

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20715

研究課題名(和文) 博物館標本孢子を用いた絶滅集団の復元：簡易生存識別法と標本管理法の開発

研究課題名(英文) Reconstruction of extinct populations using museum specimen spores: Development of a simple survival identification method and specimen management techniques

研究代表者

志賀 隆 (Shiga, Takashi)

新潟大学・人文社会科学系・准教授

研究者番号：60435881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：標本孢子的発芽可能性を検討するために、シダ植物5種110標本、車軸藻類3種の標本孢子に対して発芽試験を試みた。ほぼ全ての標本において発芽は確認されなかったが、クサソテツでは標本作製処理後225ヶ月、オクマワラビでは59ヶ月、シャジクモでは2～3か月の標本孢子において発芽が確認された。また、生存細胞を染色するTTC、MTTと死亡細胞を染色するEB、TBを用いて標本孢子的生存評価法を検討したところ、1.0% TTCによる48時間以上の染色が生存評価に適していた。また、標本作製処理における乾燥処理と保存温度の影響を検討したところ、20℃乾燥・-20℃保存が最も生存と推定される孢子が多かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、博物館の植物標本によってもたらされる情報は、作製された瞬間における植物体情報のみであり、これらを用いた研究は、その種の分布および形態的、生化学的、分子生物学的、生態学的情報を読み取るものであった。本研究によって、僅かではあるが博物館標本の中にも生きた孢子が残されていることが確認された。このことは、絶滅種や絶滅危惧種に対して、発芽から世代交代までの発生の観察、交雑試験といった生体が不可欠な研究が可能となることを示している。また、博物館標本の孢子を用いることにより、特定の地域、種を選択して復元することが可能であり、標本が生物の保全に対して直接活用できることも示したと言える。

研究成果の概要(英文)：To explore the potential of utilizing spores from herbarium specimens for reconstructing plant populations, we conducted germination tests on 118 specimens from five fern species and four charophyte species. Although most spores did not germinate, spore germination of *Matteuccia struthiopteris* (225 months following specimen preparation), *Dryopteris uniformis* (59 months), and *Chara braunii* (2 to 3 months) were observed. To evaluate spore survival, we performed staining using Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC), Diphenyl Tetrazolium Bromide (MTT), Evans Blue, and Trypan Blue. Staining with 1.0% TTC for 48 hours effectively assessed the spore survival of *Matteuccia struthiopteris*. Furthermore, in the germination and MTT staining test performed on *Dryopteris uniformis* specimens subjected to different drying temperature and storage temperature in the specimen preparation, drying at 20 °C and storage at -20 °C had the most spores presumed to be viable.

研究分野：植物分類学

キーワード：植物標本 標本孢子 シダ植物 車軸藻類 TTC MTT 発芽試験 染色試験

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

博物館や大学の標本庫には都市化などにより現在では失われてしまった種や集団の標本も残されている。植物標本には種子や胞子が残されているものが数多くあり、このような標本の種子や胞子を発芽させることができれば、失われた種の復元や、種内の遺伝的多様性の回復が可能となる (Nakahama et al. 2015)。

これまで、種子植物の標本に残された種子の一部には発芽能力があることが確認されている。例えば、平澤ら (2016) や志賀ら (2017) は種子植物 131 種の標本種子の発芽についての研究を進めてきており、標本庫に収蔵されている標本種子は少なからず生存していることを明らかにした。また、Nakahama et al. (2015) は DNA マーカーを用いることで、発芽させた個体群の遺伝的多様性を検証し、集団レベルの復元が可能であることを示している。

しかしながら、種子植物に対し、シダ植物・蘚苔類・車軸藻類といった胞子によって次世代を残す植物における標本胞子の生存可能性についてはほとんど明らかになっていない。シダ植物ではいくつかの種において標本胞子に発芽能力があることが示している (例えば Johnson 1985, Magrini et al. 2010)。車軸藻類については 60 年以上前の土壌から得られた胞子に発芽能力があったことが報告されているが (Rodorigo et al. 2010)、標本胞子の発芽可能性についてはこれまで全く着目されていない。したがって、広範な分類群において生存している標本胞子が残されている可能性がある。

これまで、標本胞子に関する研究がほとんど行われてこなかった理由に、種子に較べて胞子の発芽方法や生存識別法が標準化されていないことが挙げられる。現在ではシダ植物、蘚苔類、車軸藻類それぞれにおいてモデル植物種が確立しており、胞子発芽の方法が明らかにされている (たとえば、Anterola et al. 2009, Magrini 2011)。これを他の種に用いることで分類群横断的な発芽試験方法を開発出来る可能性がある。また、これまで種子や細胞の生存評価に用いられてきたテトラゾリウム染色法がオシダ属の胞子の生存識別において有効であることが示され (Catala et al. 2009)、様々な植物の胞子に対して利用できる可能性がわかってきている。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、1) 様々な分類群の標本胞子を実際に撒きだして発芽試験を行い、発芽可能性を評価するとともに、2) より簡便に胞子の生存を評価するため、ミトコンドリア活性の確認により生存を評価するテトラゾリウム塩染色をはじめとした複数の染色法によって生存識別法を検討する。そして、3) 野外から採集した植物・藻類の胞子に対して実際に標本作製・管理処理を施して標本胞子の生存率が高い標本作製方法、保存方法を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 標本胞子の収集と発芽試験

シダ植物の標本胞子の発芽可能性を明らかにするために、5 科 5 種 [ オオハナワラビ (ハナワラビ科)、スギナ (トクサ科)、ゼンマイ (ゼンマイ科)、クサソテツ (コウヤワラビ科)、オクマワラビ (オシダ科) ] を選定した。シダ植物については各種 16~29 標本、合計 110 標本の胞子を発芽試験に供した。発芽の前処理は Magrini et al. (2010) に従い行った。まず、標本胞子を 24 時間蒸留水に浸して吸水させ、滅菌蒸留水で洗浄と 5,000G、10 分間の遠心分離を 3 サイクル行い、直径 5 cm シャーレに作成した 0.7% 寒天培地 (Knop 液 (Knop 1865) もしくは 1% 寒天培地 (1/2MS 培地) に胞子をマイクロピペットで播種した。これらを標本ごとに 6 反復行った。また、複数のシダ植物において胞子発芽の促進効果が報告されている GA (ジベレリン) について (Jinmwei 2015)、標本胞子の発芽に対する有効性を検討した。

車軸藻類については、卵胞子が十分に成熟する藻体を多量に得るため、新たに現地採集を実施した。採集できた種のうち、系統横断的に調査するため、シャジクモ属 2 種 (シャジクモ、イトシャジクモ)、フラスコモ属 2 種 (オトメフラスコモ、*Nitella* sp.) の標本を試験に供した。シャジクモについては、種内の集団間における差異を調査するため、計 5 集団 (新潟県 2 集団・群馬県 1 集団・山梨県 2 集団) を使用した。発芽試験は、標本卵胞子および非標本卵胞子 (コントロール) を、50ml ガラス瓶に満たした 2 層培地 (滅菌珪砂土壌と蒸留水) に各 50 粒播種した。これらを標本ごとに 6 反復行った。

#### (2) 簡易染色識別法の検討

シダ植物では、クサソテツを対象に野外から得た胞子に対して 1) 無処理、2) 有効塩素濃度 0.04%、NaClO 5 分処理、3) 有効塩素濃度 4%、NaClO 60 分処理、4) 高圧蒸気滅菌処理 (121°C、2 気圧) 40 分処理の 4 処理を施した。4 通りの処理を行い、簡易染色識別法の検討を行った。細胞の生死判定に用いられる MTT [ 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromide ]、TTC [ 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride ] に加えて、死亡した細胞を染色する Evans Blue (EB) と Trypan Blue (TB) の標本胞子の生存評価に対する有効性を検討した。

車軸藻類については、シャジクモを対象に、TTC 染色による車軸藻類の卵胞子の生存評価を

報告している Holzhausen et al. (2018) の方法に従い、染色試験を行った。

### (3) 標本作製法の検討

オクマワラビを対象に、野外から採集した胞子に対して 20、40、60、80 の熱乾燥処理を施した。各処理を施した胞子を 20 と -20 で 3 か月以上の保存し、発芽試験及び MTT による染色試験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 標本胞子の発芽試験

クサソテツを除く 4 種(オオハナワラビ、スギナ、ゼンマイ、オクマワラビ)では全ての標本胞子において発芽が確認されなかった。一方、クサソテツでは標本作製処理後 225 ヶ月の標本胞子において発芽が一粒確認され、前葉体まで成長した(図 1)。オクマワラビでは GA 添加処理した培地を用いた標本経過月数 59 ヶ月の標本胞子において、100 $\mu$ M の GA 添加培地からは 1 粒、10 $\mu$ M の培地からは 2 粒発芽が確認され、前葉体まで成長した(図 2)。

TTC による染色試験を行った 4 種(オオハナワラビ、スギナ、ゼンマイ、クサソテツ)では全ての標本胞子において呈色は確認されなかった。一方、MTT 染色によって評価を行ったオクマワラビでは標本処理後 40 ヶ月(5.47 $\pm$ 1.73%)、59 ヶ月(6.27 $\pm$ 1.89%)、147 ヶ月(2.53 $\pm$ 1.06%)、292 ヶ月(5.4 $\pm$ 2.83%)の標本胞子からわずかに呈色が確認された。標本胞子のほとんどが発芽能力を失っているものの、GA 添加培地の使用などによって、発芽個体を得られる可能性がある。

シャジクモを除く 3 種では全ての標本卵胞子において発芽が確認されなかった。シャジクモでは、標本作製処理後 2~3 ヶ月の新潟県 2 集団の標本卵胞子においてのみ発芽が確認された(0.3 $\pm$ 0.82%~2.7 $\pm$ 0.01%)(図 3)。車軸藻類の標本の卵胞子に着目して発芽を確認したのは本研究が初めてであり、今後、車軸藻類においても博物館標本の利用可能性を検討する価値がある可能性が示された。

### (2) 簡易染色識別法の検討

クサソテツの無処理胞子の発芽率は 55.8 $\pm$ 3.4% で、120 時間 TTC 染色による呈色胞子は 57.2 $\pm$ 3.6%、MTT 染色では 92.2 $\pm$ 3.5% であり、MTT 染色は TTC 染色に比べて有意に生存率を高く評価した。有効塩素濃度 0.04%、NaClO 5 分処理を施した胞子では 28.6 $\pm$ 1.6% 発芽し、TTC 染色、MTT 染色ともに僅かであるが呈色した。有効塩素濃度 4%、NaClO 60 分処理と高圧蒸気滅菌処理を施した胞子では発芽率は 0%、TTC 染色と MTT 染色による生存評価は全条件で呈色率 0% であった。EB 染色と TB 染色では、発芽率が 0% であった高圧蒸気滅菌処理胞子は全ての染色時間で生存率が 100% と評価される一方で、同じく発芽率が 0% であった有効塩素濃度 4%、NaClO 60 分処理胞子においては、EB 染色による生存率は 0~0.7%、TB 染色による生存率は 0~0.5% と評価された。無処理胞子と有効塩素濃度 0.04%、NaClO 5 分処理胞子では EB 染色も TB 染色も全ての条件で生存率は 100% と評価された。これらの結果から、クサソテツの標本胞子では、1.0% TTC による 48 時間以上の染色が生存評価に適していると結論した。EB と TB は胞子の構造の違いが呈色に影響している可能性が考えられ、標本胞子の生存評価には適さないと考えられる。

車軸藻類では、平均 20~40% の発芽率を示したシャジクモ(朝日池産)の卵胞子を用いたが、TTC による染色は全く見られなかった。卵胞子は押し潰しによって殻を裂開させてから染色を行う必要があるが、力加減の制御が非常に困難であった。この処理によって卵胞子が死亡した可能性も考えられる。

### (3) 標本作製法と保存法の検討

疑似標本胞子の胞子発芽は 8 通りすべての条件で確認することが出来なかった。一方、MTT による呈色率は 20 乾燥・-20 保存が最も高かった。絶滅危惧種等の貴重な種の胞子の保存を行う場合、自然乾燥の後に収蔵庫ではなく、個別に低温保存を行うことが望ましいと思われる。

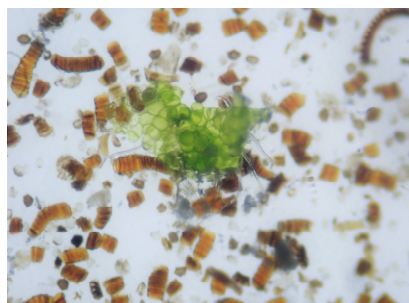


図 1. 標本胞子から発芽したクサソテツ(標本作製処理後 225 ヶ月)。

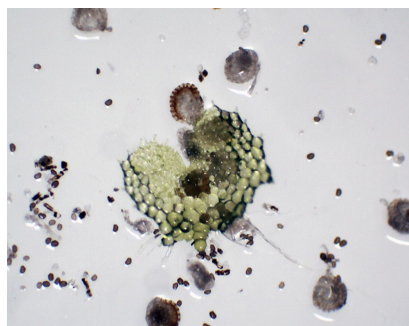


図 2. 標本胞子が発芽し前葉体まで成長したオクマワラビ(10 $\mu$ M GA 添加培地、標本作製処理後 59 ヶ月)。

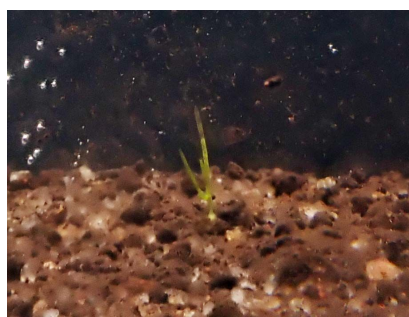


図 3. 標本胞子から発芽したシャジクモ(標本作製後 3 ヶ月)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 志賀隆
2. 発表標題 博物館標本は地域の自然のシードバンクとなり得るか
3. 学会等名 種生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大場拓郎・加藤将・志賀隆
2. 発表標題 テトラゾリウム染色試験による博物館標本胞子の生存可能性の評価
3. 学会等名 陸水学会甲信越支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石黒皓大・加藤将・志賀隆
2. 発表標題 シダ植物標本胞子の 染色による生存識別法の開発と 発芽可能性の評価
3. 学会等名 陸水学会甲信越支部会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学植物標本庫（NGU）の収蔵コレクションと植物標本の価値をテーマにした2回の展示会（植物標本は語る～新潟大学植物標本庫の歴史と収蔵コレクション～、2022年11月30日～2023年1月26日、新潟大学駅南キャンパスときめいと；2023年4月22日～5月14日、新潟県立植物園）を開催し、この中で標本胞子の発芽可能性について研究成果に基づいた展示を行った。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 将  (Kato Syou)  (30624738)	新潟大学・人文社会科学系・特任准教授    (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------