

## 無配生殖型ベニシダ (*Dryopteris erythrosora*) 胞子培養の適正培地の検討

松浦和枝・林 蘇娟

### Examination of an appropriate nutrient medium for spore culture of apogamy fern plant *Dryopteris erythrosora*

Kazue MATSUURA and Su-Juan LIN

**Abstract** In the study of the reproduction mechanism of the fern plants, the method to carry out spore culture effectively and stability are required. However, the appropriate nutrient medium composition of the fern spore culture is not shown clearly. In this study, the composition of MS medium, agar and sucrose in different densities were examined comparatively. The most appropriate nutrient medium composition, 3/4 MS : 0.7% agar : 0% sucrose was determined for the spore culture of apogamy fern *Dryopteris erythrosora*. Furthermore, it was confirmed that the nutrient medium of 3% sucrose obstructed the prothallium formation, but promoted the increase of the undifferentiated cells. The method to culture and increase prothalliums of the hybrid spores that had low germination rate was inspected, that 3% sucrose nutrient medium was used to culture and increase protonemas of the hybrid spores, and then, the protonemas were moved to the 0% sucrose nutrient medium for the prothallium culture, the result was that the number of the prothalliums was increased.

**Keywords:** *Dryopteris erythrosora*, apogamy, prothallium, gametophyte, MS medium

#### はじめに

シダ植物の生殖様式の研究において胞子の培養は欠かすことが出来ない。しかし胞子の培養について、様々な論文を検証してみると、どの培地組成も MS 培地を基本としている点は共通だが、その MS 濃度や寒天濃度、スクロースの有無など一定していない。また、シダ植物の種類によってもその培地組成は異なっている。例えば、アジアンタム (*Adiantum capillus-veneris*) では、1/2MS 培地で 3% スクロースの培地が前葉体の増殖率が高いとされている (Kuriyama, 2004)。ゼンマイ (*Osmunda japonica*) では、2–3% スクロースを含むものが前葉体増殖に適すると報告されている (佐々木, 2006)。これらは、商業開発を目的としており、商品としての大量増殖のための適正培地である。このように各研究機関では、それぞれの目的にあわせて様々な培地組成での培養を行っている。一方、シダ植物の前葉体は、光量 (照明) や胞子

密度、など、その培養環境によって成長の程度がずいぶん異なることも知られている (百瀬, 1967)。

現在シダ植物の生殖様式研究で用いられているベニシダ (*Dryopteris erythrosora*) 培養のための培地についても、適正とは言えないのが現状である。そのため、安定かつ効率よく胞子培養を行うための培養方法の確立は必須である。現在我々がベニシダ培養に用いている培地組成プロトコールをもとにして、MS 濃度、寒天濃度、スクロースの有無について、ベニシダにとっての安定的にかつ効率よく胞子培養を行うための最適培地の検討を行うこととした。

#### 実験 A

三倍体無配生殖型のベニシダから採取した胞子を培養する。

##### 1) 胞子の準備

i) 胞子は、1% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液で殺菌し

た. まず 1% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を入れた試験管に胞子を入れ, 約 30 分間置いた. ii) 試験管の底に沈んだ胞子をメスピペットで吸い取り, 蒸留水の入った試験管へ移した. 再び 30 分後に, 下に沈んだ胞子を吸い取り, i) と同様に蒸留水の入った試験管に入れ, 底に沈んだ胞子を培養に用いた.

## 2) 培地の準備 (表 1)

i) 表 1 に示すように標準の MS (MS 植物培養用培地, 和光純薬, 大阪) 濃度を 1 とし, 0 MS (蒸留水), 1/10 MS, 1/4MS, 1/2MS, 3/4MS, 1MS の 6 種類を設定し, 寒天 (Agar) 濃度が 0.7%, 1.5% での MS 培地をそれぞれ作った.

ii) 寒天濃度 0.7% でスクロース 3% を加えて, 同様に, 0 MS (蒸留水), 1/10MS, 1/4MS, 1/2MS, 3/4MS, 1MS の 6 種類を設定し, MS 培地を作った.

## 3) 培養

i) オートクレーブで加熱殺菌したこれらの①~⑬の培地を 5cm シャーレに 5ml ずつ注いだ. 常温になったのを確認し, これらの培地に殺菌した胞子をそれぞれ 1 滴おとし, 培養した. 培養環境: 25°C, 湿度 80%, 蛍光灯で 1500Lux (昼: 夜=12:12, hrs)

ii) 培養開始から 14 日後, ほとんどの胞子が発芽したのを確認し, 1 シャーレにつき約 30 個になるように間引きし, 胞子同士が密播きにならないように, 出来るだけ離すように胞子を植え替えた.

iii) 培養 27 日目, 80 日目の前葉体の様子を撮影した.

iv) 胞子培養 90 日目に, 前葉体 10 個体を無作為に 2 回選り, その 10 個体分の質量を測定し平均値を求めた.

## 4) 培養観察結果 (表 1)

i) 培地①~⑥ (0MS~1MS, Agar0.7%, Suc0%) の結果から培地① (0MS) では胞子は発芽したが, 80 日目でもほとんど成長せず, 色も薄い黄色で, 細胞数 20~30 程度で成長が止まっていた. 細胞数は他の培地よりも少なかったが, 仮根は, 長く伸びていた.

培地②, ③, ④, ⑤, ⑥ (1/10MS~1MS: Agar0.7%) では培養 27 日目ではほぼ正常な前葉体を形成した. 80 日目では, ②, ③, ④は幅約 3~4mm の前葉体に成長し, ⑤の培地では約 8mm (図 1.A), ⑥の培地では約 4.5mm に成長していた.

ii) 培地⑦~⑬ (0MS~1MS, Agar1.5%, Suc 0%) の結果から, 培地の⑦ (0MS) では胞子は発芽したが, 80 日目でもほとんど成長せず, 色も薄い黄色で, 細胞数 20~30 位で成長が止まっていた. 培地の①とほとんど同じ様子だった. 細胞数も他の培地よりも少なかったが, 仮根

表 1. Agar, Sucrose, MS 培地濃度の組み合わせで, 胞子から培養 27 日目と 80 日目の前葉体のサイズ (mm)

	Agar0.7%, Suc0%			Agar1.5%, Suc0%			Agar0.7%, Suc3%		
	No	27 <sup>th</sup> day	80 <sup>th</sup> day	No	27 <sup>th</sup> day	80 <sup>th</sup> day	No	27 <sup>th</sup> day	80 <sup>th</sup> day
0MS	①	0.1	0.3	⑦	0.1	0.3	⑬	0.5	1.0
1/10MS	②	1.5	4.0	⑧	1.0	2.5	⑭	0.8	3.0*
1/4MS	③	1.4	3.0	⑨	1.5	3.2	⑮	0.2	▲
1/2MS	④	1.5	4.0	⑩	1.5	6.5	⑯	0.8	3.5*
3/4MS	⑤	1.2	8.2	⑪	1.0	6.5	⑰	0.8	3.5*
1MS	⑥	1.0	4.5	⑫	1.0	4.0	⑱	0.2	0.2

\* 前葉体にならず原糸体 (細胞) の塊, ▲: 菌に汚染された

は, 長く伸びていた.

培地⑨, ⑩ (1/4MS, 1/2MS: Agar0.7%) では培養 27 日目ではほぼ正常な前葉体を形成した. 80 日目では, ⑨は幅約 3mm の前葉体に成長し, ⑩の培地では前葉体は, 平面状のハート形ではなく, フリル状に波打つような形状だった (約 6.5mm 長).

⑧の培地 (1/10MS) では, 27 日目は⑨, ⑩の培地と比べると前葉体の大きさがやや小さかった. しかし, 80 日目では, 正常なハート形の 2~3mm 程度の前葉体が形成された. ⑪の培地 (3/4MS) では, 27 日目の前葉体は小さく 1mm も満たなかった. 80 日目では, 大きく成長し, 幅約 6.5mm になっていた (図 1.B). ⑫の培地 (1MS) では, 27 日目では, 前葉体は形成されず, 100 個程度の細胞が前葉体のような平面状に広がらず, 積み重なるような塊になっていた. しかし, 80 日目では, ほぼ正常な前葉体で幅が約 4mm だった. この前葉体は仮根が他の前葉体に比べて非常に長く, 四方八方に広がるように伸びていた. 培養 120 日目では, ⑧~⑫のどの培地にも小さな胞子体が観察された.

iii) 培地⑬~⑱ (0MS~1MS, Agar 0.7%, Suc. 3%) の結果から, 培地⑬ (0MS) では, 少し大きく成長していたが, ①や⑦と同様に 27 日目でも前葉体にはならなかった. 27 日目では, 色の薄い細胞が 50~100 程度集まり, 平面状に広がらずに, 塊になっていた. 仮根は数が少なかった. 80 日目では, 更に細胞数が増えていたが, 色はほとんど抜けていて, 枯れているものも多かった. この時も平面状に広がらずに, 細胞が塊状になっていた. 仮根は多数あったが, まっすぐには伸びずに, ちじれたような原糸体が細胞の塊から出ていた. 培地⑭ (1/10MS)

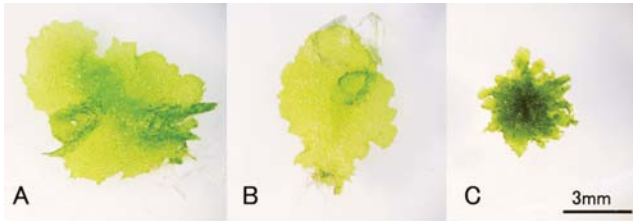


図1. 3/4 MS培地 (A:⑤, B:⑪, C:⑰) で培養された80日目の前葉体

では、27日目で細胞数は多かったが、平面状にはならず細胞の塊だった。色は濃い緑だった。仮根は細胞の塊から無秩序に出ているようだった。80日目では、他の培地よりもかなり大きく成長していたが、前葉体の形態をしてなかった。平面ではなく、細胞が団子状に固まっていた。仮根はほとんど見られず、粒状の未分化の細胞の集合体のように見えた。⑮の培地 (1/4MS) はカビが生えてしまい、成長せずに枯れてしまった。⑯の培地 (1/2MS) は、⑭とよく似ており、27日目は未分化の細胞の塊のようだった。80日目では、細長いリボン状の前葉体らしき形態のものが多数、団子状の塊の外側に形成されていた。この細長いリボン状のものは、胞子を密播きにしたときに見られる前葉体とよく似ていた。⑰の培地 (3/4MS) は⑯とよく似ていたが、⑰の27日目のものは、それらよりも小さかった。80日目のものも⑯とよく似た形態で、リボン状のものが出ている。しかし⑯よりはリボン状のものがやや少なかった (図1.C)。

⑱の培地 (1MS) では、27日目は、ほとんど成長しておらず、10~30個程度の細胞が塊になっていた。80日目では、27日目からほとんど成長せず、枯れているものが多かった。培養120日目でも、13~18の培地では胞子体は観察されなかった。

全体として (表1) スクロース0%の培地では、Agar 0.7%でも1.5%でも80日目には1/10MS~3/4MSではほぼ正常な前葉体が形成された。スクロースを3%入れた培地では、どのMS濃度でも正常な前葉体は形成されなかった。これらは、ほとんど分化しておらず、仮根もほとんど見られず未分化の細胞の塊のようだった。0MSのもの (①, ⑦, ⑬) は、どれも成長せず、80日目には枯れてしまうものが多かった。また、⑱のSuc 3%, 1MS培地でも80日目では殆どが成長せずに枯れていた。

5) 質量測定結果 (表2)

胞子培養90日目に、前葉体10個体を無作為に選び、その10個体分の質量を測定した。その作業を2回繰り返えし、10個体の平均値を求めた。その結果を以下に示した。

表2. 前葉体10個体の平均質量 (mg)

	Agar0.7%, Suc 0 %		Agar1.5%, Suc 0 %		Agar0.7%, Suc 3 %	
0MS	①	0	⑦	0	⑬	0
1/10MS	②	10.5	⑧	7.6	⑭	54.5
1/4MS	③	11.2	⑨	9.5	⑮	▲
1/2MS	④	12.4	⑩	39.5	⑯	32.0*
3/4MS	⑤	23.5	⑪	27.0	⑰	32.5*
1MS	⑥	20.01	⑫	11.5	⑱	0

\*前葉体にならず原糸体 (細胞) の塊, ▲: 菌に汚染された

i) 培地①~⑫ (Agar0.7%, Agar1.5%, 0MS~1MS, Suc 0%) の結果から (表2, 図2) Agar0.7%の培地 (①~⑥) では前葉体の質量は、MS濃度が3/4の時にピークを示した。一方、Agar1.5%の培地 (⑦~⑫) では前葉体の質量は、MS濃度が1/2の時にピークを示した。

①~⑫のうちでは、Agar1.5%, 1/2MS (⑩) がもっとも質量が大きく、前葉体がよく成長していた (表1)。

ii) 培地⑬~⑱ (0MS~1MS, Agar 0.7%, Suc 3%) の結果から (表2, 図3), 1/2MS (⑯), 3/4MS (⑰) の培地の前葉体ではあまり差は見られなかった。

スクロース3%を含んだMS培地では、1/4MSのデータがないが、濃度1/10のMS培地 (M, N) の前葉体が最も質量が大きかった。1/2MS (P), 3/4MS (Q) の培地の前葉体ではあまり差は見られなかった。スクロース3%を含んだ培地 (⑬~⑱) はスクロース0% (1~12) のものと比べて、前葉体はどれも非常に大きかった。しかし、1MSの培地⑱では、スクロース0%のものは、前葉体の大きさは小さいが、正常に成長しているのに対して、スクロース3%のものは、成長できずに枯れていた。

培地①~⑫ (Agar 0.7%, Agar 1.5%, 0MS~1MS,

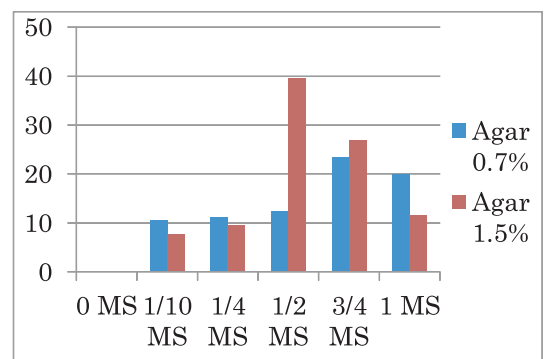


図2. MS培地濃度と前葉体10個体の質量平均値 (mg)



Suc 0%) の結果から (表 2, 図 1). Agar 0.7% の培地 (A~F) では前葉体の質量は, MS 濃度が 3/4 の時にピークを示した. 一方, Agar 1.5% の培地 (⑬~⑱) では前葉体の質量は, MS 濃度が 1/2 の時にピークを示した. ①~⑫のうちでは, Agar 1.5%, 1/2MS (⑩) がもっとも質量が大きく, 前葉体がよく成長していた.

#### 6) 考察

スクロース 0% のもの (①~⑫) を比べると, Agar 0.7% では 3/4MS, Agar 1.5% では 1/2MS で最適である事が分かった. これらの Agar 0.7, Agar 1.5%, 1/2MS, 3/4MS について詳しく調べると, 孢子培養 27 日目では, ④と⑩ (1/2MS) の前葉体はどちらも同じような大きさに見えるが, これらは孢子培養 18 日目では, Agar 1.5% (⑩) の方が, 成長が遅く個体が小さかった.

この傾向は 1/4MS の場合でもみられた. 培養 18 日目の③と⑨では, ③ (Agar 0.7%) よりも⑨ (Agar 1.5%) の方が成長は遅く, 個体が小さかった.

このことから, Agar 0.7% の方が Agar 1.5% よりも成長が速いことがわかった. Agar 濃度が低い方が柔らかい培地のため仮根が伸びやすいと思われる. そのため, 低濃度の Agar の方が速く水分, 無機塩類を吸収して成長も早くなったのだと考えられる. スクロース 0% のもの (①~⑫) の中では, ⑩ (Agar 1.5%, 1/2MS) が一番質量が大きくなっていった. Agar 1.5% は Agar 0.7% よりも成長が遅いにも関わらず, なぜこの培地の前葉体が一番大きくなっているのかは, 明らかではないが, 今後, MS 濃度をもう少し細かく設定して調べてみるべきだろう.

スクロース Suc. 3% を含んだ培地では, 仮根がなく葉状に広がる事もなく, どれも正常な形態の前葉体が形成されなかったが, 質量的な増殖率はスクロース 0% と比べて, 約 1.5 倍だった. アジアンタムやゼンマイでは, 3% スクロースで最も増殖率が高く, その点では同じ結果だった. この 3% スクロース培地での培養を 120 日間続けた

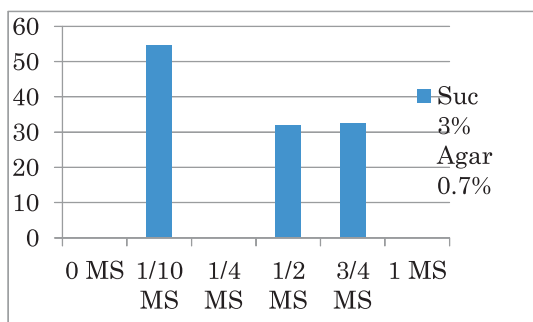


図 3. スクロース 3% を含んだ MS 培地濃度と前葉体 10 個体の質量平均値 (mg)

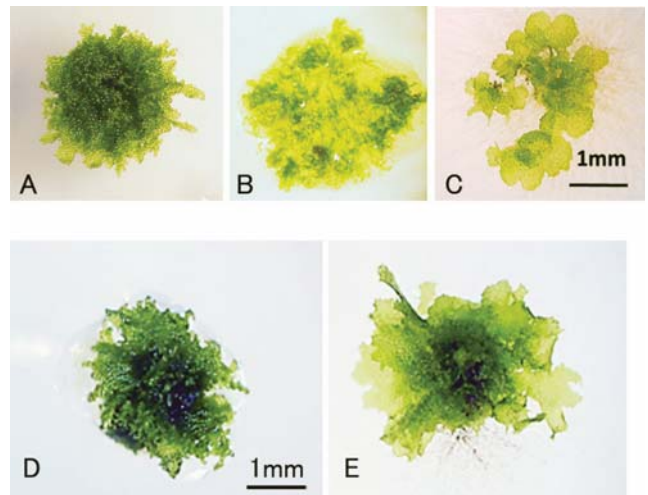


図 4. 原系体 (A, D) が Scr. 3% の培地から Scr. 0% 培地へ植えて培養した 14 日目, 正常な前葉体 (E) が形成した. ばらばらにした原系体 (B) からも正常なハード型の前葉体 (C) を形成した.

が, 孢子体は形成されず, ゆえにこの 3% スクロースはベニシダの培養には適正とは言えない. 種によってその作用が大きく異なっていることが分かった.

以上をまとめてみる. 前葉体サイズ (表 1), 平均質量 (表 2), の結果から, 考えると Agar 0.7%, 3/4MS, Suc. 0% の⑤の培地は, 最も前葉体のサイズが大きく成長も早い. このことから, 本実験では, この培地が無配生殖ベニシダの孢子培養にもっとも適正であると考えられる.

### 実験 B

⑬のスクロース 3%, Agar 0.7%, 1/2MS 培地の前葉体について. この培地では, 前葉体の個体質量はスクロース Suc. 0% で培養したもの (④) よりも質量は約 3 倍大きくなっている (表 2.④と⑬). この細胞の塊 (図 4. の A, D) は孢子 1 個から発生したものであり, これらのことからその分裂増殖作用は強いと思われる. しかし, 確かに大きくなっていったが, 仮根もなく葉状に広がる事もなく, 正常な前葉体の形態をしていなかった. このスクロースが前葉体にどのような影響を与えているのか, その作用を調べるために, この⑬の培養 90 日目の細胞の塊をスクロース Suc. 0%, Agar 0.7%, 1/2MS 培地 (④とおなじもの) に植え替える実験を試みた (I). 更に, ⑬の団子状の塊をほぐし, 未分化の細胞をバラバラに崩して, 同じくスクロース 0%, Agar 0.7%, 1/2MS 培地に植え替えて, どのような成長をするのかを実験した (II). 以下にその結果を示した.

### 1) 植え替え実験の結果と考察

スクロース 3% の培地からスクロース 0% へ植え替えて培養したところ、細長くリボン状の細胞の塊 (図 4A) は、平面状に広がって増殖した。リボン状の 1 枚 1 枚がそれぞれ広がるように増殖したと思われる。この平面状のものはハート形の前葉体らしくなっていた (図 4E)。また、植え替え前では仮根は無かったが、植え替え後には仮根も観察された。このことから、スクロースはベニシダの原糸体から前葉体への形態的な分化を阻害する作用があると考えられる。

### 2) バラバラにした細胞の培養実験の結果と考察

⑩の細胞の塊をバラバラにすると、その中は、細胞数 10 個程度の前葉体のようなものが、多数見られ、それぞれはしっかりと結合していなかった。その原糸体のようなものの細胞同士の結合も弱く、柄付き針ですぐに離すことが出来た (図 4B)。このバラバラの細胞を 0.7% Agar, スクロース Suc. 0%, 1/2MS 培地に植え替えた。植え替え後 14 日目では、小さな前葉体が多数形成されていた (図 4C) この前葉体は正常な前葉体と同様にハート形をした平面状に広がったものだった。バラバラになった細胞がそれぞれ前葉体へと分化したと考えられる。

## ま と め

本研究は、シダ植物研究における安定的かつ効率的な胞子培養を行うために、その適正培地の検討を目的とした。その結果、前葉体形成を速くする培地は、0.7% Agar, スクロース Suc. 0%, 3/4MS 培地であった。また、大きく成長させる目的では、1.5% Agar, スクロース Suc. 0%, 1/2MS 培地が適正であった。

実験 B からベニシダの培養において、スクロースは正常な前葉体形成を阻害し、未分化の細胞の増殖を促進していると考えられる。この未分化の細胞の塊は被子植物のカルスと同様で、多量の細胞の塊が体細胞分裂によって増殖していると思われる。シダ植物の生殖様式研究において、安定的かつ効率よく胞子培養するための技術は

必須である。これらの研究でよく用いられる無配生殖種では、イレギュラーな胞子が多く、それらの個体は雑種性が考えられる。このような雑種性の胞子は発芽率が低く、数千個の胞子を播いても実際に発芽して原糸体になるものは数個のみということがよくある。しかし、雑種性のシダはその多型形成の解明に重要なサンプルとなり、それらの胞子を出来るだけ多く培養し、多くの前葉体を形成できることが望ましい。本研究で用いた 3% スクロース培地は、正常な前葉体形成を阻害するが、その一方で未分化の細胞を多量に増殖させることが出来る。このスクロースの作用を応用すると、発芽率の低い雑種性の親株から発芽した希少な原糸体を、未分化の状態で大量に増殖させ、その後スクロース Suc. 0% の 0.7% Agar, 3/4MS 培地へ植え替えることによって、ごくわずかしか発芽しない胞子であっても多数のクローンの前葉体を作ることが出来るのと考えられる。ベニシダの無配生殖型は、発芽率や前葉体形成率、胞子体形成率など個体差が大きいことが分かっている、この手法が実際にどの個体にも応用できるのか、雑種性のものにも当てはまるのか、今後サンプル数を増やして実験してみる必要がある。

## 謝 辞

本研究に際して、培地作成にあたり、その手法および実験の進め方について、多くの知見と助言をくださいました赤間一仁先生に心より感謝の気持ちを申し上げたく、謝辞にかえさせていただきます。

## 引用文献

- 百瀬静雄 1967. 日本産シダの前葉体. 東京大学出版会  
Akira Kuriyama 2004. Medium Composition for the Production of Sporephytes of the Fern *Adiantum capillus-veneris*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 73(6): 580-582. 2004  
佐々木義則 2006. 組織培養によるゼンマイ苗の増殖. 九州森林研究 59: 228-231