

# 多芽球体を利用したレザーファン *Rumohra adiantiformis* (Forst.f.) Ching 大量増殖法

小林直恵

## I 緒言

オシダ科のシダ植物であるレザーファンは、切り葉として有用な観葉植物である。優良系統の選抜育種も試みられているが、育成された優良系統を増殖する場合、株分けによる増殖法では、大量のクローン集団を得るまでには長期間を要する。組織培養法を利用して大量増殖を行うと、比較的短期間で大量のクローン集団を得ることができ、増殖のための圃場の必要もなく、また、容器内で無菌的に培養を行うので、病虫害や自然災害によるロスもない。これらの理由から、組織培養法による大量増殖法の開発は、期待されている。

レザーファンの組織培養法としては、Chenらの報告がある<sup>1)</sup>。これは、根茎を外植体とし、葉状体を形成させるものであるが、約10週間のサイクルで、形成された葉状体を分割、移植して増殖を行う方法であるため、労力がかかる。そこで、培養の効率化を目的として、多芽球体を中間増殖体とした組織培養法を開発した。

## II 材料および方法

### 1. 初代培地の検討

レザーファンの十分肥大充実した根茎先端部約3cmを切り取り、細根を取り除いて表面をよく水洗いした後、中性洗剤(10分間)、流水による水洗い(30分間)、100ppmクロラムフェニコール溶液(5分間)、カピサイジン(5分間)、70%エタノール(1分間)、2%アンチホルミン溶液(5分間)、滅菌水(3回リンス)の順で殺菌処理を行った。

基本培地としては、1/2, 1/4, 1/8 MS培地

(ただしビタミン類については、いずれも1/2濃度とした)と修正Praque's培地<sup>2)</sup>を用いて培養反応を検討した。ホルモン条件としては、BAとKinetin, BAとNAA, KinetinとNAA, BAと2,4-D, Kinetinと2,4-Dの5種類の組み合わせについて、それぞれ0, 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 ppmずつ添加した処理区について検討した。培地は、2%濃度のショ糖を添加し、pH5.7に調整した後、寒天を0.8%濃度加え、試験管に10mlずつ分注し、121°C、20分間オートクレーブ滅菌した。

滅菌水でリンスした根茎を先端から1.5cm程度に切断し、外皮を形成層付近まで厚く剥ぎ、各処理区10片ずつを培地に置床した。培養は、22°C、16時間日長で行った。置床後3カ月目の多芽体形成外植体数、単芽形成外植体数、葉状体形成外植体数を調査した。

### 2. 多芽体増殖法の検討

多芽体をBAとNAAをそれぞれ0, 0.5, 1.0 ppmずつ組み合わせた1/2MS液体培地(各30mlずつ100mlフラスコに分注)に移植し、回転培養を行った(7回転/分)。

### 3. 多芽球体増殖および再生条件の検討

形成された多芽球体を、BA, NAAをそれぞれ0, 0.02, 0.2, 2.0ppmずつ組み合わせた1/2MS固体培地および液体培地に1個体ずつ移植した。固体培地には、ゲルライトを0.2%添加した。液体培地は、回転培養(7回転/分)を行った。移植2カ月後の多芽球体増殖数、総生体重を調査し、葉や根が再生したものについては、多芽球体1個あたりの葉数と根数を調査した。

### 4. 多芽球体の組織学的観察

多芽球体の切片を作成し、光学顕微鏡で観察

し、多芽球体の発生形態を調査した。

## Ⅲ 結 果

### 1. 初代培地の検討

基本培地については、1/8MS培地と修正Praqu's培地で、外植体から多芽体形成が認められた(図版1)が、後者の培地における多芽体形成数は低く、BA 1.0+Kinetin 0.1ppmとBA 1.0 ppmの条件において、各1個の外植体から多芽体が形成されただけであった。1/8MS培地では、第1表に示した13種類のホルモン条件下で多芽体形成が認められたが、特に\*の5組み合わせのホルモン処理条件下(BA 1.0 ppm, BA 1.0+Kin 0.01ppm, BA 1.0+Kin 0.1ppm, BA 1.0+Kin 1.0ppm, BA 1.0+NAA 1.0ppm)において多芽体形成が比較的良好であった。

### 2. 多芽体増殖法の検討

回転培養により、多芽体がいびつになり、多芽体表面に突起が形成し始め、その突起部分が多芽体表面から分離するようになると、急速な多芽球体の増殖が起こった。多芽球体が発生しはじめるまでは、多芽体の成長は緩慢であった。ホルモン条件としては、BA 1.0, BA 0.5+NAA 1.0, BA 0.5+NAA 0.5ppmの3種類の処理区において、移植後10カ月～1年程度で多芽球体が発生した。増殖開始は、BA 0.5+NAA 1.0ppmの条件がもっとも早かった。多芽球体発生後1～2カ月で、フラスコあたり500～1000個の多芽球体に増殖した(図版2)。

### 3. 多芽球体増殖および再生条件の検討

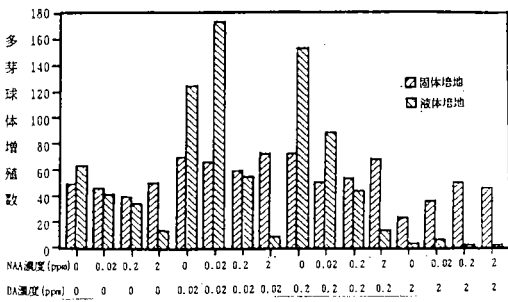
多芽球体は、固体培地、液体培地ともに、いずれのホルモン条件においても増殖したが、BA濃度が0.02～0.2ppmの条件下で、増殖が良好

第1表 多芽体形成がみとめられたホルモン条件

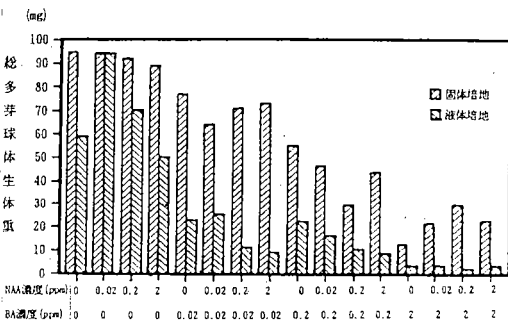
| ホルモン条件(ppm)        | 外植体数 |       |      |       |     |    |
|--------------------|------|-------|------|-------|-----|----|
|                    | 置床   | 多芽体形成 | 単芽形成 | 葉状体形成 | 変化無 | 汚染 |
| BA 0.01 Kin 10.0   | 10   | 1     | 0    | 0     | 6   | 3  |
| BA 0.1             | 10   | 1     | 0    | 1     | 6   | 2  |
| * BA 1.0           | 10   | 3     | 1    | 5     | 0   | 1  |
| * BA 1.0 Kin 0.01  | 10   | 5     | 1    | 0     | 1   | 3  |
| * BA 1.0 Kin 0.1   | 10   | 4     | 1    | 3     | 0   | 2  |
| * BA 1.0 Kin 1.0   | 10   | 3     | 0    | 4     | 2   | 1  |
| BA 10.0            | 10   | 1     | 0    | 0     | 8   | 1  |
| BA 10.0 Kin 10.0   | 10   | 1     | 1    | 0     | 6   | 2  |
| * BA 1.0 NAA 1.0   | 10   | 3     | 3    | 0     | 0   | 4  |
| BA 1.0 NAA 10.0    | 10   | 1     | 0    | 0     | 6   | 3  |
| Kin 1.0 2,4-D 0.01 | 10   | 1     | 1    | 1     | 6   | 1  |
| Kin 0.1 2,4-D 0.1  | 10   | 2     | 0    | 2     | 4   | 2  |
| 2,4-D 0.1          | 10   | 1     | 0    | 1     | 4   | 4  |

であった。増殖数は、ホルモン条件がBA0.02+NAA0.02ppmの液体培地でもっとも多く、170倍以上になった。BA0.02~0.2ppmとNAA0~0.02ppmを組み合わせた区とホルモン無添加の区では、固体培地より液体培地で増殖数が多かったが、他のホルモン条件では、固体培地で増殖数が多かった(第1図)。

1試験管あたりの総多芽球体生体重は、BA濃度が高くなるに従い、低下する傾向にあった。また、いずれのホルモン条件においても固体培地が液体培地より生体重が高く、ほとんどの区で多芽体1個あたりの生体重は固体培地で高くなる事が明らかとなった(第2図)。



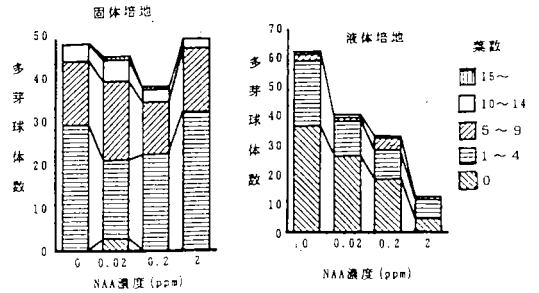
第1図 多芽球体増殖におよぼす NAA および BA 濃度の影響



第2図 多芽球体増殖生体重におよぼす NAA および BA 濃度の影響

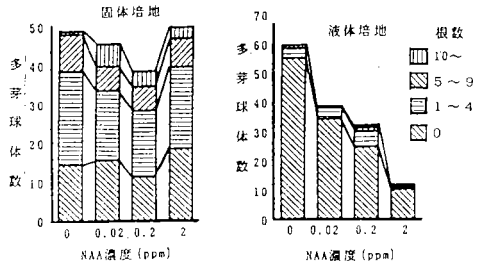
BA 0 ppmの処理区では茎葉が分化した。同一ホルモン条件下における分化率は、液体培地よりも固体培地で高かった。また、多芽球体1個あたりの葉数が5枚以上の個体の形成率も、固体培地が高かった(第3図)。固体培地においては、NAAを0.02ppm添加した処理区で、

葉数が多くなる傾向が認められた。



第3図 多芽球体あたりの葉数におよぼす NAA 濃度と培地の影響

BA 0 ppmの処理区では、根も分化した。固体培地と液体培地を比較すると、固体培地で根の分化率と根数の多い個体数が多かった。分化率は固体培地が高く、根数が多い個体の数も多かった(第4図)。また、固体培地においては、NAAを0.02ppm添加した処理区で、根数が多くなる傾向が認められた。なお、分化した根の長さは液体培地で形成した個体のほうが長かった。



第4図 多芽球体あたりの根数におよぼす NAA 濃度と培地の影響

#### 4. 多芽球体の組織学的観察

多芽球体の組織切片の顕微鏡観察の結果、組織周辺部の大型の細胞からの、密な構造をもつ芽の発生が認められた。各成長段階の組織切片の観察により、発生、分離した芽が成長するにしたがって、中心部の組織が褐変し、その周辺の細胞は大きくなる事が明らかになった(図版3)。

## IV 考 察

## 1. 初代培地について

Chenらがレーザーファン根茎からの葉状体形成用基本培地として用いたのは、修正Prague's培地に微量要素を加えたものである。本実験において、多芽体形成を認めたのは、修正Prague's培地と1/8MS培地であった。これら2つの培地の主要塩濃度は、以下に示すとおりである。

修正Prague's培地 1/8MS培地

|                                       | 修正Prague's培地 | 1/8MS培地 |
|---------------------------------------|--------------|---------|
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>       | 400mg/l      | 206.3   |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 100          | 46.2    |
| CaCl <sub>2</sub>                     | 100          | 50.0    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 100          | 21.0    |
| KNO <sub>3</sub>                      | —            | 237.5   |

本実験で今回用いた1/8MS培地は、修正Prague's培地と比べて、N源についてはほぼ等量、他の塩類については約1/4～1/2量になっている。1/4MS培地を基本培地とした場合には、多芽体の形成は認められなかったことから、多芽体形成に対しては、他の塩類ではなくN源となる塩類の量が影響すると考えられた。具体的には、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>とKNO<sub>3</sub>がかなり低濃度である必要があると考えられた。Prague's培地は、葉状体形成には適しているが<sup>1)</sup>、多芽体形成は1/8MS培地に比較して生じにくかったことから、多芽体を良好に形成させるためには、KNO<sub>3</sub>の添加が必要である可能性がある。

シダ植物から多芽球体を誘導する系については、一連の報告がある<sup>3) 4) 5) 6) 7)</sup>。外植体から多芽球体を誘導する初代培養の基本培地は、1/1MS (*Asplenium nidus* L.)、1/2MS (*Pteris ensiformis* "Victoriae", *Adiantum raddianum* K.Presl "Fritz Luthii"), 1/4MS (*Nephrolepis cordifolia* Presl.)であり、レーザーファン多芽体誘導系は、これらのシダ植物の多芽球体誘導系よりも低塩濃度要求性であることが判明した。

本実験で、多芽体形成が良好であった5種類のホルモン条件から察すると、基本的にはBA 1.0ppm濃度により多芽体誘導が生じていると考えられた。他のシダ類の実験結果でも、外植体から多芽球体を誘導する際に効果があるホルモンは、0.5～1.0ppm濃度のBAであり、本実験の結果と類似している。レーザーファンでは、同じサイトカイニン類であるKinetinを低濃度添加することによって、多芽体形成が促進される傾向が認められた。Kinetinが多芽を誘導する例は、他のシダ植物でも報告されている<sup>8)</sup>。2種類以上のサイトカイニン類を同時に添加することによって培養効率を向上させた例は他の植物でも確認されており、本実験結果においても同種ホルモンの相加効果の存在が示唆される。

## 2. 多芽体増殖法について

他のシダ植物の報告例では、多芽球体は固体培地上で外植体から直接形成されるが、レーザーファンの場合は多芽球体は外植体からは直接形成されず、多芽体を液体回転培養によって長時間培養する必要があった。多芽体から多芽球体への転換に影響するホルモン条件としては、BAが0.5ppmの場合はNAAの添加が必要であったが、BAが1.0ppmの場合はNAAの添加はむしろ多芽球体形成を阻害した。これらのホルモン条件が、多芽体の成長と多芽球体への転換のどの経路に影響を及ぼすのかは明らかではない。ホルモン条件以外の培養環境も併せて検討を加え、多芽体から多芽球体への転換を早める必要がある。

## 3. 多芽球体の増殖および再生について

他のシダ植物の報告では、多芽球体の増殖および再生に対するホルモン条件の検討として、BAとNAAを0, 0.1, 0.5, 1.0ppmを組み合わせる添加した処理区を設定して実験を行っている。その結果によると、どのシダ植物においてもBA 0 ppmでは葉や根の形成が生じ、BA 0.1～1.0ppmでは多芽球体が増殖することが明らかになっている。また、多芽球体の増殖量は、BA濃度が高くなるに従って低下することも、共通点として報告されている。本実験により、

レザーフアンでも同様の結果が得られた。従って、シダ植物の多芽球体においては、増殖、再生のメカニズムに共通性が高いと考えられる。

多芽球体生体重は、固体培地で培養すると、液体培地で培養したよりも高くなる傾向があった。このことから、再生の際には再生植物の充実や芽数の増加を促すために、液体培地で急速に増殖させた多芽球体を一定期間固体培地に移植し、肥大させるような前処理法を今後の課題として検討したい。

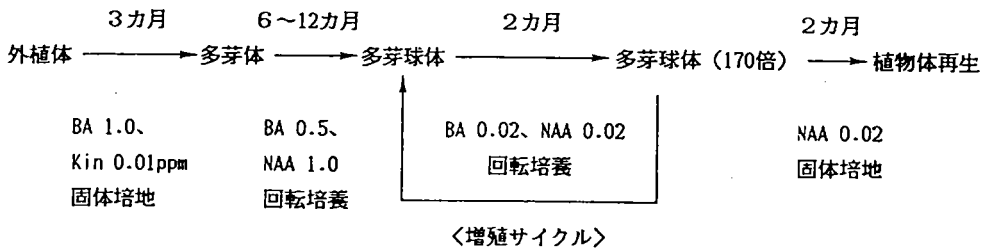
再生個体の葉数や根数が多いと、順化の成功率が向上し、その後の成長も良好になる。従って、試験管内での再生条件としても、葉数や根数を増やす条件が望ましい。本実験結果では、NAA 0.02 ppm を添加した固体培地の条件下で葉数、根数ともに多くなることが明らかとなり、レザーフアンでは低濃度の NAA 添加が再生条件として有効であると考えられた。他のシダ植物においても、*Asplenium nidus* と *pteris*

*ensiformis* では、ホルモン無添加の培地で葉数が最大であったが、*Adiantum raddianum* では、NAA を 1.0 ppm 添加した場合が最も葉数増殖がよかったと報告されている<sup>5) 6) 7)</sup>。

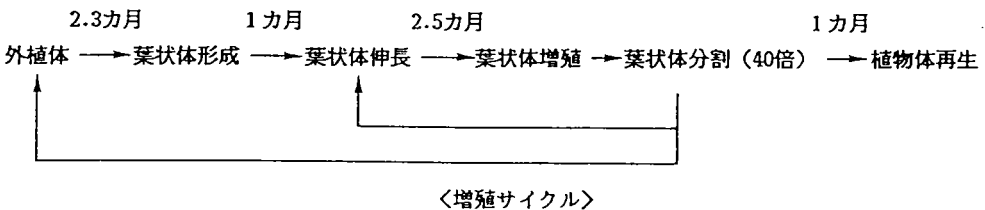
#### 4. 多芽球体の組織学的観察

多芽球体の増殖は、大型の多芽球体の表層に分裂活性の高い細胞が発生し、それが増殖、分離することによって生じる起こると考えられた。分離した多芽球体は、成長するに従って内部が空洞化し、褐変化していくようであった。この多芽球体の発生、分離、成長様式は、ヘマトキシリン染色による *Asplenium nidus* の多芽球体の組織学的観察結果に類似していた。

以上のように、レザーフアンでは、多芽球体の増殖、再生に関しては他のシダ植物との共通性が高いと考えられた。しかし、外植体から直接、多芽球体が生じず、多芽体を中間体として経るという点は他のシダ植物と異なっていた。他のシダ植物では多芽球体の増殖に際し、固体



第5図 多芽球体を利用したレザーフアン大量増殖の系



第6図 葉状体によるレザーフアン大量増殖の系 (Chen 1983 より改編引用)

培地が用いられているが、本実験の結果から、レーザーファンでは液体回転培養による増殖が有効であることが明らかとなった。しかしながら、液体回転培養をくりかえすと、図版4に示したような浸潤体が発生することがあった。長期間培養した多芽球体を再生させた場合の変異の有無については、今後検討したい。

多芽球体を利用したレーザーファン大量増殖の系を第5図に示す。Chenらの葉状体増殖系による増殖法をまとめた第6図と比較すると、本実験により開発した方法は、多芽球体が発生した時点からの増殖効率が、Chenらの方法に比べ飛躍的に向上することは明らかである。また、多芽球体は培養容器内で自然に分離、増殖するので、移植時に苗条分割操作が不要である。

## V 摘 要

レーザーファンを組織培養により効率よく増殖することを目的として実験を行い、多芽球体を中間増殖体とした培養系を確立してレーザーファンの増殖効率を向上させた。

BA1.0ppmを添加した1/8MS培地で根茎から多芽体を誘導し、その多芽体を回転培養したところ、多芽球体が発生した。多芽球体は、NAA0.02ppmを添加した培地に移植すると良好に再生した。多芽球体の増殖率は非常に高く、BA0.02+NAA0.02ppmを含む1/2MS液体培地で回転培養を行ったところ、2カ月で170倍以上になった。また、回転培養中に自然に分離していくため、移植時の分割操作は不要であった。

以上のことから、多芽球体を中間増殖体とし

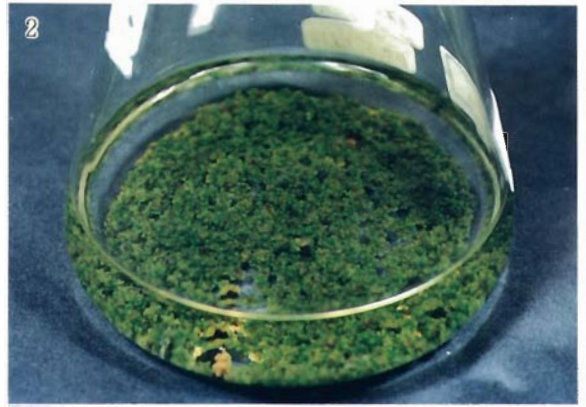
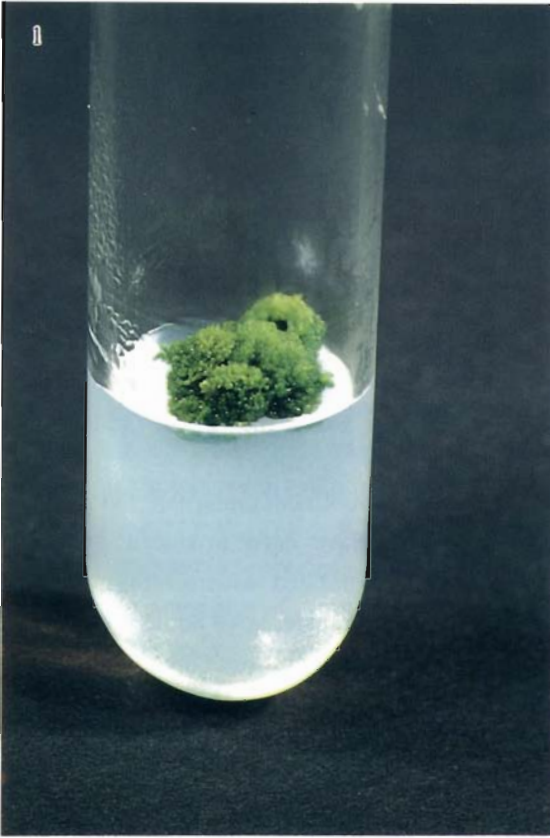
て利用すれば、レーザーファンは飛躍的に増殖できることがわかった。

## VI 引用文献

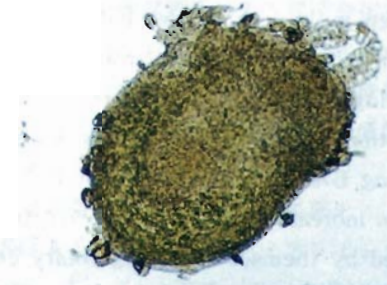
1. Chen, S. Y. et al 1983. Micropropagation of leatherleaf fern (*Rumohra adiantiformis*). Proc. Fla. State Hort. Soc. 96: 266-269.
2. Hirsch, A. M. 1975. The effect of sucrose on the differentiation of excised fern leaf tissue into either gametophytes or sporophytes. Plant Physiol. 56: 390-393.
3. 安谷屋信一 仲田ひろみ 上里健次 1984. シマオオタニワタリの組織培養による栄養繁殖 園学別2: 288-289.
4. 樋口春三 鈴木重俊 玉井悟 雨木若慶 1985. *Nephrolepis cordifolia* Presl. (タマシダ)の組織培養による増殖 園学別2: 394-395.
5. 樋口春三 雨木若慶 金杉勝 1986. *Asplenium nidus* L. の組織培養による増殖 園学別2: 328-329.
6. 雨木若慶 樋口春三 1989. *Pteris ensiformis* "Victoriae" (フライイノモトソウ)の組織培養による増殖 園学別2: 514-515.
7. 雨木若慶 樋口春三 1990. *Adiantum raddianum* K. Presl "Fritz Luthii" の組織培養による増殖 園学別2: 646-647.
8. Dykeman, B. W. & B. G. Cumming 1985. In vitro propagation of the Ostrich fern (*Matteuccia struthiopteris*). Can. J. Plant Sci. 65: 1025-1032.

## 図版説明

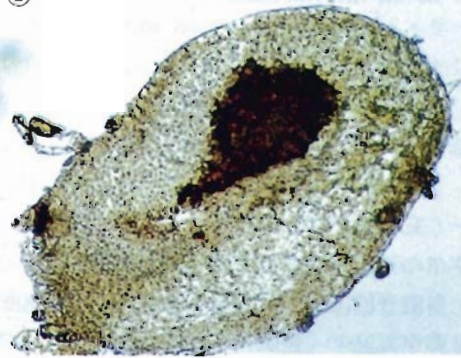
1. 多芽体
2. 増殖した多芽体
3. 多芽球体組織切片の経時変化
  - ① 多芽球体発生初期
  - ② 多芽球体内部の褐変化
  - ③ 多芽球体周辺部からの多芽球体発生
4. 発生した浸潤体



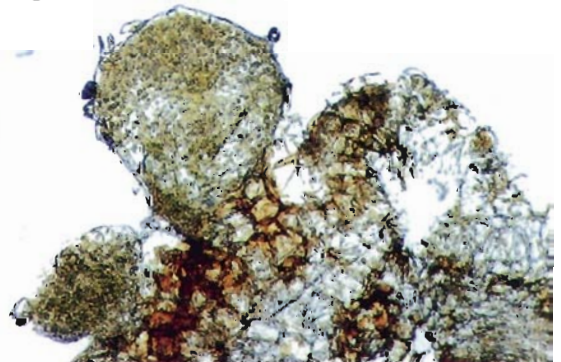
3-①



3-②



3-③



Micropropagation System of Leather Leaf Fern *Rumohra adiantiformis*  
(Forst.f.) Using the Green Globular Body.

Naoe KOBAYASHI

Summary

For the purpose of the efficient propagation of leather leaf fern *Rumohra adiantiformis* by tissue culture method, I proposed a mass propagation system using the green globular body (GGB) as an intermediate.

When multipleshoot was induced from rhizome on 1/8MS medium containing BA 1.0 ppm and then it was cultured by rotary culture method, many GGB have been produced. After reculturing on solid medium with NAA 0.02ppm GGB were regenerated satisfactorily. The propagation rate of GGB was very high, so that when GGB were transferred to liquid medium containing BA 0.02ppm and NAA 0.02ppm and incubated by rotary culture, the number of GGB has increased by more than 170 times only for two months. Moreover as the GGB were separated by themselves during rotary culture, it is not necessary to divide them into many pieces for reculture.

Thus, it is apparent that leather leaf fern could be propagated on a large scale by using GGB as an intermediate.