

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350387

研究課題名(和文) 博物館植物標本の生存組織を用いた絶滅集団の復元：組織培養法の確立と普及

研究課題名(英文) Restoration of extinct population using seed tissues of museum plant specimens:  
Technology development and dissemination of tissue culture method

研究代表者

志賀 隆 (Shiga, Takashi)

新潟大学・人文社会・教育科学系・准教授

研究者番号：60435881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：絶滅危惧種を中心に131種722標本の標本種子の発芽試験と胚の酵素活性を調査したところ、84種(64.12%)、336標本(46.54%)において生存が確認された。標本種子の組織培養に取り組むために、野外から収集したヒメヒゴタイとミスミイの健全種子を用いて、様々な培地条件、前処理条件において培養試験を行った。塩化第2水銀による表面殺菌と、防腐剤であるPPMを2%添加した培地を用いることで、菌類を100%抑制が可能だった。この方法を用いて、絶滅集団の標本種子を培地に播種した結果、種子の発芽についても確認されなかったもの、2週間が経過しても菌類の発生は確認されなかった。

研究成果の概要(英文)：I investigated the enzyme activity of the embryo and germination test of herbarium specimens' seeds of 722 specimens of 113 species. As the result, the seeds of 336 specimens (46.54%) of 84 species (64.12%) were alive. To address tissue culture of specimen's seeds, cultivation tests were conducted under various media and pretreatment conditions, using healthy seeds of *Saussurea pulchella* and *Eleocharis acutangula* collected from the wild populations. It was possible to control fungi 100% by using surface disinfection with mercuric chloride and a medium supplemented with 2% of preservative PPM. Using this method, although seed germination was not confirmed as a result of inoculating herbarium specimen's seeds of extinct populations of these species in the medium, the occurrence of fungi was not confirmed even after 2 weeks.

研究分野：総合領域

キーワード：植物標本 組織培養 生物保全 絶滅危惧種

## 1. 研究開始当初の背景

現在、日本に生育するおよそ 5300 種の植物のうち、1779 種が絶滅を危惧される状況になっており（環境省，2012）。それぞれの種に対して、適切な保全活動を行うことが喫緊の課題となっている。絶滅危惧植物の保全については、主に残存集団の生育地で保全を進めると共に、植物園等での系統保存による絶滅のリスク回避が行われている。また、既に失われた場所においては、その場所の土を撒きだして、土壌に残っている埋土種子（シードバンク）を利用した植生の復元の手法がとられてきた（鷲谷・矢原，1996）。この他にも、あらかじめ地域の種の絶滅に備えて、現存する野生集団から種子を収集し保存しておく取り組み（シードバンク事業）も行われている。しかし、地域において絶滅してしまい、更に生育環境も大きく改変されてしまった場合、上記のような方法では種の保全や復元を行うことは困難である。このような場合、別の手法を用いた保全、復元方法を考える必要がある。

博物館の標本庫には 100 年以上前から現在に至るまで、数多くの植物標本が収められており、都市化などにより現在では失われてしまった集団の標本も残されている。標本には種子が残されているものも数多くあり、このような標本から種子を収集し、撒きだすことによって失われた集団を復元することできるかもしれない（志賀，2013）。また、既に個体群のサイズが縮小してしまい遺伝的多様性が失われた集団については、種子から栽培した個体との人工交配によって、遺伝的多様性を回復させることができる可能性がある。

研究代表者は、これまでに絶滅危惧植物を中心に標本種子の発芽試験を試み、発芽実生を得ることができた（志賀，2013）。しかし、発芽する標本種子は作製から時間が経過するにつれて指数関数的に減少し、10 年以上経過した標本種子を発芽させて保全に用いることは難しいことも明らかになった。ところが、発芽しなかった種子に対して酵素活性を調べた所、54%の種において呼吸系酵素活性が確認された（志賀，2013）。このように、発芽できないものの、胚の一部が生存しているという標本種子は非常に多く、一番古いものでは 87 年前のヒメヒゴタイの標本種子（標本採集地域では既に絶滅）において活性が確認された。そのため、標本種子の生存組織を用いて培養する技術、方法論を確立することにより、より効率的に、より多くの絶滅植物集団を復元できる可能性が高いと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の 4 点を目的とした。

### (1) 組織培養法の確立

様々な絶滅危惧種に応用可能な組織培養方法を確立し、標本種子から植物体を得る。

培養試験は植物の胚や果実のタイプを網羅するように 30 種程度を選定し、複数の培地を用いて行う。また、テトラゾリウム染色などを行ったうえで、酵素活性が確認される生存組織を認識し、これを培養するといった、博物館現場で簡便に行うことができる組織培養手法を開発する。

### (2) どの種が標本の種子から発芽させることが可能なのか

土地開発などにより個体群の減少が著しい、絶滅危惧種についてスクリーニング調査を進め、標本の種子から集団の復元が可能である種をリストアップする。

### (3) どのような状態の標本ならば利用可能なのか

採集年代、薫蒸処理の方法など、標本の状態は様々である。様々な状態の標本が得られる種について 6 種選定し、より詳細な発芽実験を試みて、利用可能な標本の状態を明らかにする。また、最適な標本作製方法を明らかにするために、12 種について様々な方法で標本作製し、種子の生存率を調査することにより最適な標本作製・管理方法を明らかにする。

### (4) 博物館標本に対する普及教育と研究成果の還元

博物館や植物園において生品展示、講演会を行うことにより、研究成果を社会フィードバックする。また最終年には標本種子を利用した生物保全に関する巡回展示を作成し、標本作製の意義と博物館標本の価値について教育普及を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 組織培養法の確立

#### ① 野外からの種子収集

既に標本種子からの発芽確認されているミスミイ、イヌハギ、ヒメヒゴタイに加えて、モデル植物であるシロイヌナズナを対象に、野生集団より種子を収集した。また、これらの種子を用いた実験で得られた方法を用いて絶滅集団の標本種子の発芽試験を行った。

#### 培地の調整と発芽試験

蒸留水にムランゲ・スクーグ培地用混合塩類、スクロース、組織培養用寒天を加え、pH 5.7-5.8 に調整して培地を作製した。菌類の抑制効果を検討するために、PPM (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology) の濃度を 0%、0.05%、0.10%、0.15%、0.20% の 5 段階を設定して比較を試みた。

各発芽試験はそれぞれ 50 粒の種子を用いて 3 反復行った。なお菌類が発生したものは全て死亡種子と判定した。

なお、これに先立ち種子の滅菌処理を検討するために、塩化第二水銀と次亜塩素酸を用いて、ミスミイ、ヒメヒゴタイを対象に菌類

の発生を抑制できる条件を検討した。

テトラゾリウム染色後の種子の発芽可能性の評価

テトラゾリウム染色によって生存を確認できた種子の組織を用いて発芽試験を行えるか検討するために、4 処理（未処理、種子切断、切断の後に 48 時間蒸留水へ浸す、切断し 48 時間染色）による培地上での発芽試験を行った。各処理 30 粒の種子を試験に用いた。

(2)どの種が標本の種子から発芽させることが可能なのか

①標本種子の採集

調査対象種は、絶滅危惧種を中心に生活史特性を網羅するように選択し、種ごとに新しい年代の標本種子が含まれるように、3 標本以上を選び種子を得た。試験に用いた標本種子は大阪市立自然史博物館植物標本庫（OSA）の収蔵標本より収集した。また、調査に用いる標本は十分な数の成熟種子をつけた個体を選択した。これらを合計して 131 種 722 点の標本を解析対象とした。

なお、発芽試験に使用した種子や発芽した実生は試験終了後、再度標本にしてアノテーションカードと共に種子を回収した標本に添付し、大阪市立自然史博物館植物標本庫に収蔵した。

発芽試験

発芽試験は段階温度法（Washitani et al., 1987）を用いて行った。段階温度法では、同一の標本から得た種子試料を二つに分けて、2 種類の段階的溫度処理を施した。標本によって得られる種子数は変動するが、各条件で 1 標本につき、最大 50 種子を発芽試験に用いた（平均  $30.1 \pm 23.0$  種子）。酸素条件に関しては、調査対象種それぞれの種子発芽に関する過去の先行研究に基づいて、種毎に好気条件もしくは嫌気条件で行うかを判断した。

テトラゾリウム染色試験

発芽試験によって発芽しなかった未発芽種子はテトラゾリウム試験（Cottrell, 1947; 畑野健一, 1952）を行い、種子が生存しているかを確認した。染色試験は未発芽種子を切断してシャーレに並べ、種子の胚が十分に浸かるまでテトラゾリウム 1% 溶液を注いで、暗条件下に置き、48 時間後に胚が赤色に呈色した種子を計数し、標本毎に呈色率を求めた。なお、種子が微小で切断することが困難である種は種子をそのままテトラゾリウム 1% 溶液に浸け、呈色反応の有無を確認した。呈色の判断は Elias et al. (2012) 等を参考に十分に赤色化しているもののみを呈色反応がみられた種子とした。

呈色反応が確認された種子は胚が生存していると判断し、発芽種子と呈色した未発芽種子を合わせたものを生存種子として扱っ

た。発芽も呈色反応も確認されなかった種子は死亡種子と判断した。

(3)どのような状態の標本ならば利用可能なのか

種子生存率が最大となる標本作製・管理方法を明らかにするために、標本種子からの発芽、生存が確認された種の中から 13 種（コガマ、ホシクサ、カンガレイ、タコノアシ、ヒメミソハギ、メマツヨイグサ、イヌハギ、ナズナ、コハコベ、スズサイコ、キクモ、ピロードモウズイカ、アカメガシワ）について調査を行った。

野外から採集したこれら 13 種の種子には 12 種類の標本作製・管理の処理を施した。すなわち、3 通りの乾燥処理（20、40、80）を行った後、2 通りの温度条件（20、-20）と酸素条件（未処理、脱酸素処理）に種子を保存した。

発芽試験およびテトラゾリウム染色試験は 2~5 ヶ月後、13~19 ヶ月後、25~33 ヶ月後に上記の方法で保存した種子を用いて実施した。発芽試験や呈色試験は上述の調査で行った手順と同様に行った。

4. 研究成果

(1)組織培養法の確立

培地上での実験において、塩化第二水銀による滅菌が最も高い菌類抑制効果がみられた。しかし、41.1%の種子で菌類の発生を抑えることができなかった。そのため、防腐剤である PPM の菌類抑制の効果を検討した結果、PPM を 2% 添加した種子では、菌類の発生が確認されなかった。これらの結果を組み合わせ、塩化第二水銀による表面殺菌と、PPM2% を添加した培地を用いることで、菌類を 100% 抑制が可能だった。

この方法を用いて、絶滅集団の標本種子を培地に播種した結果、種子の発芽についても確認されなかったものの、2 週間が経過しても、菌類の発生は確認されなかった。今後、標本種子を用いて培地上での発芽試験を行う際には、表面殺菌だけでは滅菌が不十分である可能性があるため、表面殺菌に加えて PPM などの防腐剤を添加することで、菌類が内在していても抑制できると考えられる。

テトラゾリウム染色試験によって呈色したイヌハギ種子を用いて培養試験を行った結果、切断を行った後、テトラゾリウムで染色したものは発芽やカルス状組織への分化は確認されなかった。標本種子を用いて組織培養を行う場合は、染色法により生存組織を確認するプロセスを経ずに組織培養試験を行う方がカルス状組織を得る可能性が高まると考えられる。

(2)どの種が標本の種子から発芽させることが可能なのか

博物館標本種子を用いた発芽試験の結果、24 種（18.32%）、59 標本（8.17%）から発芽

が確認され、発芽と呈色を合わせて生存とした場合、84種(64.12%)、336標本(46.54%)において生存が確認された。

得られた発芽率、生存率を基に種の特徴との関係を比較したところ、種子重量では、重量が小さい種子で生存標本の割合が高かった。生活史では、一年生植物または越年生植物は多年生植物よりも生存種の割合が高かった。生育環境では、湿生植物は他の生育環境に比べ生存種の割合が高かった。また、生育環境ごとに生存していた標本の経過年数を比較すると、草地植物は、湿生植物、水生植物、木本種よりも生存期間が長かった。一般的に永続的シードバンクを作る種のはほとんどは草本であると言われており、今回の研究においても、木本種で種子寿命が短く、多年生植物や、種子重量の重い種子といった木本に代表される形質を有する種子で生存率が低かった。経過年数と発芽率、生存率の関係についてみると、生存率には違いがみられなかったが、年数が経過するにつれて発芽率が減少した。

#### (3)どのような状態の標本ならば利用可能なのか

野外から収集した種子の発芽率、生存率に与える標本作製保存処理の影響を調べると、13種で、3回の発芽試験中のいずれか、またはすべてで80の高温を経験した種子は生存率が低かった。また、酸素条件では、3回の発芽試験中に最大4種で影響がみられ種、経過月数によって影響が異なった。さらに、保存温度では、25~33ヶ月後の試験において最も多くの種で影響がみられ、-20で保存すると2種を除くすべての種で生存率が低かった。酸素条件については種によって影響は異なっていたが、乾燥温度、保存温度については、40以下の温度で乾燥し、-20で保存することで多くの種が高い生存率を示した。しかし、種によってそれぞれ最適な方法を検討する必要がある。

#### (4)博物館標本に対する普及教育と研究成果の還元

本研究内容の一部を大阪市立自然史博物館にて開催されたミニ展示「植物標本のタネは地域の自然を救う!?」(平成26年3月15日~5月31日)と長岡市立科学博物館の企画展「めがはじまり~樹木の実生・命のものがたり~」(平成26年5月30日~7月30日)において紹介した。

また、植物標本作製の意義と標本種子の発芽可能性と保全への利用可能性について取り扱った巡回展示を開催するためにコンテンツ作成を行った。これをもとに大阪市立自然史博物館において展示会を開催した(平成29年3月4日~4月9日)。更に、新潟大学旭町学術資料展示館でも開催することが決定した(平成29年4月28日~5月28日)。

なお、今回の研究成果を社会に還元するた

めに、講演会を3回(2015年3月、5月、2017年3月)実施した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

- (1) Shiga T., S. Kato, M. Usuba, T. Yamanouchi, T. Kurazono, Y. Hirasaswa, and M. Yamazaki, 2017. Genetic identification of *Sagittaria natans* Pall. (Alismataceae) from Lake Yonuma (Iwate Prefecture) as a new locality in Japan. *The Journal of Japanese Botany*, in press. (査読有)
- (2) 黒沢高秀・志賀 隆, 2016. 植物さく葉標本室をつくろう. *分類* 16(1): 15-28. (査読無し)
- (3) 平澤優輝・港 翼・長谷川匡弘・志賀 隆, 2016. 標本種子の発芽可能性の評価と標本作製および管理方法の種子寿命への影響. *分類* 16(1): 37-44. (査読無し)
- (4) Nakahama N., Y. Hirasawa, T. Minato, M. Hasegawa, Y. Isagi, and T. Shiga, 2015. Recovery of genetic diversity in threatened plants through use of germinated seeds from herbarium specimens. *Plant Ecology* 216: 1635-1647. (査読有)

〔学会発表〕(計11件)

- (1) 志賀 隆・平澤優輝・中浜直之・長谷川匡弘, 2017. 博物館標本の種子は生きている!: 発芽可能性と標本作製・管理方法の検討. 日本生態学会第64回大会, 早稲田大学(東京・新宿区).(企画集会・口頭発表)
- (2) Hirasawa Y., M. Hasegawa, and T. Shiga, 2016. Herbarium specimens' seeds still alive: germinability tests of herbarium seeds. *East Asian Plant Diversity and Conservation 2016*, Tokyo University (Tokyo, Bunkyo-ku). (Poster presentation)
- (3) 志賀 隆・加藤 将・薄葉 満・山ノ内 崇・倉園知広・平澤優輝・山崎真実, 2016. 夜沼(岩手県八幡平市)におけるカラフトグワイの発見: 生育環境と近隣地域集団との遺伝的關係. 水草研究会全国集会, 高知県立牧野植物園(高知県・高知市). (口頭発表)
- (4) 志賀 隆・平澤優輝・長谷川匡弘, 2016. 博物館に収蔵されているカヤツリグサ科植物種子の発芽可能性. すげの会第27回大会, ホテル角神(新潟県・阿賀町). (口頭発表)
- (5) 平澤優輝・港 翼・志賀 隆, 2016. 標本作製・保存方法による種子生存率の経年変化. 日本植物分類学会第15回大会, 富山大学(富山県・富山市).(口頭発表)
- (6) 平澤優輝・港 翼・志賀 隆, 2015. 標本作製・保存方法の違いによる種子生存

率の変化：新潟県生物教育研究会研究発表会，新潟薬科大学（新潟県・新潟市）。（口頭発表）

- (7) 平澤優輝・港 翼・志賀 隆，2015．標本作製・保存方法の違いによる種子生存率の変化．日本陸水学会甲信越支部会第41回大会，月岡ニューホテル冠月（新潟県・新発田市）。（口頭発表）
- (8) 平澤優輝・港 翼・志賀 隆，2015．標本作製・保存方法・時間経過が種子生存に与える影響．日本植物分類学会第14回大会，福島大学（福島県・福島市）。（ポスター発表）
- (9) 平澤優輝・港 翼・志賀 隆，2014．時間経過にともなう標本種子の生存率の変化：標本作製・管理方法に注目して．新潟県生物教育研究会研究発表会，新潟薬科大学（新潟県・新潟市）。（口頭発表）
- (10) 平澤優輝・港 翼・志賀 隆，2014．時間経過にともなう標本種子の生存率の変化：標本作製・管理方法に注目して．日本陸水学会甲信越支部会第40回大会，すずむし荘（長野県・松川村）。（ポスター発表）
- (11) 平澤優輝・港 翼・長谷川匡弘・志賀 隆，2014．標本の種子は長生きか？ 日本植物学会第78回大会，明治大学（神奈川県・川崎市）。（ポスター発表）

〔図書〕（計1件）

- (1) 大阪市立自然史博物館（編），2015．第46回特別展 たまごとたね -いのちのはじまりと不思議- ．大阪市立自然史博物館，大阪．（分担執筆）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）  
取得状況（計0件）

〔その他〕

(1) 企画展示

- ① ミニ展示「植物標本のタネは地域の自然を救う!？」～時を越えて発芽する植物標本のタネ～（大阪市立自然史博物館；2014年3月15日-5月31日）。（監修）  
企画展「めがはじまり～樹木の実生・命のものがたり～」（長岡市立科学博物館；2015年5月30日-7月30日）。（協力）  
企画展示「植物標本のタネは地域の自然を救う!？」～時を越えて発芽する植物標本のタネ～」（大阪市立自然史博物館；2017年3月4日-4月9日）。（監修）

(2) ホームページ等

- ① 大阪市立自然史博物館 ミニ展示「植物標本のタネは地域の自然を救う!？」～時を越えて発芽する植物標本のタネ～を実施します【平成26年3月15日（土曜日）～5月31日（土曜日）】  
<http://www.city.osaka.lg.jp/keizaisenryaku/page/0000257631.html>

ミニ展示「植物標本のタネは地域の自然を救う!？」～時を越えて発芽する植物標本のタネ～のお知らせ

[http://www.omnh.net/whatsnew/2014/03/post\\_149.html](http://www.omnh.net/whatsnew/2014/03/post_149.html)

アクリル標本で“木の芽”の美しさが際立つ企画展「めがはじまり」を開催

<http://www.city.nagaoka.niigata.jp/shisei/cate02/houdou-shiryoku/file2015/20150526-01.pdf>

植物標本のタネは地域の自然を救う - 大阪市立自然史博物館

<http://www.mus-nh.city.osaka.jp/tokuten/2017hatsuga/>

6．研究組織

(1) 研究代表者

志賀 隆（SHIGA, Takashi）

新潟大学・人文社会・教育科学系・准教授  
研究者番号：60435881

(2) 研究分担者

長谷川 匡弘（HASEGAWA, Masahiro）

大阪市立自然史博物館・その他部局等・研究員

研究者番号：80610542