

# クサソテツの組織培養による大量増殖

## (第2報)

### 多芽球体の誘導および植物体再生

井内美砂・後藤昭文・川村泰史

Micropropagation of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. through tissue culture II  
Induction of green globular bodies and regeneration of plantlets.

Misa IUCHI, Akifumi GOTO and Hirofumi KAWAMURA

#### 要約

井内美砂・後藤昭文・川村泰史(1999):クサソテツの組織培養による大量増殖(第2報)多芽球体の誘導および植物体再生.徳島農試研報,(35):14~19

クサソテツの組織培養による大量増殖技術を確立するため,多芽球体の誘導条件および効率的な植物体再生条件を検討した。

若いランナーの先端部を4種類の培地に置床して多芽球体の誘導条件を検討した結果,0.5mg/LのNAAと2.0mg/LのBAまたはKINを添加したMS固形培地で多芽球体の発生率が高かった。

培養容器を振る方法で多芽球体を分割し植物体を再生させた場合,順化時の再生植物体の分離に手間がかかり,順化の条件によっては活着率がかなり低かった。多芽球体をうらごし操作することにより再生植物体が増加し,目開き2mmで2回繰り返すことにより最も多い再生植物体が得られた。

キーワード:シダ,クサソテツ,多芽球体,大量増殖,組織培養

#### はじめに

多芽球体(green globular bodies, GGB)を利用したクサソテツの大量増殖について,前報<sup>9)</sup>では多芽球体の増殖条件を検討し,1.0mg/LのBAを添加した培地が増殖培地として適していること,多芽球体は培養容器を激しく振ることにより省力的に分割できること,BA無添加培地へ移植することにより植物体を再生できることを明らかにした。しかし,用いた多芽球体は限られた条件でごく少数得られたもので,多芽球体の誘導条件の検討が不十分であった。そこで若いランナーを用いて多芽球体の誘導に適する培地の植物ホルモン条件を検討した。

また前報では多芽球体から植物体を再生した際にシュートが多数密生し,1株ずつに分離しにくいという問題があった。そこで多芽球体を細かくする方法として,イネの細胞培養で用いられている“うらごし操作”<sup>11)</sup>を応用し,効率的な植物体再生を行うことができたので報告する。

なお,本報告の一部は生物系特定産業技術推進機構の実用化促進支援研究事業で実施した。

#### 試験方法

##### 1 多芽球体の誘導

材料は市販のクサソテツ苗の若いランナーの先端部を用い,70%エタノールに数秒間,0.1%塩化ベンザルコニウム溶液に10分間,有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に15分間浸して殺菌した後,滅菌水で2回すすいだ。

基本培地はMS培地<sup>10)</sup>を用い,シヨ糖濃度は3%,ジェランガム濃度は0.2%,pHは5.7~5.8に調整した。

添加する植物ホルモンとして1mg/LのBA(6-benzyl aminopurine)を添加した区, 2mg/LのBAを添加した区, 2mg/LのBAと0.5mg/LのNAA(-naphthaleneacetic acid)を添加した区, 2mg/LのKIN(kinetin)と0.5mg/LのNAAを添加した区の4区を設けた。培地は直径25mmの平底試験管に10mlずつ分注した。

ランナーの生長点を含む先端部を長さ約5mmに調整し, 各試験管に1個ずつ, 各区11~12個ずつ置床した。84日後に多芽球体の発生率を調査した。

培養は25℃, 約4000lxの14時間日長下で行った。

## 2 多芽球体からの植物体再生

材料は前項で述べた方法で2mg/LのKINと0.5mg/LのNAAを添加した培地で誘導された多芽球体を用いた。多芽球体は, 1~2カ月毎に分割し, 初代培養から約6カ月間は誘導培地と同じ培地で, その後は1mg/LのBAを添加したMS培地で継代し増殖させた。

植物体再生培地は2分の1濃度のMS培地を用い, ショ糖濃度は1.5%, ジェランガム濃度は0.2%とし, 液体培地はジェランガム以外は固形培地と同組成とした。pHは5.7~5.8に調整し, 植物ホルモンは添加しなかった。

培養は25℃, 約4000lxの14時間日長下で行った。

順化にはバーミキュライトを主成分とする園芸用培土を入れた128穴のセルトレイを用いた。

### 1) 容器を振ることにより分割した多芽球体からの植物体再生

培養容器を激しく振ることにより分割した多芽球体を植物体再生培地に移植し, 30日, 50日, 70日後にピンセットで1株ずつに分離し, 生育程度別本数を調査した。移植多芽球体数は各区1容器当たり9個で10容器ずつとした。容器は, ふたに直径約10mmのメンブレンフィルターを1枚貼った容量300mlのポリカーボネート製培養容器を用い, 培地量は50mlとした。

植物体再生培地に移植して30日後の株を生育程度別に順化し, 15日後の活着率を調査した。順化は約20℃, 12時間日長の蛍光灯で補った自然光下で行った。

### 2) 液体振揚およびうらごし処理により分割した多芽球体からの植物体再生

多芽球体への液体振盪処理の有無, うらごし処理の有無, うらごし処理の回数, うらごしのふるいの目開きサイズの組み合わせにより, 6種類の区を設けた。試験開始時の多芽球体の生重量は各区0.5gとした。液体振盪処理は多芽球体を液体の植物体再生培地に移し, 100rpmで1週間, 回転振盪培養した。うらごし処理として, 目開き2mmまたは1mmのふるい上で多芽球体をうらごし操作し, 目開き1mmまたは0.6mmのふるい上に残った組織片を液体の植物体再生培地へ移し, その後100rpmで1週間回転振盪培養する一連の操作をおこなった。すべての処理が終わった多芽球体は, 固形の植物体再生培地へ移した。液体培地の容器は100mlの三角フラスコを用い, 培地量は30ml, 固形培地の容器はふたに直径約10mmのメンブレンフィルターを1枚貼った容量約1000mlのポリカーボネート製培養容器を用い, 培地量は150mlとした。

各区とも試験開始から6週間後に順化し, 約30日後に活着率を調査した。順化は25℃, 約3000lxの14時間日長で行った。

## 試験結果

### 1 多芽球体の誘導

結果を第1表に示した。置床したランナーの約30~50%が雑菌に汚染された。多芽球体の発生率はNAAを添加した区が高く, BAのみ添加した区で低かった。NAAを添加した場合, 多芽球体の発生率はKINを添加した区で最も高かったが, BA添加区との差は小さかった。

第1表 ランナーからの多芽球体発生率に及ぼす植物ホルモンの影響

植物ホルモン濃度 (mg/L)			置床数 (雑菌汚染を除いた数)	多芽球体発生数	多芽球体発生率 (%)
BA	KIN	NAA			
1.0	0	0	12(8)	3	38

2.0	0	0	12(6)	3	50
2.0	0	0.5	11(8)	6	75
0	2.0	0.5	11(6)	5	83

## 2 多芽球体からの植物体再生

### 1) 容器を振ることにより分割した多芽球体からの植物体再生

植物体再生培地への移植後日数と植物体再生の状況を第2表に示した。移植後日数の増加とともに再生植物体の数は増えたが、生育程度別の構成比はほとんど変わらず、長さ1cm以上の根が3本以上の株数はどの時期においても全体の10%で、長さ1cm以上の根が生えていない株が常に60%前後であった。順化時に再生植物体の塊を1株ずつ分離する作業にはかなりの手間がかかった。

順化後の活着率を第3表に示した。長さ1cm以上の根が3本以上の株は活着率が100%と非常に高かった。長さ1cm以上の根が生えていない株も根が1本または2本の株と同程度のかかり高い活着率であった。

第2表 植物体再生培地への移植後日数と生育程度別再生植物体数

移植後 日数	生育程度別 <sup>注1)</sup> 再生植物体数 <sup>注2)</sup> (構成比率%)			
	3以上	2または1	0	合計
30	1.3 (10)	3.3 (25)	8.9 (66)	13.4 (100)
50	1.8 (10)	5.5 (31)	10.2 (58)	17.5 (100)
70	2.3 (10)	6.5 (27)	15.0 (63)	23.8 (100)

注1) 長さ1cm以上の根の数。

注2) 置床多芽球体1個当たりの値。

第3表 再生植物体の生育程度と順化後の活着率

順化時の生育程度 <sup>注1)</sup>	順化株数	活着株数	活着率(%)
3以上	117	117	100
2または1	294	258	88
0	799	689	86
合計	1210	1064	88

注1) 長さ1cm以上の根の数。

### 2) 液体振盪およびうらごし処理により分割した多芽球体からの植物体再生

結果を第4表に示した。

最初の振盪処理によって多芽球体数および順化株数は増加し、うらごし処理によりさらに増加した。

うらごし処理をしなかった区では、最初の振盪処理によって順化株数が約1.7倍に増加した。しかしどちらの区も、順化時に再生植物体を1株ずつに分離する作業が困難で、かなり植物体を傷つけ、順化時の発根もほとんどなかったことから、活着率は非常に低かった。振盪処理をしなかった区では順化に要した時間が最も長かった。

目開き2mmでうらごし操作をすることにより、順化株数は増加し、2回繰り返した場合最も多くなった。振盪処理はうらごし処理ほど多芽球体数および順化株数を増加させなかった。固形培地に移植したときの多芽球体1個当たりの順化株数は、振盪処理やうらごし処理の回数が増えるほど減少したが、作業時間としてはほとんど変わらなかった。順化時の発根率はうらごし処理を2回繰り返した場合に最も高かった。活着率はすべての区で高かった。

ふるいの目開き1mmでうらごし操作した場合は、褐変枯死する組織が多くなり、順化株数は極端に少なくなった。しかし多芽球体1個当たりの株数が最も少なく分離が容易だったため、順化に要した時間は他の区に比べかなり短かった。順化時の発根率も高く、活着率は高かった。

第4表 多芽球体からの植物体再生に及ぼす液体振盪処理およびうらごし処理の影響

液体振盪 処理回数	うらごし処理		順化株数/GGB数 <sup>注1)</sup> (GGB当たりの株数)	順化時の 発根率(%)	順化時の 作業時間 <sup>注2)</sup> (秒)	活着率 (%)
	回数	ふるいの 目開き (mm)				
0	0	-	128/29 (4.4)	0	10.7	29
1	0	-	223/50 (4.5)	2	8.8	29
0	1	2	729/123 (5.9)	22	8.2	100
1	1	2	892/250 (3.6)	13	8.6	94
1	2	2	1834/972 (1.9)	35	8.1	100
1	2	1	257/185 (1.4)	36	5.0	95

注1)固形の植物体再生培地に移した多芽球体数。

2)順化株1株当たりの時間。

## 考察

多芽球体はAmaki & Higuchi<sup>3,4)</sup>により提唱されたシダ類の増殖形態で、観賞用のシダ類 *Nephrolepis*, *Asplenium*, *Pteris*, *Adiantum*, *Rumohra*等では、0.5 ~ 1.0mg/LのBA添加培地による多芽球体の誘導と増殖、BA無添加培地による植物体再生という大量増殖系が確立している<sup>1,2,3,4,5,6)</sup>。クサソテツではそれ以前から組織培養による大量増殖の方法が検討されており、Dykeman & Cumming<sup>7)</sup>はクサソテツのシュートの増殖条件を検討し、1mg/LのKINを加えた培地で増殖が最大になると報告している。これとは別にHicks & Aderkas<sup>8)</sup>も $10^{-6}$ Mあるいは $10^{-5}$ MのKINを加えた培地でクサソテツのシュートの先から多数の芽の形成が起こり小さなシュートの塊を作ると報告した。これらの報告では、葉を展開していないシュートの塊を植物ホルモンを含まない培地に移すと速やかに葉の展開や根の発生がみられること、形態が似ていること等から、多芽球体と同じものであると推察される。

多芽球体の誘導条件については、これまでクサソテツでは多芽球体の誘導率そのものは出されていない。しかしシュートの増殖はKINの単独添加で起こり<sup>7,8)</sup>、NAAのシュートの増殖に対する効果はなかったと報告されている<sup>7)</sup>。今回の筆者らの結果ではBAのみ添加した培地よりNAAとBAあるいはNAAとKINを添加した培地で多芽球体の発生率が高かった。しかし前報<sup>9)</sup>でNAAの添加により多芽球体の増殖は抑えられたことから、初代培養で茎頂付近の組織から多芽球体が発生するときのみNAAの効果がみられると考えられた。KINとBAの違いによる多芽球体発生率の違いはほとんどなかった。

多芽球体からの植物体再生については、クサソテツにおいて<sup>7,8)</sup>、また他のシダ類においても<sup>3,4,5)</sup>、BAまたはKINを含まない培地に移すと速やかに葉の展開や根の伸長が起こると報告されている。筆者らも前報<sup>9)</sup>で多芽球体を植物ホルモンを含まない培地に移すことにより多数の植物体を得たが、その際多芽球体を分割せずそのまま植物体を再生させたため、順化時に1株ずつ分離するのがかなり困難であった。クサソテツについてのこれまでの報告<sup>7,8)</sup>には、植物体再生時の多芽球体の分割についての記述はない。雨木<sup>1,2)</sup>は*Asplenium*, *Nephrolepis*の多芽球体を約1mm大に分割し植物体再生培地に植えているが、順化時の株の分離についてはふれられていない。

そこでまず、培養容器を振るだけの方法で多芽球体を分割し、植物体再生培地への移植した場合の植物体再生の状況を調査した。移植後日数の増加とともに再生植物体の数は増えたが、生育程度別の構成比はほとんど変わらず、常に生育程度が様々な株が塊になった状態であった。どの生育程度の株も高い活着率を示したが、分離には非常に手間がかかり、容器を振って分割するだけで再生させるのは実用的でないと考えられた。

今回筆者らが用いた方法は、順化時の分離の手間を省き効率よく苗を生産するため、植物ホルモンを含まない培地での液体振盪培養とうらごし操作を組み合わせ、植物体再生と分割とを同時に行い、少数ずつに分離された再生植物体を多数得ることに成功した。うらごし操作は多芽球体を分割すると同時に均一な大きさに揃える効果があった。うらごし操作を伴わない液体振盪培養は、うらごし操作との組み合わせほど大きな効果はみられなかったが、植物体再生培地を多芽球体に浸透させ、大きくなりすぎた多芽球体を分割する効果があったと考えられた。

今回の結果では、多芽球体をまず1週間振盪培養し、その後目開き2mmでのうらごし操作と振盪培養を2回繰り返した場合、最も多い順化株が得られた。しかしどの処理区においても順化時に完全に1株ずつに分離された状態にはならず、うらごし操作のふるいの目開きの大きさや、うらごし処理の回数等をさらに検

討する必要がある。目開き1mmでうらごし操作した場合、再生植物体数は極端に少なくなったが、分離に要する時間は最も短かったことから、苗数が多く分離に手間のかからない最適なふるいの目開きは、1mmから2mmの間にあると推察された。

順化後の活着率は、第4表のうらごしをしなかった区は第3表に比べかなり低いですが、これは順化の条件が悪かったことに加え、分離の際に植物体の傷みが激しかったことによると考えられる。うらごしを1回または2回行った区では活着率はほぼ100%で実用上問題ないと考えられる。

以上から現在最も効率的と考えられるクサソテツの多芽球体による大量増殖技術の概略を第1図に示した。

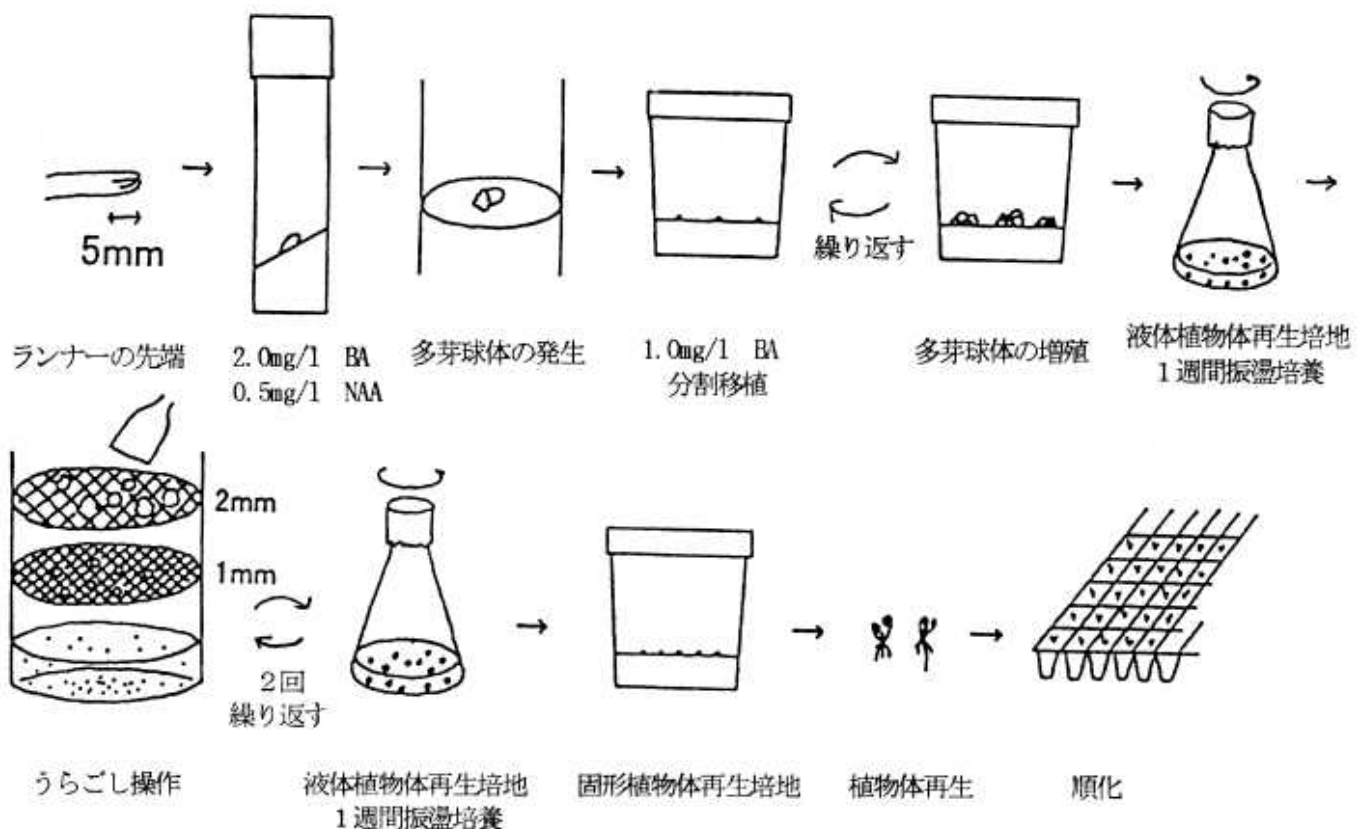
筆者らはこれまでに、多芽球体による大量増殖法を用いてクサソテツのクローン苗を5000株以上生産し、徳島県内の中山間地域での試験栽培に供しているが、これまでに形態的な変異は認められていない。他のシダ類でも元と同じ表現型を示すと報告されており<sup>3,4,5,6)</sup>、変異の発生の問題はないと考えられることや、増殖率が高いことから、クサソテツの多芽球体による大量増殖技術はきわめて実用的であると考えられる。今後さらに実用化に向けて、コストの問題などを解決していく必要があるが、クサソテツの種苗生産の手段として大きな役割を果たすと考えられる。

この報告をまとめるにあたり、東京農業大学農学部雨木若慶先生、香川大学農学部田中道男先生には貴重なご助言をいただいた。ここに心から感謝の意を表す。

## 摘要

クサソテツの組織培養による大量増殖技術を確立するため、若いランナーの先端を用い多芽球体の誘導に適する植物ホルモンの条件を検討した。また多芽球体からの効率的な植物体再生条件を検討した。

- 1 若いランナーからの多芽球体の発生率は2.0mg/LのBAまたはKINと0.5mg/LのNAAを添加したMS固形培地で高かった。
- 2 容器を振る方法のみで多芽球体を分割し植物体再生培地へ移した場合、移植後日数の増加とともに再生植物体の数は増えたが、生育程度別の構成比はほとんど変わらず、順化時の分離にかなり手間がかかった。
- 3 多芽球体を液体の植物体再生培地で1週間振盪培養した後、うらごし操作と振盪培養を2回繰り返すことにより、苗の生産効率が向上した。
- 4 うらごし操作の目開きは2mmが順化株数が多く、1mmは順化株数が極端に少なかったが順化時の株の分離に要する1株当たりの作業時間は短かった。
- 5 順化後の活着率はうらごし処理を1回または2回行った場合はほぼ100%であったが、うらごし処理をしなかった場合は低かった。



## 引用文献

- 1) 雨木若慶(1988):アスプレニウム.植物組織培養の世界,柴田ハリオ硝子(株)(東京):127 ~ 132.
- 2) (1988):ネフロレピス.植物組織培養の世界,柴田ハリオ硝子(株)(東京):213 ~ 218.
- 3) AMAKI,W.andH.HIGUCHI(1991):A possible propagation system of Nephrolepis , Asplenium , Pteris , Adiantum , and Rumohra(Arachniodes) through tissue culture. Acta Horticulturae , 300:237 ~ 243.
- 4) and (1992): XXIX Micropropagation of Boston ferns (Nephrolepis spp.). Biotechnology in Agriculture and Forestry , 20:484 ~ 494.
- 5) and (1992): Micropropagation of Pteris ensiformis `Victoriae' , 東京農業大学農学集報 , 37(1):74 ~ 82.
- 6) 雨木若慶(1997):シダ類.花木・観葉植物の培養苗生産.農業技術体系花卉編,農文協(東京):525 ~ 529.
- 7) DYKEMAN, B.W. and E.G. GUMMING (1985) :In vitro propagation of the Ostrich fern (*Matteuccia struthiopteris*). Can.J.Plant Sci. , 65: 1025 ~ 1032.
- 8) HICKS , G. and P. VON ADERKAS (1986) : A tissue culture of the Ostrich fern *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro. Plant Cell Tissue Organ Culture, 5: 199-204.
- 9) 井内美砂(1997):クサソテツの組織培養による大量増殖(第1報)多芽球体の増殖条件.徳島農試研報 , (33):13 ~ 17.
- 10) MURASHIGE , T. and F. SKOOG (1962) : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant , 15 : 473 ~ 497
- 11) 大槻義昭(1992):イネ.Ⅱ.禾穀類の組織・細胞培養の実際. 穀物いも・牧草類の増殖と育種 , 農業図書(東京):69 ~ 90.

## Summary

The induction condition of Green globular bodies (GGB) and efficient regeneration method from GGB were investigated to establish micropropagation of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod.

The optimal culture medium for induction of GGB from tips of young runners was MS medium containing 0.5mg/L NAA , 2.0mg/L BA or KIN , 3% sucrose , 0.2% gellan gum.

In case plantlets were regenerated from GGB devided by shaking plant box, separating them took time at acclimatization, and their success rate were sometimes low with the condition. The regenerated plantlets increased by the straining of GGB on stainless meshes.It could get most plantlets by the straining of two times on 2mm mesh.