

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

井内美砂

Micropropagation of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. through tissue culture
Propagation condition of Green globular bodies.

Misa IUCHI

要約

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

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、根茎から摘出した茎頂および若いランナーの先端から、0.5mg/LのNAAと2.0mg/LのKINを添加したMS固形培地で誘導された多芽球体を用い、多芽球体の増殖条件について検討した。

多芽球体は容器を激しく振ることにより容易に分割できた。多芽球体は分割後70日頃までは増殖したが、葉の分化や褐変がおこるため、継代間隔は40日程度が適すと考えられた。多芽球体の増殖培地に添加するサイトカイニンは1.0mg/LのBAが適当であり、その場合30日間で15.8倍という高い増殖率を示した。NAAの添加は増殖率を低下させた。多芽球体は植物生長調節物質を含まない培地に移植することにより、多数の植物体を再生した。

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

クサソテツはオシダ科の多年生シダ植物で、日本では北海道から九州まで広く分布する。若い葉は食用となり、東北地方の代表的な山菜として、コゴミの名で出荷されている^{4,7)}。現在徳島県内ではほとんど栽培されていないが、クサソテツは山菜として市場性が高く、中山間地域振興のための新しい作物として有望なため、産地の育成が検討されている。しかし、効率的な繁殖方法が確立していないことから、栽培面積の拡大に際し困難が予想された。

クサソテツの繁殖には、主として胞子を利用する方法と匍匐枝(ランナー)を利用する方法とがある⁸⁾。しかし胞子による方法は、株養成までに水分調整の労力や時間がかかり、形質がばらつくことも考えられる。またランナーによる方法は、繁殖率、労力などの点で問題があり、特に、生育の揃った苗が大量に必要な場合には、適当でないと考えられる。

このように種苗の生産が比較的困難な作物では、組織培養による大量増殖技術が適用されている場合が少なくない。シダ植物の組織培養による大量増殖については、主に観賞用の *Nephrolepis* などの数種のシダで、多芽球体とよばれる緑色の球状体(Green globular bodies, GGB)を利用した増殖系が報告されている^{1,2,3)}。しかし、クサソテツの組織培養については、ほとんど報告がない。そこで、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、多芽球体による増殖系を検討し、ある条件で少数の多芽球体を誘導することができた。

今回、誘導された多芽球体を用いて、クサソテツの多芽球体の増殖条件を検討したので報告する。

試験方法

1 材料

徳島県三好郡池田町に自生していたクサソテツの根茎から抽出した約1mmの茎頂と、市販のクサソテツ苗の若いランナーの長さ約5mmの先端部とを、誘導培地すなわち0.5mg/LのNAA(2-naphthalene acetic acid), 2.0mg/LのKIN(kinetin), 3%のショ糖, 0.2%のジェランガムを加えたMS培地⁶⁾(pH 5.7~5.8)で培養することにより誘導された多芽球体を用いた。多芽球体は、試験開始までの間、1~2カ月毎に分割し、誘導培地で継代培養した。

培養は25℃、約5000 luxの14時間日長下で行った。

2 多芽球体の増殖

基本培地、培養温度および照明は材料の項と同じとした。

1) 増殖の推移

培養日数と多芽球体の増殖の関係を知るため、ランナー由来の培養開始から171日後の多芽球体を用い、容器を激しく振ることにより分割した多芽球体を、1容器につき8個ずつ置床した。培地には0.5mg/LのNAA, 2.0mg/LのKINを添加し、容器は容量300mlのポリカーボネート製培養容器に直径約10mmのメンブレンフィルターを貼ったもの(以下、プラントボックスと記す)を用い、培地量は50mlとした。置床から11日後、21日後、41日後、53日後、70日後にそれぞれ7個の容器中の、容器を激しく振ることによって分割できる多芽球体数を調査した。

2) サイトカイニンの種類

多芽球体の増殖に適するサイトカイニンの種類を知るため、培養開始から148日後の茎頂由来の多芽球体を、芽を約1個ずつ含むように細かく分割し、サイトカイニンとしてKINまたはBA(6-benzyl aminopurine)を2.0mg/L添加した培地に置床した。2種類の培地とも0.5mg/LのNAAを添加した。容器は試験管(培地量20ml)を用い、1本につき1個ずつ置床し、各区29本とした。46日後、多芽球体をピンセットで軽く力を加えて分割後、多芽球体数を調査した。

3) BA濃度とNAAの添加の有無

多芽球体の増殖に適するBAの濃度とNAAの効果を知るため、培養開始から171日後のランナー由来の多芽球体を、容器を激しく振ることにより分割し、増殖培地に置床した。増殖培地は1.0mg/LのBA, 2.0mg/LのBAおよび2.0mg/LのBAに0.5mg/LのNAAを添加した3種類の培地とした。実験前の培地の影響を少なくするため、40日間これらの3種類の培地で培養した後、再び容器を激しく振ることにより分割し、同じ種類の培地へ置床した。容器はプラントボックスを用い、1個につき多芽球体を9個ずつ置床し、培地1種類につき合計180個ずつ置床した。30日後に容器を激しく振ることによって分割できた多芽球体数および多芽球体の生重を調査した。

3 植物体再生

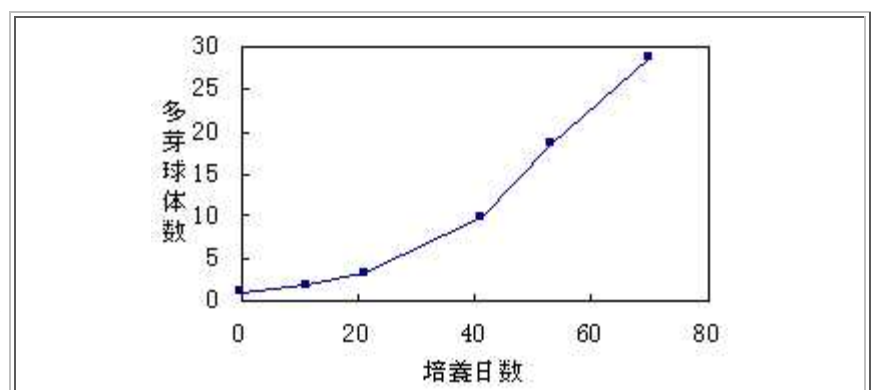
多芽球体が植物体を再生することを確認するため、培養開始から約9カ月間は多芽球体誘導培地で1~2カ月毎に分割継代培養した後、1.0mg/LのBAを添加した培地に移して約4カ月間分割継代しながら維持した多芽球体を、容器を激しく振ることにより分割し、植物生長調節物質を含まず、ジェランガム以外の成分の濃度を2分の1とした培地に移植した。容器はプラントボックスを用い、1容器につき多芽球体を16個ずつ移植した。基本培地、培養温度および照明は材料の項と同じとした。

試験結果

1 多芽球体の増殖

1) 増殖の推移

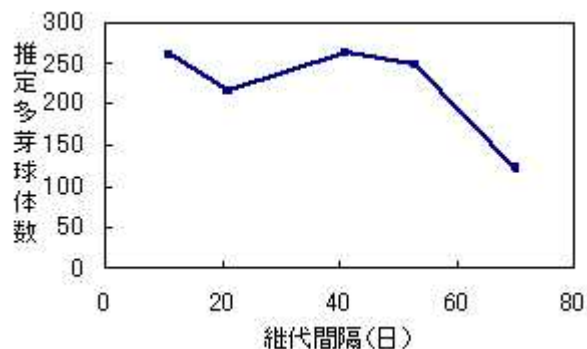
多芽球体数の変化を時間を追って調べた結果を第1図に示した。多芽球体数は置床から70日目頃まで増加を続けた。しかし観察によると53日目頃



から葉を分化し始めた多芽球体が多くなるとともに一部で褐変が始まり、70日後にはほとんどの多芽球体が褐変していた。

第1図 分割後の培養日数と多芽球体数(置床多芽球体1個当たり)

各培養日数ごとの多芽球体数をもとに、継代間隔を変えて100日間培養した場合の多芽球体数を計算した結果を第2図に示した。継代間隔を53日間までにした場合は、100日後の多芽球体数は210個から260個あまり差がないが、継代間隔を70日間にした場合は約120個と少なかった。



第2図 継代間隔と推定多芽球体数

注1) 初回分割置床多芽球体1個当たりの100日後の推定多芽球体数を表す。

注2) 推定多芽球体数 = r^n

r = 第1図における分割置床からD日後の実際多芽球体数
(分割置床多芽球体1個当たり)

$n = 100 / D$

2) サイトカイニンの種類

サイトカイニンの種類による茎頂由来の多芽球体の増殖率の違いを第1表に示した。多芽球体の増殖はBAを添加した培地で明らかに優れ、46日後の増殖率はKINを添加した培地の2倍以上であった。

第1表 サイトカイニンの種類と多芽球体数

サイトカイニンの種類	多芽球体数
KIN	3.7
BA	9.0

注) 分割置床から46日後に調査。置床した多芽球体1個当たりの値。

3) BA濃度とNAAの添加の有無

BAの濃度の違いとNAAの有無が多芽球体の増殖に与える影響を調べた結果を第2表に示した。多芽球体は1.0mg/LのBAを添加した培地で最も良く増殖し、30日間で生重は18.7倍、多芽球体数は15.8倍になった。多芽球体は容器を激しく振ることにより容易に小さな多芽球体に分割できた(第3図)。NAAを添加した培地では、多芽球体数、生重とも増加率は低かったが、多芽球体1個当たりの大きさがNAAを添加しない培地より大きくなる傾向があった。



第3図 容器を激しく振ることにより分割された多芽球体

第2表 BA濃度の違いおよびNAAの有無と多芽球体の増殖

BA mg/L	NAA mg/L	置床時の生重 ^{注)} mg	置床から30日後		
			多芽球体数 ^{注)}	生重 ^{注)} mg/L	1個当たり 生重 mg/L
1.0	0	16	15.8	300	19
2.0	0	18	8.3	179	21
2.0	0.5	22	5.9	161	27

注) 置床した多芽球体1個当たりの値

2 植物体再生

移植から1カ月後、多芽球体から多数のシュートが再生し、少数の発根もみられた(第4図)。シュートは多芽球体上に密生し、1株ずつ分離するのはかなり困難であった。



第4図 多芽球体からの植物体再生

考察

多芽球体によるシダの培養増殖系は、雨木らにより観賞用のシダ類 *Nephrolepis*, *Asplenium*, *Pteris*, *Adiantum*, *Rumohra* において、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系が報告されている^{1,2,3)}。しかし食用シダであるクサソテツについては組織培養の報告がほとんどない。

クサソテツの繁殖には従来、孢子またはランナーが用いられてきた⁸⁾が、根株の養成期間、繁殖率、労力などの点で問題が残されていた。本報告では多芽球体による増殖法を適用することにより、非常に高い増殖率で苗を生産できることが明らかになった。

多芽球体の誘導は、雨木らの報告^{1,2,3)}ではBAを添加したMS培地で可能であるとされているが、本報告ではKINとNAAを添加した培地で誘導された多芽球体を用いた。しかし、誘導条件の解明が不十分なため、今後誘導培地等について検討が必要である。

誘導培地で継代した場合、多芽球体数は分割移植から70日後まで増加を続けたが、継代間隔を変えて増殖率を計算した結果、70日間隔は増殖率が明らかに低下した。増殖率が同程度の場合、コストの面からは継代間隔が長いほど望ましいが、53日目頃から褐変や葉の分化が起こりやすくなったことから、0.5mg/LのNAAと2.0mg/LのBAとを添加した培地の場合の多芽球体の継代間隔は40日程度が適すると考えられた。なお実験では示されていないが、1.0mg/LのBAを単独で添加した増殖率の高い培地の場合、葉の分化は起こりにくくなるが、培地の養分の吸収が速くなり、多芽球体や培地の褐変が起こりやすくなるため、やはり40日程度で継代するのがよいと思われた。

多芽球体の増殖培地に添加するサイトカイニンの種類は、0.5mg/LのNAAの存在下においてBAがKINより多芽球体の増殖が優れていた。他のシダ類においてはサイトカイニンの種類の検討はされていないが、多くのシダでBAが多芽球体の増殖に使われており、本報告でもBAがKINよりも多芽球体の増殖に適していることが確認された。

増殖培地のBA濃度は1.0mg/Lが2.0mg/Lより高い増殖率が得られた。*Nephrolepis*では種または品種によって多芽球体の増殖のために要求されるBA濃度が異なり、0.5mg/L以上のBA濃度を要求するものが多いが、0.3mg/L未満で多芽球体を増殖するものもある²⁾。クサソテツの場合1.0mg/Lで非常に高

い増殖率を示したが、1.0mg/L未満の濃度でさらに高い増殖率が得られる可能性も考えられる。

また、増殖培地へのNAAの添加は増殖率を低下させたことから、*Nephrolepis* 等と同様にクサソテツにおいても、BAの単独添加がよいと考えられた。

継代時の多芽球体の分割方法については、多芽球体が培養容器を激しく振ることによって容易に分割できたため、メスでの切断等を必要とせず、非常に省力的であった。*Nephrolepis*では分割時の大きさを2mg(径約1.5mm)にするともっとも効率よく増殖するという報告²⁾があり、クサソテツにおいても分割時の大きさを変えることにより増殖率が向上することが考えられるが、実際の培養では、さらに小さく分割するためにはメスで切断する等の操作が必要となるため、クサソテツの多芽球体の分割方法は本報告の方法が実用的であると考えられた。

多芽球体は植物調節物質を添加しない培地に移植すると、容易に植物体を再生した。しかし、植物体再生培地上でシュートが多数密生し、分離に時間がかかり、シュートの大きさもばらつくことから、植物体再生培地への分割移植時の多芽球体の切断処理方法等を検討する必要があると考えられた。再生植物体には現在までに変異は見出されていないが、今後圃場で栽培して特性を調査する必要がある。また、*Pteris*ではBA添加培地での継代培養を頻繁に繰り返すと、多芽球体の増殖率やBA無添加培地へ移植したときの葉形成速度が低下するようになる³⁾。本報告の培養系は初代培養から約1年ほどしか経過していないため、今後増殖率や植物体再生率などを調査していく必要がある。

組織培養による種苗生産において、実用化に際し生産コストが問題となることが多い。川村ら⁵⁾が行ったシオデの組織培養による大量増殖の生産コストシミュレーションによると、1つのシュートから試験管苗を約1万本生産するためには236日を要し、14日ごとに継代し、増加率が2倍の場合、苗1本当たりの生産費は70.8円と試算された。各要因の数値を変えてシミュレーションした結果、特に再生率の向上、初代シュート数の増加、増加率の向上、容器当たりのシュート数の増加、植え換え時間の短縮によって、生産コストが低減できると推定された。クサソテツの場合、多芽球体の移植に要する時間が短いこと、シオデに比べ増殖率が非常に高いこと、植物体再生が容易なことなどから、シミュレーションに利用した要因のほとんどを向上させることができ、その結果かなりの低コスト化が可能になると考えられた。

今後、多芽球体誘導条件を確立すること、植物体再生から順化までの段階で改良を加えることなどにより、効率的なクサソテツ種苗生産方法を確立することが必要である。

なお、クサソテツの組織培養および栽培についてご助言をいただいた富山県農業技術センター山村特産指導所の内田智美研究員に感謝の意を表します。

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、根茎から摘出した茎頂および若いランナーの先端から、0.5mg/LのNAAと2.0mg/LのKINを添加したMS固形培地で誘導された多芽球体を用い、多芽球体の増殖条件について検討した。

- 1) 0.5mg/LのNAAと2.0mg/LのKINを添加したMS固形培地で継代した場合、分割後53日目頃から葉の分化や褐変が始まるため、継代間隔は40日程度が適当と考えられた。
- 2) 増殖培地に添加するサイトカイニンは、KINよりもBAが適していた。
- 3) 増殖培地に添加するBAの濃度は1.0mg/Lが適していた。NAAの添加は増殖率を低下させた。
- 4) 多芽球体数の増殖率は、1.0mg/LのBAを単独で添加したMS固形培地で30日間に15.8倍であった。
- 5) 多芽球体を植物生長調節物質を含まない1/2MS固形培地に移すと、多数のシュートを再生した。

引用文献

- 1) AMAKI, W. and H. HIGUCHI (1991): A possible propagation system of *Nephrolepis*, *Asplenium*, *Pteris*, *Adiantum*, and *Rumohra* (*Arachniodes*) through tissue culture. *Acta Horticulturae* 300:237 ~ 243
- 2) 雨木若慶(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) 樋口春三(1992): シダ類の多芽球体による増殖. 図解花のバイオ技術, 誠文堂新光社(東京). 96 ~ 99.
- 4) 青葉高(1988): クサソテツ. 園芸植物大事典, 小学館(東京). 102.
- 5) 川村泰史・久島繁(1996): 植物組織培養の生産コストシミュレーションによる技術改良の方向付け. 筑波大農林研報, 9:47 ~ 62.

- 6) MURASHIGE, T. and F. SKOOG (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473 ~ 497.
- 7) 瀬戸剛(1988): クサソテツ属. 園芸植物大事典, 小学館(東京). 102.
- 8) 鈴木泉(1988): クサソテツ(コゴミ). 農業技術体系野菜編11 特産野菜・地方品種, 農文協(東京). 117 ~ 121.

Summary

The multiplication condition of Green globular bodies (GGB) was investigated to establish micropropagation of *Mattoeuccia struthiopteris* (L.) Tod. GGB were prepared for this test, which were induced from shoot apex and tips of young runners when they were cultured on MS medium containing 0.5mg/L NAA, 2.0mg/L KIN, 3% sucrose, 0.2% gellan gum.

GGB were divided easily by shaking plant box hard. Division interval of GGB was considered to be suitable for about 40 days as regeneration of leaves and browning occurred on about 53th day after division though GGB continued multiplication until about 70 days. MS medium containing 1.0mg/L BA was suitable for the GGB multiplication, and the multiplication rate of the case was 15.8 times during 30 days. Addition of NAA into the medium made multiplication rate decrease. Many plants regenerated when GGB were transplanted on hormone-free 1/2 MS medium.