

# 絶滅危惧植物ハヤチネウスユキソウの組織培養による大量増殖

小山田智彰・新井隆介・鞍懸重和

岩手県環境保健研究センター  
〒020-0173 岩手県盛岡市飯岡新田 1-36-1

## In vitro propagation of endangered plants, *Leontopodium hayachinense*

Tomoaki OYAMADA, Ryusuke ARAI and Shigekazu KURAKAKE

### 要 約

絶滅危惧植物ハヤチネウスユキソウについて，組織培養により苗の大量増殖を行なう条件を設定した。

無菌播種の結果から，組織培養に用いる培地は，Hyponex 改変培地とした。

茎頂分裂組織の摘出は，4月から5月が適期であった。

茎頂培養からシュート形成を進めるには，NAA0.1mg/L+BA0.1mg/L を添加した培地が最も適当であった。

葉片培養から多芽体を得るためには，NAA1.0mg/L+BA1.0mg/L を添加した培地が最も適当であった。

多芽体を材料に，NAA0.5mg/L を添加した培地で発根を進め，植物体を得ることができた。

以上の方法を組み合わせることで，ハヤチネウスユキソウの大量増殖が可能になった。

### キーワード

ハヤチネウスユキソウ 組織培養 茎頂分裂組織 多芽体 大量増殖

## I はじめに

ハヤチネウスユキソウ (*Leontopodium hayachinense* (Takeda) H. Hara et Kitam.<sup>1)</sup>) (図1) は，岩手県早池峰山のみで自生し<sup>2)</sup>，ヨーロッパアルプスに生育するエーデルワイスに似ていることから，早池峰山を代表する花として知られており，この山を訪れる多くの登山者のあこがれの花となっている。



図1 ハヤチネウスユキソウ (7月19日曇り)  
早池峰山小田越登山道8合目

しかし、いわてレッドデータブックでは、環境省レッドデータブックの絶滅危惧Ⅰ類に相当するAランクに掲載され、その生存に対する脅威として登山者による踏みつけや盗掘があげられている<sup>3)</sup>。近年は、登山者の増加に伴うオーバーユースによる生育環境の破壊や盗掘によって、個体の減少が指摘されており、岩手県（環境生活部自然保護課、環境保健研究センター）では、2009年から小田越登山道周辺のモニタリング調査を行っている（第2、3、4図）。

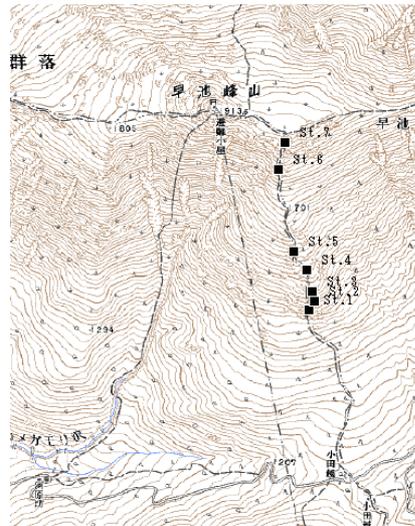


図2 モニタリングの位置図  
早池峰山小田越登山道 調査地点7ポイント

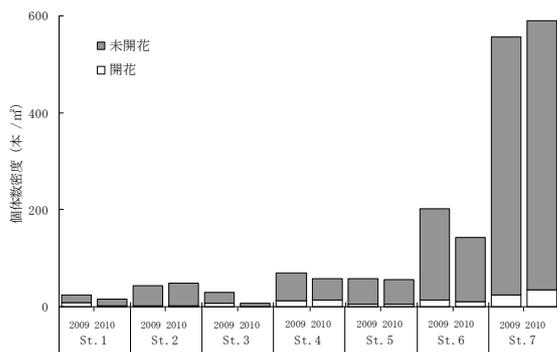


図3 ハヤチネウスユキソウのモニタリング調査結果



図4 ハヤチネウスユキソウのモニタリング調査状況  
St. 1に1m×1mのコドラート設置

なお、ハヤチネウスユキソウは、「岩手県希少野生動植物の保護に関する条例」により、「指定希少野生動植物」及び「特定希少野生動植物」に指定されており、その採取及び損傷が禁止され、栽培品の流通が監視されている。

ところで、ハヤチネウスユキソウの薬用については定かでない。同属種のエーデルワイスは、強い抗酸化作用を持ち、抗炎症・メラニン抑制作用があるとされている。薬用研究に使用する材料を確保する際は、大量の苗が必要となり、組織培養による増殖技術が有効である。

ハヤチネウスユキソウの組織培養による増殖の報告を確認できなかったため、過去に増殖に取り組んだ経験<sup>4)</sup>をもとに試験を行なった結果、葉片培養によって大量増殖を行うことができたので報告する。

## II 試験方法

### 1. 茎頂培養

岩手県遠野市の「道の駅 遠野風の丘」（特定希少野生動植物事業の届出事業者）で購入したハヤチネウスユキソウを材料に用いた。

茎頂培養の前に、培養に使用する基本培地の選定を行った。MS 培地、Hyponex 培地、White 培地、および Hyponex 改変培地に、ハヤチネウスユキソウの種子を播いて発芽および生育状況を肉眼観察で確認した。

茎頂分裂組織の殺菌は、茎頂分裂組織を含んだ植物体を中性洗剤で洗い、水道水で十分に洗浄した後、クリーンベンチ内に搬入した。70%エタノールに数秒浸漬し、0.6%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に30分浸漬して殺菌した。滅菌水で3回洗浄した後、実体顕微鏡下で茎頂分裂組織を摘出し、培地に置床した。

培養に用いる培地は、Hyponex 改変培地を使用した（第1表）。以下、全ての試験にこれを用いた。植物生長調節物質を添加しない培地（以下、ホルモンフリー培地）と、植物生長調節物質である NAA と BA を添加した合計13試験区の培地に、ショ糖 30g/L を加えて pH6.0 に調整後、ゲランガム 2.5g/L（または、寒天 7g/L）を加えて加熱・溶解し、試験管に分注して 121°C、15 分の条件で高圧滅菌を行い、得られた培地を用いた。

試験に用いた培養容器は、25mm×120mm の植物培養試験管で、これに培地 20ml を分注した。培養の環境条件は、照度 2,000lx、16 時間日長、設定温度 20°C を基本とし、以下全ての試験をこの条件で行った。

1 試験区につき 10 容器（茎頂分裂組織 10 個）を供試し、培養で得られた形態を茎葉（以下、シュート）形成の有無、カルス、枯死、コンタミネーション（雑菌による培地の汚染）を肉眼観察により分類する方法で調査した。

表1 Hyponex改変培地の組成

成分	添加量	MS5液の組成	添加量
Hyponex (6.5 - 6.0 - 19.0)	2.0 g/L	ミオイノシトール	100 mg/L
スクロース	30 g/L	ニコチン酸	0.5 mg/L
MS5液	1.0 mL/L	塩酸ピリドキシン	0.5 mg/L
ゲランガム*	2.5 g/L	塩酸チアミン	0.1 mg/L
pH	6.0	グリシン	2.0 mg/L

\* ゲランガムの代わりに寒天7.0g/Lでも可

### 2. 葉片培養

葉片培養は、ホルモンフリー培地と、NAA と BA を添加した合計9試験区の培地に、ショ糖 30g/L を加えて pH6.0 に調整後、ゲランガム 2.5g/L（または、寒天 7g/L）を加えて加熱・溶解し、25mm×120mm の植物培養試験管に分注して 121°C、15 分の条件で高圧滅菌を

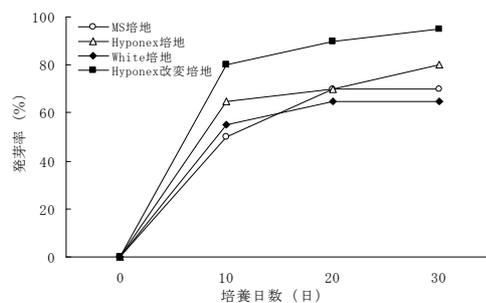


図5 4つの培地による発芽率の経時変化

行い、得られた培地を用いた。茎頂培養で得られたシュートの葉片を約 10 mm角に切り出し、葉の裏面が接地するよう培地上に置床した。

1 試験区につき 10 容器（葉片 10 個）を供試し、培養で得られた形態を多芽体の形成、カルス、枯死を肉眼観察により分類する方法で調査した。

### 3. 発根培養

ホルモンフリー培地、NAA0.1mg/L、NAA0.5mg/L 添加した合計 3 試験区の培地に、ショ糖 30g/L 加え、ゲランガム 2.5g/L（または、寒天 7g/L）を加えて加熱・溶解し、108mm×159mm×39mm のメリクロン培養用フラスコに分注して 121℃、15 分の条件で高圧滅菌を行い、得られた培地を用いた。

葉片培養から得られた多芽体を切り分けて移植し、1 試験区につき 2 容器（多芽体 10 個）を供試した。培養で得られた植物体の草丈と葉数を計測し、発根の有無を肉眼観察により分類する方法で調査した。生育を判断する材料として、無菌播種で発芽させた実生の植物体と比較を行った。

## III 試験結果

### 1. 茎頂培養

無菌播種に用いた培地の比較結果を第 5, 6 図に示した。無菌播種後、10 日経過した頃から発芽が観察された。無菌播種後、30 日経過した時に最も発芽率が高い培地は、Hyponex 改変培地の 95%であった。続いて Hyponex 培地が 80%、MS 培地が 70%、White 培地が 65%であった。この結果を参考にして組織培養に用いる培地は、全て Hyponex 改変培地とした。

抽出した茎頂分裂組織を第 7 図に示した。茎頂の抽出時期について調査した結果、4 月から 5 月が適期であった。6 月以降は、花芽分化が始まり茎頂培養には適さなかった。



図 6 Hyponex 改変培地で発芽した実生苗  
無菌播種開始 30 日経過 発芽率 95%



図 7 ハヤチネウスユキソウの茎頂分裂組織 (40 倍)  
出芽の確認から 30 日経過した植物体から抽出

表 2 茎頂培養における植物調整物質の添加がシュート形成に及ぼす影響

NAA (mg/L)	BA (mg/L)	結果*
0.00	0.00	+
0.01	0.01	+
0.01	0.05	+
0.01	0.10	++
0.01	0.20	+
0.05	0.01	+
0.05	0.05	++
0.05	0.10	++
0.05	0.20	++
0.10	0.01	+
0.10	0.05	++
0.10	0.10	+++
0.10	0.20	++

\* +++: 最適 ++: 適 +: 変化あり -: 不適

茎頂培養における植物調整物質の効果を（表 2, 図 8）に示した。

茎頂培養からシュート形成を進めるには、NAA0.1 mg/L+BA0.1mg/L を添加した培地が最も適当であった。

ホルモンフリー培地, NAA0.01mg/L+BA0.01mg/L および NAA0.01mg/L+BA0.05mg/L を添加した培地では, シュート形成は行われたが, 生育で劣った。

NAA0.01mg/L+BA0.10mg/L, NAA0.05mg/L+BA0.05 mg/L, NAA0.05mg/L+BA0.10mg/L および NAA0.05mg/L +BA0.20mg/L を添加した培地では, シュート形成が進んだが, 増殖で劣った。

NAA0.01mg/L+BA0.20mg/L, NAA0.05mg/L+BA0.01 mg/L および NAA0.10mg/L+BA0.01mg/L を添加した培地では, カルス化が進んだ。

NAA0.10mg/L+BA0.05mg/L, NAA0.10mg/L+BA0.20 mg/L を添加した培地では, シュートとカルスの増殖が見られた。枯死およびコンタミネーションはなかった。

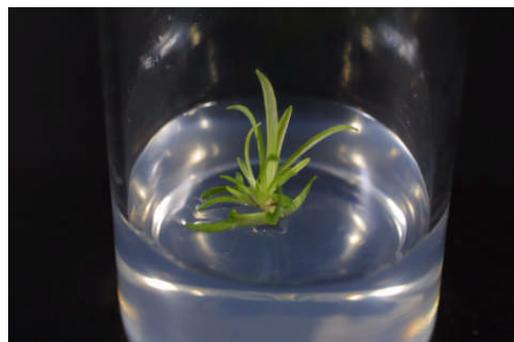


図8 NAA0.1mg/L+BA0.1mg/Lを添加した培地によって得られたシュート 茎頂培養開始20日経過

表3 葉片培養における植物調整物質の添加が多芽体形成に及ぼす影響

NAA (mg/L)	BA (mg/L)	結果*
0.0	0.0	-
0.1	0.1	-
0.5	0.5	++
0.5	1.0	++
1.0	0.5	++
1.0	1.0	+++
1.0	1.5	+
1.5	1.0	-
1.5	1.5	+

\* +++: 最適 ++: 適 +: 変化あり -: 不適

## 2. 葉片培養

茎頂培養で得られた植物体の葉を約10mm長に分割して培地に置床し, 多芽体の形成について見た結果を表3, 図9)に示した。

葉片を材料として多芽体を形成させるには, NAA1.0mg/L +BA1.0mg/L を添加した培地が最も適当であった。

ホルモンフリー培地, NAA0.1mg/L+BA0.1mg/L を添加し培地は, 全てが枯死した。

NAA0.5mg/L+BA0.5mg/L, NAA1.0mg/L+BA0.5mg/L を添加し培地は, 多芽体の形成が見られた。

NAA1.0mg/L+BA1.5mg/L を添加し培地は, 多芽体とカルス化の増殖が見られた。

NAA1.5mg/L+BA1.5mg/L, NAA1.5mg/L+BA1.5mg/L の培地では, カルス化の形成が見られた。

培養で得られたカルスは, そのままの状態を続けると枯死したが, NAA1.0mg/L +BA1.0mg/L を添加した培地に継代して培養すると多芽体を形成した。

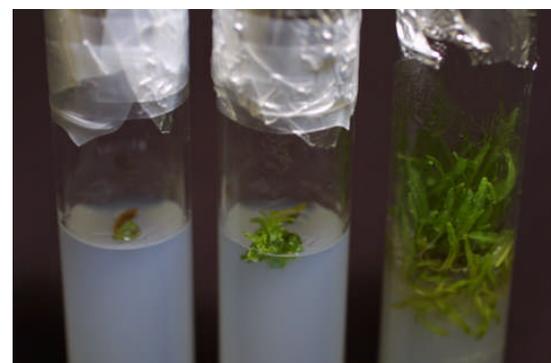


図9 NAA1.0mg/L+BA1.0 mg/L を添加した培地で得た多芽体 左から培養開始後15日, 30日, 45日

表4 発根培養におけるNAAの添加が発根に及ぼす影響

NAA (mg/L)	0.0	0.1	0.5	1.0	1.2	1.5
結果*	+	+	++	-	-	-

\* ++: 効果大 +: 効果あり -: 効果なし (カルス化含む)

### 3. 発根培養

葉片培養で得られた多芽体を分割して培地に置床し、培養で得られた植物体の生育と発根について見た結果を第4表、第10、11図に示した。

NAA0.5mg/Lを添加した培地で最も草丈、葉数ともに増加し、発根が確認された。このときの生育を判断する材料として、無菌播種で発芽させた実生の植物体と比較した結果、草丈、葉数ともに実生の苗を上回った。

ホルモンフリー培地およびNAA0.1mg/Lを添加した培地は、発根を確認できたが、NAA0.5mg/Lを添加した培地より劣った。

NAA1.0mg/L、NAA1.2mg/LおよびNAA1.5mg/Lを添加した培地では、発根せずにカルス化が進んだ。



図11 発根培養50日経過  
左：ホルモンフリー培地  
右：NAA0.5mg/Lを添加した培地

## IV 考察

今回の試験に用いる培地は、無菌播種の結果を参考に Hyponex 改変培地とした。MS培地やホワイト培地と比較すると構成成分が少ないことから、培地調整が容易である。また、この培地は、以前に行ったエーデルワイスの茎頂培養においても効果が認められたことから、他のウスユキソウにも利用できる可能性がある。

茎頂培養では、NAA0.1mg/L+BA0.1mg/Lを添加した培地によってシュートの形成と増殖が得られた。ハヤチネウスユキソウについてウイルス病の発生が報告された例は確認できていないが、栽培地では他の植物等からウイルスの感染を受ける可能性もある。このことから、茎頂培養を用いたウイルスフリー苗の作出は、園芸の分野において有益な技術となるだろう。

茎頂培養由来のシュートの葉片を材料に増殖の検討を行い、NAA1.0mg/L+BA1.0mg/Lを添加した培地によって多芽体を得ることができた。また、葉片培養の結果から、NAAとBAの添加量を調整することによってカルスの誘導や多芽体の状態を維持することも可能と思われる。安定した培養と増殖が可能と考えられる。

葉片培養由来の多芽体を分割して発根培養を行ったところ、NAA0.5mg/L添加した培地で正常な発根個体が得られたことから、発根には、少量のサイトカイニンが適していると考えられる。

以上の結果から、ハヤチネウスユキソウは、Hyponex改変培地が利用でき、摘出した茎頂分裂組織をNAA1.0mg/L+BA0.1mg/L添加した培地に置床してシュート形成を行い、シュートの葉片を用いてNAA1.0mg/L+BA0.1mg/L添加した培地で多芽体を得ることができる。この多芽体を分割してNAA0.5mg/L添加した培地で発根させることにより、組織培養による植

物体再生が可能であることが明らかになった。発根培養から50日経過した培養苗をメリクロン培養用フラスコから取り出して順化し、栽培を行ったところ、全ての個体を開花まで到達することができた（第12図）。



図12 開花したハヤチネウスユキソウ培養苗

ハヤチネウスユキソウは、「岩手県希少野生動物の保護に関する条例」の「特定希少野生動物」に指定され、事業者は届出を行うことにより生産したハヤチネウスユキソウを販売することが可能であるが、販売個体の起

源は、早池峰山から採取された個体または種子の可能性が高いと推察される。組織培養による大量増殖の技術が確保されたことで、早池峰山を除いた場所で栽培されている個体を材料に苗の大量生産が可能となる。山で採取することなく苗の提供が行われることは、希少種保護の視点からも有用な技術になるものと考えられる。また、カサネの誘導および植物体の再生を実現できたことは、絶滅危惧植物の性格上から材料になりえなかった薬用植物の研究分野においても、その取り組みを支える技術となりえるだろう。

## 摘 要

絶滅危惧植物ハヤチネウスユキソウについて、組織培養により苗の大量増殖を行なう条件を設定した。

- 1 無菌播種の結果から、組織培養に用いる培地は、Hyponex 改変培地とした。
- 2 茎頂分裂組織の摘出は、4月から5月が適期であった。
- 3 茎頂培養からシュート形成を進めるには、NAA0.1mg/L+BA0.1mg/L を添加した培地が最も適当であった。
- 4 葉片培養から多芽体を得るためには、NAA1.0mg/L+BA1.0mg/L を添加した培地が最も適当であった。
- 5 多芽体を材料に、NAA0.5mg/L を添加した培地で発根を進め、植物体を得ることができた。
- 6 以上の方法を組み合わせることで、ハヤチネウスユキソウの大量増殖が可能になった。

## 謝 辞

論文の作成にあたり、岩手県環境保健研究センター地球科学部の山内貴義博士よりご助言をいただいた。研究活動の外部紹介・普及については、岩手県環境保健研究センター企画情報部の兼平俊亮主任よりご支援をいただいた。早池峰山におけるハヤチネウスユキソウのモニタリング調査は、千葉和氏ならびに菊池久蔵氏、前岩手県環境生活部自然保護課野生生物担当の金亜希子主査らとともに実施した。モニタリング調査のご助言と評価は、岩手植物の会顧問・いわてレッドデータブック改訂検討委員会委員の猪苗代正憲先生より

いただいた。本研究で作出した培養苗の野外栽培は、盛岡市三辰園のご協力をいただいた。心より御礼申し上げます。

Corresponding author. E-mail: tomo-oyamada@pref. iwate. jp

## 引用文献

- 1) 米倉浩司・梶田忠. 2003. BG Plants 和名-学名インデックス (YList), [http://bean.bio.chiba-u.jp/bgplants/ylist\\_main.html](http://bean.bio.chiba-u.jp/bgplants/ylist_main.html) (確認: 2011年4月20日).
- 2) 大井次三郎. 1978. ハヤチネウスユキソウ. 1296. 日本植物誌顕花篇. 至文堂, 東京.
- 3) 岩手県生活環境部自然保護課. 2001. ハヤチネウスユキソウ. 77. 岩手県, 岩手.
- 4) 小山田智彰. 2004. エーデルワイスの増殖に関する研究. 1-9. 東北地域環境計画研究会 自主研究報告書 第7・8・9合併号.

## 【論文執筆者紹介】

小山田智彰（おやまだ ともあき）

- ・ 出身地：岩手県盛岡市
- ・ 北里大学大学院獣医畜産学研究科修了
- ・ 岩手県立大学大学院博士後期課程修了  
博士（学術）専門：植物バイオテクノロジー
- ・ 県立高校教諭を経て、岩手県環境保健研究センター地球科学部主査専門研究員
- ・ 希少植物や地域在来種を中心に増殖や育種の研究に取り組む

新井隆介（あらい りゅうすけ）

- ・ 出身地：埼玉県秩父市
- ・ 信州大学大学院農学研究科修士課程修了
- ・ 岩手県環境生活部自然保護課を経て、岩手県環境保健研究センター地球科学部専門研究員
- ・ 半自然草原の生物多様性保全の研究、いわてレッドデータブック改訂業務

鞍懸重和（くらかけ しげかず）

- ・ 出身地：栃木県真岡市
- ・ 岩手大学大学院農学研究科修士課程修了
- ・ 岩手県環境保健研究センター地球科学部非常勤専門職員
- ・ 専門は、地理情報システム（GIS）データベースの維持管理など