平均気温をみてみると、いずれの月も平年値と同様かやや高い値を示しており、2006年栽培時の気象条件がカバークロップに用いたIRの越夏を助長したとは考えにくい。このため、2006年栽培時のIRも2008年と同様に越夏できなかったものと考えられ、2006年栽培時の秋季以降に観察されたIR個体は、越夏した個体ではなく実生から生育した個体と考えられる。こうした秋季以降のIR個体の発生は、2006年の両IR区におけるダイズの定着個体数が不耕起狭畦栽培における目標茎数密度の20,000本/10aに比べ大幅に低く、ダイズ本葉の展開後も完全には地上部を覆うことができず、IRが発芽し生育できる空間が確保されたためと考えられる。

2008年栽培時においてIRの草高と大豆主茎長の推移をみると（図1）、IRの草高は両IR区ともにダイズ播種時にすでに10cm前後であった。早生IR区のIRの草高は、7月中旬までダイズ主茎長に比べ高く推移した。IRの早生品種タチワセは、放牧終了時には節間伸長を始めており、伸長速度は高かったが葉部割合が低く、生育してもダイズを覆うことはほとんどなかった。また、7月中旬以降は、ダイズの主茎長がIRの草高を上回ったことから明らかなように、ダイズの葉がIRを覆い、生育を抑制した。このように早生のIRは、ダイズの生育を抑圧することはなかった。しかし、出穂茎の多くは、8月中旬頃にIRが枯死するまでダイズの冠部より高く、7月下旬の風雨により一部のIRが周辺のダイズに覆い被さるように倒伏するなどの影響も見られた。これに対して晩生IR区は、すでに7月中旬にダイズの主茎長がIRの草高を上回っており、早い時期から、ダイズがIRの生育を抑制していたと言える。また、晩生品種のエースは、タチワセに比べほふく型のため、上方への伸長よりも横方向へ展開したため、IRがダイズの生育に影響した期間は短かったものと思われる。さらに、出穂茎が少なく、ダイズの冠部を上回る出穂茎はほとんど見られ

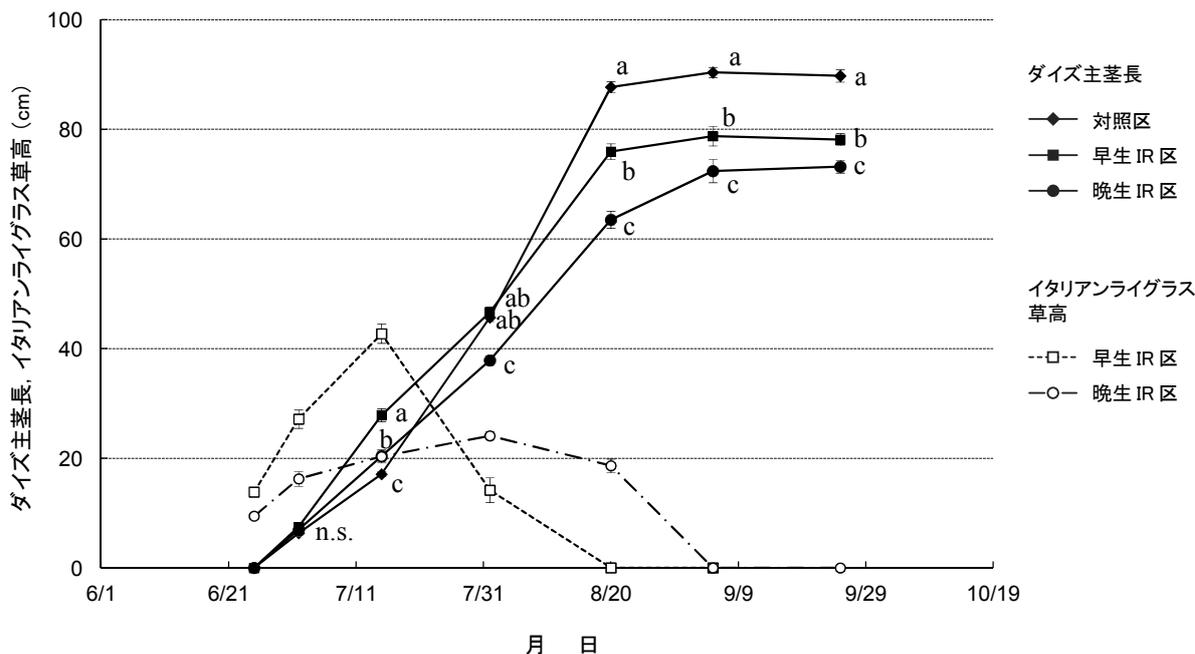


図 1. 2008 年におけるダイズの主茎長とイタリアンライグラスの草高の経時的変化  
各記号は平均値を、縦棒は標準誤差を表す  
同一調査日のダイズの異符号間に有意差有り ( $p < 0.01$ ), n.s. は有意差なし

表 3. イタリアンライグラスリビングマルチによる雑草抑制効果

処 理 <sup>i)</sup>	2006 年 <sup>ii)</sup>	2008 年				
	総雑草数 (本/m <sup>2</sup> )	アオビユ (本/m <sup>2</sup> )	シロザ (本/m <sup>2</sup> )	ヒメムカシヨモギ (本/m <sup>2</sup> )	ヒメジョオン (本/m <sup>2</sup> )	メヒシバ被度 (%)
早生 IR 区	2.3	0.1	0.0	6.9	0.7	35.0
晩生 IR 区	1.5	0.1	0.0	7.2	0.2	2.7
対照区	0.1	1.6	0.1	0.4	0.1	30.0

i) 各処理区のダイズ播種前の植生は、イタリアンライグラス品種タチワセ (早生 IR 区)  
イタリアンライグラス品種エース (晩生 IR 区)、ライ麦品種ハルミドリ (対照区)

ii) 2006 年は、広葉雑草のみの調査

ず、早生 IR 区のように IR の倒伏による被害もなかった。

一方、両 IR 区と対照区のダイズ主茎長を比較すると、IR の生育が旺盛な 7 月中旬頃までは、両 IR 区のダイズの主茎長が対照区より高い傾向にあったが、ダイズの主茎長が IR の草高を上回る 7 月下旬頃からは対照区が両 IR 区に比べ高くなり、ダイズの主茎の伸長が止まった 8 月下旬以降は有意 ( $p < 0.01$ ) に高かった。ただし、後に述べるように 2006 年栽培では、収穫時のダイズの主茎長が早生 IR 区、対照区、晩生 IR 区の順に高く、2008 年とは異なっていた。こうした結果の要因としては、先に述べたように 2006 年は、実生由来と考えられる IR がダイズ収穫時まで生育していたことから、これらの IR がダイズの生育に影響していたことが考えられ

る。このように、カバークロップとしての IR は、ダイズの伸長に少なからず影響を及ぼしており、さらに検討が必要と思われる。しかしながら、ダイズの不耕起狭畦栽培では、通常の栽培方法に比べ栽培後期に風雨によってなびいたり湾曲しやすくなる傾向にある<sup>2)</sup>ことから、2008 年に両 IR 区で観察されたダイズの主茎長の伸長が抑制されるという現象は、これらの影響が受け難くなる利点も有していると考えられる。特に晩生の IR でこの傾向が強く、前述のように IR 自身の倒伏も少ないことから、カバークロップとしての利用適性が早生に比べて優れているものと思われる。

2006 年栽培時の広葉雑草の本数は (表 3)、対照区の 0.1 本/m<sup>2</sup> に対し早生 IR 区 2.3 本/m<sup>2</sup>、晩生 IR 区 1.5 本/

m<sup>2</sup>であった。2008年栽培時も同様に、両IR区で発生した広葉雑草数が対照区に比べ多かった。しかし、対照区でダイズの生育初期に問題となるシロザとアオビユが多かったのに対し、両IR区とも、これらの草種やタデ類等の大型の1年生雑草は少なく、越年生のヒメムカシヨモギ、ヒメジョオンが多かった。このような越年生雑草は、前年の草地造成時に発生したもので、対照区は、除草剤処理によりダイズの出芽前にほとんど枯死したと思われる。両IR区は、除草剤処理を行わなかったため、これらの雑草は残存していたが、ダイズの初期生育時には草高が低く、ダイズの初期生育に及ぼす影響は少なかったものと思われる。また、除草剤処理を行った対照区より1年生雑草の発生が少なかったことから、IRによるリビングマルチの効果が高かったものと思われる。さらに、早生IR区と対照区では、夏季以降メヒシバの被度が高かったのに対し晩生IR区で低かった。これは、ほふく型の晩生IRにより、メヒシバの発生も抑制されたと考えられる。これらのことから、IRのリビングマルチにより、ダイズの生育初期の雑草発生を抑制することができ、特に晩生品種で抑制効果が持続性も含め高いものと思われる。

### 3. ダイズの子実収量

2006年栽培の子実収量は(表4)、231-361 kg/10aで、対照区、晩生IR区、早生IR区の順に高い傾向に

あった。2008年の子実収量は(表5)、343-460 kg/10aで、いずれの区も2006年の収量より高かった。このような違いは、2006年の定着密度が、当初予定した密度である20,000本/10a以上に比べて低かったこと、生育期間を通してIRが存在した影響が大きかったものと思われる。また、両年の子実収量は、いずれも平成23年度の全国平均166 kg/10aより高かった<sup>6)</sup>。処理区間では、有意差はなかったが、晩生IR区の子実収量が最も高く、ついで対照区、早生IR区の順となり、両年とも晩生IR区が早生IR区より高い傾向にあった。IRの早晩性によりダイズ収量の違いが生じる要因の一つとして、分枝数について考えてみると、2006年栽培時における両IR区の子実収量は(表4)、ともに対照区に比べ有意に低く、処理区間で差はなかったが、分枝数が少なくなるに従って子実収量も低下する傾向にあった。また、2008年栽培時におけるダイズの子実収量は(表5)、子実収量が最も高かった晩生IR区が最も多かった(p<0.05)。本試験での栽植密度は、播種したダイズ品種ナカセンナリの通常栽培における栽植密度(8,000-9,000本/10a)より明らかに高く、通常栽培における分枝数の8.9本<sup>5)</sup>に比べ分枝数は減少したが、分枝数が子実収量に影響したことは明らかである。これに対し100粒重は、2006年栽培で有意差はなかったが(表4)、2008年栽培では、晩生IR区が早生IR区、および対照区に比べ有意(p<0.05)に低かった(表5)。分枝が増えたことで莢数

表4. 2006年栽培時のダイズ収量

処 理 <sup>i)</sup>	主茎長 <sup>ii)</sup> (cm)	分枝数 <sup>ii)</sup> (/本)	子実収量 <sup>ii) iii)</sup> (kg/10a)	機械収穫量 <sup>iii) iv)</sup> (kg/10a)	100粒重 <sup>i) iii)</sup> (g)	不良子実率 <sup>ii)</sup> (%)
早生IR区	76.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	231.2 ± 28.4 <sup>a</sup>	193.3	28.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.3 <sup>a</sup>
晩生IR区	64.5 ± 0.8 <sup>c</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	282.5 ± 69.5 <sup>a</sup>	193.3	27.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.3 <sup>a</sup>
対 照 区	69.6 ± 1.0 <sup>b</sup>	3.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	360.8 ± 19.9 <sup>a</sup>	193.3	26.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.2 <sup>a</sup>

i) 各処理区のダイズ播種前の植生は、イタリアンライグラス品種タチワセ(早生IR区)

イタリアンライグラス品種エース(晩生IR区)、ライ麦品種ハルミドリ(対照区)

ii) 平均値 ± 標準誤差 同一カラムの異符号間に有意差あり(p<0.05)

iii) 水分15%換算値

iv) コンバイン収穫時の収量 全区画一括して収穫した

表5. 2008年栽培時のダイズ収量

処 理 <sup>i)</sup>	主茎長 <sup>ii)</sup> (cm)	分枝数 <sup>ii)</sup> (/本)	子実収量 <sup>ii) iii)</sup> (kg/10a)	機械収穫量 <sup>ii)</sup> (kg/10a)	100粒重 <sup>i) iii)</sup> (g)	不良子実率 <sup>ii)</sup> (%)
早生IR区	73.0 ± 0.8 <sup>b</sup>	3.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	342.9 ± 34.9 <sup>a</sup>	232.9	29.8 ± 0.6 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.4 <sup>a</sup>
晩生IR区	65.5 ± 1.0 <sup>c</sup>	4.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	459.5 ± 33.8 <sup>a</sup>	284.1	27.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.4 ± 0.4 <sup>a</sup>
対 照 区	85.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.2 <sup>c</sup>	407.8 ± 31.4 <sup>a</sup>	325.3	30.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.6 <sup>a</sup>

i) 各処理区のダイズ播種前の植生は、イタリアンライグラス品種タチワセ(早生IR区)

イタリアンライグラス品種エース(晩生IR区)、ライ麦品種ハルミドリ(対照区)

ii) 平均値 ± 標準誤差 同一カラムの異符号間に有意差あり(p<0.05)

iii) 水分15%換算値

と子実数が増え、収量増につながったが、反対に一個あたりの子実重が低くなったといえる。このため、リビングマルチに用いた IR の早晩性の違いがダイズ子実の形成に及ぼす影響についてさらに検討する必要があると思われる。

一方、機械収量についてみると、処理区毎に求めた 2008 年栽培では（表 5）、坪刈り収量と異なり対照区が最も高く、晩生 IR 区、早生 IR 区の順となった。対照区と早生 IR 区は、前述のように、倒伏が多く、晩生 IR 区に比べ登熟が遅かったと考えられる。このため、これらの区に合わせて収穫を行った結果、登熟が進んでいたため、収穫時の衝撃による脱粒が多くなり、晩生 IR 区の機械収量と坪刈り収量との差が最も大きくなったと考えられ、適期刈りを行うことにより、機械収量も増加するものと思われる。

不良子実の割合は（表 4, 5）、早生 IR 区は対照区と同程度であったが、晩生 IR 区は対照区より低い傾向にあった。今回の調査で不良子実としたのは、紫斑病に罹病した子実、黒斑がある子実、一部が欠損した子実、未熟の子実で、コンバイン収穫時に問題となる雑草等の液汁による汚染は調査していない。また、調査に用いた子実は、液汁による汚染を受けない坪刈りに採取した子実のため、収穫時に生育していた IR が、コンバイン収穫時にどの程度ダイズの汚粒に影響するかについて今後検討する必要があると思われる。

以上のことから、IR はダイズ栽培のリビングマルチとして用いることができ、不耕起狭畦栽培と同程度のダイズ収量が得られることが明らかとなった。また、カバークロップに用いる IR は、晩生品種が早生品種に比べ適していると考えられた。

## 謝 辞

本試験の実施に当たり、放牧地の造成、放牧牛の管理、ダイズ播種および収穫調製ならびに収量調査に協力して頂いた元畜産草地研究所業務第 4 科技術専門職員の佐藤喜則氏をはじめとする業務科職員ならびに非常勤職員の方々に、感謝の意を表します。また、ダイズの収穫調製にあたって、多大な協力を頂いた御代田町塩野中山間地

営農事業組合（故内堀晴人代表）に深謝いたします。

## 引用文献

- 1) 畜産草地研究所(2006). 小規模移動放牧マニュアル, 畜草研技術リポート, 6, 1-2.
- 2) 浜口秀生 (2004). 大豆不耕起栽培技術, 中央農業総合研究センター [http://www.naro.affrc.go.jp/training/files/2004\\_1-03.pdf](http://www.naro.affrc.go.jp/training/files/2004_1-03.pdf) [2012 年 8 月 10 日参照].
- 3) 濱口秀生・中山壮一・梅本雅 (2004). 汎用型不耕起播種機によるダイズ不耕起狭畦栽培マニュアル, 中央農研研究資料, 5, 1-21.
- 4) 小林浩幸・小柳敦史 (2005). 冬作オオムギをカバークロップとして用いた不耕起ダイズ栽培において狭畦化と除草処理が雑草量とダイズの収量に及ぼす影響, 雑草研究, 50 (4), 284-291
- 5) 長野県 (2007). 平成 19 年度主要農作物奨励品種特性表, 11.
- 6) 農林水産省 (2012). ダイズをめぐる事情, 農林水産省, 東京. [http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/pdf/daizu\\_meguji\\_h2405.pdf](http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/pdf/daizu_meguji_h2405.pdf) [2012 年 8 月 10 日参照]
- 7) 高橋俊・八木隆徳・鈴木悟 (2003). シロクローバのリビングマルチによるアルファルファ単播草地の雑草侵入抑制 1. アルファルファ単播草地における雑草実生の時期別発生ならびに生育型の異なるシロクローバ品種の秋期におけるマルチ効果, 日草誌, 49 (別), 116-117.
- 8) 高橋俊・八木隆徳・鈴木悟 (2004). シロクローバのリビングマルチによるアルファルファ単播草地の雑草侵入抑制 2. 秋期にマルチ処理した雑草の越冬後の生育ならびに夏期の出芽雑草へのマルチ効果. 日草誌 50 (別), 74-75.
- 9) 魚住順・出口新・伏見昭秀 (2004). シロクローバを用いたリビングマルチ栽培における飼料用トウモロコシの播種適期, 東北農試研報, 102, 93-100.
- 10) 吉田実 (1983). 畜産を中心とする実験計画法, 養賢堂, 東京, 474p.

# Soybean Cultivation Using a Living Mulch of Winter Crops Used for Grazing on Abandoned Cultivated Lands.

## 1. Italian Ryegrass Aftermath

Shigeki TEJIMA, Tetsuya IKEDA<sup>1</sup>, Kazumasa SHINDO and Daigo YAMADA

Grassland Management Research Division,  
NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Miyota, 389-0201 Japan

<sup>1</sup>Department of Planning and General Administration,  
NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Nasushiobara, 329-2793 Japan

### Summary

Aftermath of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.), used for small-scale move grazing on abandoned cultivated lands, was utilized as living mulch for soybean (*Glycine max* Merr.) cultivation. In mid-June of 2006 and 2008, soybeans were planted in plots of two Italian ryegrass varieties (an early variety and a late variety) immediately after grazing; a non-tillage sowing method was applied without herbicide treatment. As a control, soybeans were sown in plots of rye (*Secale cereale* L.) after grazing, using the same non-tillage method with herbicides. Although more weeds emerged in the Italian ryegrass plots than in the control plots, the existence of weeds did not negatively affect initial soybean growth. Moreover, compared to the plots of the early variety Italian ryegrass, markedly fewer weeds emerged in the plots of the late variety Italian ryegrass. No significant difference was observed in the grain yield of soybeans between the control plots and the plots of both varieties of Italian ryegrass. These results indicate that soybean cultivation using Italian ryegrass as a living mulch is a laborsaving and cost effective technology that can reduce the effort required for tilling and herbicide application. It was also suggested that the late variety of Italian ryegrass is better suited for use as living mulch for soybean cultivation.

**Key words:** Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.), Soybean (*Glycine max* Merr.), living mulch-cultivation, non-tillage cultivation, grazing

## カリウムと窒素の同時制御による泌乳牛の尿量低減化

大谷文博・樋口浩二・小林洋介・野中最子<sup>a</sup>・矢用健一<sup>1</sup>・須藤まどか

農研機構畜産草地研究所 家畜生理栄養研究領域, つくば市, 305-0901

<sup>1</sup>農業生物資源研究所, つくば市, 305-0901

### 要 約

尿生成に関わる主要な栄養素要因と考えられるカリウム (K) と窒素 (N) を同時に制御した栄養管理を泌乳牛で行い, 両栄養素の尿量に対する効果と, 尿量低減化における両栄養素同時制御の有効性について検証した。飼料処理区としてイタリアンライグラスサイレージを主な粗飼料源とし, それに大豆粕, トウモロコシおよび大麦を組み合わせた高 K 高粗タンパク質 (CP) 飼料区 (HH 区; K 1.75%, CP 18.1%), 主な粗飼料源にコーンサイレージを使用し, 配合飼料の多くの部分をビール粕, コーングルテンミール, 尿素および馬鈴薯デンプンに置き換えることで K 含量を低下させた低 K 高 CP 飼料区 (LH 区; K 0.94%, CP 17.6%) および LH 飼料のビール粕とコーングルテンミールの一部を大麦と馬鈴薯デンプンに置き換えて CP 含量も低下させた低 K 低 CP 飼料区 (LL 区; K 0.93%, CP 13.5%) の 3 区を設定し, 泌乳後期牛 4 頭を用いて 3×3 ラテン方格法で出納試験を実施した。低 K 飼料を給与した LH および LL 区では, 使用した低 K 飼料原料の影響で HH 区よりも成分消化率が低下したが, 乳量・乳成分率には飼料処理による有意な差は観察されず, K と N の制御によって乳生産に悪影響が生じることはなかった。尿量は HH 区の 14.5 kg/日から LH 区で 9.8 kg/日に減少し, さらに LL 区では 6.6 kg/日まで減少した。K および N 摂取量の減少は, 泌乳牛の尿量に対して同程度の低減効果を及ぼしていたと推測された。低 K 摂取量条件下でも N 摂取量の減少が相加的な尿量低減効果を発揮することが確認されたことから, 両成分の同時制御によって泌乳牛の尿量を効率的に減少させる栄養管理は有効であると考えられた。また, LH あるいは LL 飼料給与による尿量の減少は, 泌乳牛の総水分摂取量を減少させ, 糞中水分排せつ量も減少させる効果を有する可能性が示唆された。

キーワード: 泌乳牛, カリウム, 窒素, 栄養管理, 尿量低減化

### 緒 言

泌乳牛は乳を生産するために毎日大量の水分を摂取する一方で, 尿として排せつする水分も非常に多い。多量の尿は処理を要する排せつ物の総量を増大させるだけでなく, 畜舎内では糞と混合してスラリー状になり易いため, 放置すれば悪臭の発生や牛体の汚染の原因となる。また, 糞尿を堆肥化して利用する際には, 固液分離システムの設置や多大な水分調整材が必要となり, コスト負担を余儀なくされる<sup>35)</sup>。従って, 栄養管理によって泌乳牛の尿量を減少させることができれば, 酪農経営

の糞尿処理に要する労力と経済的負担は大いに軽減されるはずである。ただし, そのための栄養管理は乳牛の生産性に対して悪影響を与えるものであってはならず, 飲水制限のような手法では尿量を減少させる効果はあっても, 同時に乾物摂取量や乳量も低下させてしまうので<sup>27)</sup>, 乳牛の尿量低減化手法として適切なものとは言えない。

泌乳牛においてナトリウム (Na) とカリウム (K) の摂取量<sup>3)</sup>, あるいは窒素 (N) と K の摂取量<sup>28)</sup> を独立変数とする尿量の重回帰式は, 高い相関係数を示すことが報告されており, Na, K および N は泌乳牛の尿生

成に関わる主要な栄養素要因と考えられることから、これらの栄養素を制御する栄養管理を行えば、泌乳牛の生理に矛盾することなく、泌乳牛の尿量を減少させることが可能と思われる。しかし、一般的な飼養管理においては、Naは鉱塩として泌乳牛に自由摂取させる場合が多いため、酪農現場で利用するための栄養管理としては、KとNを対象とした制御技術が現実的である。

これまでにK給与量制御に関しては、泌乳牛の尿量低減化に対する有効性が確認されており<sup>14,21)</sup>、コーンサイレージやビール粕などの低K飼料資源を活用して設計した実用的な低K飼料の給与でも、泌乳牛の生産性を損なうことなく、尿量を低減できることが実証されている<sup>34)</sup>。これに対してNの制御に関しては、給与飼料中の粗タンパク質(CP)水準の低減によって、泌乳牛の尿量に有意な減少を観察した報告<sup>4,5,12,39)</sup>がある一方で、異なるCP含量の飼料を給与をしても、泌乳牛の尿量に変化が認められなかったとする報告<sup>6,20,31,36,45)</sup>もあり、N制御による尿量低減効果については、未だに判然とはしていない。また、KとNの尿中排せつには相互作用が存在することも報告されており<sup>19,37,45)</sup>、両者の制御を同時に行った場合に、尿量に対するそれぞれの作用が影響を及ぼしあう可能性も考えられる。しかし、実際に飼料中の両成分を同時に制御した飼料を乳牛に給与し、尿量にどのような効果が現れるのかを観察する試験は、これまでほとんど行われていない。

そこで本研究は、泌乳牛の尿量を規制する栄養素要因と考えられるKとNを同時に制御した栄養管理を行い、両栄養素の尿量に対する効果と同時制御の有効性を検証することを目的に実施した。

### 材料および方法

泌乳後期のホルスタイン種泌乳牛4頭を、温度20℃、湿度60%に調節した代謝実験施設に収容して出納試験を実施した。供試牛は試験開始時点で平均分娩後日数 $191 \pm 30$ 日、平均体重 $509 \pm 40$ kgで、2頭が2産、2頭が3産であった。試験は予備期9日間、出納試験5日間、出納試験終了7日後に第一胃液および頸静脈血を採取するまでの連続した21日間を1期とし、3期3牛群(4頭の内2頭を同期同一処理)に3飼料処理区を割り付ける3×3ラテン方格法によって実施した。なお、試験は独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所動物実験指針に従って行った。

飼料処理は高K高CP飼料区(HH区)、低K高CP飼料区(LH区)および低K低CP飼料区(LL区)の

3区で(Table 1)、いずれの区も粗濃比は6:4とした。主な粗飼料源をHH区ではイタリアンライグラスサイレージ(2番草・出穂期)とし、LH区およびLL区ではK含量の少ないコーンサイレージ(黄熟期)とした。さらに、HH区では配合飼料中の主なタンパク質源を大豆粕、炭水化物源をトウモロコシと大麦としたが、LH区とLL区では飼料の低K化を図るためにこれらを減らし、代わりにK含量の低いビール粕、コーングルテンミール、尿素および馬鈴薯デンプンを加えた。また、LL区の飼料構成はLH区をベースとし、タンパク質源のビール粕とコーングルテンミールの一部を大麦および馬鈴薯デンプンに置き換えることによって、飼料のCP水準を低下させた。

各飼料の成分組成をTable 2に示した。K含量はHH区の1.75%に対して、LH区とLL区ではそれぞれ0.94%および0.93%と、HH区の半分程度の水準であった。CP含量はHH区とLH区が18%程度(それぞれ18.1%と17.6%)の水準なのに対し、LL区は両区よりも4%以上低い13.5%であった。また、コーンサイレージと馬鈴薯デンプンを用いたLH区とLL区では、HH区と比べて中性デタージェント繊維(aNDFom)と酸性デタージェント繊維(ADFom)含量が低く、デンプン含量が高かった。Na含量はHH区がやや高かった。

飼料給与量は試験開始に先だつ馴致期間中に、当所の慣行的な飼養条件下で観察された各試験牛の乳量と試験飼料の栄養価から、日本飼養標準<sup>28)</sup>の要求量に基づいたTDN充足率が概ね100%となるように給与量を設定し、定量を給与した。飼料は粗飼料と濃厚飼料のすべ

Table 1. Ingredient composition of the experimental diets (% DM)

Ingredient	Diets <sup>1</sup>		
	HH	LH	LL
Italian ryegrass silage	45.0	—	—
Corn silage	—	50.0	50.0
Alfalfa hay cube	15.1	10.1	10.1
Corn	11.7	4.9	4.9
Barley	12.3	8.9	9.4
Soybean meal	13.5	2.1	2.0
Brewer's grains	—	10.1	9.1
Corn gluten meal	—	6.1	2.0
Potato starch	—	5.0	9.6
Vegetable oil calcium soap	1.5	1.0	1.0
Urea	—	0.5	0.5
Vitamin-Mineral mixture	0.9	1.4	1.4

<sup>1</sup>HH = high K high CP diet, LH = low K high CP diet, LL = low K low CP diet

DM : dry matter

てを混合し、1日2回に分けて朝夕の搾乳(8:30および18:00)終了後に給与したが、試験期間を通して、すべての牛で残飼は観察されなかった。また、ウォーターカップからの飲水は自由とした。

出納試験は全糞尿採取法により実施した。出納試験期間中は毎日、飲水量、乳量、糞量、尿量を個体毎に定時に測定し、糞および尿は5日分を日量に応じて按分混合して分析サンプルとした。牛乳も各搾乳時毎の乳量に応じて按分混合して分析サンプルとしたが、乳脂肪、乳蛋白質、乳糖および全固形分については各搾乳時毎のサンプルを分析し、乳量による加重平均を行って出納試験期間における成分値を算出した。

出納試験終了7日後の朝の搾乳が終了して飼料を給与する直前に、第一胃液の経口的な採取および真空採血管を用いた頸静脈血の採取を行った。採取した第一胃液は四重ガーゼでろ過した後、一部は直ちにpHとアンモニア濃度を測定し、残りは揮発性脂肪酸(VFA)濃度分析用に凍結保存した。血液は3,000rpm、30分間の遠心分離により得られた血漿を分析用サンプルとして凍結保存した。

飼料および糞の一般成分と乳および尿中の水分とNは常法<sup>1)</sup>に従って分析し、飼料および糞のaNDFomおよびADFomはデタージェント法<sup>48)</sup>によって分析した。デンプンは過塩素酸抽出-グルコースオキシダーゼ比色法<sup>1)</sup>によって分析したが、その際のグルコース分析にはグルコースC IIテスト(ワコー純薬)を使用した。また、それらサンプルと乳および尿サンプルは、硝酸-過塩素酸による湿式灰化後、原子吸光分光分析計(AA-

6400F, 島津製作所)によりKとNa濃度を測定した。乳脂肪、乳蛋白質、乳糖および全固形分の分析には赤外線自動分析計(ミルコスキャン133B, ホスエレクトリック社)、第一胃液VFA濃度の測定にはガスクロマトグラフィー(6890シリーズ, ヒューレットパッカード社)、血漿浸透圧の分析には浸透圧計(OSMOMAT 030, ゴノテック社)をそれぞれ用いた。血漿および乳中尿素濃度と第一胃液アンモニア濃度は市販キット(尿素窒素Bテストワコーおよびアンモニアテストワコー, 和光純薬)を用いて分析を行った。また、血漿Na, K, 塩素(Cl), グルコース、遊離脂肪酸および乳酸濃度は株式会社エスアールエル(東京)に分析を依頼し、Na, KおよびClは電極法により、グルコース、遊離脂肪酸および乳酸は酵素法によって測定した。

出納試験の測定結果から、K, NおよびNaの見かけの蓄積量(発汗等による損失量を含む)は、各成分の摂取量(Naの場合は飲水からの摂取量を含む)から総排せつ量(糞中および尿中排せつ量と乳中移行量の合計)を差し引いて求めた。また、見かけの水分保持量(蒸発量を含む)は飼料水量、飲水量および代謝水量を合計した総水分摂取量から、糞中および尿中水分排せつ量と乳中水分移行量(乳中全固形分から算出)を合計した総水分排せつ量を差し引いて求め、代謝水量は可消化CP摂取量と可消化非タンパク質有機物摂取量から算出した<sup>13)</sup>。

統計処理はSASのGLMプロシジャ<sup>40)</sup>によって行い、データは最小二乗平均値と標準誤差で記載した。分散分析で飼料処理に有意な効果が検出された場合には、ボンフェローニの方法により最小二乗平均値の多重比較検定を行った。また、有意水準は危険率5%未満として表中に示したが、5%以上10%未満の場合は傾向があるものとして本文中に危険率を記載した。

## 結 果

Table 3に乾物摂取量、排せつ物量、乳量、乳成分率、消化率および栄養価の測定結果を示した。定量給与条件で残飼がなかったことから、乾物摂取量はすべての区で同じであった。糞量はHH区が最も多く、次いでLL区、LH区の順に少なくなり、HH区とLH区の間には有意な差が認められた。尿量はHH区の14.5 kg/日に対して、LH区で約3割少ない9.7 kg/日、さらにLL区ではHH区の半分以下の6.6 kg/日へと有意な減少が観察された。LL区の尿量はLH区に対しては減少傾向であった(P=0.070)。糞尿合わせた排せつ物量ではLH区とLL区がほぼ同程度であり、HH区よりも10 kg以上少

Table 2. Chemical composition of the experimental diets (% DM)

	Diets <sup>1)</sup>		
	HH	LH	LL
DM (% FM)	76.2	46.1	46.0
OM	92.0	93.6	93.8
CP	18.1	17.6	13.5
EE	3.8	4.4	4.1
aNDFom	46.8	39.9	38.8
ADFom	26.8	21.5	20.7
Starch	16.0	29.4	33.4
K	1.75	0.94	0.93
Na	0.27	0.19	0.20

<sup>1)</sup> HH = high K high CP diet, LH = low K high CP diet, LL = low K low CP diet

DM: dry matter, FM: fresh matter, OM: organic matter, CP: crude protein, EE: ether extracts, aNDFom: neutral detergent fiber, ADFom: acid detergent fiber

Table 3. Dry matter intake, excreta, milk performance, digestibility and nutrient values of cows fed the experimental diets

	Diets <sup>1</sup>			SE
	HH	LH	LL	
DM intake (kg/day)	15.8	15.8	15.8	0.0
Excreta (kg/day)				
Feces	40.2 <sup>a</sup>	33.7 <sup>b</sup>	36.1 <sup>ab</sup>	1.1
Urine	14.5 <sup>a</sup>	9.8 <sup>b</sup>	6.6 <sup>b</sup>	0.7
Feces + Urine	54.7 <sup>a</sup>	43.5 <sup>b</sup>	42.7 <sup>b</sup>	1.3
Milk yield (kg/day)	22.2	23.7	21.7	0.4
Milk composition (%)				
Fat	4.26	4.29	4.36	0.14
Protein	3.08	3.08	3.16	0.06
Lactose	4.56	4.58	4.60	0.08
Digestibility (%)				
DM	69.8 <sup>a</sup>	65.2 <sup>b</sup>	64.0 <sup>b</sup>	0.6
OM	72.1 <sup>a</sup>	67.1 <sup>b</sup>	65.8 <sup>b</sup>	0.6
CP	70.5 <sup>a</sup>	67.2 <sup>a</sup>	59.2 <sup>b</sup>	0.7
EE	72.3	65.0	62.4	3.2
aNDFom	63.4 <sup>a</sup>	51.4 <sup>b</sup>	48.3 <sup>b</sup>	2.0
ADFom	61.2 <sup>a</sup>	48.1 <sup>ab</sup>	44.7 <sup>b</sup>	2.7
Starch	97.4 <sup>a</sup>	92.3 <sup>b</sup>	92.1 <sup>b</sup>	0.9
TDN (%DM)	69.7 <sup>a</sup>	66.4 <sup>b</sup>	64.9 <sup>b</sup>	0.7
TDN/CP	3.85 <sup>b</sup>	3.78 <sup>b</sup>	4.82 <sup>a</sup>	0.04
<sup>2</sup> CP sufficiency rate (%)	132 <sup>a</sup>	121 <sup>b</sup>	99 <sup>c</sup>	1

<sup>a,b,c</sup>Means in a row with different superscripts differ significantly (P<0.05)

<sup>1</sup>HH = high K high CP diet, LH = low K high CP diet, LL = low K low CP diet

<sup>2</sup>CP sufficiency rate = CP intake / CP requirement x 100

DM : dry matter, OM : organic matter, CP : crude protein, EE : ether extracts, aNDFom : neutral detergent fiber, ADFom : acid detergent fiber, TDN : total digestible nutrients

なかった。また、乳量および乳成分率には飼料処理による統計的に明確な差は観察されなかった。

乾物、有機物、aNDFom およびデンプン消化率は、HH 区に比べて LH および LL 両区で有意に低下した。ADFom 消化率も HH 区に対して LL 区で有意に低下し、LH 区でも 10% 以上低下する傾向が観察された (P=0.052)。また、粗脂肪 (EE) 消化率も LH および LL 区の方が HH 区よりも低かったが、その違いは統計的に明確なものではなかった。CP 消化率は HH および LH 両区に対して LL 区で有意に低下したが、LH 区も HH 区よりも約 3% 低い傾向にあった (P=0.067)。これらの各成分の消化率の違いを反映して、可消化養分総量 (TDN) は HH 区よりも LH および LL 区が有意に低くなった。また、TDN/CP 比は CP 水準の低い LL 区が他の 2 区よりも有意に高かった。日本飼養標準<sup>28)</sup>の要求量に基づいて算出した CP 充足率は、HH、LH および LL 区でそれぞれ 132、121 および 99% で、各処理間

の差は有意であった。

Table 4 に K、N および Na 出納の結果を示した。K 摂取量は HH 区の 277 g/日に対して、LH 区と LL 区でそれぞれ 149 g/日および 147 g/日で、HH 区よりも約 130 g/日少なかった。K の糞中への排せつ量に飼料処理の影響は観察されなかったが、尿中への排せつ量は摂取量の違いに反応して、LH および LL 区で HH 区よりも 100 g/日以上減少した。また、乳中への K 移行量にも処理間の差がなかったことから、糞尿合計した排せつ物中への K 排せつ量および排せつ物と乳を合わせた総 K 排せつ量の変化は、尿中排せつ量の変化が反映される結果となった。さらに、見かけの K 蓄積量も HH 区に比べて LH 区と LL 区が有意に減少し、その減少量は両区で同程度であった。

N 摂取量は HH 区の 457 g/日に対して LH 区は 443 g/日で 14 g/日少なかったが、LL 区は 340 g/日と他の 2 区よりも 100 g/日以上少なかった。しかし、乳中へ

Table 4. K, N and Na balance of cows fed the experimental diets

	Diets <sup>1</sup>			SE
	HH	LH	LL	
K intake (g/day)	276.8 <sup>a</sup>	149.0 <sup>b</sup>	147.1 <sup>b</sup>	1.0
K excretion (g/day)				
Feces	66.4	62.5	62.9	3.8
Urine	149.1 <sup>a</sup>	40.9 <sup>b</sup>	42.5 <sup>b</sup>	2.2
Milk	36.3	38.6	35.2	1.8
Feces + urine	215.5 <sup>a</sup>	103.4 <sup>b</sup>	105.5 <sup>b</sup>	3.7
Total <sup>2</sup>	251.8 <sup>a</sup>	142.0 <sup>b</sup>	140.7 <sup>b</sup>	3.9
K balance <sup>3</sup> (g/day)	25.1 <sup>a</sup>	7.0 <sup>b</sup>	6.5 <sup>b</sup>	3.6
N intake (g/day)	457.1 <sup>a</sup>	443.3 <sup>b</sup>	340.1 <sup>c</sup>	1.4
N excretion (g/day)				
Feces	135.2 <sup>b</sup>	145.1 <sup>a</sup>	138.6 <sup>ab</sup>	2.0
Urine	148.9 <sup>a</sup>	117.3 <sup>b</sup>	70.5 <sup>c</sup>	5.2
Milk	106.2	110.8	103.2	1.6
Feces + urine	284.1 <sup>a</sup>	262.5 <sup>b</sup>	209.1 <sup>c</sup>	4.1
Total <sup>2</sup>	390.3 <sup>a</sup>	373.2 <sup>b</sup>	312.3 <sup>c</sup>	3.1
N balance <sup>3</sup> (g/day)	66.8 <sup>a</sup>	70.1 <sup>a</sup>	27.8 <sup>b</sup>	2.8
Na intake <sup>4</sup> (g/day)	44.9 <sup>a</sup>	30.8 <sup>c</sup>	32.2 <sup>b</sup>	0.1
Na excretion (g/day)				
Feces	25.5	13.7	14.5	3.3
Urine	6.9	5.9	5.4	1.3
Milk	6.0	6.6	5.9	0.2
Feces + urine	32.4 <sup>a</sup>	19.6 <sup>b</sup>	19.8 <sup>b</sup>	2.3
Total <sup>2</sup>	38.3 <sup>a</sup>	26.2 <sup>b</sup>	25.8 <sup>b</sup>	2.3
Na balance <sup>3</sup> (g/day)	6.6	4.7	6.5	2.2

<sup>a,b,c</sup>Means in a row with different superscripts differ significantly (P<0.05)

<sup>1</sup>HH = high K high CP diet, LH = low K high CP diet, LL = low K low CP diet

<sup>2</sup>Sum of feces, urine and milk

<sup>3</sup>Subtracted total excretion from total intake

<sup>4</sup>From feed and drinking water

のN移行量には、乳タンパク質率の結果と同様に、飼料処理の影響は認められなかった。糞中N排せつ量はLH区が最も多く、最少のHH区との差は約10gで統計的に有意であった。LL区は他の2区に対して、Nの尿中排せつ量、糞尿中排せつ量、乳中移行量も含めた総排せつ量および見かけの蓄積量のいずれも有意に少なかった。また、LH区はHH区と比較して、N蓄積量に違いはなかったが、尿中排せつ量、糞尿中排せつ量および総排せつ量は有意に少なく、その差は摂取量における差よりも大きかった。

Na摂取量はHH, LH, LL区でそれぞれ45, 31, 32g/日であり、NやKと比べると各処理区間の差は小さかったものの、その差は統計的にすべて有意であった。Naの尿中排せつ量、乳中移行量および見かけの蓄積量には飼料処理による有意な効果は観察されなかった。糞中Na排せつ量も統計的な差は検出されなかったものの、HH区の糞尿中Na排せつ量と総Na排せつ量は他

の2区よりも有意に多く、その差は概ね糞中Na排せつ量における処理間の差と一致していた。

飼料からの水分摂取量は給与飼料の水分含量が低いHH区で少なく、飲水量は逆にHH区が有意に多かった(Table 5)。HH区では代謝水生成量も他の2区と比べてわずかではあるが有意に多かった。これらを合計した総水分摂取量はHH, LHおよびLL区でそれぞれ84.8, 75.1および71.9kg/日で、HH区と他の2区の間には有意差が観察されたが、LH区とLL区の差は統計的に有意ではなかった。一方、糞中および尿中への水分排せつ量と乳中への水分移行量で観察された各飼料処理間関係は、上述の原物糞量および原物尿量と乳量で観察された結果と同様であった。ただし、HH区における糞中水分排せつ量の高値には、LH区に対する有意な差に加え、LL区との差にも一定の傾向が検出された(P=0.093)。糞尿中水分排せつ量と乳も含めた総水分排せつ量は、HH区に対してLHおよびLL区が10kg/

日以上の有意味な減少を示したが、見かけの水分保持量には飼料処理による影響は観察されなかった。

各飼料の給与による生体液成分の反応を Table 6 にまとめた。第一胃液では pH および VFA 濃度に飼料

処理による影響は観察されなかったが、アンモニア濃度は HH 区で 11.8 mgN/dl であったものが、LH 区で 7.2 mgN/dl と低下傾向を示し (P=0.054)、さらに LL 区では 3.8 mgN/dl まで有意に低下した。血漿では浸

Table 5. Water balance of cows fed the experimental diets

	Diets <sup>1</sup>			SE
	HH	LH	LL	
Water intake (kg/day)				
Feed	5.0 <sup>b</sup>	18.4 <sup>a</sup>	18.6 <sup>a</sup>	0.1
Drinking	74.7 <sup>a</sup>	51.8 <sup>b</sup>	48.5 <sup>b</sup>	1.3
Metabolic <sup>2</sup>	5.1 <sup>a</sup>	4.9 <sup>b</sup>	4.8 <sup>b</sup>	0.1
Total <sup>3</sup>	84.8 <sup>a</sup>	75.1 <sup>b</sup>	71.9 <sup>b</sup>	1.5
Water excretion (kg/day)				
Feces	35.4 <sup>a</sup>	28.3 <sup>b</sup>	30.5 <sup>ab</sup>	1.2
Urine	13.8 <sup>a</sup>	9.3 <sup>b</sup>	6.2 <sup>b</sup>	0.7
Milk	19.4	20.6	18.9	0.4
Feces + urine	49.2 <sup>a</sup>	37.6 <sup>b</sup>	36.7 <sup>b</sup>	1.3
Total <sup>4</sup>	68.5 <sup>a</sup>	58.2 <sup>b</sup>	55.5 <sup>b</sup>	1.4
Water balance <sup>5</sup> (kg/day)	16.2	16.9	16.3	1.2

<sup>a,b,c</sup>Means in a row with different superscripts differ significantly (P<0.05)

<sup>1</sup>HH = high K high CP diet, LH = low K high CP diet, LL = low K low CP diet

<sup>2</sup>Calculated from the intake of digestible crude protein and digestible non-protein organic matter<sup>13)</sup>

<sup>3</sup>Sum of feed, drinking and metabolic

<sup>4</sup>Sum of feces, urine and milk

<sup>5</sup>Subtracted total excretion from total intake

Table 6. Ruminal fluid, plasma and milk constituent concentration and urinary constituent excretion of cows fed the experimental diets

	Diets <sup>1</sup>			SE
	HH	LH	LL	
Ruminal fluid				
pH	7.35	7.33	7.38	0.13
Ammonia (mgN/dl)	11.8 <sup>a</sup>	7.2 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>b</sup>	0.9
Acetic acid (mmol/L)	46.3	42.6	37.0	8.1
Propionic acid (mmol/L)	9.9	8.6	7.7	2.0
Butyric acid (mmol/L)	7.2	7.4	6.4	0.9
Acetic/Propionic	4.7	5.0	4.8	0.2
Plasma				
Osmolality (mOsm/kg)	284.8	284.1	282.1	1.4
Na (mEq/L)	137.9	138.5	137.7	0.8
K (mEq/L)	4.0	3.9	4.2	0.2
Cl (mEq/L)	100.9	103.3	103.1	1.4
Glucose (mg/dl)	69.9	72.3	69.3	4.6
Free fatty acid (μEq/L)	177.7	178.2	202.6	52.4
Lactic acid (mg/dl)	8.4	7.8	9.0	0.9
Urea (mgN/dl)	21.4 <sup>a</sup>	16.8 <sup>a</sup>	9.4 <sup>b</sup>	1.0
Milk				
Urea (mgN/dl)	22.0 <sup>a</sup>	17.1 <sup>b</sup>	10.5 <sup>c</sup>	0.5
Urine				
Urea (gN/day)	117.3 <sup>a</sup>	87.9 <sup>b</sup>	42.9 <sup>c</sup>	4.3

<sup>a,b,c</sup>Means in a row with different superscripts differ significantly (P<0.05)

<sup>1</sup>HH = high K high CP diet, LH = low K high CP diet, LL = low K low CP diet

透圧や Na, K, Cl, グルコース, 遊離脂肪酸および乳酸濃度には飼料処理間の違いはなかったが, 尿素濃度は HH, LH および LL 区がそれぞれ 21.4, 16.8 および 9.4 mgN/dl で, LL 区が他の 2 区と比較して有意に低く, また LH 区も HH 区に対して低くなる傾向にあった ( $P=0.073$ )。また, 同様の尿素濃度の反応は乳中でも観察され, 乳中濃度ではすべての飼料処理間に統計的な有意差が認められた。尿中への尿素排せつ量の反応は, 尿中 N 排せつ量で観察されたものと同様で, 各飼料処理間に有意な差が検出され, 特に LL 区の減少が顕著であった。

## 考 察

本試験の 2 つの低 K 飼料区の飼料中 K 含量は, 日本飼養標準・乳牛<sup>28)</sup> で泌乳牛の要求量として呈示されている 0.8% に近い水準であった。我々は K 含量を 1.2% まで低減した飼料を泌乳牛に給与しても, 採食量, 乳生産および消化率に悪影響が観察されなかったことを報告した<sup>34)</sup>。本試験はそれよりもさらに低 K 水準の飼料を給与したが, 採食量と乳生産への影響は観察されなかったものの, 飼料成分の消化率が高 K 飼料給与の HH 区に対して有意に低下した。K が大きく欠乏する場合に消化管運動が低下することは報告されているが<sup>25)</sup>, 両低 K 飼料区ともに見かけの K 蓄積量は正の値を示しており, K が欠乏する状態ではなかった。おそらく, この両低 K 飼料区における成分消化率の低下は, K 摂取量の減少が直接引き起こしたのではなく, 低 K 飼料を調製するために使用した飼料原料の消化性が影響したものと考えられる。すなわち, 本試験では 1% を下まわる含量の低 K 飼料を設計するために, K 含量の低い飼料原料を多用したが, 粗飼料に用いたコーンサイレージは, HH 区で用いたイタリアンライグラスサイレージに比べると CP や繊維の消化率が低い<sup>27)</sup>。さらに, 濃厚飼料では馬鈴薯デンプンやコーングルテンミールなどのデンプンや CP の消化率が高い飼料原料も使用してはいるものの, 全般的に成分消化率の高い大豆粕, コーンおよび大麦を大幅に減らして, 比較的消化率が低いビール粕を多用しており, これらが LH および LL 区の消化率を低下させたものと思われる。加えて, LL 区では摂取 N 量の減少により内因性糞 N の比率が相対的に増加したことも, 見かけの CP 消化率の低下を大きくした原因と考えられる。

本試験は K および N の摂取水準を変化させて, その尿量への効果を調べることを意図して設計されたが, 尿

量を規制するもう一つの主要な栄養要因である Na の摂取量も飼料処理区間で有意に異なり, HH 区の Na 摂取量は LH および LL 区の 1.4 倍程度あった。しかし, HH 区は統計的に有意ではないものの, 糞中への Na 排せつ量も他の 2 区よりも多く, 見かけの Na 吸収量 (摂取量 - 糞中排せつ量) を計算すると, HH, LH および LL 区でそれぞれ 19.4, 17.1 および 17.8 g/日となり, 各飼料区で概ね同程度であった。HH 区で糞中 Na 排せつ量が多かった理由は明らかではないが, 消化管における Na の吸収は水分の吸収と密接に関係するので<sup>46)</sup>, HH 区の糞中水分排せつ量が他の 2 区よりも多かったことが関係しているかもしれない。いずれにしても, 吸収された Na 量が各処理区で同程度であれば, Na が尿量の試験結果に及ぼした影響は少なかったと推定できるので, K と N の効果を検討する上で, Na 摂取量の違いが問題になることはない判断した。

本試験では HH 区と LH 区の比較から尿量に対する K 摂取量の効果を, また LH 区と LL 区との比較から尿量に対する N 摂取量の効果を, それぞれ定量的に把握することを試みた。HH 区から LH 区へは有意に, LH 区から LL 区へは統計的な傾向として, 尿量の減少が確認された。K 摂取量が 127.8 g 減少した HH 区から LH 区への尿量減少は 4.7 kg, N 摂取量が 103.2 g 減少した LH 区から LL 区への尿量減少は 3.2 kg である。ただし, HH 区から LH 区にも 13.8 g の N 摂取量の減少があり, LH 区から LL 区でもわずかではあるが 1.9 g の K 摂取量の減少があったので, これらの分を差し引いた上で, それぞれの栄養素摂取量減少と尿量減少との関係を計算してみると, HH 区から LH 区への K 摂取量 1 g の減少は尿量を 30.0 g 減少させ, LH 区から LL 区への N 摂取量 1 g の減少は尿量を 29.9 g 減少させたものと算出される。すなわち, 両栄養素摂取量は尿量に対して同程度の効果を及ぼしていたと推測される結果であった。一方, 日本飼養標準・乳牛<sup>28)</sup> で呈示された K 摂取量および N 摂取量を独立変数とする尿量の重回帰式 [尿量 (kg) =  $-8.3575 + 0.0167 \times N$  摂取量 (g) +  $0.0509 \times K$  摂取量 (g)] から示唆される両栄養素摂取量の尿量に及ぼす効果は, K 摂取量 1 g あたり尿量 50.9 g および N 摂取量 1 g あたり尿量 16.7 g であり, N 摂取量の効果は K 摂取量の効果の約 1/3 と推定される。これと比較すれば, 本試験の結果は尿量に対する K 摂取量の効果が小さく, 逆に N 摂取量の効果は大きく現れたと言える。

K も N も腎尿細管において浸透圧作用を及ぼすことにより, 水分再吸収に影響して尿量を左右すると考えられる<sup>24)</sup>。しかし, K がイオン態としてそのまま排せつ

されるのに対し、Nの腎臓における主たる排せつ形態は蛋白質・アミノ酸代謝の最終産物の尿素であり、腎尿細管では主に尿素として浸透圧作用を発揮して水分排せつ量に影響を及ぼす<sup>46)</sup>。そのため、N摂取量の尿量に対する効果には、血中尿素濃度の変化が重要な役割を果たしており、それは泌乳牛においても同様と考えられるが<sup>39)</sup>、泌乳牛の血中尿素濃度の変動には、N摂取量以外に複数の栄養要因が関与し、特に第一胃内における微生物のN利用性に影響を与える要因は、泌乳牛の血漿尿素濃度を大きく左右する。本試験のLH区からLL区への血漿尿素濃度の変化は7.4 mg/dlとかなり大きく、統計的にも有意な低下を示していた。この血漿尿素濃度の大きな変化に、LL区で3.8 mg/dlまで低下した第一胃液アンモニア濃度の変化が大きく寄与したことは間違いない。そして、このアンモニア濃度の低下には一義的な原因であるN摂取量の減少に加え、蛋白質飼料を代替するのに馬鈴薯デンプンを多給したことも影響したと推測される。すなわち、第一胃において速やかに分解・発酵される馬鈴薯デンプンは、第一胃微生物にエネルギーを供給して菌体蛋白質合成へのアンモニア利用を促進させるため、第一胃液中のアンモニア濃度を低下させる<sup>29,33)</sup>。従って、LL区の飼料条件では、N摂取量の減少の効果が代替した飼料の効果が加わることで、血漿尿素濃度に大きな低下を引き起こした結果、N摂取量減少による尿量低減効果が比較的大きく現れた可能性が考えられる。ただし、血中尿素が尿量を決定する要因であることは疑いないところであるものの、その定量的な効果については必ずしも明確となっているわけではない。Nennichら<sup>26)</sup>は日内変動のある血中尿素濃度の代わりに、平均的な血中尿素レベルを安定して反映するとされる乳中尿素濃度<sup>18)</sup>を用いて、尿量推定式を作成しているが、実際に我々の個別データをその推定式に適用してみても、乳中尿素濃度から推定される尿量と実尿量が一致しない場合の方が多い。血中尿素濃度と尿量との関係を定量的に評価するためには、他の尿量規制要因との相互関係や牛の生理状態の影響などについて、さらに研究を積み重ねることが必要である。

Kはアルカリ産生効果を有するミネラルであり、Kを多く含む牧草を摂取する乳牛の尿pHは、通常はアルカリ性である。K摂取量の減少<sup>9,22,23)</sup>あるいは飼料陽イオン陰イオン差(DCAD)の低下<sup>10,11,15)</sup>はこの尿pHを低下させ、酸性側にも傾かせる。尿pHが低下すると、腎尿細管による水素イオンの分泌量が増加するが、その多くはアンモニアイオンとして排せつされるため<sup>42)</sup>、K摂取量の減少<sup>44)</sup>あるいはDCAD<sup>42,47)</sup>の低下によって、

乳牛の尿中アンモニア排せつ量が増加する。さらに、K摂取量の減少<sup>17,30)</sup>あるいはDCADの低下<sup>8,16)</sup>が、尿中へのカルシウム(Ca)排せつ量を増加させることも知られており、これは骨におけるCa沈着が低下する一方で、腎でのCa再吸収が減少するためと考えられる<sup>43)</sup>。本試験におけるHH区からLH区への大幅なK摂取量の減少からすれば、LH区でアンモニアやCaの尿中排せつ量が増加していた可能性は十分に考えられる。そして、これらの成分が腎臓において浸透圧効果を及ぼせば、減少したKの浸透圧作用の一定分が相殺されることになるので、尿量に対するKの効果が、見かけ上小さく評価された可能性は考えられる。従って、Kの尿量への効果を定量化するための今後の課題として、低K条件下で泌乳牛の腎浸透圧形成にどのような成分が関与するのか、明らかにすることが重要である。

KとNの尿中への排せつには相互作用があり<sup>37)</sup>、飼料CP含量の低下によって尿中K排せつ量に有意な減少が観察されたことが報告されている<sup>45)</sup>。また、パス解析を用いた統計研究<sup>19)</sup>では、乳牛の尿中N排せつ量の約1/4はK摂取量によって説明できるとされ、それはK摂取量の変化による尿量の変動がN排せつに影響するためと考察されている。従って、Kを制御した条件下でNの制御を行った場合に、そのような相互作用に影響されて尿量に対するN制御の効果が十分に現れない可能性も想定された。本試験では高K低CP飼料区を設定していないので、K制御とN制御の尿量効果における量的な相互作用については、明確な判断を下すことはできないが、低K飼料給与条件下のLH区からLL区へのN摂取量の減少によって確認された尿量低減効果が、飼養標準の回帰式から予想される効果を下まわらなかったことから、少なくともK制御下でもN制御が尿量低減に対して一定の相加的效果を及ぼすと判断できる。従って、KとNの同時制御は、効率的に乳牛の尿量を低減する有効な栄養管理手法として利用できるものと考えられた。

上述の通り、Nを制御したLL区では第一胃アンモニア濃度が3.8 mg/dlまで低下して、最終的に大きな尿量低減効果を発揮したが、第一胃内微生物合成に対してバランスのとれた最適なアンモニア濃度は5 mg/dl前後とされていることからすると<sup>28,41)</sup>、LL区の第一胃アンモニア濃度はやや低下しすぎであったかもしれない。確かに、統計的な差はないものの、LL区では他の2区よりもVFA濃度に若干の数値的な低下も窺われた。しかし、第一胃液pHや血漿乳酸濃度に第一胃の恒常性の乱れを窺わせる徴候はなく、血漿のグルコースや遊離脂肪

酸濃度にも特段の変化は認められなかったため、生体に対するエネルギー供給に支障をきたすような微生物合成への悪影響はなかったと推測され、結果的に他の2区と同様な乳生産が維持されたものと考えられる。ただし、LL区では他の2区で70 g/日程度あった正味のN蓄積量が、30 g/日程度まで有意に減少した。これはN摂取量が減少した泌乳牛のN分配において、尿中への排せつ量の減少に加え、蓄積に向かう量も減少させて、乳へのN利用が優先されていたことを示唆している。泌乳後期は乳牛のボディーコンディションを回復させる時期でもあり、扇ら<sup>32)</sup>も40頭の泌乳後期経産牛のN蓄積量の平均値を、HH区およびLH区と同程度の約70 g/日と報告している。従って、尿量低減化のために制御するN摂取量の水準については、泌乳後期牛のN蓄積という観点からも、さらに検討する余地があるかもしれない。

LHおよびLL区ではHH区に対する有意な尿中水分排せつ量の減少に加え、糞中水分排せつ量にも有意な減少あるいは減少傾向が観察された。我々の以前の低K飼料給与試験<sup>34)</sup>では尿量の減少は観察されても、糞中水分排せつ量に変化は認められなかった。Paquayら<sup>38)</sup>は泌乳牛100頭の水分出納試験成績に基づいた統計研究から、糞中水分排せつ量は総水分摂取量と高い相関( $r=0.713$ )があることを明らかにしている。さらに、実際に泌乳牛の飲水を通常の半分に制限して総水分摂取量を減少させた試験では、糞中水分排せつ量がほぼ半減することも報告されている<sup>7)</sup>。本試験ではLHおよびLL区の総水分摂取量はHH区よりも有意に減少していた。これは牛が尿量の減少に応じて、HH区との飼料水摂取量の違い以上に飲水量を減少させたことによるものであり、生理的な水分調節反応が行われた結果と考えられる。我々の以前の低K飼料給与試験<sup>34)</sup>でも、低K飼料給与による尿量減少時に、飲水量の減少反応があったと推察はされたものの、対照の高K飼料区と低K飼料区とで採食量と乳量の水準が異なったために、両区の総水分摂取量には差がなかった。そのため、同じ低K飼料給与試験でも、今回のような糞中水分排せつ量の変化が観察されなかった可能性が考えられる。糞中水分は糞の物性に大きな影響を与え、排せつ物処理の労力を左右する主たる要因の一つであるので、給与飼料中のK低減(あるいはKとNの低減)が、尿量のみならず糞中水分排せつ量の削減にも有効である可能性が示唆されたことは重要であり、今後のさらなる研究が期待される。

## 謝 辞

本研究の動物試験の遂行にあたり多大なご協力をいただいた、畜産研究支援センター業務第一科C棟作業班の皆様へ厚く御礼申し上げます。また、試験データの統計解析手法に関して貴重なご助言をいただいた、家畜育種繁殖研究領域佐々木修主任研究員に深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) 阿部亮 (2001). 栄養実験のための分析方法, 新編動物栄養試験法 (石橋晃監修), 養賢堂, 東京, 455-564.
- 2) Agricultural Research Council (1980). The nutrient requirement of ruminant livestock, Commonwealth Agricultural Bureaux, England, 295-306.
- 3) Bannink, A., Valk, H. and Van Vuuren, A.M. (1999). Intake and excretion of sodium, potassium, and nitrogen and the effects on urine production by lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 82, 1008-1018.
- 4) Broderick, G.A. (2003). Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 86, 1370-1381.
- 5) Broderick, G.A., Stevenson, M.J., Patton, R.A., Lobos, N.E. and Olmos Colmenero, J.J. (2008). Effects of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 91, 1092-1102.
- 6) Broderick, G.A., Stevenson, M.J. and Patton, R.A. (2009). Effect of dietary protein concentration and degradability on response to rumen-protected methionine in lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 92, 2719-2728.
- 7) Burgos, M.S., Senn, M., Sutter, F., Kreuzer, M. and Langhans, W. (2001). Effect of water restriction on feeding and metabolism in dairy cows, *Am. J. Physiol.*, 280, R418-R427.
- 8) Charbonneau, E., Pellerin, D. and Oetzel, G.R. (2006). Impact of lowering dietary cation-anion difference in nonlactating dairy cows: A meta-analysis, *J. Dairy Sci.*, 89, 537-548.

- 9) Constable, P.D., Gelfert, C.C., Furl, M., Staufenbiel, R. and Stampfli, H.R. (2009). Application of strong ion difference theory to urine and the relationship between urine pH and net acid excretion in cattle, *Am. J. Vet. Res.*, 70, 915-925.
- 10) DeGaris, P.J. and Lean, I.J. (2009). Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles, *Vet. J.*, 176, 58-69.
- 11) Delaquis, A.M. and Block, E. (1995). Acid-base status, renal function, water, and macromineral metabolism of dry cows fed diets differing in cation-anion difference, *J. Dairy Sci.*, 78, 604-619.
- 12) Dinn, N.E., Shelford, J.A. and Fisher, L.J. (1998). Use of the Cornel Net Carbohydrate and Protein System and rumen-protected lysine and methionine to reduce nitrogen excretion from lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 81, 229-237.
- 13) Faichney, G.J. and Boston, R.C. (1985). Movement of water within the body of sheep fed at maintenance under thermoneutral conditions, *Aust. J. Biol. Sci.*, 38, 85-94.
- 14) Fisher, L.J., Dinn, N., Tait, R.M. and Shelford, J.A. (1994). Effect of level of dietary potassium on the absorption and excretion of calcium and magnesium by lactating cows, *Can. J. Anim. Sci.*, 74, 503-509.
- 15) Hu, W. and Murphy, M.R. (2004). Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows: A meta-analysis, *J. Dairy Sci.*, 87, 2222-2229.
- 16) Hu, W., Murphy, M.R., Constable, P.D. and Block, E. (2007). Dietary cation-anion difference and dietary protein effects on performance and acid-base status of dairy cows in early lactation, *J. Dairy Sci.*, 90, 3355-3366.
- 17) Hu, W. and Kung, L.Jr. (2009). Effect of dietary ratio of Na:K on feed intake, milk production, and mineral metabolism in mid-lactation dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 92, 2711-2718.
- 18) 生田健太郎・小鴨睦・篠倉和己・函城悦司 (2000). 乳中尿素態窒素測定法の比較と測定値に及ぼす乳汁採取・保存方法の影響, *日獣会誌*, 53, 285-288.
- 19) Kojima, H., Kume, S., Nonaka, K., Oshita, T., Kozakai, T. and Hirooka, H. (2005). Effects of feeding and animal performance on nitrogen, phosphorus and potassium excretion by Holstein cows, *Anim. Sci. J.*, 76, 139-145.
- 20) Krober, T.F., Kulling, D.R., Menzi, H., Sutter, F. and Kreuzer, M. (2000). Quantitative effects of feed protein reduction and methionine on nitrogen use by cows and nitrogen emission from slurry, *J. Dairy Sci.*, 83, 2941-2951.
- 21) 久米新一・野中和久・大下友子・小酒井貴晴・小島英紀 (2004). 自給粗飼料多給時における乾乳牛, 妊娠牛および泌乳牛のカリウム排せつ量, *日畜会報*, 75, 179-184.
- 22) Kume, S., Sato, T., Murai, I., Kitagawa, M., Nonaka, K. and Oshita T. (2011). Relationships between urine pH and electrolyte status in cows fed forages, *Anim. Sci. J.*, 82, 456-460.
- 23) Leiber, F., Wettstein, H.R. and Kreuzer, M. (2009). Is the intrinsic potassium content of forages an important factor in intake regulation of dairy cows?, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 93, 391-399.
- 24) 松田浩二郎・市岡正道・東建彦・林秀生・菅野富雄・中村嘉男・佐藤昭雄 共訳 (1986). 原書12版 医科生理学展望, 丸善, 東京, 644-645.
- 25) National Research Council (2001). Nutrient requirements of dairy cattle. 7th. ed. National Academy Press, Washington, D.C., 124-128.
- 26) Nennich, T.D., Harrison, J.H., Van Wieringen, L.M., St-Pierre, N.R., Kincaid, R.L., Wattiaux, M.A., Davidson, D.L. and Block, E. (2006). Prediction and Evaluation of urine and urinary nitrogen and mineral excretion from dairy cattle, *J. Dairy Sci.*, 89, 353-364.
- 27) 農業技術研究機構 (2001). 日本標準飼料成分表, 2001年版, 245p.
- 28) 農業・食品産業技術総合研究機構編 (2006). 日本飼養標準 乳牛, 2006年版, 中央畜産会, 東京, 205p.
- 29) Obara, Y., Dellow, D.W. and Nolan, J.V. (1990). The influence of energy-rich supplements on nitrogen kinetics in ruminants, In *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*, 515-539, Academic Press, San Diego.
- 30) O'Connor, A.M. Beede, D.K. and Wilcox, C.J. (1988). Lactational responses to dietary magnesium, potassium, and sodium during winter in Florida, *J. Dairy Sci.*, 71, 971-981.

- 31) 扇勉・糟谷広高・藤田眞美子・斉藤繁・原悟志 (2003) . 魚粉利用による泌乳牛の窒素排泄量低減, 日畜会報, 74, 509-515.
- 32) 扇勉・峰崎康裕・西村和行・糟谷広高・藤田眞美子・原悟志 (2003) . 牧草サイレージ主体飼養における泌乳牛の糞尿量および窒素排泄量, 日畜会報, 74, 525-530.
- 33) 大谷文博・田鎖直澄・上野孝志 (2001) . 飼料への易発酵性炭水化物の添加が乳牛の糞尿窒素排泄量に及ぼす影響, 日畜会報, 72, J239-J246.
- 34) 大谷文博・田鎖直澄・甘利雅弘・小笠原俊介・森田総一郎・松浦庄司・鈴木知之・栗原光規・樋口浩二・野中最子 (2010) . 低カリウム飼料の給与が泌乳牛の尿量低減化に及ぼす影響, 畜草研報, 10, 1-8.
- 35) 岡本英竜・原田靖生 (2006) . 新編畜産ハンドブック (扇元敬司他編), 講談社, 東京, 471-484.
- 36) Olmos Colmenero, J.J. and Broderick, G.A. (2006). Effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 89, 1704-1712.
- 37) Paquay, R., Lomba, F., Lousse, A. and Bienfet, V. (1969). Statistical research on the fate of dietary mineral elements in dry and lactating cows. V. Potassium, *J. Agric. Sci.*, 73, 445-452.
- 38) Paquay, R., De Baere, R. and Lousse, A. (1970). Statistical research on the fate of water in the adult cow. II. The lactating cow, *J. Agric. Sci.*, 75, 251-255.
- 39) Sannes, R.A., Messman, M.A. and Vagnoni, D.B. (2002). Form of rumen-degradable carbohydrate and nitrogen on microbial protein synthesis and protein efficiency of dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 85, 900-908.
- 40) SAS Institute (2008). SAS/STAT 9.2 User's Guide: The GLM Procedure (Book Excerpt). SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- 41) Satter, L.D. and Slyter, L.L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro, *Br. J. Nutr.*, 32, 199-208.
- 42) Schneider, P.L., Beede, D.K. and Wilcox, C.J. (1988). Effects of supplemental potassium and sodium chloride salts on ruminal turnover rates, acid-base and mineral status of lactating dairy cows during heat stress, *J. Anim. Sci.*, 66, 126-135.
- 43) Schonewille, J.Th., Van't Klooster, A.Th., Dirckzwager, A. and Beynen, A.C. (1994). Stimulatory effect of an anion(chloride)-rich ration on apparent calcium absorption in dairy cows, *Livest. Prod. Sci.*, 40, 233-240.
- 44) St. Omer, V.V.E. and Roberts, W.K. (1967). Some effects of dietary potassium upon digestibility, serum electrolytes and utilization of potassium, sodium, nitrogen and water in heifers, *Can. J. Anim. Sci.*, 47, 39-46.
- 45) Tomlinson, A.P., Powers, W.J., Van Horn, H.H., Nordstedt, R.A. and Wilcox, C.J. (1996). Dietary protein effects on nitrogen excretion and manure characteristics of lactating cows, *Transactions of the ASAE*, 39, 1441-1448.
- 46) 津田恒之・小原嘉昭・加藤和雄 (2004) . 家畜生理学, 第二次改訂増補版, 養賢堂, 東京, 321p.
- 47) Vagnoni, D.B. and Oetzel, G.R. (1998). Effect of dietary cation-anion difference on the acid-base status of dry cows, *J. Dairy Sci.*, 81, 1643-1652.
- 48) Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition, *J. Dairy Sci.*, 74, 3583-3597.

## Simultaneous Control of Potassium and Nitrogen to Reduce Urine Volume in Lactating Dairy Cows

Fumihiro OHTANI, Kouji HIGUCHI, Yousuke KOBAYASHI, Itoko NONAKA<sup>a</sup>,  
Kenich YAYOU<sup>1</sup> and Madoka SUTOH

Animal Physiology and Nutrition Research Division,  
NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba, 305-0901 Japan

<sup>1</sup>National Institute of Agrobiological Science, Tsukuba, 305-0901 Japan

### Summary

An experiment that simultaneously controlled dietary potassium (K) and nitrogen (N) in lactating dairy cows was carried out to determine the effects of each nutrient on urine volume and whether simultaneous control of both nutrients could reduce urine volume effectively. Three feed treatments were arranged; high K high crude protein (CP) diet (HH diet: 1.75% of K, 18.1% of CP) which combined soybean meal, corn and barley as formula feed with Italian ryegrass silage as a main roughage, and low K high CP diet (LH diet: 0.94% of K, 17.6% of CP) which reduced K content by using corn silage as a main roughage and replacing a substantial portion of formula feed with brewer's grain, corn gluten meal, urea and potato starch, and low K low CP diet (LL diet: 0.93% of K, 13.5% of CP) which reduced CP content by replacing a part of brewer's grain and corn gluten meal in LH diet with barley and potato starch. Diets were fed to four dairy cows in late lactation assigned to 3 x 3 Latin square design and balance trials were conducted. When LH and LL diets were fed, several nutrient digestibilities were lower than HH diet in consequence of poor digestibilities of ingredients constituted low K diets, although there were no differences in milk yield and composition rates among treatments, indicating that the control of K and N in diets did not exert adversely effects on milk production of dairy cows. Urine volume decreased from 14.5 kg/day in HH diet to 9.8 kg/day in LH diet and moreover decreased to 6.6 kg/day in LL diet. It was deduced that either decrease in K or N intake produced comparable reduction effect on urine volume of cows. Because it was confirmed that lower N intake could show additive reduction effect on urine volume even under lower K intake condition, it was thought that simultaneous control of both nutrients would be useful nutritional management to decrease urine volume in lactating dairy cows efficiently. In addition, it was suggested that the decrease in urine volume by feeding LH or LL diets might be able to reduce fecal water excretion, presumably in association with reduction of total water intake of dairy cows.

**Key words:** lactating dairy cows, potassium, nitrogen, nutritional management, urine volume reduction

---

<sup>a</sup> Present address: NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, Koshi, 861-1192 Japan

## 昼間帯および夜間帯のL-トリプトファン連続静脈内投与がホルスタイン種雄子牛のメラトニン分泌に及ぼす効果\*

新宮博行・櫛引史郎・伊藤文彰<sup>a</sup>・林征幸・守谷直子<sup>b</sup>・小林寿美・山地佳代子・甫立孝一<sup>1</sup>

農研機構畜産草地研究所 家畜生理栄養研究領域, つくば市, 305-0901

<sup>1</sup>北里大学, 十和田市, 034-8628

### 要 約

L-トリプトファン (トリプトファン: L-Tryptophan) を静脈内投与する時間帯の相違が子牛のメラトニン (melatonin, *N*-acetyl-5-methoxytryptamine) 分泌に及ぼす影響を検討するため, 昼間帯 (12:00-14:00) および夜間帯 (19:00-21:00) の各時間帯において, 6 週齢で離乳した 3 ヶ月齢のホルスタイン種雄子牛 4 頭の静脈内に溶媒, または, トリプトファン溶液を 120 分間連続投与する試験をラテン方格法により実施した。これら 4 種類の静脈内投与試験において, 溶媒投与群には, 溶媒として, 糖液 (グルコース投与量: 324 mg/ (kg of BW)) を投与し, また, トリプトファン溶液投与群には, この溶媒にトリプトファンを溶解した溶液 (トリプトファン投与量: 36 mg/ (kg of BW)) を投与した。溶液の投与は供試牛の左頸静脈内に連続的に行い, 一方, 採血は右頸静脈から投与開始直前 (0 分: 基礎値) および開始後 30, 60, 90, 120 (投与終了時間), 180, 210 分に実施した。血漿メラトニン濃度は RIA を用いて測定した。各溶液の静脈内投与後に血液中に放出されるメラトニンの増減量の指標として, 血漿メラトニンの基礎値を示す直線と濃度曲線で囲まれる正味の反応曲線下面積 (net AUC: net area under the response curve) を算出した。メラトニンの血漿基礎値は, 昼間帯の投与試験時より夜間帯の投与試験時の方が有意に高くなった ( $P < 0.001$ )。昼間帯の投与試験において, 血漿メラトニン濃度は溶媒投与群, トリプトファン溶液投与群とも, 試験終了時までほぼ基礎値のレベルで推移し, すべての採血時間で両群間に有意差は認められなかった。また, net AUC も血漿濃度と同様に両群間に有意差はなかった。一方, 夜間帯の投与試験では, トリプトファン溶液投与群のメラトニンの血漿濃度および net AUC は溶媒投与群の値よりいずれも有意に高くなった ( $P < 0.05$ )。これらの結果から, 昼間帯におけるトリプトファンの供給はホルスタイン種雄子牛のメラトニン分泌にほとんど影響を与えないが, 夜間帯の供給はメラトニン分泌を顕著に促進させることが示唆された。

キーワード: L-トリプトファン, 昼間帯 (明期), メラトニン, 夜間帯 (暗期)

### 緒 言

メラトニンは, 生体リズム調節や睡眠誘導の作用を持つホルモンとして知られているが, 免疫機能の増強作用や強い抗酸化作用を持つ物質であることも明らかにされている<sup>5)</sup>。さらに, 成長ホルモンの分泌促進作用を持つこともヒト<sup>11)</sup>, ウシ<sup>6)</sup>で報告されている。従って, そ

の分泌亢進は家畜の健康維持と生産性の向上に結びつくことが期待される。

体内におけるメラトニンの合成基質となるのは, 芳香族アミノ酸の一つであるトリプトファンである。トリプトファンからセロトニンが合成され, 次いで 2 種類の酵素, アリルアルキルアミン *N*-アセチルトランスフェラーゼ (AANAT: arylalkylamine *N*-acetyltransferase)

2012 年 10 月 7 日受付, 2012 年 12 月 7 日受理

\* 本研究は, 独立行政法人日本学術振興会 (科学研究費補助金: No. 23580381) の支援を受けて実施された

<sup>a</sup> 現 農研機構北海道農業研究センター

<sup>b</sup> 現 農研機構畜産草地研究所 畜産物研究領域, つくば市, 305-0901

およびヒドロキシインドール-O-メチルトランスフェラーゼの作用によってメラトニンへと合成される。体内におけるメラトニンの合成速度は、基質であるトリプトファンの供給速度に影響を受けると考えられるが、それ以外に、その個体が置かれた光環境、すなわち、照度や明暗周期による強い影響を受けることがよく知られている。血中メラトニン濃度は明期または昼間に低く、暗期または夜間に高くなることが、哺乳類、鳥類などに共通して認められており、このパターンは光によるAANAT活性の変化によって形成されることが明らかにされている<sup>9)</sup>。ウシについても、ラットやヒトなどと同様に、血中メラトニン濃度は日中極めて低く、日没から上昇を始めて夜間に高くなること<sup>2)</sup>、また、暗期における光暴露でメラトニン合成が抑制されること<sup>7)</sup>などが報告されている。しかし、このような光環境の日周変化によるメラトニン分泌動態変化に対して、合成基質であるトリプトファンの体内供給量の変化がどの程度影響するかについては、まだ情報は少ない。

そこで、本研究では、メラトニンの分泌を増加させると考えられるトリプトファンの効果的な供給方法について検討するため、昼間帯および夜間帯、2種の明暗の時間帯においてトリプトファンの静脈内連続投与を行い、投与後のホルスタイン雄子牛のメラトニン分泌に及ぼす影響について調査を行った。

### 材料および方法

本研究は独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所動物実験指針に従って実施した。

6週齢で離乳した3ヶ月齢のホルスタイン種雄子牛4頭をフリーストール牛舎の房(床面積120 m<sup>2</sup>: 屋内部50 m<sup>2</sup>および屋外パドック部70 m<sup>2</sup>)に収容し、採食時間帯を除き、飲水と鈹塩の舐食が常時できるよう群飼した。給与飼料には切断型チモシー(63% TDN, 12% CP (DM換算))と配合飼料(80% TDN, 21% CP (DM換算))を用い、これら飼料の栄養価から、日本飼養標準・乳牛<sup>1)</sup>の養分要求量(DG: 0.7 kg/day)に基づいたTDN充足率を100%充たすよう粗濃比1:2 (DM換算)で調整した飼料を朝夕の一日2回供試牛に給与した(8:45-10:00および15:45-16:30)。試験期間は10日間の馴致期間と以後16日間の本試験期間から構成され、この本試験期間において、4種類の静脈内投与試験を4日間隔で実施した(第1-4試験ステージ)。馴致最終日における供試牛の日齢は104 ± 4日齢(標準誤差)であり、その体重は102 ± 4 kg(標準誤差)であった。供試牛の

体重測定は試験日前日の12:00に行い、飼料給与量の変更は各試験終了後の次の給餌時間から、直近の体重測定の結果に基づいて実施した。

試験日の昼間帯試験の開始時刻は直近の給餌開始後から3時間15分後の12:00に、終了時刻は15:30とし、この間の試験用溶液の投与時間帯は12:00-14:00に設定した。また、昼間帯の試験時と同様に、夜間帯試験の開始および終了時刻は各々19:00、22:30とし、溶液の投与時間帯は19:00-21:00に設定した。これらの昼間および夜間の各時間帯において、供試牛の静脈内に溶媒、または、トリプトファン溶液を120分間連続投与する試験(昼間帯溶媒投与試験、昼間帯トリプトファン溶液投与試験、夜間帯溶媒投与試験、ならびに、夜間帯トリプトファン溶液投与試験)をラテン方格法により実施した。溶媒には、血中アミノ酸に占めるトリプトファンの比率を高めることでメラトニン合成速度の変動がより明確になることを期待して、生理食塩水にグルコース液(Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Tokushima, Japan)を加えたものを用いた。グルコースによって分泌が促進されるインスリンは、筋肉組織への分岐鎖アミノ酸の取り込みを強く促進するが、トリプトファンの取り込みにはほとんど影響しないことが知られている<sup>3)</sup>。トリプトファン溶液には、この溶媒に粉末のトリプトファン(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)を溶解した。溶媒としてのグルコースおよびトリプトファンの投与量は、それぞれ324 mg/(kg of BW)および36 mg/(kg of BW)とした。投与試験開始1時間前までに、収容房の屋内部に繋留した供試牛の両頸静脈内に留置カテーテルを装着し、以後、試験終了時まで供試牛を安静にしておいた。溶液はペリスタリックポンプ(MINIPULS 3; Gilson, Inc., Middleton, USA.)を用いて、供試牛の左頸静脈内に連続投与し、一方、血液は右頸静脈から投与開始直前(0分:基礎値)および開始後30、60、90、120(投与終了時間)、180、210分に採取した。夜間帯の投与試験では、ヘッドライトから放たれる微弱な赤色光を基に、採血用カテーテルの血液採取口から採血を行った。採取した5 mLの血液は血漿メラトニン濃度測定用のヘパリン添加採血管に分けて注入し、ゆっくり攪拌した後、氷冷した。その後、1,600 × g, 4℃, 20分間の条件で遠心分離処理を行うことにより血漿を得た。得られた血漿サンプルは分析時まで-80℃で冷凍保存した。

本試験期間における日の出および日の入りの平均時刻はそれぞれ4:45、18:50であった。自然環境に沿った日周性を維持するため、畜舎への自然光の入射を除き、畜

舎内は常時消灯した。昼間帯および夜間帯の投与試験における収容房内の照度は、採血時間に携帯型照度計 (LM-331; AS ONE Corporation, Osaka, Japan) を用いて、供試牛の目元で10秒間測定した。

血漿メラトニン濃度はRIAキット (RK-MEL; BÜHLMANN Laboratories AG, Schönenbuch, Switzerland) を用いて測定した (メラトニンの測定内変動係数: 3.9%)。本研究では、投与溶液に反応して放出されるメラトニンの分泌量の指標に、血漿基礎値を示す直線と濃度曲線で囲まれる正味の反応曲線下面積 (net AUC: net area under the response curve) を用いた。

データは以下のモデルを用い、SAS・GLM プロシジャにより解析した (SAS Inst. Inc., Cary, U.S.A.)。

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijk}$$

$Y_{ijk}$ : データ値,  $\mu$ : 全体平均,  $\alpha_i$ : 処理 i の効果,  $\beta_j$ : 試験ステージ j の効果,  $\gamma_k$ : 個体 k の効果,  $\varepsilon_{ijk}$ : 残差

処理の効果は F 検定により判定し、さらに Contrast ステートメントにより、投与時間帯の効果、投与溶液の効果について検定した。

また、平均値の差の検定には Duncan's multiple range test を用いた。

## 結 果

昼間帯の静脈内投与試験時における溶媒投与群およびトリプトファン溶液投与群の平均照度はそれぞれ、試験開始時刻 (12:00) で 1,340, 1,390 lx, 終了時刻 (15:30) で 650, 690 lx であり、これらを含むすべての照度計測時刻において、群間で有意差は認められなかった (データ未掲載)。また、夜間帯の静脈内投与試験時における平均照度は、19:00 の試験開始時刻で溶媒投与群、トリプトファン投与群の順に、10, 20 lx であり、群間で有意差はなかった。また、以後、終了時刻 (22:30) まで、両群とも照度は 0 lx であった。

メラトニンの血漿基礎値は、昼間帯の投与試験時より夜間帯の投与試験時の方が有意に高くなった (昼間帯試験時 (12:00) vs. 夜間帯試験時 (19:00): 0.9 vs. 8.4 pg/mL,  $P < 0.001$ )。Fig. 1 は昼間帯および夜間帯の投与試験時における血漿メラトニン濃度の変化を示す。昼間帯の投与試験における血漿メラトニン濃度は溶媒投与群、トリプトファン溶液投与群とも、試験終了時まで基礎値のレベルで推移し、すべての採血時間で群間に有意差は認められなかった。また、net AUC も血漿濃度と同様

の結果を示した (溶媒投与群 vs. トリプトファン溶液投与群: 1.2 vs. 6.7 pg·min·mL<sup>-1</sup>)。一方、夜間帯の投与試験では、トリプトファン溶液投与群の血漿濃度は、試験開始後 120, 180, 210 分に溶媒投与群より有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。また、net AUC もトリプトファン溶液投与群の方が溶媒投与群より有意に大きくなった (溶媒投与群 vs. トリプトファン溶液投与群: 870.4 vs. 1,962.3 pg·min·mL<sup>-1</sup>,  $P < 0.05$ )。

## 考 察

メラトニンは、主に松果体のメラトニン産生細胞において、トリプトファンからセロトニンを経て合成される。セロトニンからメラトニンへの合成過程においては、AANAT の活性が反応の律速因子となっており、その活性は視交叉上核にある生体時計によって支配されている<sup>4)</sup>。哺乳類では、網膜から入力する光情報がこの生体時計を制御する最も重要な因子となっており、暗期における松果体の AANAT 活性は明期の 30-70 倍に上昇する<sup>9)</sup>。そのため、末梢血中のメラトニン濃度は昼間に比べ夜間で圧倒的に高くなるのが、反芻動物を含む多くの動物種で確認されている<sup>9,12)</sup>。本研究においても、昼間帯のメラトニン濃度は極めて低く (全検体で 1.6 pg/mL 以下)、一方、夜間帯においては、試験開始時 (日没後約 10 分) において既に昼間帯の約 10 倍の値を示し、その後、直線的に増加した。この結果から、メラトニン分泌の増加は日没前から既に始まっていた可能性があると考えられる。ヒトでは、メラトニン分泌の制御が認められる最低照度が 100 lx 前後であることが報告されている<sup>13)</sup>。

末梢血中へのトリプトファン投与は、夜間帯における時間経過に伴うメラトニン濃度の上昇をさらに加速させたが、昼間帯においてはメラトニン分泌に影響しなかった。同様の結果は、ルーメンバイパス処理したトリプトファンを経口投与した乳牛でも報告されている<sup>10)</sup>。これらの結果は、ウシの AANAT 活性が昼間に極めて低く、基質であるトリプトファンの供給速度を増加させてもメラトニンの合成速度はほとんど影響しないことを示唆している。従って、メラトニン分泌の亢進を目的とするウシへのトリプトファンの投与は、その血中への吸収が夜間に増加する場合にのみ有効であると考えられる。

血中トリプトファンの一部は、血液脳関門を通じて脳内に移行し、神経伝達物質であるセロトニンへと合成される。本研究とはほぼ同量・同速度でのトリプトファンの静脈内投与は、照明下のウシで脳脊髄液中セロトニン濃度を上昇させることが報告されている<sup>8)</sup>。血中トリプト

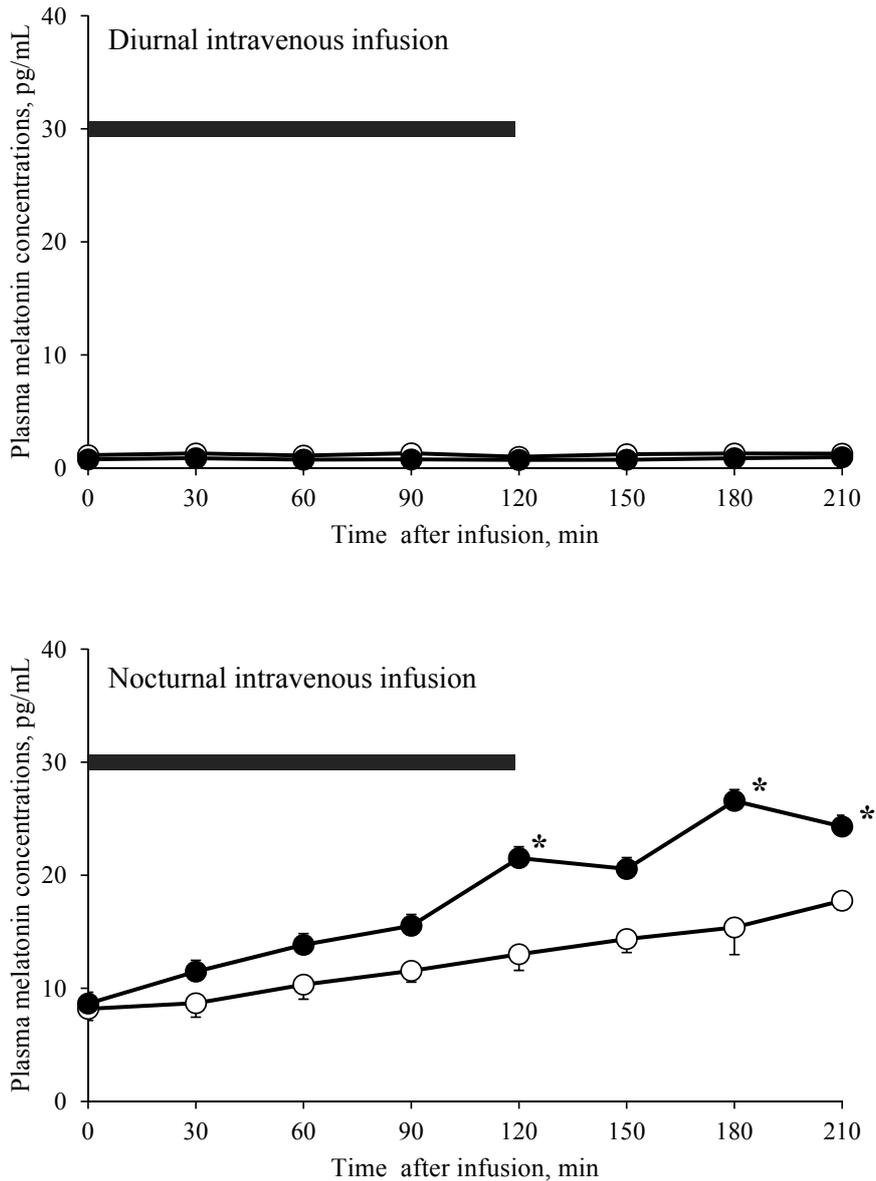


Fig. 1. Changes in plasma melatonin concentrations at diurnal (upper panel) and nocturnal (bottom panel) intravenous infusions in vehicle-infused calves (○) and tryptophan solution-infused calves (●). Values are the mean  $\pm$  SE. Asterisks indicate significant differences: \* $P < 0.05$  compared with the corresponding values for vehicle-infused calves. Horizontal lines represent the intravenous infusion periods: 12:00 to 14:00 (upper panel); 19:00 to 21:00 (bottom panel). Tryptophan solution-infused calves were offered 36 milligrams of tryptophan per kg of BW for 120 min.

ファンのメラトニン合成への利用が夜間帯にのみ大きく増加するという本研究の結果から、トリプトファンの脳内移行とそれに起因する脳内セロトニン合成の増加は、夜間には昼間よりも小さくなる可能性があると考えられる。脳内セロトニンの機能は、体温調節、摂食行動、ストレス反応調節など多岐にわたることが知られているが、トリプトファン投与の時間帯の違いがそれらの生理機能に及ぼす影響については、今後の検討課題である。

## 謝 辞

本研究の遂行にご支援いただいた寺田文典博士（九州沖縄農業研究センター所長）、畜産草地研究所畜産研究支援センター業務第一科職員の諸氏、ならびに、中村則子非常勤職員（畜産草地研究所）に深く感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1) Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council. (2006). Japanese feeding standard for dairy cattle, AFFRC, Tokyo, Japan.
- 2) Berthelot, X., Laurentie, M., Ravault, J.P., Ferney, J. and Toutain, P.L. (1990). Circadian profile and production rate of melatonin in the cow, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 7, 315-322.
- 3) Fernstrom, J.D. and Wurtman, R.J. (1971). Brain serotonin content: increase following ingestion of carbohydrate diet, *Science*, 174, 1023-1025.
- 4) 飯郷雅之 (2011) . メラトニン研究の歴史, *時間生物学*, 17, 23-34.
- 5) Karasek, M. and Winczyk, K. (2006). Melatonin in humans, *J. Physiol. Pharmacol.*, 57 Suppl 5, 19-39.
- 6) Kasuya, E., Kushibiki, S., Sutoh, M., Saito, T., Ito, S., Yayou, K., Sakumoto, R. and Hodate, K. (2006). Effect of melatonin injected into the third ventricle on growth hormone secretion in Holstein steers, *J. Vet. Med. Sci.*, 68, 1075-1080.
- 7) Kasuya, E., Kushibiki, S., Yayou, K., Hodate, K. and Sutoh, M. (2008). Light exposure during night suppresses nocturnal increase in growth hormone secretion in Holstein steers, *J. Anim. Sci.*, 86, 1799-1807.
- 8) Kasuya, E., Yayou, K., Hashizume, T., Kitagawa, S. and Sutoh, M. (2010). A possible role of central serotonin in L-tryptophan-induced GH secretion in cattle, *Anim. Sci. J.*, 81, 345-351.
- 9) Klein, D.C., Coon, S.L., Roseboom, P.H., Weller, J.L., Bernard, M., Gastel, J.A., Zatz, M., Iuvone, P.M., Rodriguez, I.R., Bégay, V., Falcón, J., Cahill, G.M., Cassone, V.M. and Baler, R. (1997). The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland, *Recent Prog. Horm. Res.*, 52, 307-357.
- 10) Kollmann, M.T., Locher, M., Hirche, F., Eder, K., Meyer, H.H. and Bruckmaier, R.M. (2008). Effects of tryptophan supplementation on plasma tryptophan and related hormone levels in heifers and dairy cows, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 34, 14-24.
- 11) Valcavi, R., Zini, M., Maestroni, G.J., Conti, A. and Portioli, I. (1993). Melatonin stimulates growth hormone secretion through pathways other than the growth hormone-releasing hormone, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 39, 193-199.
- 12) Wehr, T.A. (1997). Melatonin and seasonal rhythms, *J. Biol. Rhythms*, 12, 518-527.
- 13) Zeitzer, J.M., Dijk, D.J., Kronauer, R., Brown, E. and Czeisler, C. (2000). Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: melatonin phase resetting and suppression, *J. Physiol.*, 526, 695-702.

## Effects of Diurnal and Nocturnal Intravenous Infusions of L-tryptophan on Melatonin Secretion in Male Holstein Calves\*

Hiroyuki SHINGU, Shiro KUSHIBIKI, Fumiaki ITOH<sup>a</sup>, Masayuki HAYASHI, Naoko MORIYA<sup>b</sup>,  
Hisami KOBAYASHI, Kayoko YAMAJI and Koichi HODATE<sup>1</sup>

Animal Physiology and Nutrition Research Division,  
NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba, 305-0901 Japan

<sup>1</sup>Kitasato University, Towada, 034-8628 Japan

### Summary

The present study was performed to examine the effects of diurnal and nocturnal intravenous infusions of L-tryptophan (Trp) on secretion of melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) in male Holstein calves. Four 3-month-old male calves, weaned at 6 week of age, were intravenously infused for 120 min with either vehicle or Trp solution at diurnal and nocturnal periods ranging from 12:00 to 14:00 and from 19:00 to 21:00. During these 4 challenge tests, vehicle-infused and Trp solution-infused calves respectively received infusions of physiological saline in which liquid glucose was added (a vehicle; glucose content: 324 mg/(kg of BW)) and the vehicle in which powdered Trp was dissolved (Trp content: 36 mg/(kg of BW)) in Latin square crossover design. The solutions were intravenously infused into left jugular vein of the calves, and a series of blood samples was collected from right jugular vein at 0 (just before the infusion; basal concentration of hormone), 30, 60, 90, 120 (at the endpoint of infusion), 150, 180, and 210 min after the infusion. Plasma melatonin concentrations were determined by RIA. As an indicator of the amount of change in blood hormone after the infusion, net area under the response curve (net AUC) was calculated. The net AUC was the residual area subtracted by the area under a hypothetical line of basal concentration, from total AUC of hormone in response to vehicle or Trp solution infused. Basal melatonin concentrations in plasma at the nocturnal challenge tests were greater than those at the diurnal challenge tests ( $P < 0.001$ ). At the diurnal challenge tests, plasma melatonin concentrations after infusion were similar to basal concentrations in vehicle-infused and Trp solution-infused calves. Moreover, there were no significant differences in plasma concentrations and net AUC of melatonin between the groups of calves, respectively. In contrast, at the nocturnal challenge tests, plasma concentrations ( $P < 0.05$ ) and net AUC of melatonin ( $P < 0.05$ ) in Trp solution-infused calves increased as compared with those in vehicle-infused calves. These results suggest that supplement of Trp at diurnal period has almost no effect on the secretion of melatonin, but that at nocturnal period induces marked increase in the secretion in male Holstein calves.

**Key words:** diurnal period (light period), L-tryptophan, melatonin, nocturnal period (dark period)

<sup>a</sup> Present address: NARO Hokkaido Agricultural Research Center, Sapporo, 062-8555 Japan

<sup>b</sup> Present address: Animal Products Research Division, NILGS, Tsukuba, 305-0901 Japan

\*The present study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research, KAKENHI (No. 23580381) from Japan Society for the Promotion of Science.

© 2013 NARO Institute of Livestock and Grassland Science

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced without the permission of the copyright holder.

Published by Institute of Livestock and Grassland Science,  
National Agriculture and Food Research Organization (NARO)  
Ikenodai 2, Tsukuba, Ibaraki 305-0901 Japan

## 編集委員会事務局

企画管理部情報広報課

新谷 成正

飛鳥井可奈子

那須企画管理室連絡調整チーム

大里 孝

本研究報告から転載，複製を行う場合は，独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所の許可を得て下さい。

平成 25 年 3 月 印刷

平成 25 年 3 月 発行

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

# 畜産草地研究所

〒305-0901 茨城県つくば市池の台2

TEL 029-838-8600(代)

FAX 029-838-8606

印刷所 筑波印刷情報サービスセンター協同組合

## (目的)

第1条 畜産草地研究所研究報告及び畜産草地研究所研究資料への投稿については、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構刊行物著作権取扱規程（14規程56号）に定めるもののほかこの要領の定めるところによる。

## (投稿者の資格)

第2条 投稿者は原則として、畜産草地研究所職員（以下「職員」という。）及び流動研究員、依頼研究員、日本学術振興会特別研究員、日本学術振興会外国人特別研究員等（以下「他の職員」という。）とする。

- 一 職員が投稿する内容は、主として畜産草地研究所（以下「研究所」という。）で行った研究とする。
- 二 他の職員が投稿する内容は、研究所で行った研究とする。

## (投稿原稿の内容)

第3条 投稿原稿の内容は次のとおりとする。

- 1 畜産草地研究所研究報告（Bulletin of NARO Institute of Livestock and Grassland Science / 略誌名：Bull NARO Inst Livest Grassl Sci）
  - 一 原著論文：研究所において行った試験研究及び研究所以外の者に委託して行った試験研究の成果に関わる論文とする。
  - 二 短報：一以外の研究の予報、速報などの短報とする。
  - 三 技術論文：新しい技術や技術の組立、実証などを主体とする報告。
  - 四 総説：畜産草地研究に関わるものとする。総説は投稿のほか、編集委員会が依頼したものを含む。
  - 五 学位取得論文：研究所において主として行った試験研究による学位取得論文とする。
- 2 畜産草地研究所研究資料（Memoirs of NARO Institute of Livestock and Grassland Science / 略誌名：Mem NARO Inst Livest Grassl Sci）  
調査資料・技術資料・研究資料：研究所において行った試験研究及び研究所が研究所以外のものに委託して行った試験研究のうち、学術的・産業的に有用な未発表の資料とする。

## (原稿の執筆)

第4条 原稿の執筆にあたっては、別に定める畜産草地研究所研究報告及び畜産草地研究所研究資料執筆要領（13畜草B第44号）に基づくものとする。使用する言語は日本語又は英語とする。

## (原稿の提出)

第5条 次の手続きにより原稿及び原稿提出票を事務局に提出する。

- 一 職員は原稿提出票に必要事項を記載し、所属研究領域長等の校閲を受ける。
- 二 他の職員は原稿提出票に必要事項を記載し、所属研究領域長等の校閲を受ける。

## (受付)

第6条 原稿及び原稿提出票を事務局が受け取った日を受付日とする。受理日は編集委員会の審査の結果、掲載が妥当と認められた日とする。

## (審査)

第7条 編集委員会は次の手続きにより論文を審査する。ただし、学位取得論文については審査を省略することができる。

- 一 編集委員会は論文の内容により審査員正副をそれぞれ1名決定し、論文審査を依頼する。審査員は研究所内及び研究所外の研究者等とし、その氏名は公表しない。
- 二 審査員は論文審査票により審査を行う。また必要に応じて指摘事項を書き出し提出する。
- 三 事務局は審査員と著者の間のやり取りの対応にあたる。
- 四 編集委員会は審査員の審査結果を参考にして掲載の可否を判断する。  
審査の内容によっては著者に原稿の訂正を求めることができる。
- 五 著者は審査結果を受領後、編集委員会が指定する期日までに修正原稿を事務局に提出する。

## (校正)

第8条 著者による校正は原則として初校のみとする。校正は誤植の訂正程度にとどめる。やむを得ず大きな変更等を行う場合には編集委員会の承認を得なければならない。

## (別刷り)

第9条 別刷りは次のとおりとする。

- 一 100部とし、筆頭著者が代表で受け取る。
- 二 別刷りの追加を希望する場合は研究費負担で印刷する。

## 附 則

この規定は、平成14年4月1日から施行する。

## 附 則

この規定は、平成15年10月1日から施行する。

## 附 則

この規定は、平成18年4月1日から施行する。

## 附 則

この要領は、平成20年4月1日から施行する。

## 附 則

この要領は、平成23年4月1日から施行する。

## 附 則

この要領は、平成23年8月8日から施行する。

