

シダ植物の増殖技術としての
胞子発芽と前葉体成長に関する研究

Studies on spore germination and prothallus growth as
ferns breeding techniques

2021 年 3 月

西野 文貴

FUMITAKA NISHINO

Doctoral Thesis

Tokyo University of Agriculture

(March,2021)

目次

第 I 章 序論..... 5

 第 I-1 : シダ植物とは 5

 第 I-2 : 研究目的 9

 第 I-3 : 研究史 13

 第 I-4 : 研究概要 15

第 II 章 胞子の発芽に関する研究..... 18

 第 II-1 : 温度条件と胞子発芽の関係..... 18

 第 II-1-A : 恒温条件と胞子発芽の関係..... 20

 第 1 項 : 実験方法 20

 第 2 項 : 実験結果 24

 第 3 項 : 小括 28

 第 II-1-B : 変温条件と胞子発芽の関係..... 30

 第 1 項 : 実験方法 31

 第 2 項 : 実験結果 34

 第 3 項 : 小括 37

 第 II-2 : 光条件と胞子発芽の関係 39

 第 II-2-A : 照度条件と胞子発芽の関係..... 40

 第 1 項 : 実験方法 40

 第 2 項 : 実験結果 43

 第 3 項 : 小括 46

 第 II-2-B : 光質条件と胞子発芽の関係..... 48

 第 1 項 : 実験方法 48

 第 2 項 : 実験結果 52

 第 3 項 : 小括 61

| | |
|--------------------------------|-----|
| 第Ⅱ-3：生育基盤・培地条件と孢子発芽の関係..... | 64 |
| 第Ⅱ-3-A：生育基盤と孢子発芽の関係..... | 64 |
| 第1項：実験方法..... | 64 |
| 第2項：実験結果..... | 66 |
| 第3項：小括..... | 79 |
| 第Ⅱ-3-B：培地の栄養条件と孢子発芽の関係..... | 80 |
| 第1項：実験方法..... | 80 |
| 第2項：実験結果..... | 82 |
| 第3項：小括..... | 85 |
| 第Ⅱ-3-C：培地の pH 条件と孢子発芽の関係..... | 87 |
| 第1項：実験方法..... | 87 |
| 第2項：実験結果..... | 91 |
| 第3項：小括..... | 103 |
| 第Ⅱ-4：常温・冷蔵・冷凍の保存条件と発芽率の関係..... | 105 |
| 第1項：実験方法..... | 107 |
| 第2項：実験結果..... | 111 |
| 第3項：小括..... | 115 |
| 第Ⅱ-5：孢子の重量と発芽数の関係..... | 117 |
| 第1項：実験方法..... | 117 |
| 第2項：実験結果..... | 120 |
| 第3項：小括..... | 123 |
| 第Ⅱ-6：利用頻度の異なる孢子と発芽率の関係..... | 125 |
| 第1項：実験方法..... | 125 |
| 第2項：実験結果..... | 129 |
| 第3項：小括..... | 130 |
| 第Ⅲ章 前葉体の生育条件に関する研究..... | 133 |
| 第Ⅲ-1：温度条件と前葉体成長の関係..... | 133 |

| | |
|----------------------------|-----|
| 第1項：実験方法..... | 135 |
| 第2項：実験結果..... | 138 |
| 第3項：小括..... | 139 |
| 第Ⅲ-2：光条件と前葉体成長の関係..... | 142 |
| 第1項：実験方法..... | 142 |
| 第2項：実験結果..... | 145 |
| 第3項：小括..... | 146 |
| 第Ⅲ-3：生育基盤条件と前葉体成長の関係..... | 155 |
| 第1項：実験方法..... | 155 |
| 第2項：実験結果..... | 157 |
| 第3項：小括..... | 160 |
| 第Ⅲ-4：栄養条件と前葉体成長の関係..... | 162 |
| 第1項：実験方法..... | 162 |
| 第2項：実験結果..... | 164 |
| 第3項：小括..... | 176 |
| Ⅲ-5：生育密度と前葉体成長の関係..... | 177 |
| 第1項：実験方法..... | 177 |
| 第2項：実験結果..... | 180 |
| 第3項：小括..... | 183 |
| 第Ⅳ章 植栽の生育条件に関する研究..... | 185 |
| 第Ⅳ-1：植栽密度の条件と前葉体成長の関係..... | 189 |
| 第1項：実験方法..... | 189 |
| 第2項：実験結果..... | 193 |
| 第3項：小括..... | 198 |
| 第Ⅳ-2：栽培容器の条件と前葉体成長の関係..... | 202 |
| 第1項：実験方法..... | 202 |
| 第2項：実験結果..... | 206 |
| 第3項：小括..... | 212 |

| | |
|---------------|-----|
| 第Ⅴ章 総合考察..... | 214 |
| おわりに..... | 217 |
| 謝辞..... | 220 |
| 引用文献..... | 222 |
| 要旨..... | 241 |
| SUMMARY..... | 247 |

第I章 序論

第 I -1 : シダ植物とは

シダ植物は花および果実を持たない隠花植物に属している。生育環境は幅広く、低地から高山、乾燥地から湿地、池や沼または樹上に着生する種類も存在し、現在地球上には約 1 万 1 千種生育するとされている(岩槻, 1996) (清水・長谷部, 2007) (写真 I -1-1)。シダ植物は大きさ約 30~60 μm の胞子を空中に散布することによって繁殖を行い、胞子を葉の裏面につける種類と胞子葉を別にもつ種類に分けられる(三井, 1982)。1 シーズンに 1 個体がつくる胞子数は異なるが、*Dryopteris filix-mas* (オシダ属) では約 5 千万個の胞子をつくることが報告されている(Ernest *et al.*, 2002)。シダ植物の生活環は、胞子体世代(無性世代)と配偶体世代(有性世代)の 2 つに分けられ、胞子囊の中で胞子母細胞(2n)が減数分裂を起こして胞子(n)となり、胞子囊から排出された胞子が発芽して細胞分裂と細胞分化を行い原糸体になり、その後前葉体と呼ばれる配偶体へと成長する。性的に成熟した配偶体では造精器と造卵器が作られ、造精器では多数の雄性配偶子(精子)、造卵器では通常 1 つの雌性配偶子(卵)が発生し、それぞれの配偶子が合体(受精)することで接合子(2n)となる。接合子からは胚が発生し、細胞分裂と器官を形成することで成熟した胞子体になる(Ernest *et al.*, 2002)。したがって、胞子囊が裂開して空気中に散布された胞子は核相 n の配偶体世代(有性世代)、受精後に前葉体から発生した第一葉(幼胞子体)は核相 2n の胞子体世代(無性世代)となる。第一葉(幼胞子体)が胞子囊をつける

胞子体になるまでに数年かかり、前葉体から発生した第一葉が必ず胞子体になるとは限らない(Hoshizaki & Moran, 2001)。第一葉の名称は既存研究では幼植物もしくは若い胞子体や幼個体と様々な名称で呼ばれている(坂巻, 2005)。今まで語句が統一されていない理由としては、第一葉の生活史が種によって異なるためだと考えられる。しかし、第一葉が若い胞子体であることに違いはなく、今まで語句が統一されていない方が研究の妨げになると考えられるため、本研究では第一葉の名称を『幼胞子体』として定義し論じることにした。著者が調べた限り幼胞子体の語句が論文で使用されたのは2012年(水野, 2012)が最初だと考えられるが、特別な意図や理由があって幼胞子体と称した旨は記載されていない。幼胞子体は数年かけて胞子体へと成長し、大半の種が葉の裏面に胞子嚢をつけ繁殖を行う。また、胞子体(幼胞子体)は生理的に独立し、生活環の中で優位であり一般には光合成機能を発達させた段階とされ、胞子体の生理的独立と優位性は維管束植物の最も重要な特徴の一つであると言える(Ernest et al., 2002)。しかし、シダ植物の中には受精の過程を経ないで胚を発生しない種類もあり、この種類を無融合生殖種と呼ぶが、遺伝的多様性を欠くわけではないと報告されている(Ootsuki Ryo, 2011)(大槻涼, 2011)。

シダ植物はコケ植物と生活環が類似しているが、コケ植物の胞子体は配偶体に寄生するような形をとり、シダ植物では胞子体が独立して栄養を獲得できることができるのが大きな違いである(伊藤, 1972)。

シダ植物の祖先は古生代のデボン紀に生育したりニアと呼ばれる植物だとさ

れ、リニアは維管束植物でありながらもコケ型の世代交代を行う原始シダ類であつた(西田, 1978)。その後、進化と絶滅を経て、現在シダ植物はマツバラン類、ヒカゲノカズラ類、トクサ類、シダ類の4つのグループに大別され、さらにシダ類は古生シダ類、真囊シダ類、薄囊シダ類(シダ目、ゼンマイ目、デンジソウ目、サンショウモ目)に分類され、その中でも薄囊シダ類は現生シダの大部分が属する(井上, 1975)。また、孢子囊の形態はマツバラン門、ヒカゲノカズラ門、トクサ門、シダ門ではっきりと区別できることも報告されている(Ernest et al., 2002)。今後も APG による分類などにより系統が変わることも考えられる。このようにシダは、その孢子の形、生活形や形態から上記のように分類されているが、都市緑化などの植栽に利用される種類の殆どはシダ目に属し、また人間が山菜などに利用してきた種類はゼンマイ目に属する。したがって、本研究では薄囊シダ類の中でもシダ目、ゼンマイ目を中心に扱うことにした。本研究で取り扱ったシダ植物の分類と学名については海老原淳著の「日本産シダ植物標準図鑑 I・II」に従って記載した(海老原, 2016, 2017)。

薄囊シダ類の特徴としては、1層の細胞からなる薄い孢子囊壁をもっており、これはできあがった壁の厚さだけでなく、孢子囊の発生が数個の細胞から出発するか1個の細胞から出発するかという違いである(井上, 1975)。また、孢子囊の形態は系統学上の形質としてよく取り扱われており、一般的に薄囊は真囊より進化した形態とされている(三井, 1982)。このように分類群によって孢子囊の形、起源と発生など、これらの情報は維管束植物を分類するうえで信頼性の

高い基準だとされる(Ernest *et al.*, 2002)。本研究ではゼンマイなど古い起源の種も様々な条件で実験を行っているため、上記のような内容にも関わる可能性があると考えられる。



写真 I-1-1 左：マメヅタが樹幹に生育する様子,右：ホソバカナワラビが地表面を覆う様子

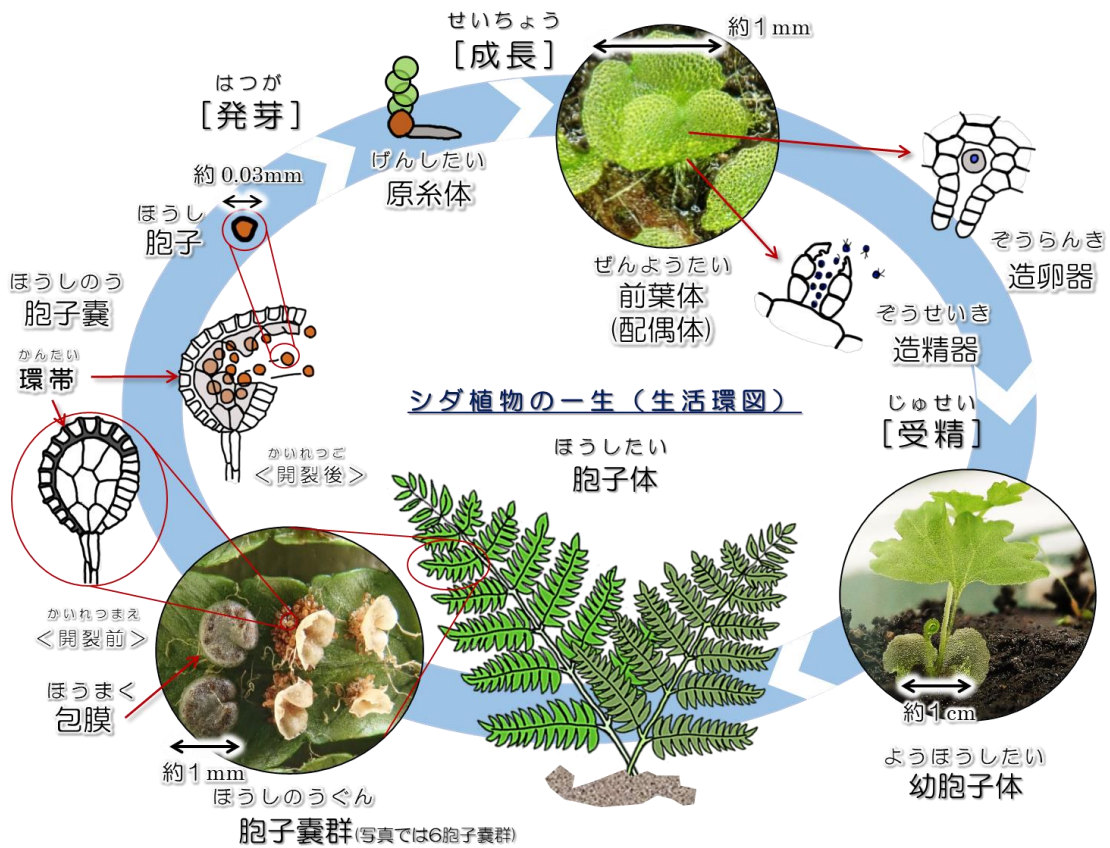


図 I-1-1 シダ植物の生活環

第 I -2 : 研究目的

シダ植物は日本に約 700 種生育し(海老原, 2010), 様々な生活形や耐性などを
持つことで多様な環境に適応してきたと考えられる。例えば, オシダ
(*Dryopteris crassirhizoma* Nakai) は耐凍性を獲得した(佐藤・酒井, 1981b)こ
とで, 日本海側の多雪環境下に成立するブナ林(チシマザサ-ブナ群集)の林床
一面を覆うほど優占することがあり(宮脇・奥田, 1990)(写真 I -2-1), 暖温帯の照
葉樹林においては種数の約 1/3 を占めているとも言われている(服部ほか, 2001)。
シダ植物は孢子を用いて繁殖する。孢子が発芽する環境要因については温度, 光
などがあげられ(Galán *et al.*, 2011)(石川・大房, 1954) (佐藤・酒井, 1981a), そ
の定着には地形の起伏, 土壌の質や湿度など微環境の影響を受けやすい特性が
あることも指摘されている(松井ほか, 2003)。例えば, スギナ (*Equisetum*
arvense L.) の孢子の発芽可能温度域は 15~30 °C, 最適温度は 20 °C と温度に
よる発芽率の違いが確認されている(中谷ほか, 1996)。また, 一般に在来シダ植
物の孢子の発芽は 22~25 °C 前後が適し, 前葉体は 15 °C 以上で成長し, 30 °C
以上だと抑制されることが報告されている(百瀬, 1967)。そのため, 多くの栽培
試験は 20~25 °C 前後で行われているが, Ranal(Ranal, 1999)によると孢子の
温度に対する感度は種によって異なると報告されている。また, シダ植物の大半
である同形孢子シダ類は孢子発芽後に, 両性的な配偶体をつくり自配受精を行
う受精法が見られる。他にも, 共進化した葉食者は少なく, 生物的要因は小さい
と言われる(Barrington, 1993)。

シダ植物はオシダなどのように生活形や葉形などが独特なだけでなく、耐陰性に優れた種が存在し、室内緑化または新たな緑化素材としての利用が期待されている(平田,1993)(村上,2019)。シダ植物が緑化に利用されることで、新しい景観の創出や種多様性に貢献することが考えられる。今後は緑化植物として利用が拡大すると考えられるが、それに対して今の生産状況は大きな問題を抱えている。一社で出荷する数としては年間 2,000 個体以上取引されており、全国での流通は相当数になると思われる(写真 I -2-1)。近年発行された図鑑にはベニシダ (*Dryopteris erythrosora* (D.C.Eaton) Kuntze.) やオニヤブソテツ (*Cyrtomium falcatum* (L.f.) C.Presl subsp.*falcatum*) は壁面緑化等造園用と表記されるほどである(海老原, 2016・2017)。図鑑で上述したような表記は 10 年前には見られなかったことから、需要は高まっていることが予想される。また、室内緑化や壁面緑化などに利用され緑化植物として注目を浴びているが、科学的な知見が少ないことも報告されている(近藤, 2007)。しかし、現状において緑化植物として利用されているシダ植物の種類は 1800 年代の造園工事と比較してもベニシダ類やヤブソテツ類など十数種類程度で大きくは変わっていない(近藤, 2007)(西村, 2015)(飛田, 2002)(飛田, 2009)(写真 I -2-2)。その理由の一つとして、シダ植物の増殖・栽培方法の技術に重要な課題があると考えられる。

シダ植物の増殖方法については株分けが主流とされるが(Hoshizaki & Moran, 2001), オシダやイヌガンソク (*Onoclea orientalis* (Hook.) Hook.) など根茎が

匍匐しない種類(伊藤, 1972)は株分けが難しい。他の増殖方法としてカルスを用いた実験が行われているものの(安部ら, 2016) (竹内, 1987), 実験設備の確保や順化などの面から野外栽培などは困難と考えられる。したがって、シダ植物の増殖方法には孢子を用いた栽培(以下, 孢子栽培とする)が有効と考えられる。孢子栽培はクサソテツ (*Onoclea struthiopteris* (L.) Hoffm.) やゼンマイ (*Osmunda japonica* Thunb.) など, 山菜として利用される種類を中心に実験が行われてきた(古澤・中村, 2015) (本田・坂梨, 2018)。しかし, 温度や光など多岐にわたる条件が種ごとの孢子の発芽率の推移や前葉体成長に関する具体的な数値や差異は明らかになっていない。その原因として, 孢子自体が小さいことが挙げられ, 孢子の大きさは様々ではあるものの, サンショウモ科など大孢子を形成する一部の分類群を除くと, 基本的にはその大半は約 30~60 μ m 以下の小さいものであるとされる(三井, 1982)。

また, 近年自生地環境が変化する中では, 貴重種などの保全対策としても孢子栽培は有効であると考えられる。道路工事や開発で発生する植物の移植工事においてはシダ植物が移植困難植物として挙げられることも報告されている(長谷川, 2016)。これらの問題は孢子からの栽培方法を確立することで解決すると考えられる。本研究では孢子からの栽培方法を中心に行い, 光・温度条件などについての実験は実際の施工管理などの緑化技術として寄与できると考えられる。

現在, 増殖技術の主流は, 前述したように, 山採りした個体の根を分割して増やす株分けである(Hoshizaki & Moran, 2001)。この増殖方法では, 株分けの難

しい種類、一度に大量に増やすことが困難な種類もあるため、緑化に利用できる種が限られてしまう。一方で、シダ植物は孢子によって繁殖することが大半である。したがって、シダ植物を緑化に利用するためには、孢子を用いた増殖・栽培方法の技術確立が必要だと考えられる。



写真 I-2-1 左：オシダの群生風景(東北地方)、右：シダ植物が出荷される様子(大分県)

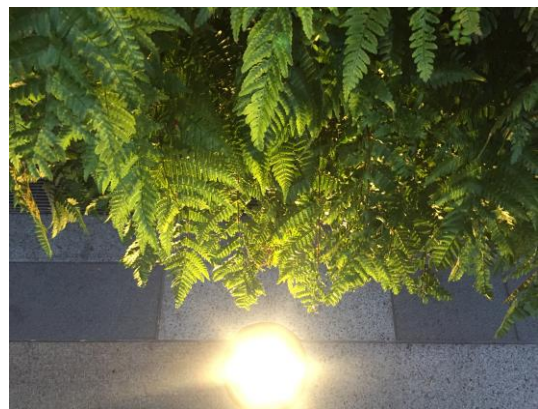


写真 I-1-2 左：東京駅前の壁面緑化、右：ベニシダ類が使用されている様子

第 I -3 : 研究史

シダ植物の研究では孢子や前葉体の観察に関する研究が 1960 年より行われてきた。観察は種ごとに行われ、その形態についてスケッチと写真にて詳細に記録されている(三井, 1982)(百瀬, 1967)。しかし、それらの研究の中で増殖・栽培方法についての記述は少なく、孢子発芽や前葉体成長に必要な温度条件・光条件は種に関係なく記述されている(百瀬, 1967)。孢子の発芽は適度の水・光・温度さえあれば発芽して成長するが、種類によって発芽の条件に違いが見られる(伊藤, 1972)と報告されている。その中でも、シダ植物の多くは孢子の発芽条件に光が関係しており、1950 年代から様々な実験が行われている(石川ほか, 1954)(嶋田, 1962)(菅井, 1973)。

孢子栽培の研究は全国の林業・農業試験場を中心に 1980 年代から行われ、対象としてはクサソテツ、ゼンマイなど山菜として利用できる種で研究が行われてきた(根子, 1986)(阿部, 2003)(佐々木, 2006)(本田, 2018)。野外での孢子栽培の研究は林業試験場で行われることが多く、対象種としてはゼンマイやワラビ (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn subsp. *Japonicum* (Nakai)), クサソテツなど山菜として利用される種が多い。山菜は山村地域において、手軽に誰でも採取が可能であり、現金収入源となることから魅力ある特産林産物の一つに数えられている(水上, 1985; 根子, 1986)。ゼンマイは東北・北陸地方を中心に生産され、中でも新潟県、福島県および山形県の三県で全国生産量の半分以上を占め、1980 年代にはゼンマイだけで生計を得ているものが部落の半数以上という

ところが各地にあったとされる。しかし、ゼンマイの採取は一人前の男性で 90 キロを担いで山道を 3 時間かけて運搬するという重労働のうえに、農林業従事者の高齢化により、衰退に拍車をかけている現状にある(根子, 1986)。ゼンマイやワラビの人工栽培で主流なのが地植え栽培だが、これは土壌改良と大量の株を用意する労力がかかるシダ植物の増殖方法として主に行われているのが株分けであり、長所として特殊な技術を必要とせず簡易的にできる点が挙げられる。短所は一度に大量に増やすことが難しく、実際の栽培では株分けした子株が枯れることもあるため、栽培時における生育場所で圃場のスペースを狭くしてしまうことも挙げられる。しかし、胞子栽培であれば大量に増殖でき、胞子体のような大型の個体に生育させるまでは前葉体の形態で苗を確保でき、圃場のスペースを無駄にすることが少ない。胞子栽培の技術確立はこのような問題を解決し、将来的には山村地域の産業に貢献できる可能性もあると考えられる。しかし、胞子栽培の既存研究は少なく(Hoshizaki & Moran, 2001)、緑化植物として有望な種を対象に胞子栽培の試験を行い、胞子発芽に関わる要因を明らかにする必要がある。また、都市緑化などに利用されるベニシダ、オニヤブソテツについての胞子からの栽培例はきわめて少ない(Akira, 2004; 松浦, 2013)。そこで、胞子からの栽培方法を確立するために胞子の発芽・前葉体の成長に与える影響を明らかにする実験が必要だと考えられる。

第 I -4 : 研究概要

第 I -1 で述べたように、シダ植物は孢子から発芽するまでの過程と、発芽した後の前葉体や幼孢子体で生活様式が異なる。したがって、本研究では孢子の発芽(第 II 章)と幼孢子体が発生する前葉体(第 III 章)、実際に植え替えなどを想定した栽培に関する研究(第 IV 章)で纏めることにした。第 II 章では孢子の発芽に与える光・温度・保存・基盤条件で実験を行った(写真 I -4-1)。孢子の発芽は適度の水・光・温度さえあれば発芽して成長するが、種類によって発芽の条件に違いが見られる(伊藤, 1972)。また、孢子自体の条件により発芽もしくは前葉体の成長に影響を与える可能性も考えられたため、第 II 章では孢子自体に焦点を当てて実験を行った。シダ植物は種によって異なるが日本全国に広く分布するため、地域ごとに発芽特性に違いがあることも考えられる。例えば、タブノキの北限に近い新潟県で採取した種子は、九州など南方で採取した種子と比較すると、結実時期に違いがあり発芽に必要な(積算)温度が異なるため、発芽が遅くなることが報告されている(武田, 2017)。また、孢子の重量は同一種内でも異なり、チャセンシダ属の一種 (*Asplenium abscissum* Willd.) では最小値と最大値の間では約 3 倍の差があったことを報告している(Gómez et al., 2016)。したがって、本研究において孢子の重量が発芽に与える影響を実験する必要があると考えられた。

また、第 I 章で述べたようにシダ植物の多くは孢子の発芽条件に光が関係しており、シダ植物の光発芽孢子は種子植物と同様の傾向を示すことがわかって

いる(Weinberg et al., 1969)。また、一般に在来シダ植物の胞子の発芽は 22～25 °C前後が適し、前葉体は 15 °C以上で成長し、30 °C以上だと抑制されることが報告されている(百瀬, 1967)。胞子の保存期間と発芽に関する既存研究では、ゼンマイの胞子が常温保存 50 日目、冷蔵保存 155 日目で発芽が確認されなかったことが報告されている(古澤・中村, 2015)。植物の発芽・生育において生育基盤は重要な要素であり、既存研究では生育基盤に肥料や保水剤が含まれると発芽が早まる、または生育が良好になることが報告されている(木村ほか, 2000)。

したがって、上記のような条件で実験を行う必要があると考えられ、第Ⅲ章では前葉体の成長に与える影響を第Ⅱ章の条件と同様にして行った。第Ⅳ章では実際に胞子から発芽した前葉体を栽培することを想定し、植栽密度と栽培容器に関する実験を行った。以上の研究概要を図 I-4-1 に示す。

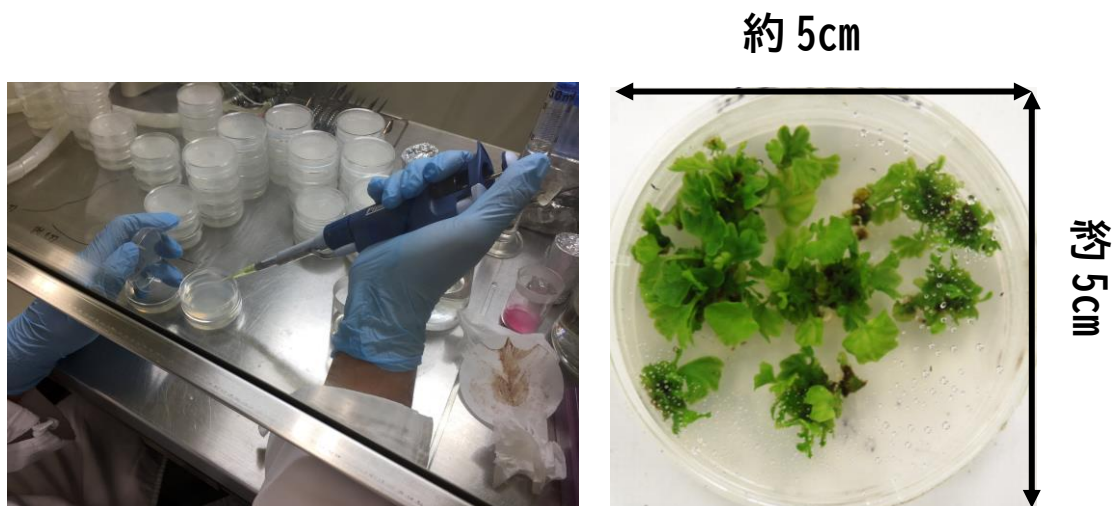


写真 I-4-1 左：胞子播種風景，右：播種後 100 日目の様子(1,000Lux)

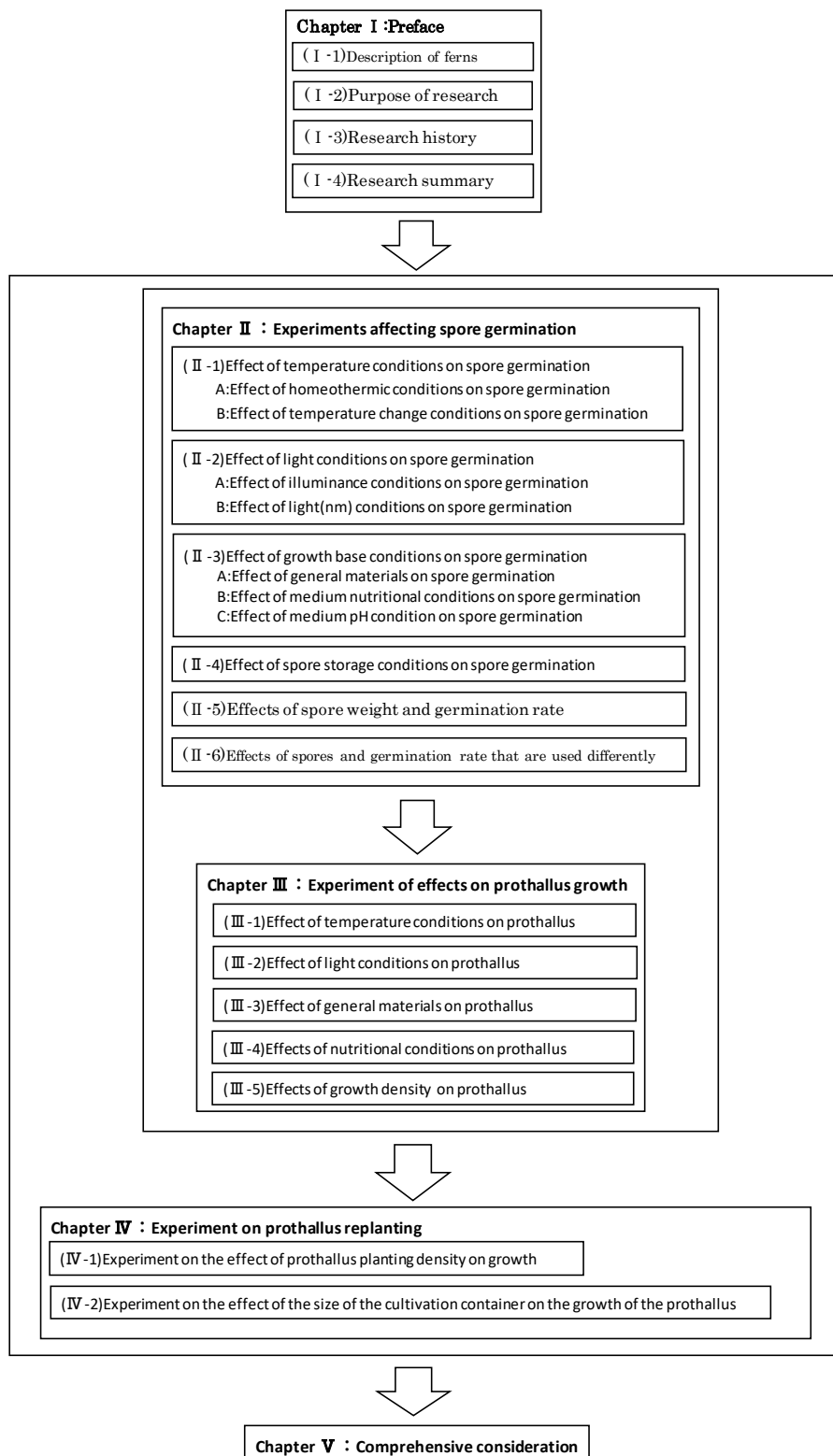


図 I -4-1 本研究におけるフローチャート

第II章 胞子の発芽に関する研究

第II-1：温度条件と胞子発芽の関係

植物にとって温度は発芽・生育に大きく関係し、種子植物においては発芽タイミングを決定する一つの環境要因である(吉岡ほか, 2009)。発芽タイミングを決定する温度は種によって違うことが知られている。特に農林種子については生活や産業に繋がるため、昔から多くの研究が行われてきた。例えば、ミツバやホウレンソウでは 20°C以上だと発芽しにくく、トマトやゴボウでは 20°C以上だと発芽しやすいことが農業分野では一般的に知られている。他にもレタスは播種時の温度が高いと種子の中の成分(アブシシン酸)が生成されることで、発芽が著しく阻害される(高温発芽阻害)ことがわかっている(吉岡ほか, 2009)。樹木については「日本の樹木種子(広葉樹)」がよく纏めており(勝田ほか, 1998)、属ごとに種子の形状や結実期などから発芽まで報告している。その報告から、属によって大まかな傾向があると考えられる。例えば、冷温帯で主に生育する *Fagus*(ブナ属)では低温域(低温処理)の方が発芽する傾向、暖温帯で主に生育する *Rhus*(ウルシ属)では高温域(高温処理)の方が発芽する傾向にある。他に類似した例では作物の種子の発芽適温は原産地によるところが大きいと報告されており、熱帯原産のトウモロコシは 25~30°C、温帯原産のダイコンは 20~25°Cが発芽に適しているとされる(農文協編, 2019)。シダ植物では種子植物と、構造が違うため同様の結果を得られるか不明であるが、本研究においてもオシダ属のオシダ(冷温帯)、ベニシダ(暖温帯)を用いて実験を行い考察した。

シダ植物の場合、大半の種の孢子発芽は20～25℃が適温と報告されているが、それに加えて種によって適温が異なることも同時に報告されている(伊藤, 1972)。例えば、スギナの孢子発芽についての実験では、温度条件を5℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃の5段階に設定し実験を行った結果、発芽可能温度域は15～30℃, 最適温度は20℃という報告がある(中谷ら, 1996)。スギナは日本全国, 北半球の暖温帯から寒帯にかけて広く分布する夏緑性の多年生シダ植物であり、前述した気候帯との関係性で言えば低温域(低温処理)の方が発芽する傾向にあると考えられる。また、孢子の耐凍性については種によって異なることが報告されており(佐藤・酒井, 1981b), 孢子の分布要因のひとつになっていることも考えられる。

しかし、温度の実験については恒温条件で実験が行われることが多く、変温条件で行われることは少ない。本研究では野外での孢子栽培も想定しているため、変温での実験も行った。野外における既存研究では、ゼンマイを対象として実験が行われたが、まだ十分な調査が行われておらず、今後の研究課題であると報告されている(根子, 1986)。また、恒温条件に関する実験は日本緑化工学会誌で発表した内容である(西野ら, 2020)。

第Ⅱ-1-A：恒温条件と孢子発芽の関係

第1項：実験方法

供試植物は従来から緑化植物として利用されているオシダ科オシダ属のベニシダ，独特の葉形や耐凍性を有し今後の緑化植物として期待されているオシダ科オシダ属のオシダ，コウヤワラビ科コウヤワラビ属のイヌガンソクとした。ベニシダとオシダは同科同属であるが，暖温帯と冷温帯で分布域が大きく異なる。ベニシダは常緑性で本州から琉球列島（沖永良部島以北）の主に暖温帯の低山地の林下，オシダは夏緑性で南千島から四国（徳島県）の主に冷温帯の山地林下，イヌガンソクは夏緑性で北海道から九州の主に山地林下に生育することが多い（海老原, 2016・2017；田川, 1959）。ベニシダの孢子は2018年6月下旬に東京都町田市，オシダとイヌガンソクの孢子は2018年10月上旬に岩手県一関市にて採取し，実験は2018年11月に東京都世田谷区の東京農業大学構内にて行っ

た。

採取した孢子葉は紙封筒に入れ，室温の暗所にて数日間風乾したのち孢子を採取した。採取した孢子は70%エタノールで殺菌した硼珪酸ガラスのスクリー一瓶（口内径:14.5 mm×胴径: 24.0 mm×高さ:50 mm）に入れ，暗所にて室温で保存した。

孢子の殺菌はクリーンベンチ内で行った。殺菌には12%次亜塩素酸ナトリウム（株式会社松葉薬品）を希釈して，1%次亜塩素酸ナトリウムを作成し，これを孢子の入ったスクリー一瓶に10 ml 入れ5分間攪拌した。孢子は浸漬後，ろ

過して滅菌水で 3 回洗浄した。ろ紙上の孢子を葉さじで集め、滅菌水に浸漬させ、30 分以内に培地へ播種した。

培地はスクロースが添加されていないムラシゲ・スクーグ培地の粉末培地（日本製薬株式会社）を使用した（以下 MS 培地）。蒸留水 1 ℓ に粉末培地を溶かしたものを 1MS 濃度とし、500 ml を別の容器に移し蒸留水を 500 ml 加えることで濃度を 1/2MS に調整した。培地の pH は 5.75 ± 0.05 に調整したのち、寒天粉末を濃度 0.7% になるよう加え、オートクレーブ（121 °C, 20 分間）で滅菌処理を行った。

培地は滅菌処理後にクリーンベンチ内にて滅菌プラスチックシャーレ（直径 50.7 mm, 高さ 14.7 mm）に 15 ml 分注し、常温になるまで放冷した。放冷後、殺菌した孢子をマイクロピペットで吸い取り、培地上の 5 ヶ所が等間隔になるように 1 滴ずつ播種した。なお、播種範囲は 1 滴あたり実体顕微鏡での観測視野（縦 2.5 mm, 横 3 mm）に収まるように設定した。播種後シャーレの周囲に自己粘着フィルム（高機能被覆フィルム ラボピタ 20 mm×30 mm）を 2 周ほど巻き密閉した。播種後にコンタミネーションが発生しても観察ができるように、1 条件につき 5 シャーレ作成した。したがって、1 温度条件区につき 1 シャーレに 5 滴の孢子播種を行い反復は 5 回とした。

播種後のシャーレは恒温 10 °C・15 °C・20 °C・25 °C・30°C に設定した温度勾配機（東京理化器械 EYELA MTI-202）内に設置した。温度勾配機内の光量は 3,300 lux（明期 16 時間・暗期 8 時間）とした。

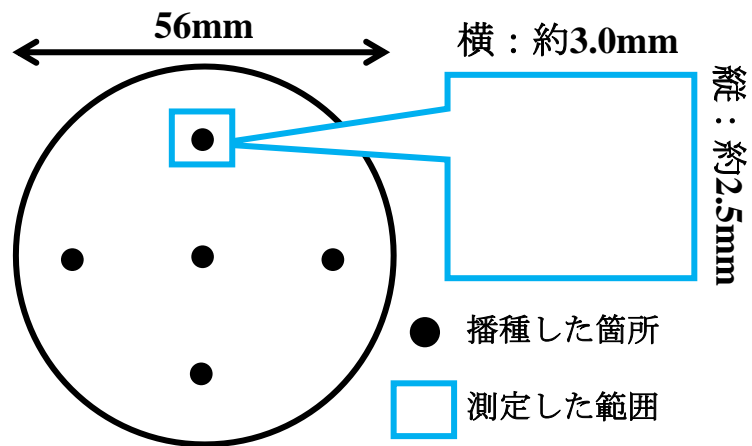
胞子発芽の観察には実体顕微鏡 (OLYMPUS SZ61) を使用した。発芽測定は各シャーレに播種した 5 滴のうち 1 カ所を測定箇所とし、顕微鏡用デジタルカメラ (OLYMPUS DP22) でシャーレ毎に播種後 12 日までは 2 日間隔で撮影し、新規の発芽が認められなくなるまで撮影を行った。12 日以降は、16 日、20 日、24 日、28 日、34 日、38 日、48 日、54 日、64 日、90 日で撮影し、ベニシダは 48 日、オシダは 28 日、イヌガンソクは 90 日以降に新規の発芽は認められなかった。測定を行わなかった残り 4 箇所はコンタミネーションが発生した、もしくは播種した胞子数が著しく多いか少ない状態であった。また、各シャーレは 90 日が経過するまで一度も開封しておらず、温度勾配機内に設置した際にシャーレが重なった場合は数日おきにその順番を変えることで、シャーレが受ける光量に差が生じないようにした。胞子播種数はベニシダにおいて 10 °C は 80 ± 38 (平均値 \pm 標準偏差)、15 °C は 84 ± 33 , 20 °C は 100 ± 30 , 25 °C は 92 ± 41 , 30 °C は 90 ± 37 , オシダにおいて 10 °C は 158 ± 35 , 15 °C は 290 ± 22 , 20 °C は 259 ± 90 , 25 °C は 283 ± 48 , 30 °C は 352 ± 103 , イヌガンソクにおいて 10 °C は 131 ± 59 , 15 °C は 170 ± 77 , 20 °C は 139 ± 69 , 25 °C は 131 ± 48 , 30 °C は 197 ± 49 , であった。発芽は撮影画像の胞子から緑色の原糸体が突出した時点とした。発芽率は発芽胞子と未発芽胞子を計数して式 1 にて算出した。また、平均発芽日数は式 2 (中村ら, 2009) にて算出した。発芽率は逆正弦変換を行い、各温度条件における最終発芽率の差の有無を一元配置分散分析で判定し、有意差を確認したうえで Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。また、平均発芽日数の差の有無も同様に

検定を行った。

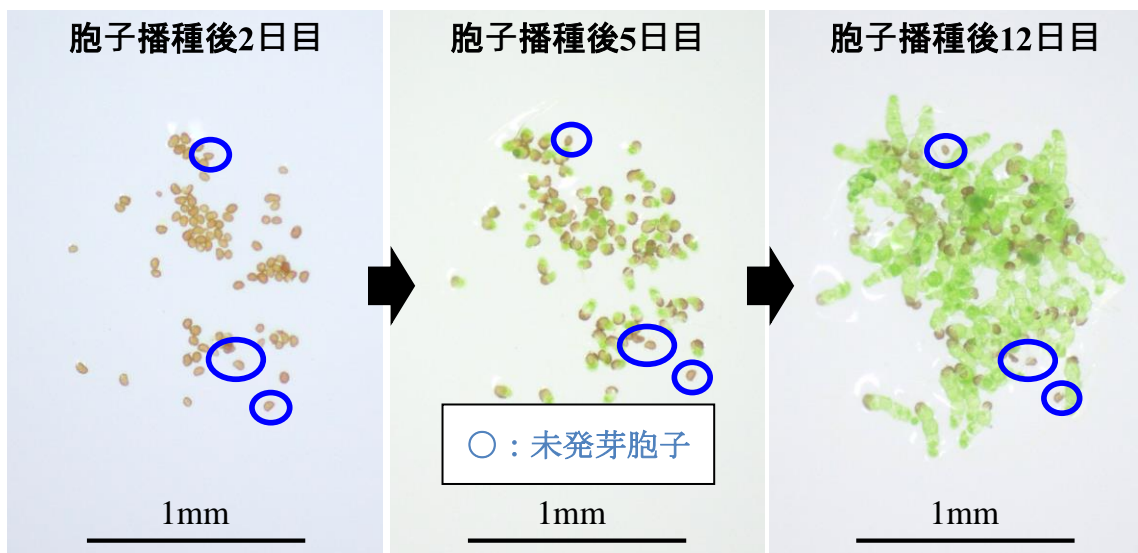
$$\text{発芽率(\%)} = 100 \times \Sigma n / N \quad (1)$$

$$\text{平均発芽日数(日)} = \Sigma(t \times n) / \Sigma n \quad (2)$$

N : 培地に播種した胞子数, n : 日毎の発芽した胞子数, t : 経過日数



写真Ⅱ-1-A-1 シャーレに分注された寒天培地への胞子播種について



写真Ⅱ-1-A-2 発芽胞子と未発芽胞子について

第 2 項：実験結果

各温度条件の胞子の発芽率の推移を図 II-1-A-3~5, 平均発芽日数と最終発芽率を表 II-1-A-1 に示す。ベニシダで発芽が最初に確認されたのは 30 °C 区の 4 日目, 最も遅いのは 10 °C 区の 20 日目で 16 日間の差があった。48 日目以降, 発芽率に変化は見られなかった。平均発芽日数は 10 °C 区で 26.3 ± 1.0 日, 15 °C 区で 18.2 ± 0.4 日, 20 °C 区で 12.2 ± 0.3 日, 25 °C 区で 8.9 ± 0.8 日, 30 °C 区で 9.8 ± 0.4 日となった。最も早かった 25 °C 区と比べると, 10 °C 区では約 17 日, 15 °C 区では約 9 日, 20 °C 区では約 3 日の遅れが見られた。平均発芽日数は全温度条件区間において有意な差が認められた。最終発芽率は 10 °C 区で $43.8 \pm 4.4\%$, 15 °C 区で $48.3 \pm 3.9\%$, 20 °C 区で $40.8 \pm 4.7\%$, 25 °C 区で $45.0 \pm 4.0\%$, 30 °C 区で $47.6 \pm 2.4\%$ となった。最も高い 15 °C 区と比べると, 10 °C 区で約 4.5%, 20 °C 区で約 7.5%, 25 °C 区で 3.3%, 30 °C 区で 0.7% 低下した。48 日目で最も高い発芽率は 15 °C 区で 48.3%, 最も低い発芽率は 20 °C 区で 40.8% となった。最終発芽率は 48 日目の全温度条件区間において有意な差は認められなかった。

オンダで発芽が最初に確認されたのは 20 °C 区, 25 °C 区, 30 °C 区の 4 日目, 最も発芽が遅いのは 10 °C 区の 20 日目で 16 日間の差があった。平均発芽日数は 10 °C 区で 21.2 ± 0.1 日, 15 °C 区で 9.7 ± 0.2 日, 20 °C 区で 5.0 ± 0.1 日, 25 °C 区で 4.0 ± 0.0 日, 30 °C 区で 4.1 ± 0.0 日となった。最も早かった 25 °C 区と比べると, 10 °C 区では約 17 日, 15 °C 区では約 5 日, 20 °C 区では約 1 日の遅れが

見られた。平均発芽日数は全温度条件区間において有意な差が認められた。最終発芽率は 28 日目で全温度条件区において 100%を示し，全条件間で有意な差は認められなかった。

イヌガンソクで発芽が最初に確認されたのは 25 °C区と 30°C区で 8 日目，最も発芽が遅いのは 10 °C区の 34 日目で 26 日間の差があった。90 日目以降，発芽率に変化は見られなかった。イヌガンソクの平均発芽日数は 64 日目の測定より長期間欠測したため，64 日までの発芽数から算出した。最も早かった 25 °C区と比べると，10 °C区では約 42 日，15 °C区では約 12 日，20 °C区では約 3 日，30 °C区では約 5 日の遅れが見られた。平均発芽日数は 25 °C区と 20 °C区とそれ以外の温度条件区間において有意な差が認められた ($p<0.01$)。最終発芽率は 10 °C区で $95.0\pm 2.9\%$ ，15 °C区で $94.2\pm 2.8\%$ ，20 °C区で $81.2\pm 2.4\%$ ，25 °C区で $39.1\pm 3.9\%$ ，30 °C区で $19.1\pm 4.6\%$ となった。最も高い 10 °C区と比べ，15 °C区で約 0.8% ，20 °C区で約 13.8%，25 °C区で 55.9%，30 °C区で 75.9%低下した。最終発芽率は 90 日目で 10 °C区と 15 °C区を除いて有意な差が認められた ($p<0.01$)。

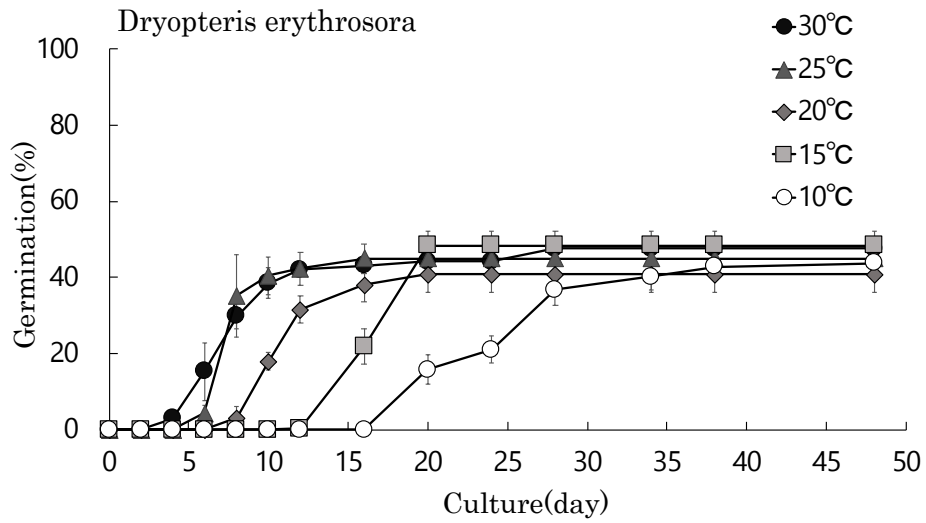


図 II-1-A-3 ベニシダの各温度条件による発芽率の推移 (エラーバーは標準偏差を示す)

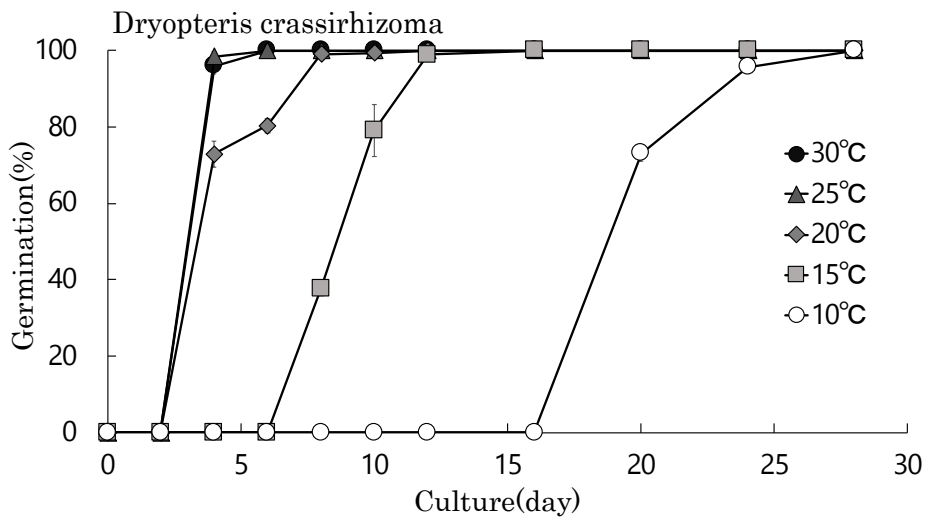


図 II-1-A-4 オシダの各温度条件による発芽率の推移 (エラーバーは標準偏差を示す)

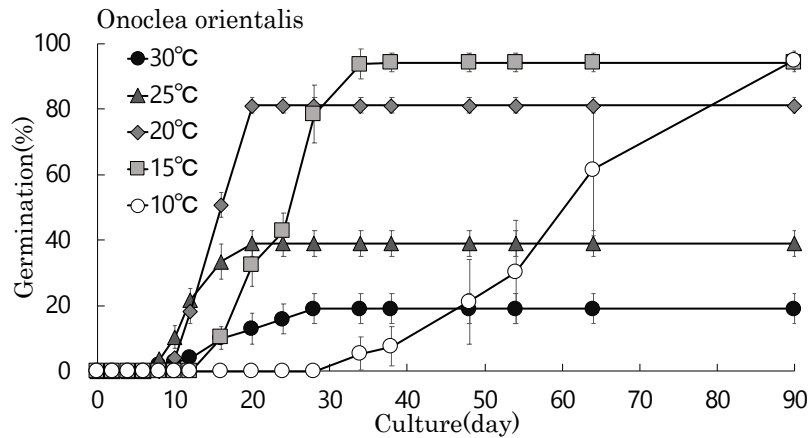


図 II-1-A-5 イヌガンソクの各温度条件による発芽率の推移 (エラーバーは標準偏差を示す)

表II-1-A-1 各種の温度条件と胞子の播種量と発芽率 (値は平均値, ±は標準偏差, 異なるアルファベットの文字は統計的有意差があることを示す。Tukey-Kramer test, $p < 0.01$)

| Species (Culture day) | Average spore seeding number | temperature (°C) | Cumulative germination rate(%) | Average germination days(日) |
|--|------------------------------------|---------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Dryopteris erythrosora</i> (48 days) | 90±37 | 30 | 47.6±2.4 | 9.8±0.4 ^b |
| | 92±41 | 25 | 45.0±4.0 | 8.9±0.8 ^a |
| | 100±30 | 20 | 40.8±4.7 | 12.2±0.3 ^c |
| | 84±33 | 15 | 48.3±3.9 | 18.2±0.4 ^d |
| | 80±38 | 10 | 43.8±4.4 | 26.3±1.0 ^e |
| <i>Dryopteris crassirhizoma</i> (28 days) | 352±103 ^a | 30 | 100±0 | 4.1±0.0 ^b |
| | 283±48 | 25 | 100±0 | 4.0±0.0 ^a |
| | 259±90 | 20 | 100±0 | 5.0±0.1 ^c |
| | 290±22 | 15 | 100±0 | 9.7±0.2 ^d |
| | 158±35 ^b | 10 | 100±0 | 21.2±0.1 ^e |
| <i>Onoclea orientalis</i> (90 days) | 197±49 | 30 | 19.1±4.6 ^d | 18.5±1.3 ^b |
| | 131±48 | 25 | 39.1±3.9 ^c | 13.6±0.4 ^a |
| | 139±69 | 20 | 81.2±2.4 ^b | 16.5±0.3 ^{ab} |
| | 170±77 | 15 | 94.2±2.8 ^a | 25.4±1.0 ^c |
| | 131±59 | 10 | 95.0±2.9 ^a | 55.4±3.2 ^d |

第3項：小括

平均発芽日数は、3種とも25℃が最も早く、25℃以外では発芽日数が遅れるため、早く発芽させるには25℃が適切な温度条件だと考えられる。しかし、3種とも10℃で発芽日数は遅くなるものの、最終発芽率は高い値を示していることから積算温度が孢子発芽に関係していると考えられる。今回の実験では積算温度の結果を孢子栽培に応用できるかはわからなかった。今後、積算温度に焦点を当てて実験を行うことで、孢子栽培に応用できるか判明すると考えられる。

ベニシダとオシダの累積発芽率は各条件間で有意な差が認められなかったため、10℃～30℃の範囲では温度条件が発芽率に与える影響は少ないと考えられる。Quintanilla et al. (2000)によるとシシガシラ科の *Woodwardia* 属の一種で温度条件ごとの発芽試験を行った結果、累積発芽率は各条件間で有意な差が認められず、ベニシダやオシダと同様の傾向を示した。また、Galán et al. (2011)によるとイノモトソウ科の *Jamesonia* 属の三種を対象に温度条件ごとの発芽試験を行った結果、累積発芽率は10℃で21.6%、15℃で37.5%、20℃で47.5%、各条件間において有意な差が認められたと報告されている($p < 0.01$)。したがって、孢子発芽に適切な温度条件は種によって異なると考えられる。また、ベニシダの発芽率が全条件において約45%と他種に比べて低くなった要因として、孢子的保存期間が関係している可能性がある。孢子的保存期間と発芽に関する既存研究では、ゼンマイの孢子が常温保存50日目、冷蔵保存155日目で発芽が確認されなかったと報告されている(古澤・中村, 2015)。本研究で使用したベニシ

ダの胞子は常温保存約 150 日目となり、胞子の保存が長期間または保存方法が発芽率の低下に起因していると考えられる。しかし、詳細な原因究明には至っていない。

イヌガンソクの最終発芽率は 10 °C と 15 °C で約 95% と最も高く、20 °C 以上になると低い値を示した。また、25 °C 以上で発芽率の低下が著しかったことから、イヌガンソクでは 20~30 °C の間で発芽の抑制が起きていると考えられる。スギナの胞子の発芽率は 20 °C で約 40%、30 °C では約 20% の値を示し(中谷ほか, 1996)、ワラビ (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn subsp. *Japonicum* (Nakai)) では 20 °C で約 80%、32 °C で約 60% の値を示した(嶋田, 1962)、今回の結果と類似した報告がある。また、発芽率の値が同じ温度条件下においてワラビの方が高いのは、スギナに比べワラビの分布域が南方にあることが関係していると考えられる。しかし、分布域と胞子発芽における温度条件の研究はほとんど行われておらず、研究を行うことでシダ植物の生態の解明に繋がると考えられる。とりわけ温度は胞子の発芽を決定する制限要因の一つに挙げられ(三井, 1982)、既存研究では種類によっては、地球温暖化などの気温上昇により分布域が変わる可能性があるとも報告されている(村上・森本・堀川, 2011)。

第Ⅱ-1-B：変温条件と孢子発芽の関係

変温実験を行うにあたり実験温度を検討した。日本は南北に長く四季を有するため同標高であっても、様々な気候が存在する。例えば、北海道の中頓別（標高約 25m）では1月の最高気温が約 2℃、最低気温が約 -25℃、平均気温が約 -7℃、神奈川県の小田原（標高約 14m）では1月の最高気温が約 15℃、最低気温が約 -2℃、平均気温が約 5℃、鹿児島県の種子島（標高約 25m）では1月の最高気温が約 21℃、最低気温が約 3℃、平均気温が約 12℃である。このように様々な気候が存在するため、変温実験を行うことであらかじめ栽培が可能な種を判定することや、孢子の播種時期を推定することが可能であると考えられる。例えば、ナスでは1日の温度が朝晩は低く（22℃）、日中に温度が上昇（28℃）することによって発芽率が上がると報告されている（一般社団法人日本種苗協会監修，2017）。他にも在来種を用いた変温の実験では、ニガナは明暗の両条件下とも 15℃/25℃（16 時間/8 時間）が恒温 20℃や 15℃に比べ発芽率が高い傾向にあった（近藤哲也，1993）。同様の結果がノアザミやオヘビイチゴにも見られたことから、種子が落ち葉などで光が遮られても変温の影響によって発芽する可能性が考えられる。前述したように暗発芽孢子は少ないため、変温が孢子発芽に起因する可能性は低いと考えられるが、野外における孢子播種を想定するならば必要な知見であると考えられる。また、野外では恒温条件はないに等しく、本研究での実験は孢子栽培の技術確立では重要な参考事例になると考えられる。例えば、春期に孢子散布を行う種は自然条件下では春期の気候の中で発芽する

ことになるため、冬期に孢子を野外播種することは自然条件下では存在しにくいと考えられる。しかし、種によっては冬期に孢子を野外播種することで前葉体期に夏期の厳しい暑さを避け、冬期が終わった瞬間から成長することで孢子栽培には利点がある可能性も考えられる。

第 1 項：実験方法

供試植物は従来から緑化植物として利用されているオシダ科オシダ属のベニシダ (*Dryopteris erythrosora* (D.C.Eaton) Kuntze.)、オシダ科ヤブソテツ属のオニヤブソテツ (*Cyrtomium falcatum* (L.f.) C.Presl subsp. *falcatum*)、昔より山菜として利用されているゼンマイ科ゼンマイ属のゼンマイ (*Osmunda japonica* Thunb.)、独特の葉形や耐凍性を有し今後の緑化植物として期待されているオシダ科オシダ属のオシダ (*Dryopteris crassirhizoma* Nakai) とした。ベニシダは常緑性で本州から琉球列島 (沖永良部島以北) の主に暖温帯の低山地の林下、オニヤブソテツは本州から琉球列島の海岸沿いに生育することが多く、ゼンマイは夏緑性で北海道から九州の山地林下や路傍に生育することが多い (海老原, 2016・2017; 田川, 1959)、オシダは夏緑性で南千島から四国 (徳島県) の主に冷温帯の山地林下に生育することが多い。ベニシダの孢子は 2020 年 7 月 2 日に東京都町田市で採取し、オニヤブソテツの孢子は 2019 年 5 月 25 日に神奈川県真鶴町で採取し、ゼンマイの孢子は 2020 年 4 月 23 日に神奈川県相模原市にて採取し、オシダの孢子は 2020 年 8 月 28 日に秋田県北秋田市にて採取した。

ゼンマイは冷凍保存だが他の 3 種は冷蔵保存した孢子を使用した。

採取した孢子葉は紙封筒に入れ、室温の暗所にて数日間風乾したのち孢子を採取した。採取した孢子は 70%エタノールで殺菌した硼珪酸ガラスのスクリー一瓶（口内径:14.5 mm×胴径: 24.0 mm×高さ:50 mm）に入れ、保存温度は 5°C（冷蔵），-18°C（冷凍）を設けた。

孢子の殺菌はクリーンベンチ内で行った。殺菌には 12%次亜塩素酸ナトリウム（株式会社松葉薬品）を希釈して、1%次亜塩素酸ナトリウムを作成し、これを孢子の入ったスクリー瓶に 10 ml 入れ 5 分間攪拌した。孢子は浸漬後、ろ過して滅菌水で 3 回洗浄した。ろ紙上の孢子を葉さじで集め、滅菌水に浸漬させ、30 分以内に培地へ播種した。

培地はスクロースが添加されていないムラシゲ・スクーグ培地の粉末培地（日本製薬株式会社）を使用した（以下 MS 培地）。蒸留水 1 l に粉末培地を溶かしたものを 1MS 濃度とし、500 ml を別の容器に移し蒸留水を 500 ml 加えることで濃度を 1/2MS に調整した。培地の pH は 6.00±0.05 に調整したのち、寒天粉末を濃度 0.7%になるよう加え、オートクレーブ（121 °C，20 分間）で滅菌処理を行った。

培地は滅菌処理後にクリーンベンチ内にて滅菌プラスチックシャーレ（直径 50.7 mm，高さ 14.7 mm）に 15 ml 分注し、常温になるまで放冷した。放冷後、殺菌した孢子をマイクロピペットで吸い取り、培地上の 5 ヲ所が等間隔になるように 1 滴ずつ播種した。なお、播種範囲は 1 滴あたり実体顕微鏡での観測視

野（縦 2.5 mm, 横 3 mm）に収まるように設定した。播種後シャーレの周囲に自己粘着フィルム（高機能被覆フィルム ラボピタ 20 mm×30 m）を 2 周ほど巻き密閉した。したがって、1 条件区につき 1 シャーレに 5 滴の孢子播種を行い反復は 3 回とした。

播種後のシャーレは 10 °C/10 °C・15 °C/15 °C・20 °C/20 °C・25 °C/25 °C・30 °C/30 °C・15 °C/5 °C・25 °C/15 °C・35 °C/25 °C に設定した温度勾配機(東京理化器械 EYELA MTI-202 他) 内に設置した。温度勾配機内の光量は 3,300 lux(明期 12 時間・暗期 12 時間) とした。播種後 61 日目に生存確認のため、全条件のシャーレを 25°C に移動した。

孢子発芽の観察には実体顕微鏡 (OLYMPUS SZ61) を使用した。発芽測定は各シャーレに播種した 5 滴のうち 1 カ所を測定箇所とし、顕微鏡用デジタルカメラ (OLYMPUS DP22) でシャーレ毎に播種後、1 か月間は週に 3 回行った。測定を行わなかった残り 4 箇所はコンタミネーションが発生した、もしくは播種した孢子数が著しく多いか少ない状態であった。温度勾配機内に設置した際にシャーレが重なった場合は数日おきにその順番を変えることで、シャーレが受ける光量に差が生じないように配慮した。発芽は撮影画像の孢子から緑色の原糸体が突出した時点とした。発芽率は発芽孢子と未発芽孢子を計数して式 1 にて算出した。また、平均発芽日数は式 2(中村ほか, 2009) にて算出した。発芽率は逆正弦変換を行い、各温度条件における最終発芽率の差の有無を一元配置分散分析で判定し、有意差を確認したうえで Tukey-Kramer の HSD 検定を行

った。また、平均発芽日数の差の有無も同様に検定を行った。

$$\text{発芽率(\%)} = 100 \times \Sigma n / N \quad (1)$$

$$\text{平均発芽日数(日)} = \Sigma(t \times n) / \Sigma n \quad (2)$$

N : 培地に播種した胞子数, n : 日毎の発芽した胞子数, t : 経過日数

第 2 項 : 実験結果

ベニシダの 14 日目の発芽率は 15°C/5°C, 10°C/10°Cでは 0%, 35°C/25°Cでは約 9%, それ以外の条件では 90%以上の値を示した。30 日目の発芽率は 15°C/5°Cでは約 50%, 10°C/10°Cでは約 30%, 35°C/25°Cでは約 12%の値を示した。

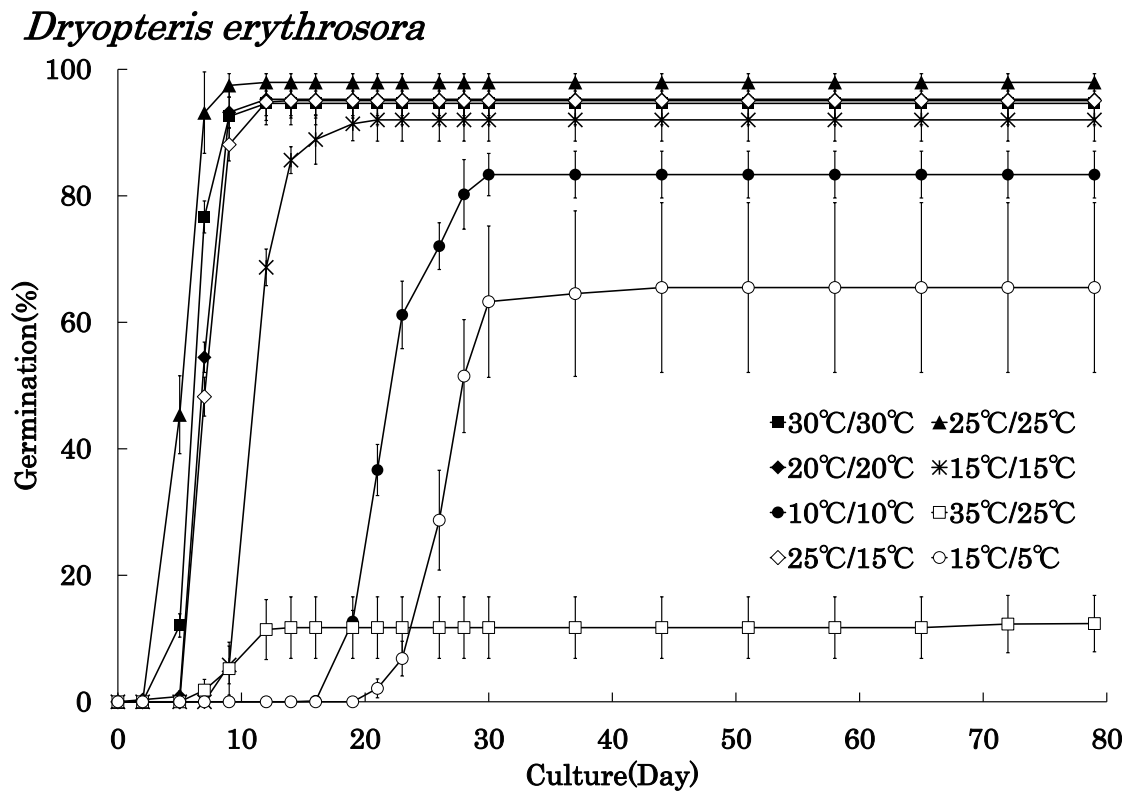


図 II-1-B-1 ベニシダの各温度条件による発芽率の推移 (エラーバーは標準偏差を示す)

オシダの 14 日目の発芽率は 35°C/25°C, 15°C/5°C, 10°C/10°Cでは 0%, それ以外の条件では 80%以上の値を示した。30 日目の発芽率は 15°C/5°Cでは約 50%, 10°C/10°Cでは約 90%, 35°C/25°Cでは 0%の値を示した。

Dryopteris crassirhizoma

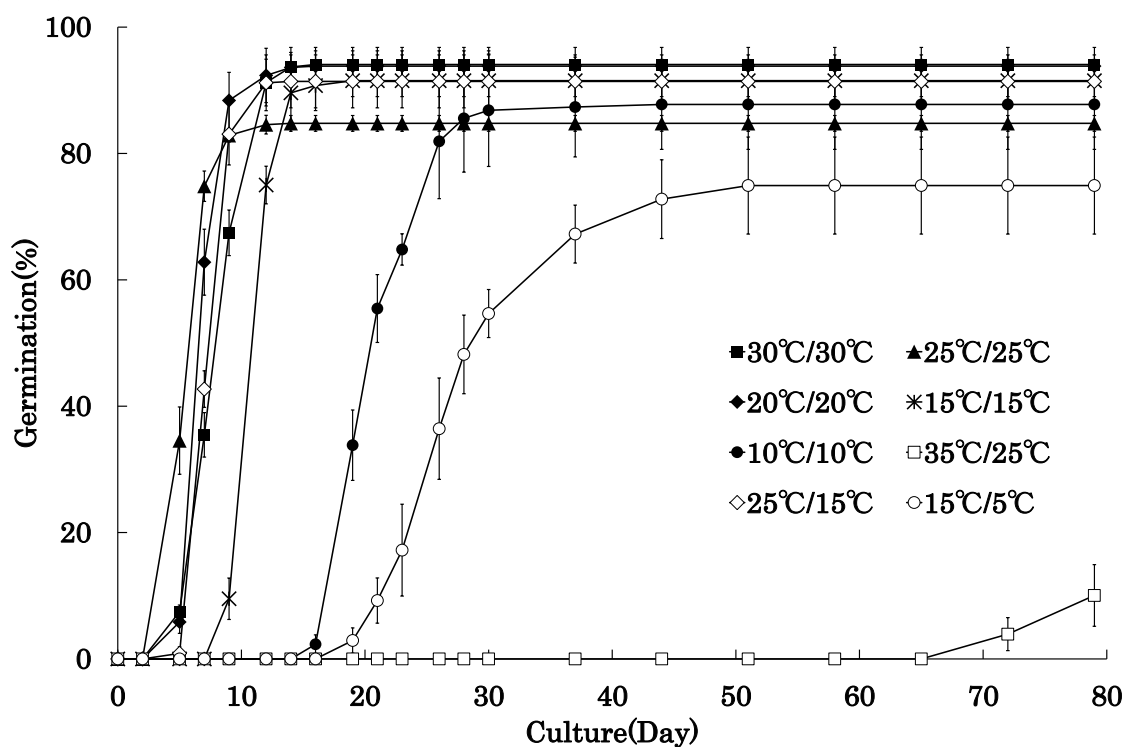


図 II-1-B-2 オシダの各温度条件による発芽率の推移 (エラーバーは標準偏差を示す)

オニヤブソテツの 14 日目の発芽率は 35°C/25°C, 15°C/5°C, 10°C/10°Cでは 0%, それ以外の条件では 80%以上の値を示した。30 日目の発芽率は 15°C/5°Cでは約 80%, 10°C/10°Cでは約 75%, 35°C/25°Cでは 0%の値を示した。

Cyrtomium falcatum

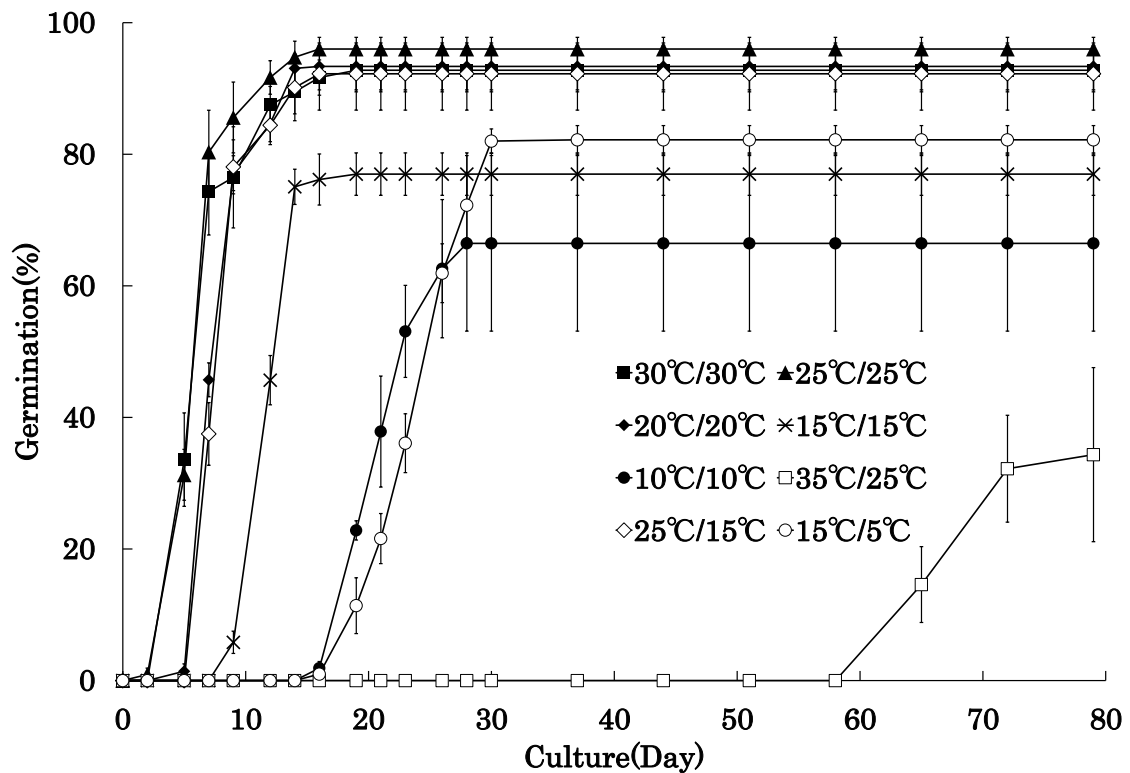


図 II-1-B-3 オニヤブソテツの各温度条件による発芽率の推移 (エラーバーは標準偏差を示す)

ゼンマイの14日目の発芽率は一番低いのは35°C/25°Cの約30%、一番高いのは25°C/25°Cの約50%の値を示した。30日目の発芽率は15°C/5°C, 10°C/10°Cで約15%の上昇が見られたが、発芽率は約50%以内であった。

Osmunda japonica

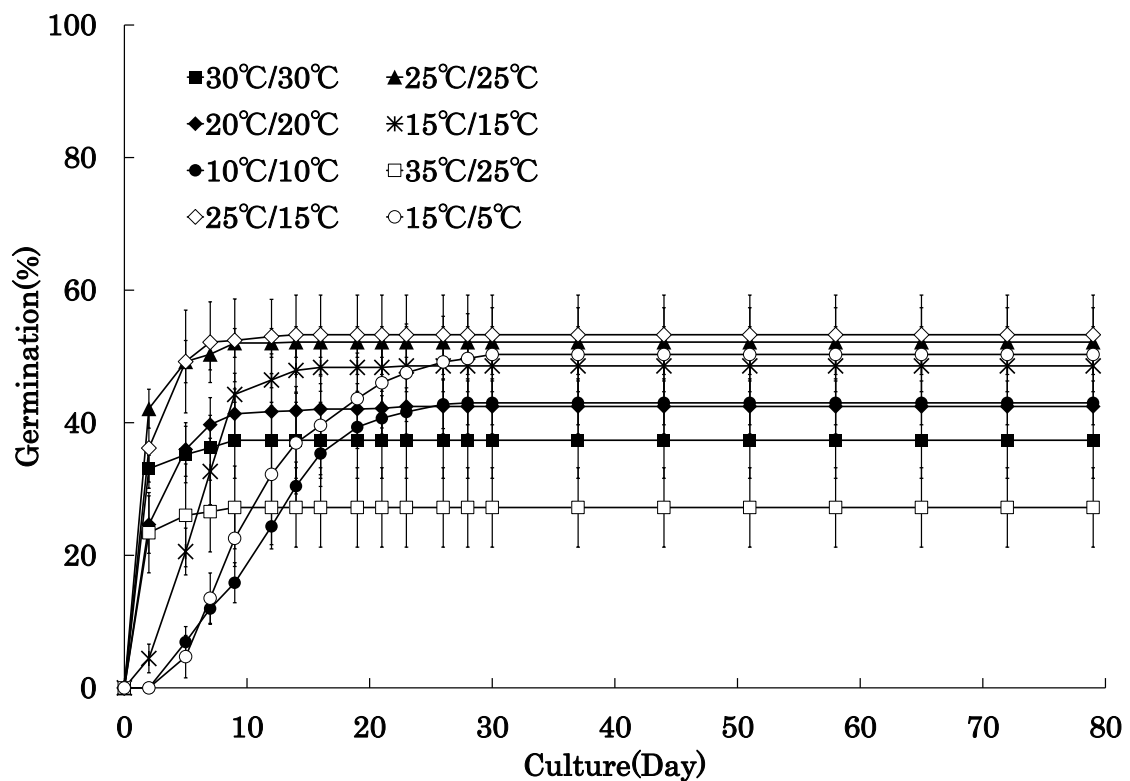


図 II-1-B-4 ゼンマイの各温度条件による発芽率の推移 (エラーバーは標準偏差を示す)

第3項：小括

ベニシダの14日目の発芽率は15°C/5°C, 10°C/10°Cでは0%, オシダ, オニヤブソテツの35°C/25°C, 15°C/5°C, 10°C/10°Cでは0%の値を示した。しかし, 30日後の35°C/25°C温度条件のみ発芽率が上昇せず, 30°C/30°Cでは発芽率が約80%以上の値を示している。したがって, 30~35°Cの間に発芽を阻害する可能性があると考えられる。また, ベニシダとオニヤブソテツの15°C/15°Cの発芽率は15°C/5°C, 10°C/10°Cに比べて早く発芽することから, 15°C未満で発芽を抑制する可能性があると考えられる。しかし, オシダのみが14日目の発芽率10°C/10°Cでは0%だったのが, 30日目には約90%の値を示した。した

がって、オシダは 10℃未満で発芽を抑制する可能性が考えられる。ベニシダ、オシダ、オニヤブソテツは変温による影響を受けることが考えられる。

ゼンマイは他の種に比べて違う結果を示したが、30 日目の発芽率に大きな差が生じなかった。ゼンマイの胞子は葉緑素を有しており、今回設定した 5~35℃での温度条件において影響をあまり受けないのは胞子自体による特徴だと考えられる。また、今回の実験での変温条件は温度が 30 分以内にはその温度に切り替わるため、段階的な加温や温度条件についても考慮する必要があると考えられる(吉田剛, 2016)。また、変温条件を設定する際に明期、暗期時に与える温度が違うことで、成長が異なる可能性も考えられる(GREENHOUSE GROWER, 1992)。

本研究の独自な結果として、シダ植物において【発芽の最適温度(Optimal temperature for germination)】、【発芽の可能温度(Possible temperature for germination)】、【発芽の抑制温度(Suppression temperature for germination)】が存在すると考えられる。このような定義は種子植物の場合では、(鷺谷, 1996)(鷺谷, 1997)が唱えているが、それはあくまでも種子植物を対象としているため、本研究のシダ植物を対象とした結果から得られた知見は独自のものである。今後は温度条件をさらに細かく設定することで、具体的な発芽の最適・可能・抑制温度が判明するものと考えられる。

第Ⅱ-2：光条件と孢子発芽の関係

孢子の発芽は適度の水・光・温度さえあれば発芽して成長するが、種類によって発芽の条件には違いが見られる（伊藤, 1972）。シダ植物の多くは孢子の発芽条件に光が関係しており、1950年代から様々な実験が行われている（石川茂雄ら, 1954）（嶋田, 1962）（菅井, 1973）。シダ植物も光発芽孢子においては種子植物と同様の傾向を示すことがわかっている（Weinberg & Eric & Voeller & Bruce, 1969）。種類によっては光を必要とせず、暗所でも発芽するものもある。例えば、コウヤワラビ科コウヤワラビ属コウヤワラビ (*Onoclea sensibilis* L.var.*interrupta* Maxim)の孢子は20~25℃では暗所で発芽しないが、28~35℃にすると大半が暗所でも発芽することが報告されている（伊藤, 1972）。また、光合成には最適温度があることがわかっており、種類によっては40℃以上で光合成速度が最適になる種類や、20℃で最適になる種類もある（Lincoln ら, 2017）。

本研究では光強弱が孢子の発芽と前葉体の形成との関係を明らかにすることを目的とする。



写真Ⅱ-2-1 上からの光を遮って、横から光を当てて育てると仮根が上面に伸びる様子

第Ⅱ-2-A：照度条件と孢子発芽の関係

第1項：実験方法

供試植物は従来から緑化植物として利用されているオシダ科オシダ属のベニシダ (*Dryopteris erythrosora* (D.C.Eaton) Kuntze.), オシダ科ヤブソテツ属のオニヤブソテツ (*Cyrtomium falcatum* (L.f.) C.Presl subsp.*falcatum*), 昔より山菜として利用されているゼンマイ科ゼンマイ属のゼンマイ (*Osmunda japonica* Thunb.) とした。ベニシダは常緑性で本州から琉球列島(沖永良部島以北)の主に暖温帯の低山地の林下, オニヤブソテツは本州から琉球列島の海岸沿いに生育することが多く, ゼンマイは夏緑性で北海道から九州の山地林下や路傍に生育することが多い(海老原, 2016・2017; 田川, 1959)。ベニシダの孢子は2019年6月26日に東京都町田市で採取, オニヤブソテツの孢子は2019年5月25日に神奈川県真鶴町で採取, ゼンマイの孢子は2019年4月18日に東京都町田市にて採取した。

採取した孢子葉は紙封筒に入れ, 室温の暗所にて数日間風乾したのち孢子を採取した。採取した孢子は70%エタノールで殺菌した硼珪酸ガラスのスクリー一瓶(口内径:14.5 mm×胴径:24.0 mm×高さ:50 mm)に入れ, ベニシダとオニヤブソテツは5℃(冷蔵)にて保存, ゼンマイは-18℃(冷凍)にて保存した孢子を使用した。

孢子の殺菌はクリーンベンチ内で行った。殺菌には12%次亜塩素酸ナトリウム(株式会社松葉薬品)を希釈して, 1%次亜塩素酸ナトリウムを作成し, これ

を胞子が入ったスクリー瓶に 10 ml 入れ 5 分間攪拌した。胞子は浸漬後，ろ紙でろ過して滅菌水で 3 回洗浄した。ろ紙上の胞子を葉さじで集め，滅菌水に浸漬させ，30 分以内に培地へ播種した。

培地はスクロースが添加されていないムラシゲ・スクーグ培地の粉末培地（日本製薬株式会社）を使用した（以下 MS 培地）。蒸留水 1 ℓ に粉末培地を溶かしたものを 1MS 濃度とし，500 ml を別の容器に移し蒸留水を 500 ml 加えることで濃度を 1/2MS に調整した。培地の pH は 6.00 ± 0.05 に調整したのち，寒天粉末を濃度 0.7% になるよう加え，オートクレーブ（121 °C，20 分間）で滅菌処理を行った。

培地は滅菌処理後にクリーンベンチ内にて滅菌プラスチックシャーレ（直径 50.7 mm，高さ 14.7 mm）に 15 ml 分注し，常温になるまで放冷した。放冷後，殺菌した胞子をマイクロピペットで吸い取り，培地上の 5 ヶ所が等間隔になるように 1 滴ずつ播種した。なお，播種範囲は 1 滴あたり実体顕微鏡での観測視野（縦 2.5 mm，横 3 mm）に収まるように設定した。播種後シャーレの周囲に自己粘着フィルム（高機能被覆フィルム ラボピタ 20 mm×30 mm）を 2 周ほど巻き密閉した。したがって，1 条件区につき 1 シャーレに 5 滴の胞子播種を行い反復は 5 回とした。

播種後のシャーレは恒温 25 °C に設定した温度勾配機（東京理化器械 EYELA MTI-202）内に設置した。温度勾配機内の照度条件は表 II-2-A-1 に示す。

胞子発芽の観察には実体顕微鏡（OLYMPUS SZ61）を使用した。発芽測定は

各シャーレに播種した 5 滴のうち 1 カ所を測定箇所とし、顕微鏡用デジタルカメラ (OLYMPUS DP22) で実験開始から 7 日目の胞子を撮影し、発芽率を算出した。測定を行わなかった残り 4 箇所はコンタミネーションが発生した、もしくは播種した胞子数が著しく多いか少ない状態であった。また、温度勾配機内に設置した際にシャーレが重なった場合は数日おきにその順番を変えることで、シャーレが受ける光量に差が生じないように配慮した。発芽は撮影画像の胞子から緑色の原糸体が突出した時点とした。発芽率は発芽胞子と未発芽胞子を計数して式 1 にて算出した。また、平均発芽日数は式 2(中村ほか, 2009)にて算出した。発芽率は逆正弦変換を行い、各条件における最終発芽率の差の有無を一元配置分散分析で判定し、有意差を確認したうえで Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。また、平均発芽日数の差の有無も同様に検定を行った。

$$\text{発芽率(\%)} = 100 \times \Sigma n / N \quad (1)$$

$$\text{平均発芽日数(日)} = \Sigma (t \times n) / \Sigma n \quad (2)$$

N : 培地に播種した胞子数, n : 日毎の発芽した胞子数, t : 経過日数

表 II-2-A-1 lux 条件と 1 日あたりの照射時間

| Illuminance | Hour in light(h/day) |
|-------------|-----------------------------|
| 100lux | |
| 1,000lux | 0,3,6,9,12,15,18,21,24hours |
| 10,000lux | |

第 2 項：実験結果

各条件の 7 日目の最終発芽率を図 II-2-A-1~3 に示す。ベニシダの 100lux 区において最終発芽率が最も高かったのは、1 日 21 時間照射で 71%の値を示した。1,000lux 区において最終発芽率が最も高かったのは、1 日 18 時間照射で 67%の値を示した。10,000lux 区において最終発芽率が最も高かったのは、1 日 9 時間照射で 38%の値を示した。その反面、ベニシダの 100lux 区において最終発芽率が最も低かったのは、1 日 3 時間照射で 24%の値を示した。1,000lux 区において最終発芽率が最も低かったのは、1 日 3 時間照射で 18%の値を示した。10,000lux 区において最終発芽率が最も低かったのは、1 日 3 時間照射で 12%の値を示した。最終発芽率が最も高い照射時間の条件区は照度によって異なったが、最終発芽率が最も低い照射時間の条件区は全 lux とも 1 日 3 時間照射であった。また、全条件の中で最終発芽率が最も高いのは 100lux 区の 1 日 21 時間照射で 71%、最も低いのは 10,000lux 区の 1 日 3 時間照射の 12%を示し、約 60%の差が生じた。

オニヤブソテツの 100lux 区において最終発芽率が最も高かったのは、1 日 24 時間照射で 44%の値を示した。1,000lux 区において最終発芽率が最も高かったのは、1 日 21 時間照射で 75%の値を示した。10,000lux 区において最終発芽率が最も高かったのは、1 日 18 時間照射で 36%の値を示した。その反面、オニヤブソテツの 100lux 区において最終発芽率が最も低かったのは、1 日 3 時間照射で 4%の値を示した。1,000lux 区において最終発芽率が最も低かったのは、1 日

3 時間照射で 18%の値を示した。10,000lux 区において最終発芽率が最も低かったのは、1 日 3 時間照射で 8%の値を示した。最終発芽率が最も高い照射時間の条件区は照度ごとに異なったが、最終発芽率が最も低い照射時間の条件区は全 lux とも 1 日 3 時間照射であった。また、全条件の中で最終発芽率が最も高いのは 1,000lux 区の 1 日 21 時間照射で 75%、最も低いのは 10,000lux 区の 1 日 3 時間照射の 8%を示し、約 65%の差が生じた。

ゼンマイの 100lux 区において最終発芽率が最も高かったのは、1 日 21 時間照射で 30%の値を示した。1,000lux 区において最終発芽率が最も高かったのは、1 日 24 時間照射で 75%の値を示した。10,000lux 区において最終発芽率が最も高かったのは、1 日 24 時間照射で 37%の値を示した。その反面、オニヤブソテツの 100lux 区において最終発芽率が最も低かったのは、1 日 3 時間照射で 14%の値を示した。1,000lux 区において最終発芽率が最も低かったのは、1 日 3 時間照射で 20%の値を示した。10,000lux 区において最終発芽率が最も低かったのは、1 日 3 時間照射で 21%の値を示した。最終発芽率が最も高い照射時間の条件区は照度ごとに異なったが、最終発芽率が最も低い照射時間の条件区は全 lux とも 1 日 3 時間照射であった。最終発芽率が最も高い照射時間の条件区は照度ごとに異なったが、最終発芽率が最も低い照射時間の条件区は全 lux とも 1 日 3 時間照射であった。また、全条件の中で最終発芽率が最も高いのは 1,000lux 区の 1 日 24 時間照射で 75%、最も低いのは 10,000lux 区の 1 日 3 時間照射の 14%を示し、約 60%の差が生じた。

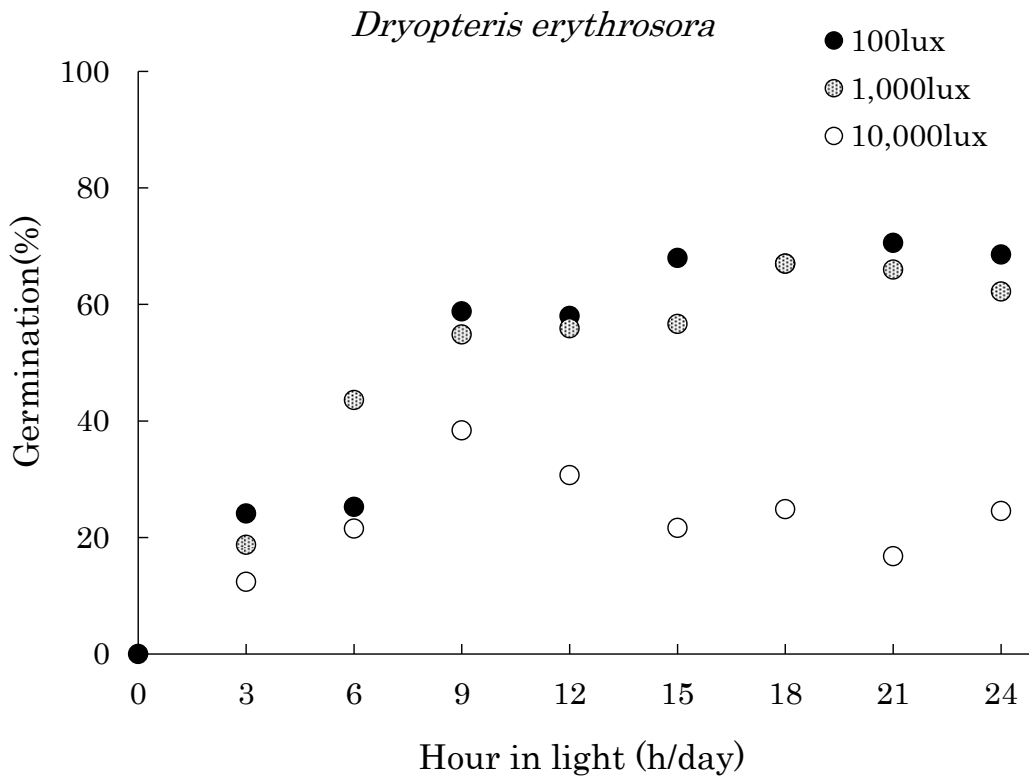


図 II-2-A-1 ベニシダの7日目における各条件の最終発芽率 (n=5)

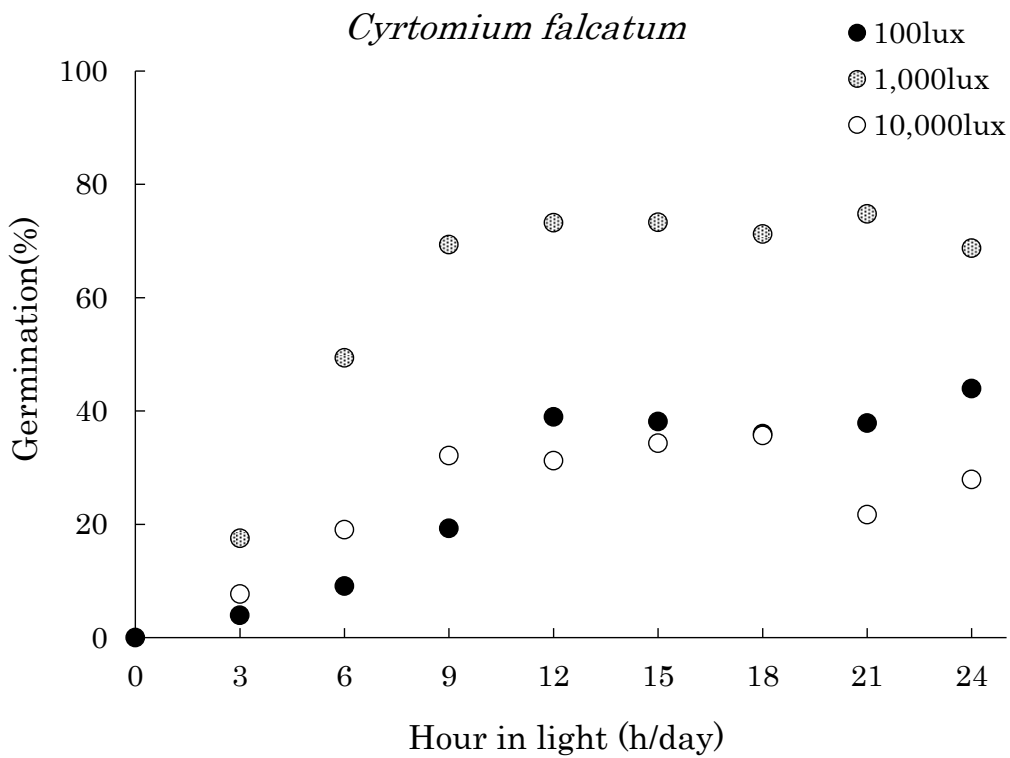


図 II-2-A-2 オニヤブソテツの7日目における各条件の最終発芽率 (n=5)

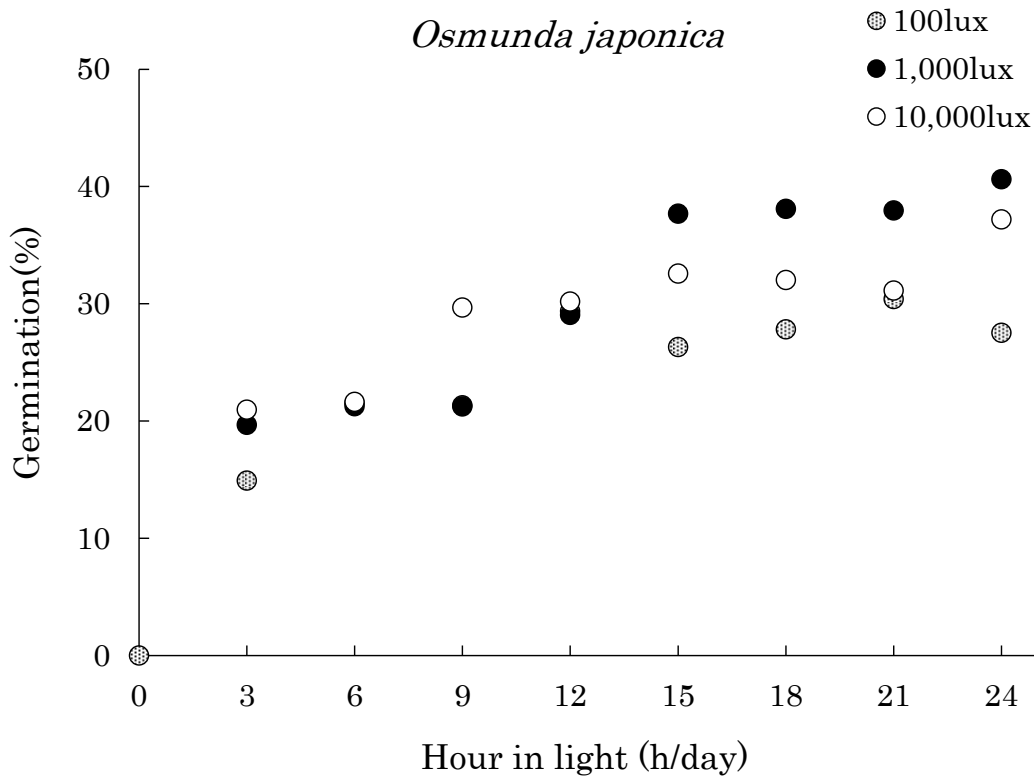


図 II-2-A-3 ゼンマイの7日目における各条件の最終発芽率 (n=5)

第3項：小括

ベニシダの最終発芽率が最も高い照射時間の条件区は照度ごとに異なり、100lux 区において最終発芽率が最も高かったのは1日21時間照射で71%、10,000lux 区では最も高い最終発芽率が1日9時間照射で38%と100lux 区と比べて30%以上の差が生じた。したがって、照射時間が長すぎる、もしくは照度が強すぎる場合は発芽を阻害する可能性があると考えられる。また、最終発芽率が最も低い照射時間の条件区は全luxとも1日3時間照射であったことから、発芽に必要な照射時間はある一定以上必要だと考えられる。

オニヤブソテツの最終発芽率が最も高い照射時間の条件区は照度ごとに異

なり 1,000lux 区において最終発芽率が最も高かったのは 1 日 21 時間照射で 75%、10,000lux 区では最も高い最終発芽率が 1 日 18 時間照射で 36%と 1,000lux 区と比べて約 40%の差が生じた。したがって、ベニシダ同様に照射時間が長すぎる、もしくは照度が強すぎる場合は発芽を阻害する可能性があると考えられる。しかし、オニヤブソテツの 100lux 区では 1 日あたり 24 時間照射が最も高い最終発芽率だったことから、100lux では照射時間が長くても発芽を阻害しない可能性が考えられる。また、最終発芽率が最も低い照射時間の条件区は全 lux とも 1 日 3 時間照射であったことから、発芽に必要な照度時間はある一定以上必要だと考えられる。

ゼンマイの 100lux 区において最終発芽率が最も高かったのは、1 日 21 時間照射で 30%の値を示した。1,000lux 区において最終発芽率が最も高いのは、1 日 24 時間照射で 75%の値を示した。したがって、照度時間が長くなるにつれて発芽率が高くなる傾向を示したが、10,000lux では照度が強すぎるため発芽を阻害する可能性が考えられる。また、ゼンマイでは 100lux 区において 24 時間照射よりも 21 時間照射の発芽率が高いことから、100lux 以上でないと発芽が開始しない可能性が考えられる。また、最終発芽率が最も低い照射時間の条件区は全 lux とも 1 日 3 時間照射のため、発芽に必要な照度時間はある一定以上必要だと考えられる。また、自然界の照度条件と温度条件の複合的な実験が必要だと考えられる(Boysen, 1982)。本研究では 6,9 時間から発芽率が上昇する傾向が確認されたが、日長が関係していると考えられる(日本施設園芸協会 (編集), 2015)。

第Ⅱ-2-B：光質条件と孢子発芽の関係

第1項：実験方法

供試植物は従来から緑化植物として利用されているオシダ科オシダ属のベニシダ (*Dryopteris erythrosora* (D.C.Eaton) Kuntze.)、オシダ科ヤブソテツ属のオニヤブソテツ (*Cyrtomium falcatum* (L.f.) C.Presl subsp.falcatum)、昔より山菜として利用されているゼンマイ科ゼンマイ属のゼンマイ (*Osmunda japonica* Thunb.) とした。ベニシダは常緑性で、本州から琉球列島(沖永良部島以北)の主に暖温帯の低山地の林下、オニヤブソテツは本州から琉球列島の海岸沿いに生育することが多く、ゼンマイは夏緑性で、北海道から九州の山地林下や路傍に生育することが多い(海老原, 2016・2017; 田川, 1959)。ベニシダは常緑性で、本州から琉球列島(沖永良部島以北)の主に暖温帯の低山地の林下、オニヤブソテツは本州から琉球列島の海岸沿いに生育することが多く、ゼンマイは夏緑性で、北海道から九州の山地林下や路傍に生育することが多い(海老原, 2016・2017; 田川, 1959)。ベニシダの孢子は2019年6月26日に東京都町田市で採取し冷蔵保存した。オニヤブソテツの孢子は2019年5月25日に神奈川県真鶴町で採取し、冷蔵保存した。ゼンマイの孢子は2019年4月18日に東京都町田市にて採取し、冷凍保存した。

採取した孢子葉は紙封筒に入れ、室温の暗所にて数日間風乾したのち孢子を採取した。採取した孢子は70%エタノールで殺菌した硼珪酸ガラスのスクリー瓶(口内径:14.5 mm×胴径:24.0 mm×高さ:50 mm)に入れ、ベニシダとオ

ニヤブソテツは 5°C（冷蔵）にて保存，ゼンマイは−18°C（冷凍）にて保存した胞子を使用した。

胞子の殺菌はクリーンベンチ内で行った。殺菌には 12%次亜塩素酸ナトリウム（株式会社松葉薬品）を希釈して，1%次亜塩素酸ナトリウムを作成し，これを胞子の入ったスクリー瓶に 10 ml 入れ 5 分間攪拌した。胞子は浸漬後，ろ過して滅菌水で 3 回洗浄した。ろ紙上の胞子を葉さじで集め，滅菌水に浸漬させ，30 分以内に培地へ播種した。

培地はスクロースが添加されていないムラシゲ・スクーグ培地の粉末培地（日本製薬株式会社）を使用した（以下 MS 培地）。蒸留水 1 l に粉末培地を溶かしたものを 1MS 濃度とし，500 ml を別の容器に移し蒸留水を 500 ml 加えることで濃度を 1/2MS に調整した。培地の pH は 6.00±0.05 に調整したのち，寒天粉末を濃度 0.7%になるよう加え，オートクレーブ（121 °C，20 分間）で滅菌処理を行った。

培地は滅菌処理後にクリーンベンチ内にて滅菌プラスチックシャーレ（直径 50.7 mm，高さ 14.7 mm）に 15 ml 分注し，常温になるまで放冷した。放冷後，殺菌した胞子をマイクロピペットで吸い取り，培地上の 6 ヶ所が等間隔になるように 1 滴ずつ播種した。なお，播種範囲は 1 滴あたり実体顕微鏡での観測視野（縦 2.5 mm，横 3 mm）に収まるように設定した。播種後シャーレの周囲に自己粘着フィルム（高機能被覆フィルム ラボピタ 20 mm×30 mm）を 2 周ほど巻き密閉した。播種後にコンタミネーションが発生しても観察ができるように，

1条件につき2シャーレ作成した。したがって、1条件区につき1シャーレに5滴の孢子播種を行い反復は5回とした。播種後のシャーレは温度勾配機内にて(株)MRTの植物育成LEDライトバーGCR-30-RGB(波長:450nm青色,660nm赤色)とGCR-30-NIR(波長:730nm遠赤色)の前にシャーレを設置し、温度条件は恒温25℃とした。

試験の実施は播種翌日の2019年7月20日,2019年7月24日から行い、試験開始まで個々のシャーレをアルミホイルで包み、光の照射を受けないようにした。試験期間は7日間とし、孢子播種後8日目以降は各波長条件下において24時間照射に切り替えた。光の波長の設定は青色(450nm),赤色(660nm),遠赤色(730nm)の3条件とし、1日当たりの照射時間は0,3,6,9,12,15,18,21,24時間の計9条件とした。また、試験の開始時間は午前7時30分,終了時間は午後7時30分とした(作業は±30分以内とした)。例えば、照射6時間の条件は毎7時30分にシャーレをアルミホイルから外し、各波長条件下において照射を行い、毎13時30分にアルミホイルで個々のシャーレを包み、暗期の状態をつくった。加えて、試験期間中の7日間は1日おきにシャーレの配置を並び替えることで、ライトの距離などによる影響が生じないように操作した。また、孢子播種後8日目以降は各光の波長条件下において、照射時間が短いものから順に光源に近い場所へ設置し、幼孢子体の経過観察を行うまでの期間中、固定の位置に設置した。

孢子発芽の観察には実体顕微鏡(OLYMPUS SZ61)を使用した。発芽測定は

各シャーレに播種した 12 滴のうち 1 カ所を測定箇所とし、倍率を 3.0 倍に設定し顕微鏡用デジタルカメラ (OLYMPUS DP22) でシャーレ毎に播種後から換算して 2~3 日間隔で行い、孢子播種後より約 2 週間で打ち切りとした。測定を行わなかった残り 7 箇所はコンタミネーションが発生した、もしくは播種した孢子数が著しく多いか少ない状態であった。また、各シャーレは播種後から前葉体計測まで一度も開封しておらず、ベニシダとオニヤブソテツは孢子播種後 76 日後、ゼンマイは孢子播種後 80 日後に目視で幼孢子体の個体数を計数した。温度勾配機内に設置した際にシャーレが重なった場合は数日おきにその順番を変えることで、シャーレが受ける光量に差が生じないように配慮した。

発芽は撮影画像の孢子から緑色の原糸体が突出した時点とした。発芽率は発芽孢子と未発芽孢子を計数して式 1 にて算出した。また、平均発芽日数は式 2 (中村・沖・足立, 2009) にて算出した。発芽率は逆正弦変換を行い、各条件における最終発芽率の差の有無を一元配置分散分析で判定し、有意差を確認したうえで Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。また、平均発芽日数の差の有無も同様に検定を行った。

$$\text{発芽率(\%)} = 100 \times \Sigma n / N \quad (1)$$

$$\text{平均発芽日数(日)} = \Sigma (t \times n) / \Sigma n \quad (2)$$

N : 培地に播種した孢子数, n : 日毎の発芽した孢子数, t : 経過日数

第 2 項：実験結果

ベニシダの累積発芽率は孢子播種後 6 日目の青色光（450nm）では照射 9 時間で最も高い 17.9%，照射 3 時間で最も低い 2.6%，赤色光（660nm）では照射 24 時間で最も高い 43.9%，照射 9 時間で最も低い 15.2%，遠赤色光（730nm）では照射 21 時間で最も高い 26.3%，照射 3 時間で最も低い 0%であった。照射 0 時間の条件ではどの波長でも発芽が確認できなかった。孢子播種後 13 日目の累積発芽率は、青色光では照射 15 時間で最も高い 83.7%，照射 3 時間で最も低い 60.1%，赤色光では照射 21 時間で最も高い 85.1%，照射 9 時間で 72.0%，遠赤色光では照射 18 時間で最も高い 79.3%，照射 12 時間で最も低い 59.8%であった。

ベニシダは全波長条件で孢子播種後 6 日目以降発芽率が上昇する傾向があった。また、孢子播種後 6 日目においては、青色光で各照射時間の発芽率のばらつきは小さいが、播種後 8 日目は、青色光で各照射時間の発芽率の最小値と最大値の差はおよそ 60%となった。遠赤色光は全照射時間条件において 24 時間照射に切り替えた後、発芽率が上昇する傾向があった。

孢子播種後 6 日目の累積発芽率は一元配置分散分析を用い、光の波長別に照射時間の中で有意な差が認められるか確認した。青色光の照射 3 時間と 9 時間の間に有意な差が認められたが ($p<0.001$)、赤色光の照射 12 時間、18 時間、21 時間と照射 24 時間の間には有意な差が見られなかった。遠赤色光照射の照射 15 時間と 21 時間の間に有意な差が認められた ($p<0.001$)。

また、照射時間別に光の波長間で有意差があるか確認した。照射 3 時間、9 時間、12 時間では赤色光と遠赤色光間で有意な差が認められた ($p<0.001$)。照射 9 時間では青色光と遠赤色光間で有意な差が認められた ($p<0.001$)。照射 15, 18, 21, 24 時間では青色光と赤色光間で有意な差が認められた ($p<0.001$)。

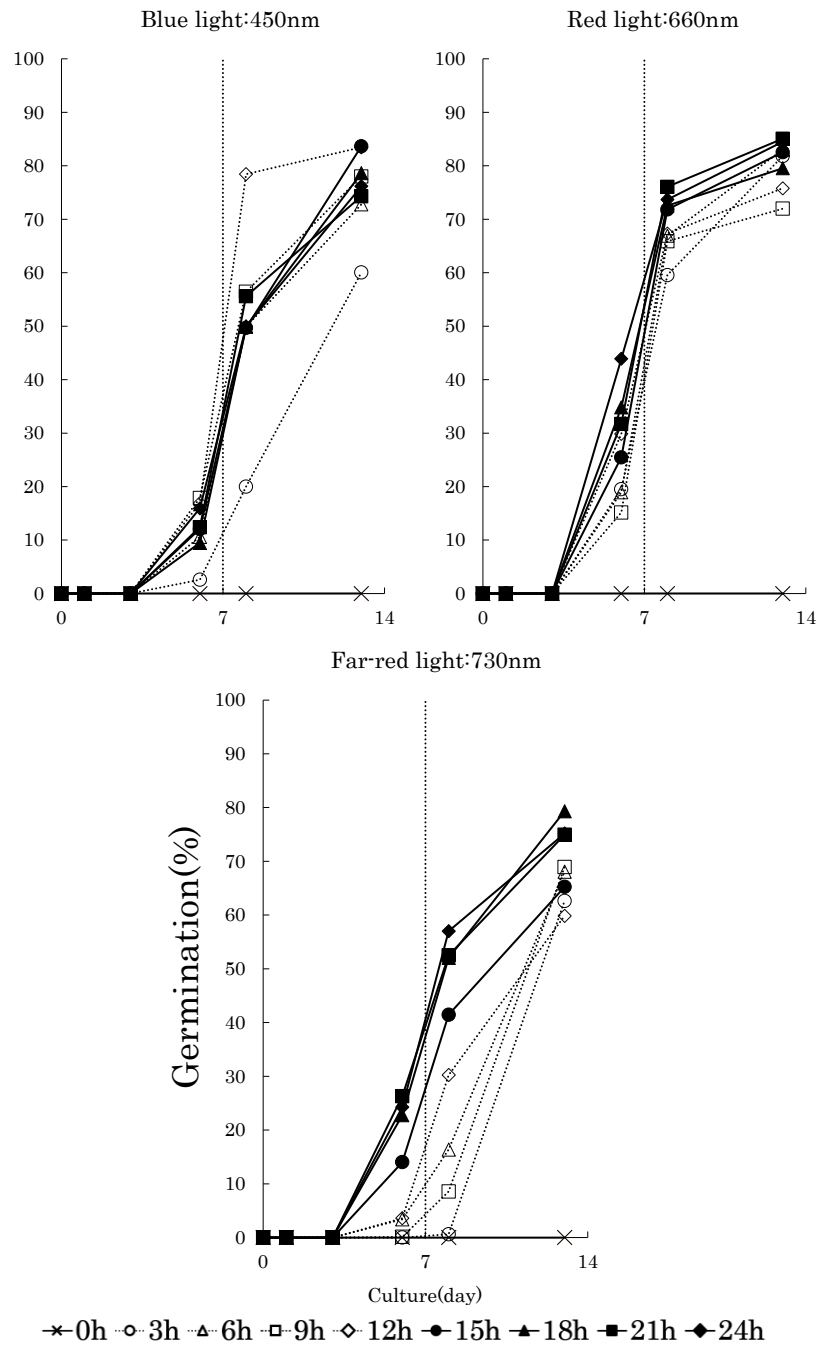


図 II-2-B-1 ベニシダの波長ごとの照射時間条件による発芽率の推移 (n=5)

表 II-2-B-1 ベニシダの波長ごとの照射時間条件による累積発芽率 (n=5)

| <i>Dryopteris erythrosora</i> | | | |
|-------------------------------|-----------------------|--|---|
| Wavelength of light | Hour in light (h/day) | Cumulative germination after 6days (%) | Cumulative germination after 12days (%) |
| 450nm | 0h | 0.0 | 0.0 |
| | 3h | 2.6 | 60.1 |
| | 6h | 10.6 | 72.8 |
| | 9h | 17.9 | 78.0 |
| | 12h | 16.9 | 83.5 |
| | 15h | 12.1 | 83.7 |
| | 18h | 9.5 | 78.6 |
| | 21h | 12.4 | 74.3 |
| | 24h | 15.9 | 76.2 |
| 660nm | 0h | 0.0 | 0.0 |
| | 3h | 19.5 | 81.8 |
| | 6h | 18.9 | 83.0 |
| | 9h | 15.2 | 72.0 |
| | 12h | 29.9 | 75.8 |
| | 15h | 25.5 | 82.6 |
| | 18h | 34.8 | 79.5 |
| | 21h | 31.7 | 85.1 |
| | 24h | 43.9 | 84.5 |
| 730nm | 0h | 0.0 | 0.0 |
| | 3h | 0.0 | 62.6 |
| | 6h | 3.4 | 68.1 |
| | 9h | 0.1 | 68.9 |
| | 12h | 3.6 | 59.8 |
| | 15h | 14.0 | 65.2 |
| | 18h | 22.8 | 79.3 |
| | 21h | 26.3 | 74.9 |
| | 24h | 24.3 | 75.2 |

オニヤブソテツの累積発芽率は播種後 6 日目の青色光 (450nm) では照射 24 時間で最も高い 70.2%, 照射 3 時間で最も低い 0.2% の値を示し, 赤色光 (660nm) では照射 24 時間で最も高い 88.5%, 照射 3 時間で最も低い 4.5% の値を示し, 遠赤色光 (730nm) では照射 21 時間で最も高い 10.4%, 照射 3, 6 時間で最も

低い 0%の値を示した。照射 0 時間の条件では全波長条件下にて発芽が確認できなかった。孢子播種後 13 日目の累積発芽率は青色光では照射 15 時間で最も高い 89.7%，照射 3 時間で最も低い 64.3%の値を示し，赤色光では照射 18 時間で最も高い 95.2%，照射 3 時間で最も低い 81.0%の値を示し，遠赤色光では照射 21 時間で最も高い 86.6%，照射 3 時間で最も低い 38.7%の値を示した。オニヤブソテツは青色光と赤色光において孢子播種後 3 日目以降に発芽率が上昇する傾向にあった。また，全波長条件下で照射時間が 3 時間と短い場合には発芽に時間を要した。

孢子播種後 6 日目の累積発芽率は一元配置分散分析を用い，光の波長別に照射時間の中で有意な差が認められるか確認した。青色光の照射 18 時間と 24 時間の間に有意な差が認められたが ($p < 0.001$)，赤色光の照射 6 時間と 24 時間の間に有意な差は見られなかった。遠赤色光の照射 12 時間と 21 時間の間に有意な差が認められた ($p < 0.001$)。また，孢子播種後 6 日目で照射時間別に光の波長間で有意差があるか確認した。照射 6 時間から 24 時間では赤色光と遠赤色光間で有意な差が認められた ($p < 0.001$)。照射 12 時間，18 時間，21 時間，24 時間では青色光と遠赤色光間で有意な差が認められた ($p < 0.001$)。照射 6 時間，9 時間，12 時間，18 時間では青色光と赤色光間で有意な差が認められた ($p < 0.001$)。

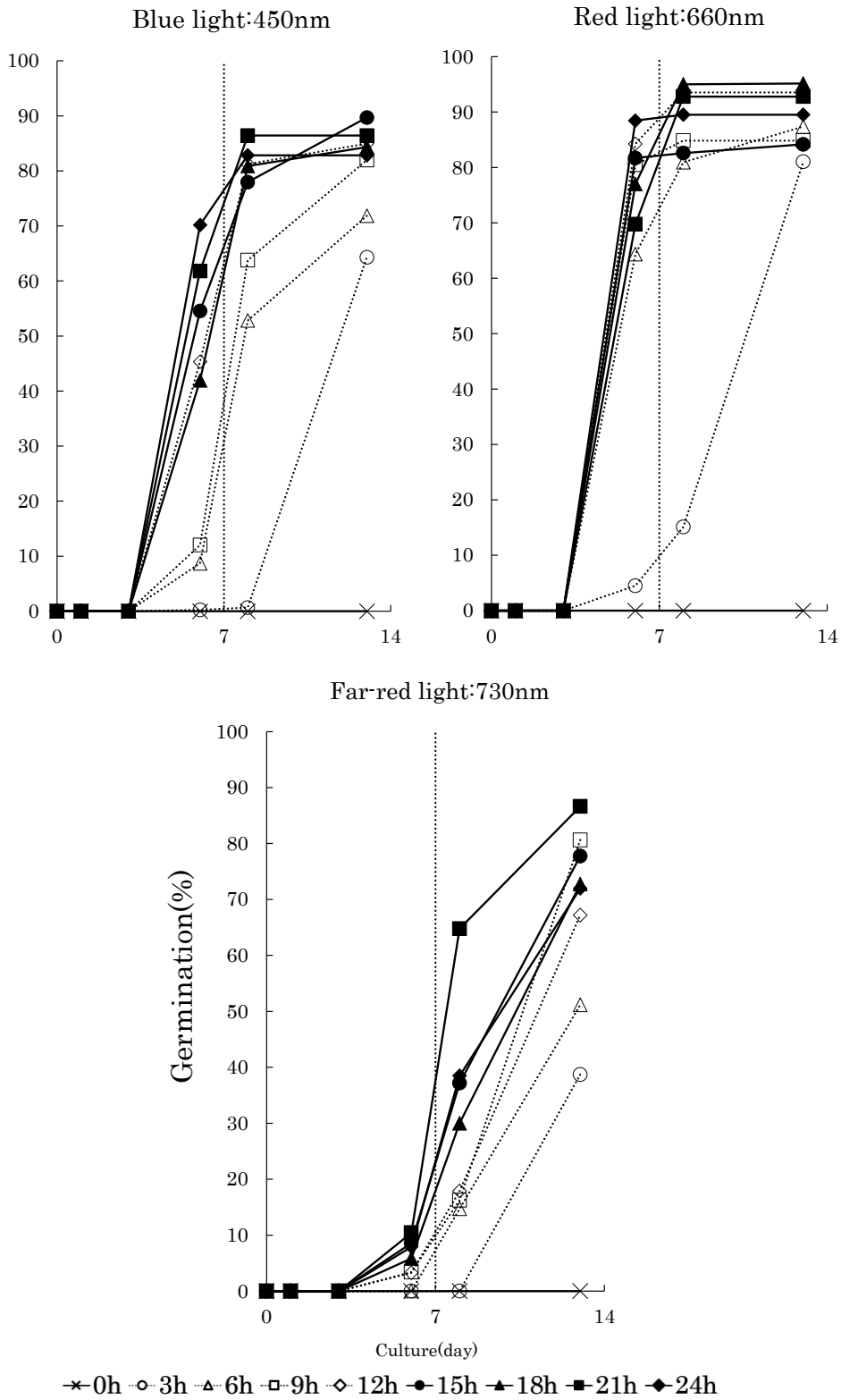


図 II-2-B-2 オニヤブソテツの波長ごとの照射時間条件による発芽率の推移 (n=5)

表 II-2-B-2 オニヤブソテツの波長ごとの照射時間条件による累積発芽率 (n=5)

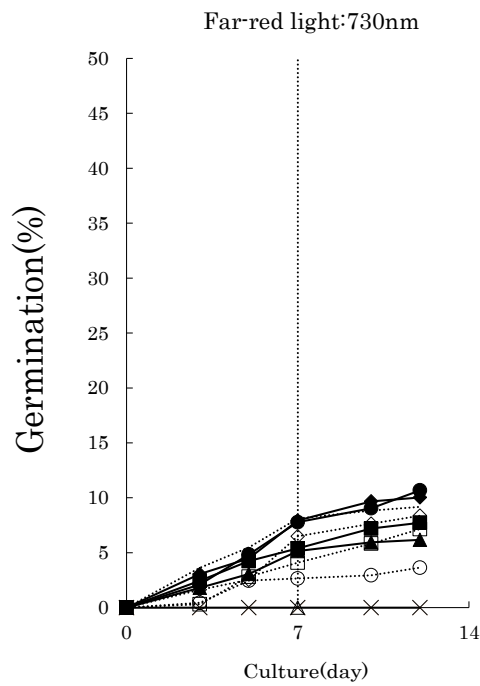
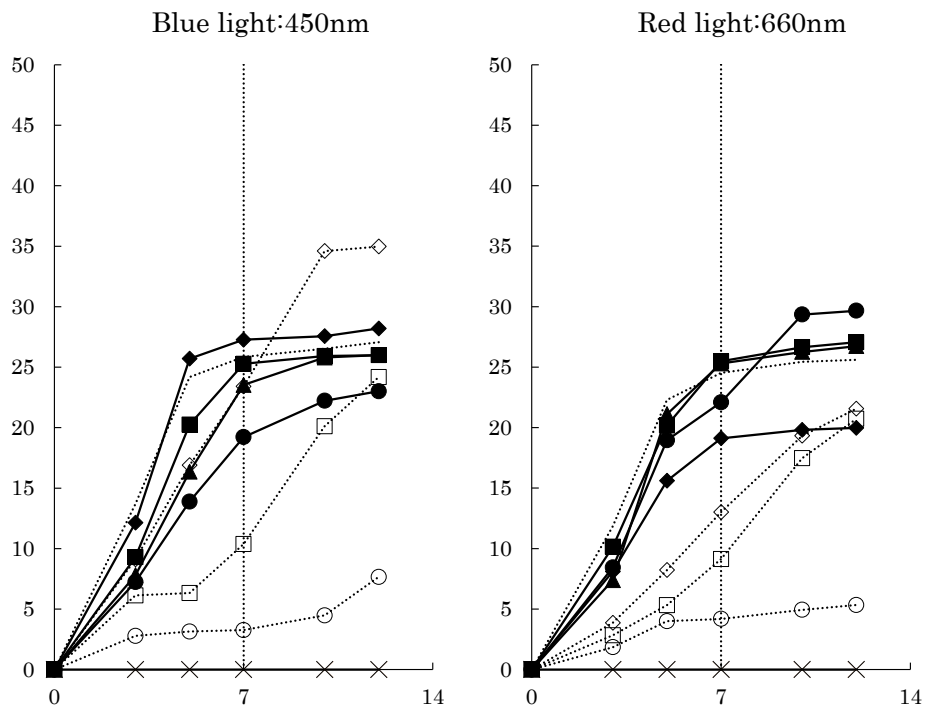
| <i>Cyrtomium falcatum</i> | | | |
|---------------------------|-----------------------|--|---|
| Wavelength of light | Hour in light (h/day) | Cumulative germination after 6days (%) | Cumulative germination after 12days (%) |
| 450nm | 0h | 0.0 | 0.0 |
| | 3h | 0.2 | 64.3 |
| | 6h | 8.7 | 71.9 |
| | 9h | 12.0 | 82.0 |
| | 12h | 45.3 | 85.0 |
| | 15h | 54.5 | 89.7 |
| | 18h | 41.9 | 84.3 |
| | 21h | 61.8 | 86.4 |
| | 24h | 70.2 | 82.8 |
| 660nm | 0h | 0.0 | 0.0 |
| | 3h | 4.5 | 81.0 |
| | 6h | 64.3 | 87.4 |
| | 9h | 80.5 | 84.8 |
| | 12h | 84.3 | 93.5 |
| | 15h | 81.7 | 84.2 |
| | 18h | 77.0 | 95.2 |
| | 21h | 69.7 | 92.8 |
| | 24h | 88.7 | 89.5 |
| 730nm | 0h | 0.0 | 0.0 |
| | 3h | 0.0 | 38.7 |
| | 6h | 0.0 | 51.2 |
| | 9h | 3.4 | 80.6 |
| | 12h | 3.3 | 67.2 |
| | 15h | 8.6 | 77.7 |
| | 18h | 5.8 | 72.7 |
| | 21h | 10.4 | 86.6 |
| | 24h | 7.9 | 72.0 |

ゼンマイの累積発芽率は孢子播種後 7 日目の青色光 (450nm) では照射 21 時間で最も高い 27.3%, 照射 3 時間で最も低い 3.3%であった。赤色光 (660nm) では照射 18 時間で最も高い 25.5%, 照射 3 時間で最も低い 4.2%であった。遠赤色光 (730nm) では照射 24 時間で最も高い 8.1%, 照射 3 時間で最も低い 2.7%であった。照射 0 時間の条件では発芽が確認できなかった。孢子播種後 12

日目の累積発芽率について、青色光では照射 9 時間で最も高い 35.0%，照射 3 時間で最も低い 7.7%であった。赤色光では照射 12 時間で最も高い 29.7%，照射 3 時間で最も低い 5.3%であった。遠赤色光では照射 12 時間で最も高い 10.7%，照射 3 時間で最も低い 3.6%であった。

ゼンマイは全波長条件で孢子播種後 7 日目の発芽率は 30%以下と低く、同時期に白色光環境下で生育した場合の播種後 7 日目における発芽率 65%より劣る結果となった。孢子播種後 7 日間においては、青色光と赤色光の照射 3~12 時間は発芽率が緩やかに上昇する傾向があった。播種後 8 日以降は、青色光と赤色光の照射 15~24 時間は発芽率がほぼ横ばいに推移した。

孢子播種後 7 日目の累積発芽率は一元配置分散分析を用い、光の波長別に照射時間の中で有意な差が認められるか確認した。青色光の照射 3 時間と 6 時間では有意差が見られなかったが、照射 3 時間と 9 時間から 24 時間では有意な差が認められた ($p < 0.001$)。赤色光の照射 6 時間と 3 時間、9 時間の間では有意差が見られなかったが、照射 6 時間と 12 時間から 24 時間では有意な差が認められた ($p < 0.001$)。遠赤色光の照射 3 時間と 12 時間、21 時間、24 時間の間に有意な差が認められた ($p < 0.001$)。また、照射時間別に光の波長間で有意差があるか確認した。照射 12 時間から 24 時間では赤色光と遠赤色光間で有意な差が認められた ($p < 0.001$)。照射 9 時間から 24 時間では青色光と遠赤色光間で有意な差が認められた ($p < 0.001$)。照射 21 時間では青色光と赤色光間で有意な差が認められた ($p < 0.001$)。



× 0h ○ 3h ▲ 6h □ 9h ◇ 12h ● 15h ▲ 18h ■ 21h ◆ 24h

図 II-2-B-3 ゼンマイの波長ごとの照射時間条件による発芽率の推移 (n=5)

表 II-2-B-3 ゼンマイの波長ごとの照射時間条件による累積発芽率 (n=5)

| <i>Osmunda japonica</i> | | | |
|-------------------------|-----------------------|--|---|
| Wavelength of light | Hour in light (h/day) | Cumulative germination after 6days (%) | Cumulative germination after 12days (%) |
| 450nm | 0h | 0.0 | 0.0 |
| | 3h | 3.3 | 7.7 |
| | 6h | 10.4 | 24.2 |
| | 9h | 23.4 | 35.0 |
| | 12h | 19.2 | 23.0 |
| | 15h | 23.4 | 26.0 |
| | 18h | 25.3 | 26.0 |
| | 21h | 27.3 | 28.2 |
| | 24h | 25.8 | 27.1 |
| 660nm | 0h | 0.0 | 0.0 |
| | 3h | 4.2 | 5.3 |
| | 6h | 9.1 | 20.7 |
| | 9h | 13.0 | 21.6 |
| | 12h | 22.1 | 29.7 |
| | 15h | 25.3 | 26.7 |
| | 18h | 25.5 | 27.1 |
| | 21h | 19.1 | 20.0 |
| | 24h | 24.5 | 25.6 |
| 730nm | 0h | 0.0 | 0.0 |
| | 3h | 2.7 | 3.6 |
| | 6h | 4.1 | 7.2 |
| | 9h | 6.5 | 8.4 |
| | 12h | 7.8 | 10.7 |
| | 15h | 5.2 | 6.2 |
| | 18h | 5.4 | 7.7 |
| | 21h | 7.9 | 10.0 |
| | 24h | 8.1 | 9.2 |

第3項：小括

ベニシダでは孢子播種後6日目において、青色光の照射3時間と9時間の間に有意な差が認められたが ($p<0.001$)、赤色光の照射12時間、18時間、21時間と照射24時間の間には有意な差が見られず、遠赤色光照射の照射15時間と21時間の間に有意な差が認められた ($p<0.001$)。したがって、450nm, 660nm, 730nmの照射で光の波長別に一日当たりの照射時間が発芽率に与える影響は光の波長によって異なると考えられる。

また、照射3時間、9時間、12時間では赤色光と遠赤色光間で有意な差が認められ ($p<0.001$)、照射9時間では青色光と遠赤色光間で有意な差が認められ ($p<0.001$)、照射15時間、18時間、21時間、24時間では青色光と赤色光間で有意な差が認められた ($p<0.001$)。したがって、一日当たりの照射時間が0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24時間の照射で光の波長が発芽率に与える影響は大きいと考えられる。

ベニシダの孢子栽培に適する光の波長や照射時間を導くことは難しい。しかし、24時間照射切り替え後の孢子播種後13日目では各光の波長、照射時間で約60%から80%の発芽率を示し、類似した傾向を示したため、孢子発芽の段階においては3つの波長とも適していると考えられる。既存研究ではシダの孢子は発芽に赤色光を必要とし、青色光は阻害的に作用する(加藤, 1962) のだが、ベニシダにおいては青色光も発芽に有効であると考えられる。

オニヤブソテツは孢子播種後6日目において、青色光の照射18時間と24時

間の方に有意な差が認められたが ($p < 0.001$), 赤色光の照射 6 時間と 24 時間の間に有意な差は見られず, 遠赤色光の照射 12 時間と 21 時間の間に有意な差が認められた ($p < 0.001$)。したがって, 450nm, 660nm, 730nm の照射で光の波長別に一日当たりの照射時間が発芽率に与える影響は光の波長によって異なると考えられる。

また, 照射 6 時間から 24 時間では赤色光と遠赤色光間で有意な差が認められ ($p < 0.001$), 照射 12 時間, 18 時間, 21 時間, 24 時間では青色光と遠赤色光間で有意な差が認められ ($p < 0.001$), 照射 6 時間, 9 時間, 12 時間, 18 時間では青色光と赤色光間で有意な差が認められた ($p < 0.001$)。したがって, 一日当たりの照射時間が 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 時間の照射で光の波長が発芽率に与える影響は大きいと考えられる。

オニヤブソテツの胞子栽培に適する光の波長や照射時間を導くことはベニシダ同様に難しいが, 24 時間照射切り替え後の胞子播種後 13 日目では赤色光の照射 3 時間から 24 時間で発芽率 80%以上を示したことから胞子発芽の段階においては赤色光が最も適していると考えられる。また, シダの胞子は発芽に赤色光を必要とし, 青色光は阻害的に作用するのだが(加藤, 1962), オニヤブソテツにおいては赤色光に加え, 青色光も発芽に有効であると推察される。

ゼンマイは胞子播種後 7 日目において, 青色光の照射 3 時間と 6 時間では有意差が見られなかったが, 照射 3 時間と 9 時間から 24 時間では有意な差が認められ ($p < 0.001$), 赤色光の照射 6 時間と 3 時間, 9 時間の間では有意差が見ら

れなかったが、照射 6 時間と 12 時間から 24 時間では有意な差が認められ ($p < 0.001$)、遠赤色光の照射 3 時間と 12 時間、21 時間、24 時間の間に有意な差が認められた ($p < 0.001$)。したがって、450nm, 660nm, 730nm の照射で光の波長別に一日当たりの照射時間が発芽率に与える影響は光の波長によって異なると考えられる。

また、照射 12 時間から 24 時間では赤色光と遠赤色光間で有意な差が認められ ($p < 0.001$)、照射 9 時間から 24 時間では青色光と遠赤色光間で有意な差が認められ ($p < 0.001$)、照射 21 時間では青色光と赤色光間で有意な差が認められた ($p < 0.001$)。したがって、一日当たりの照射時間が 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 時間の照射で光の波長が発芽率に与える影響は大きいと考えられる。

ゼンマイの孢子栽培に適する光の波長や照射時間を導くことは難しいが、青色光と赤色光は発芽率の推移が類似した傾向を示し、遠赤色光は 24 時間照射切り替え後も発芽率が著しく劣った。シダの孢子は発芽に赤色光を必要とし、青色光は阻害的に作用するのだが、ゼンマイにおいては赤色光に加え、青色光も発芽に有効であると考えられる。

また、原糸体にはネオクロムと呼ばれる色素タンパク質 (光受容体) が含まれると報告されており(石井ほか, 2009) , これはゼンマイにおいても含まれる可能性がある(坂巻義章, 2005) 。したがって、ゼンマイの発芽が赤色光と青色光で有効だったのはネオクロムが関係していると考えられる。

第Ⅱ-3：生育基盤・培地条件と孢子発芽の関係

第Ⅱ-3-A：生育基盤と孢子発芽の関係

第1項：実験方法

供試植物は、オシダ科オシダ属のベニシダとオシダ科ヤブソテツ属のオニヤブソテツとした。ベニシダとオニヤブソテツは同科同属であるが、生育立地が異なる。ベニシダは常緑性で本州から琉球列島（沖永良部島以北）の常緑広葉樹林帯の林下、オニヤブソテツは常緑性で、本州から琉球列島の海岸沿いに生育することが多い（海老原, 2017；田川, 1959）。実験に使う個体は両種とも2015年12月に大分県速見郡で山採りを行い、2017年3月から東京都世田谷区の東京農業大学構内の圃場にてスリットコンテナ（直径15cm, 深さ13cm, TO-SC150, 東海化成）を使用し育成管理した。育成期間中は全個体とも屋外にて黒色の遮光率75%の寒冷紗下にて同一の管理を行った。個体ごとの株の大きさや孢子囊群（以下、ソーラスとする）の色、成熟度合については目視と写真にて観察、記録を行ったが外見上に大きな差は確認されなかった。両種の孢子は2017年6月7日に東京農業大学世田谷区キャンパス内の圃場にてメスを用いてソーラスが褐色かつ胞膜が剥がれていないものを植物体から採取し、薬包紙内に集めて封入した。1個体からソーラスを1反復3個とし、5反復分の15ソーラスを両種それぞれ採取した。採取したソーラスは暗所にて3日間風乾し、ソーラスから裂開して出てきた孢子を実験に用いた。

プラスチックシャーレ（滅菌ディスポシャーレ（PS製）直径56mm, 高さ

16mm) にミズゴケ，バーミキュライト，石灰石，赤玉土，軽石，鹿沼土，黒ボク土の基盤をそれぞれ充填した(日本施設園芸協会 (編集), 2015)。ミズゴケは既存の状態だと形が揃っていないため，乾燥させた状態で 1.00g 計測して一昼夜浸水させ，ミキサーで粉碎し，シャーレに充填した。これらのシャーレに胞子を均等に播き，温度条件を 25°C 恒温，光条件を明条件 16 時間 (11,000lux)，暗条件 8 時間に設定した人工気象器 (日本医科器械製作所 (株) SK-101R LH-240S) 内に設置した。室内実験は同大学構内にて行った。また，灌水は高・中・低の灌水条件に分け，灌水頻度を高では 2 日毎に 1 ml 灌水し，中では 5 日毎に 2.5ml 灌水し，低では 10 日毎に 5ml 灌水した。

胞子発芽の観察にはコンパクトデジタルカメラ (Tough TG-5) を使用し，定位置よりシャーレの上から 10 日おきに撮影を行った。発芽は撮影画像の胞子から緑色の原糸体が突出した時点とした。胞子の発芽は撮影した画像を画像処理ソフト ImageJ (Schneider et al., 2012) (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) の画像解析により，前葉体の部分のみを被覆面積 (mm^2) として抽出を行い，胞子発芽の指標とした。

前葉体の生育試験は胞子播種後 30 日目，45 日目，60 日目の前葉体を同基盤条件の区に植え替えを行った。発芽試験より成長した横幅 1mm 程度の前葉体を 1 反復につき 15 個体，3 から 5 繰り返しとして植え替え実験を行った。植え替え後に前葉体の個体数，前葉体の横幅 (mm)，幼胞子体形成数を測定項目とした。

表Ⅱ-3-A-1 各生育基盤の情報について

| | Andosol | Limestone | Vermiculite | Sphagnum | Akadama soil | Kanuma soil | Pumice |
|-------------|---------|-----------|-------------|----------|--------------|-------------|--------|
| pH | 5.4 | 8.42 | 6~7 | 4.8 | 6 | 6.02 | 6.42 |
| EC(ms/cm) | 0.42 | 0.03 | 0.19 | 0.13 | 0.58 | 0.28 | 0.09 |
| C/N ratio | 12.9 | - | - | 67.7 | 8.2 | 5.2 | - |
| Total N | 0.52 | 0 | 0 | 0.63 | 0.28 | 0.2 | 0 |
| Porosity(%) | 83 | 70.7 | 70.7 | 95.4 | 84.4 | 91.9 | 69.4 |

表Ⅱ-3-A-2 灌水条件について

| Irrigation conditions | frequency | amount(ml) |
|-----------------------|----------------|------------|
| High | Once in 2days | 1 |
| Middle | Once in 5days | 2.5 |
| Low | Once in 10days | 5 |

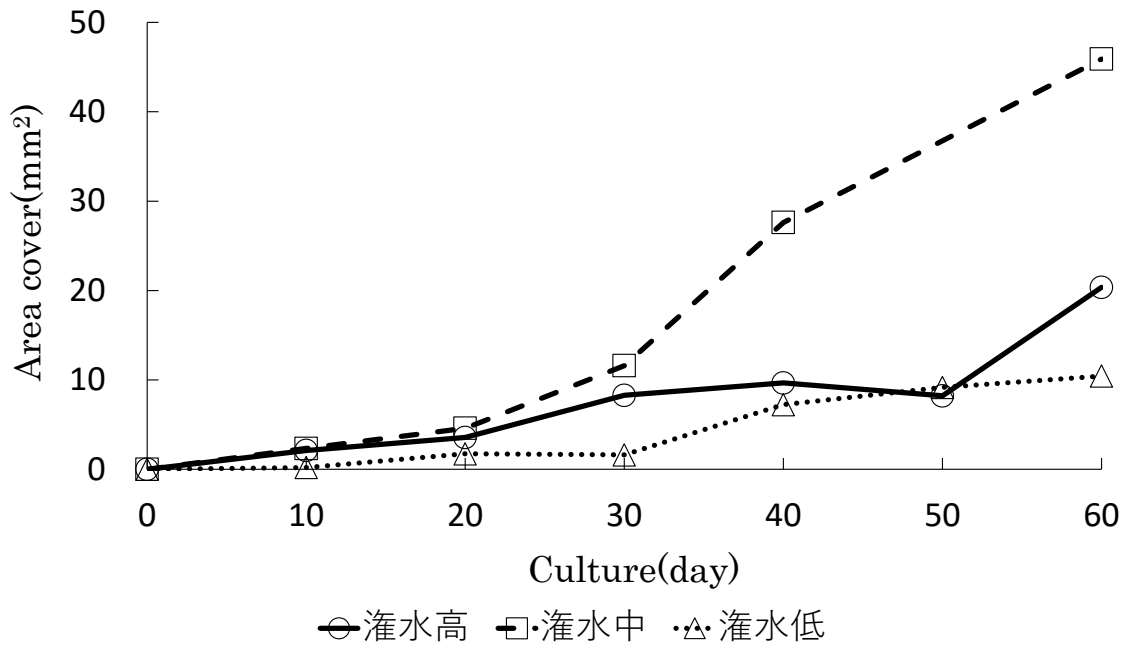
第2項：実験結果

前葉体による基盤ごとの平均被覆面積を計時変化で示したグラフをベニシダにおいては図Ⅱ-3-A-1，オニヤブソテツは図Ⅱ-3-A-2に示す。ベニシダで発芽が最初に確認されたのは黒ボク土と鹿沼土の10日目，最も遅いのは40日目のバーミキュライトで30日間の差があった。オニヤブソテツで発芽が最初に確認されたのは黒ボク土と石灰石とミズゴケと赤玉土の20日目，残りのバーミキュライトと鹿沼土と軽石は30日目で発芽し，その差は10日間であった。また，両種共に灌水頻度低の区では発芽が他の灌水頻度条件よりも遅れる，もしくは平均被覆面積が小さい傾向にあった。

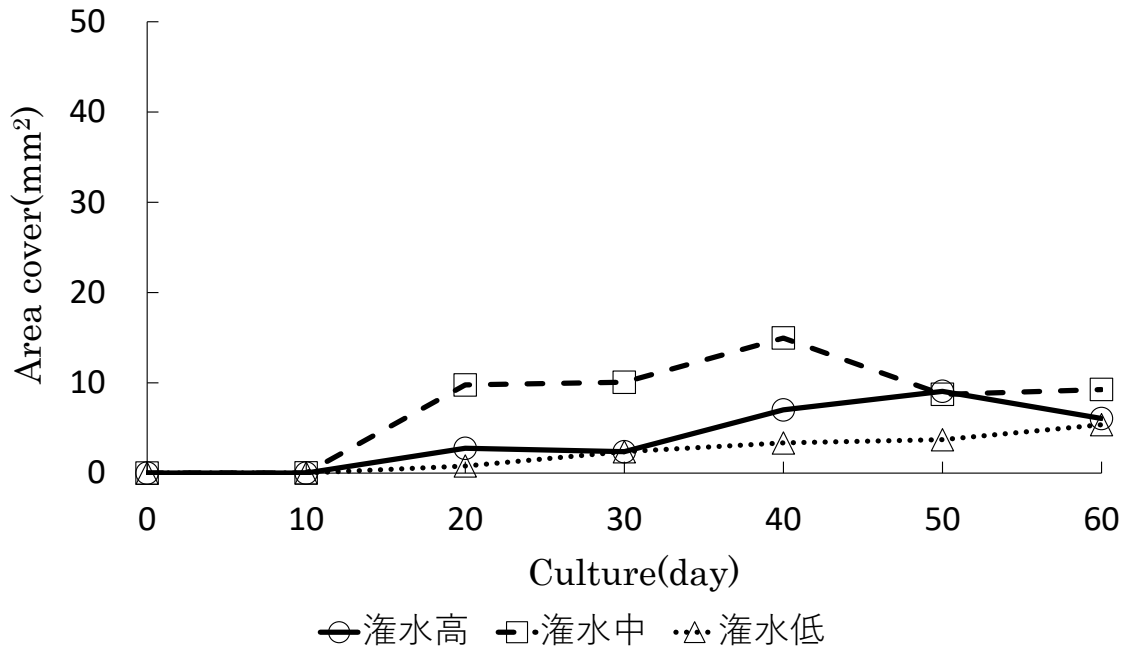
経過日数 60 後の灌水条件ごとの平均被覆面積を示したグラフをベニシダにおいては図 II-3-A-3, オニヤブソテツは図 II-3-A-4 に示す。ベニシダの平均被覆面積においては灌水頻度と各生育基盤で有意な差が認められなかった。オニヤブソテツの平均被覆面積においては軽石の生育基盤のみ灌水頻度高と中との間に有意な差が認められた ($p < 0.05$)。また, 灌水頻度高の黒ボク土が石灰石以外の区と有意な差が認められた ($p < 0.05$)。

経過日数 60 後の各生育基盤の平均被覆面積を示したグラフをベニシダにおいては図 II-3-A-5, オニヤブソテツは図 II-3-A-6 に示す。ベニシダ, オニヤブソテツの平均被覆面積は両種ともに黒ボク土が最も高い値を示した。また, ベニシダでは黒ボク土とそれ以外の生育基盤の区で有意な差が認められた ($p < 0.05$)。オニヤブソテツでは黒ボク土が鹿沼土と軽石の区で有意な差が認められた ($p < 0.05$)。

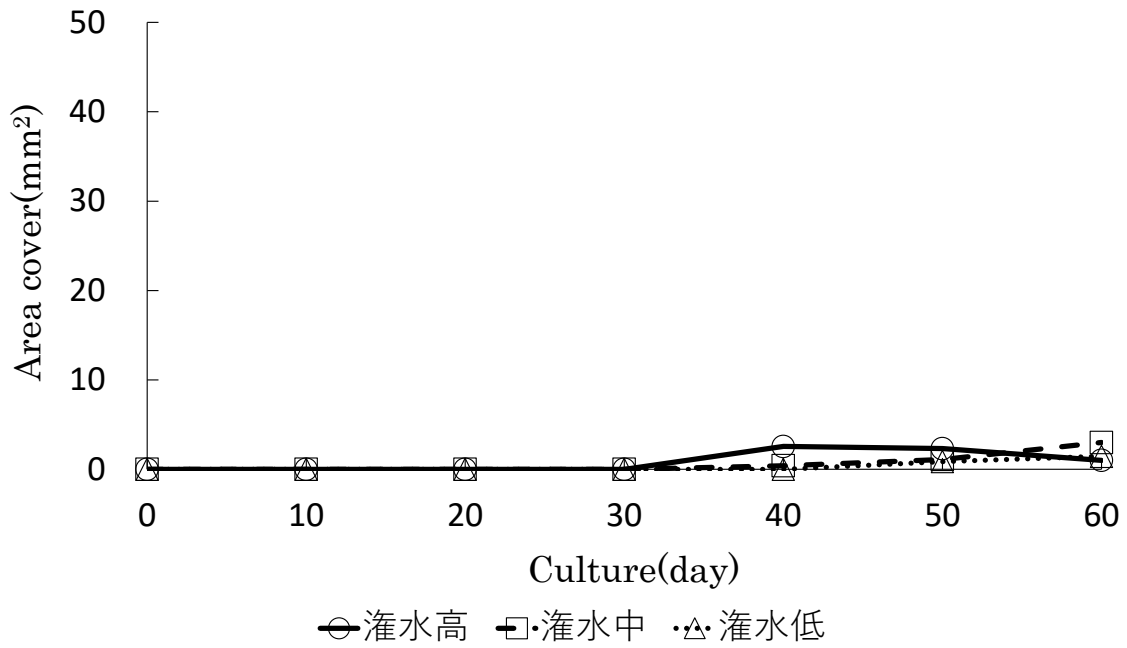
Andosol: *Dryopteris erythrosora* n=5



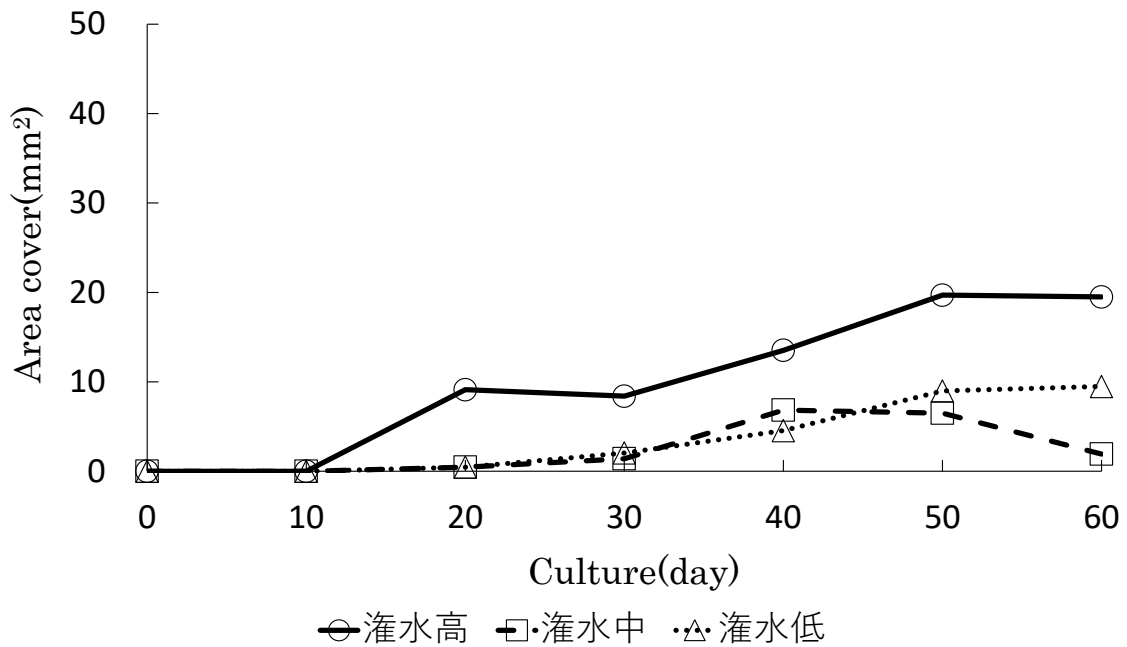
Limestone: *Dryopteris erythrosora* n=5



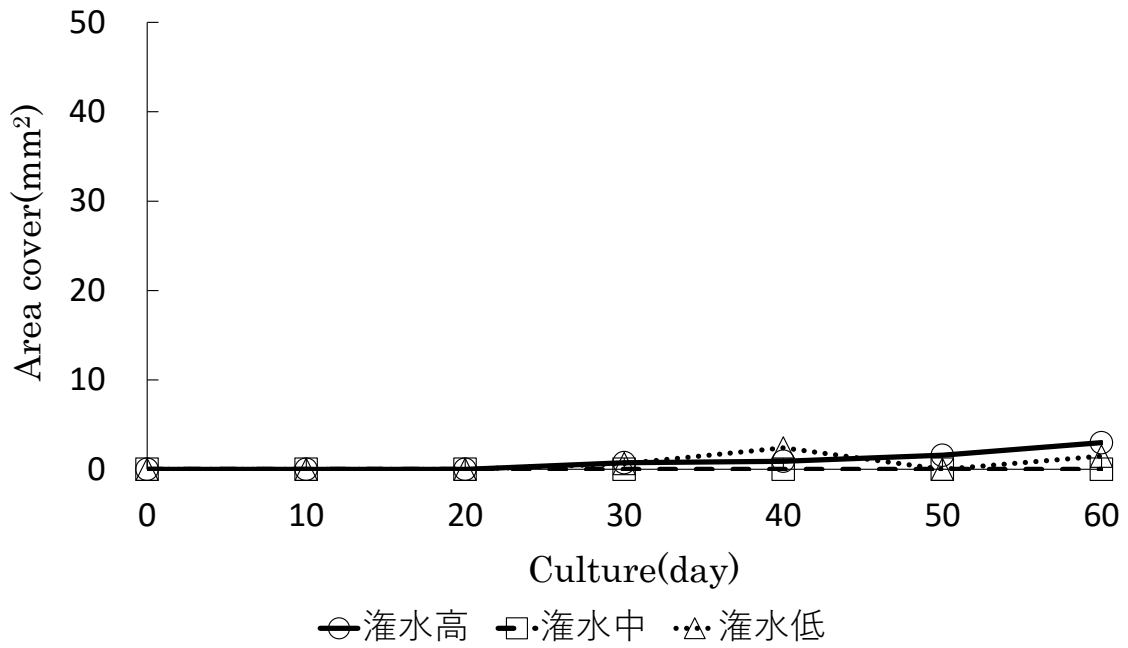
Vermiculite: *Dryopteris erythrosora* n=5



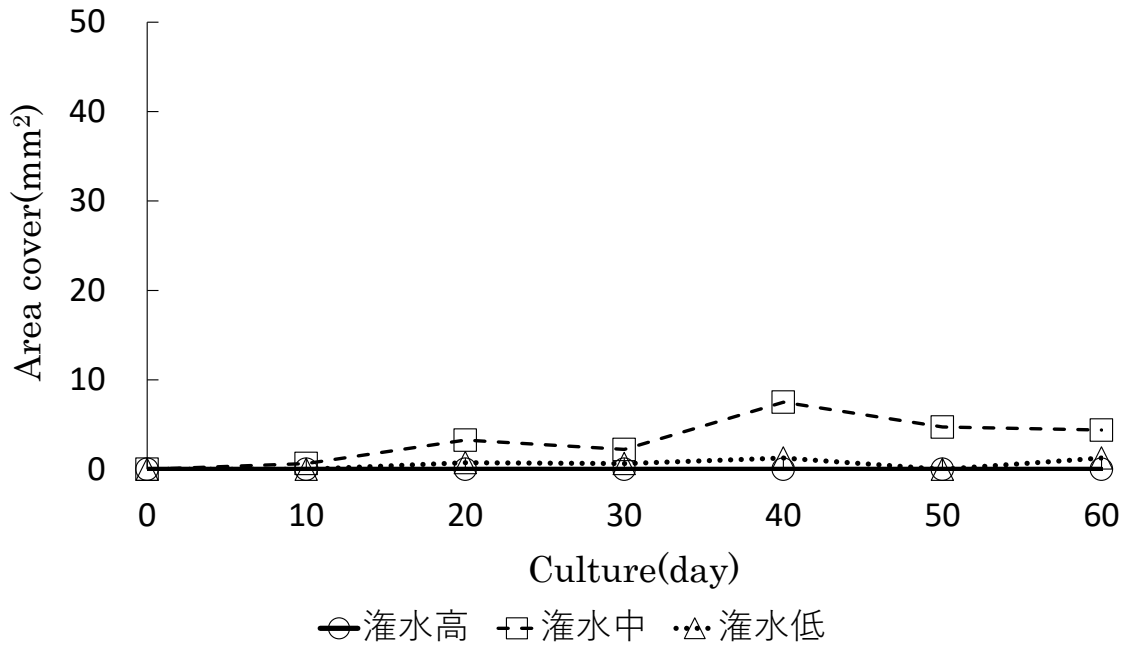
Sphagnum: *Dryopteris erythrosora* n=5



Akadama soil: *Dryopteris erythrosora* n=5



Kanuma soil: *Dryopteris erythrosora* n=5



Pumice: *Dryopteris erythrosora* n=5

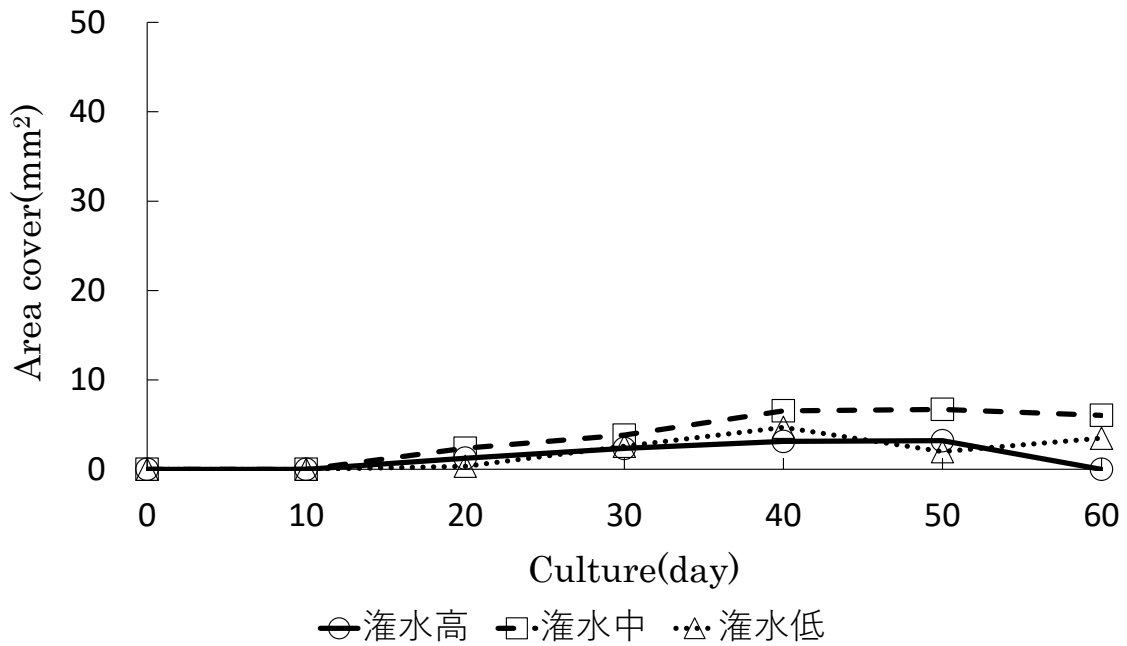
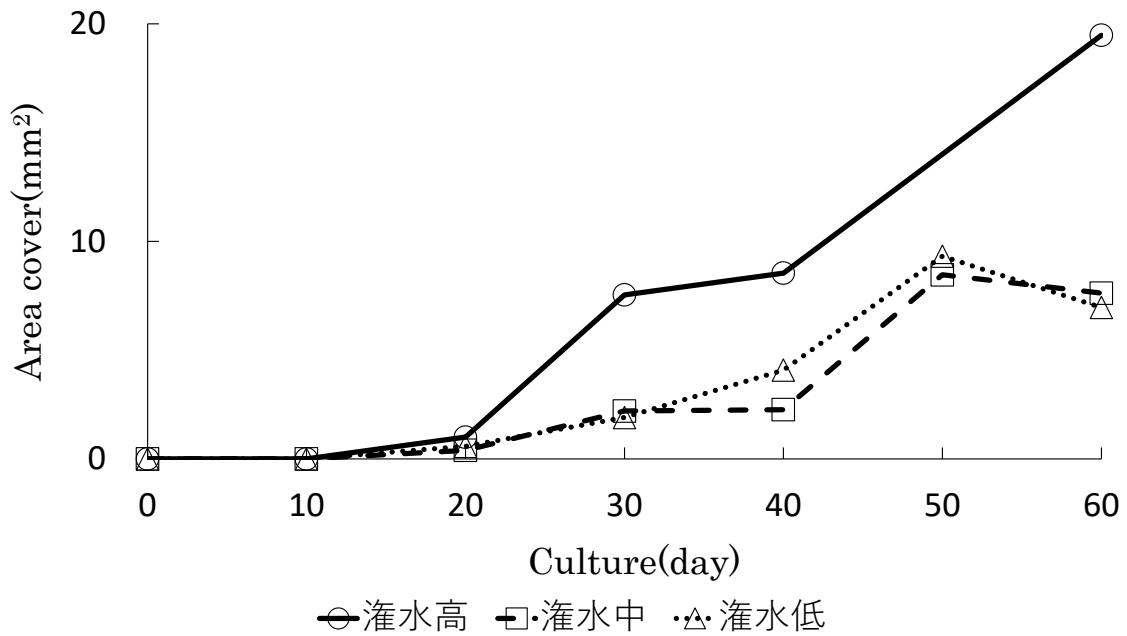
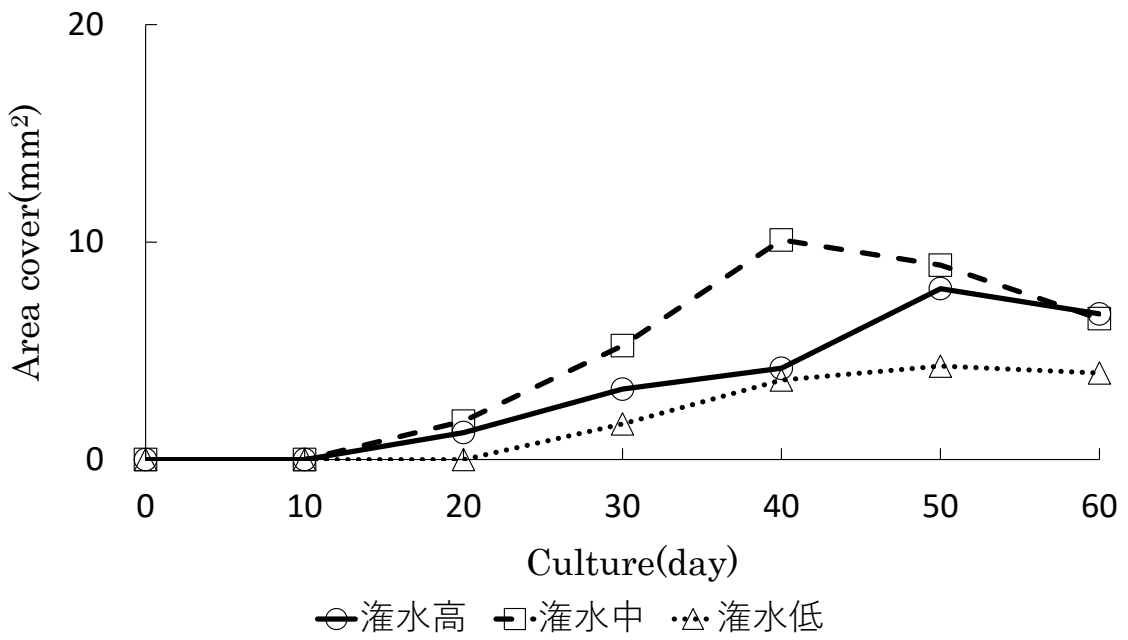


図 II-3-A-1 ベニシダの各生育基盤による平均被覆面積の推移

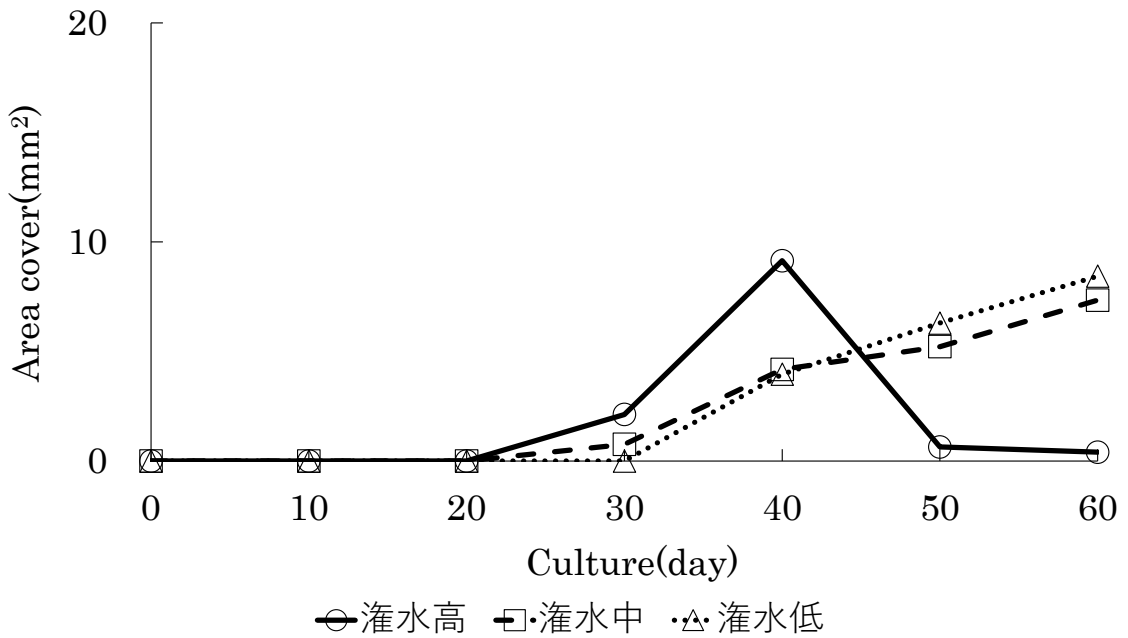
Andosol: *Cyrtomium falcatum* n=5



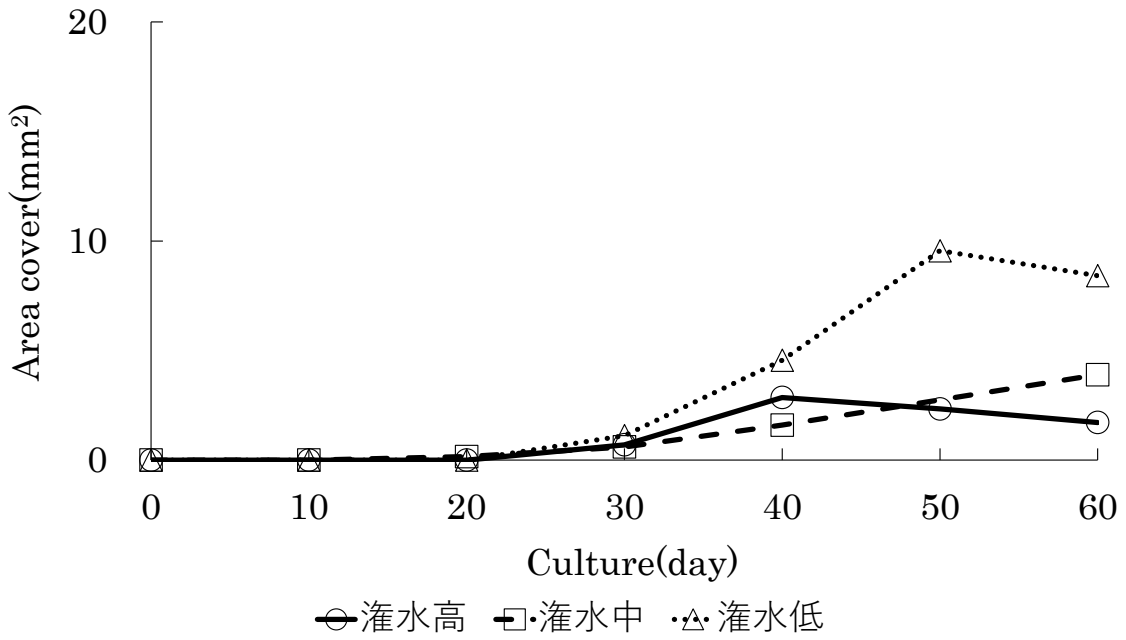
Limestone: *Cyrtomium falcatum* n=5



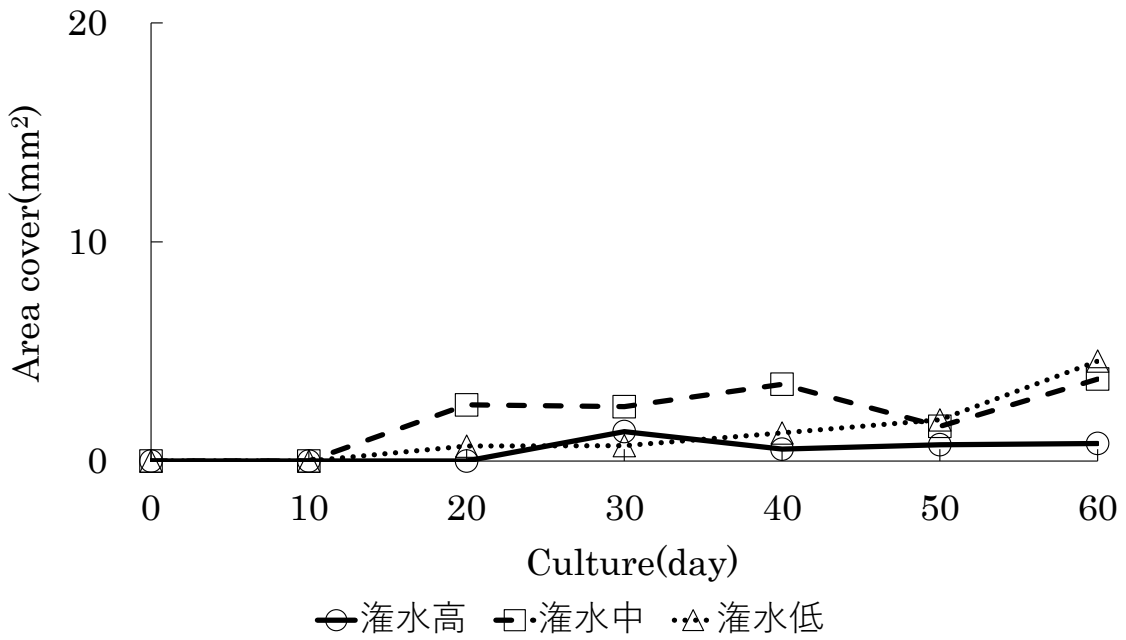
Vermiculite: *Cyrtomium falcatum* n=5



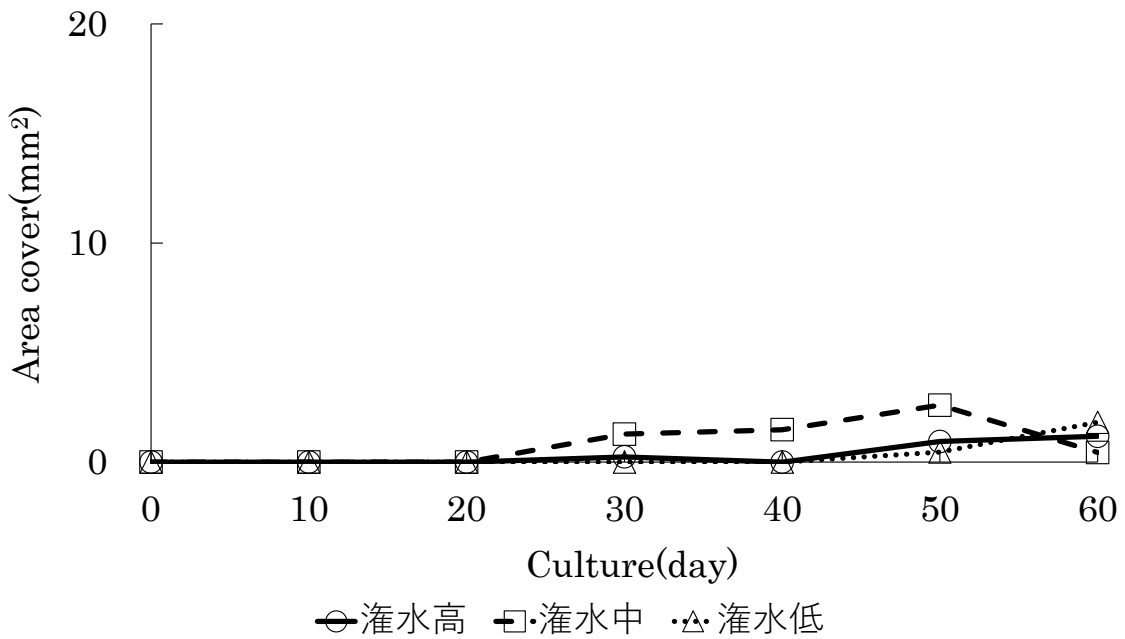
Sphagnum:Cyrtomium falcatum n=5



Akadama soil:Cyrtomium falcatum n=5



Kanuma soil: *Cyrtomium falcatum* n=5



Pumice: *Cyrtomium falcatum* n=5

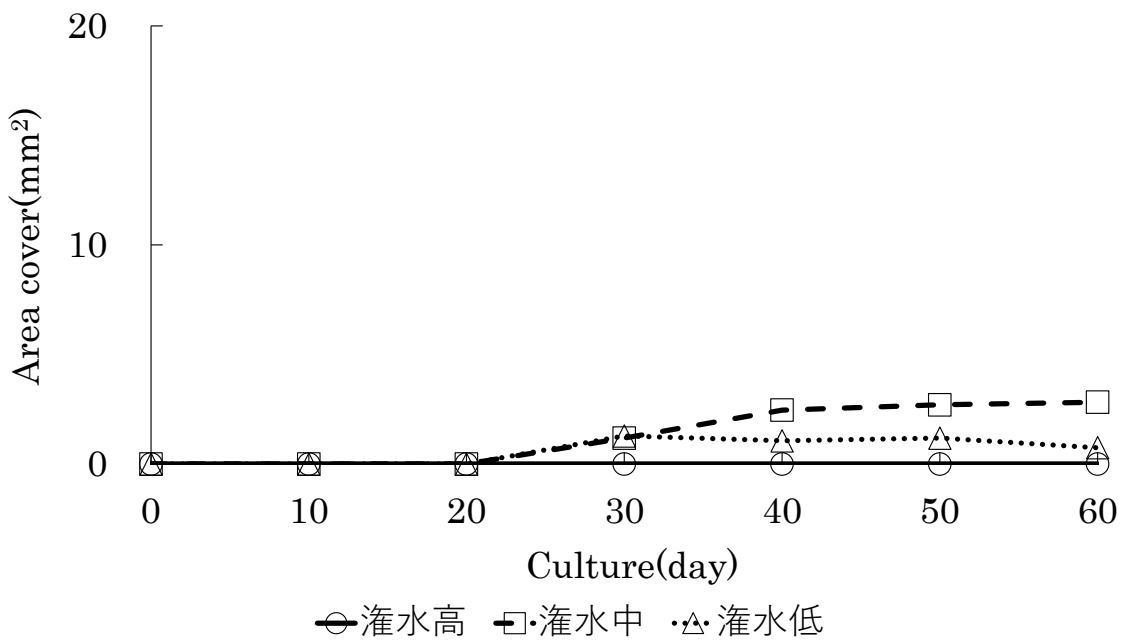
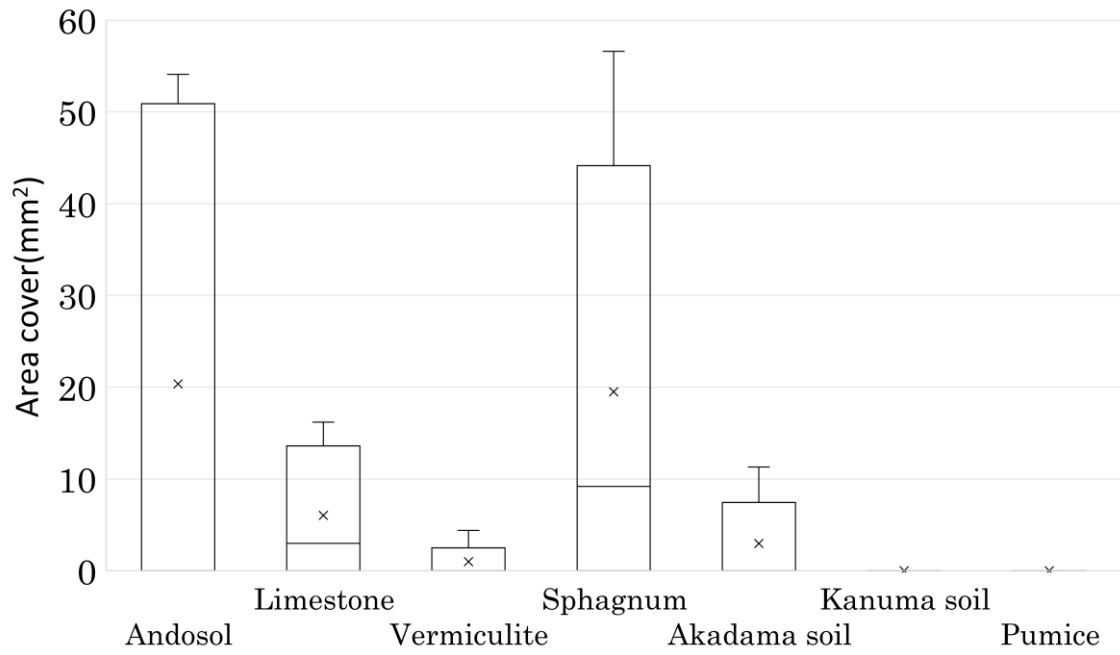
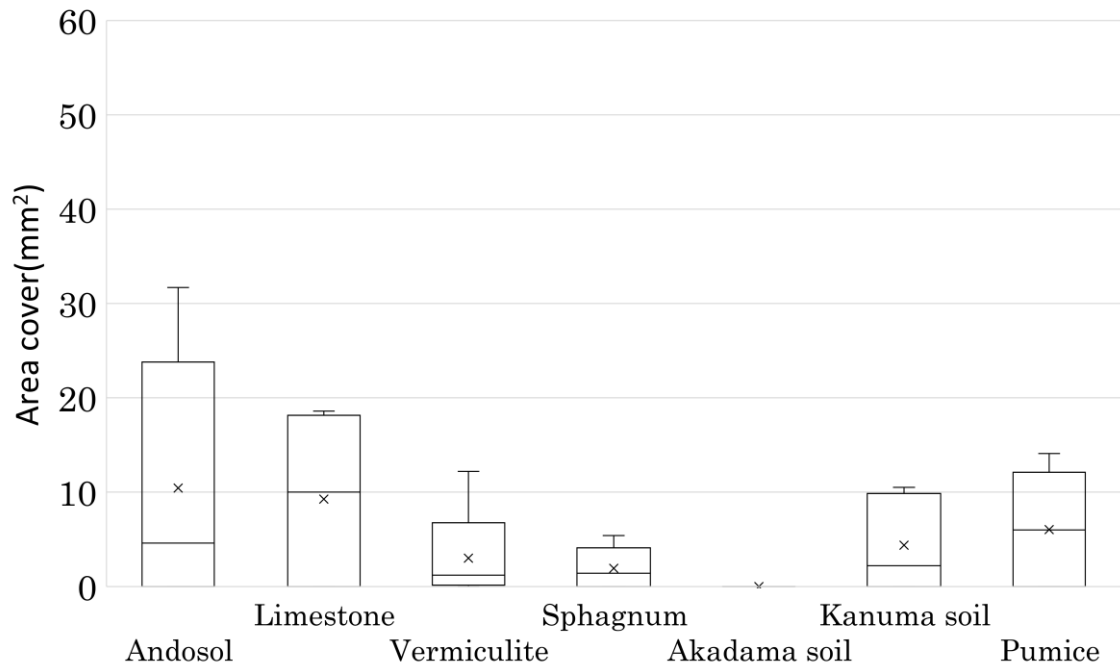


図 II-3-A-2 オニヤブソテツの各生育基盤による平均被覆面積の推移

High irrigation frequency : *Dryopteris erythrosora*



Medium irrigation frequency : *Dryopteris erythrosora*



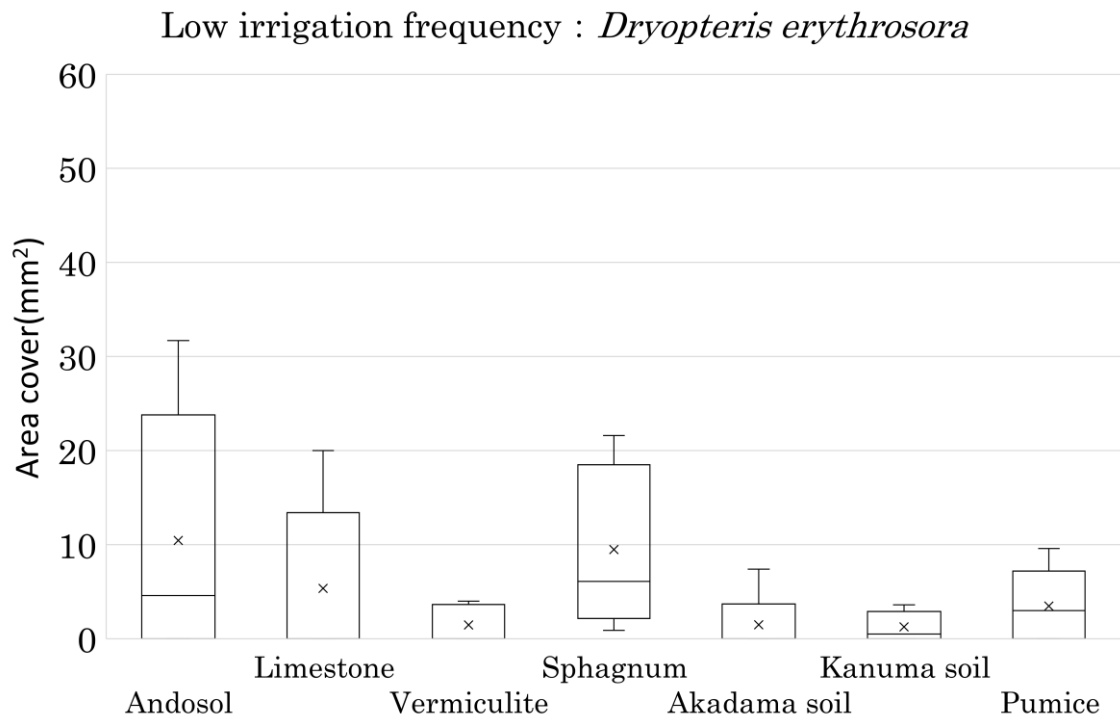
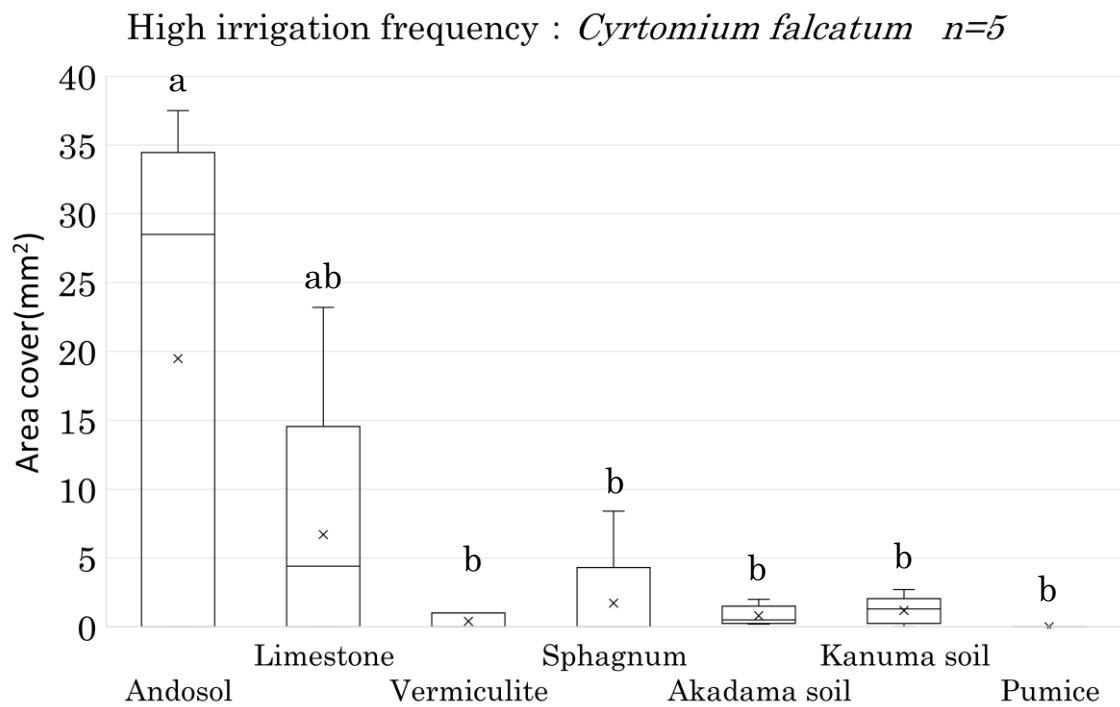


図 II-3-A-3 ベニシダの灌水頻度と各生育基盤の60日後の平均被覆面積の推移



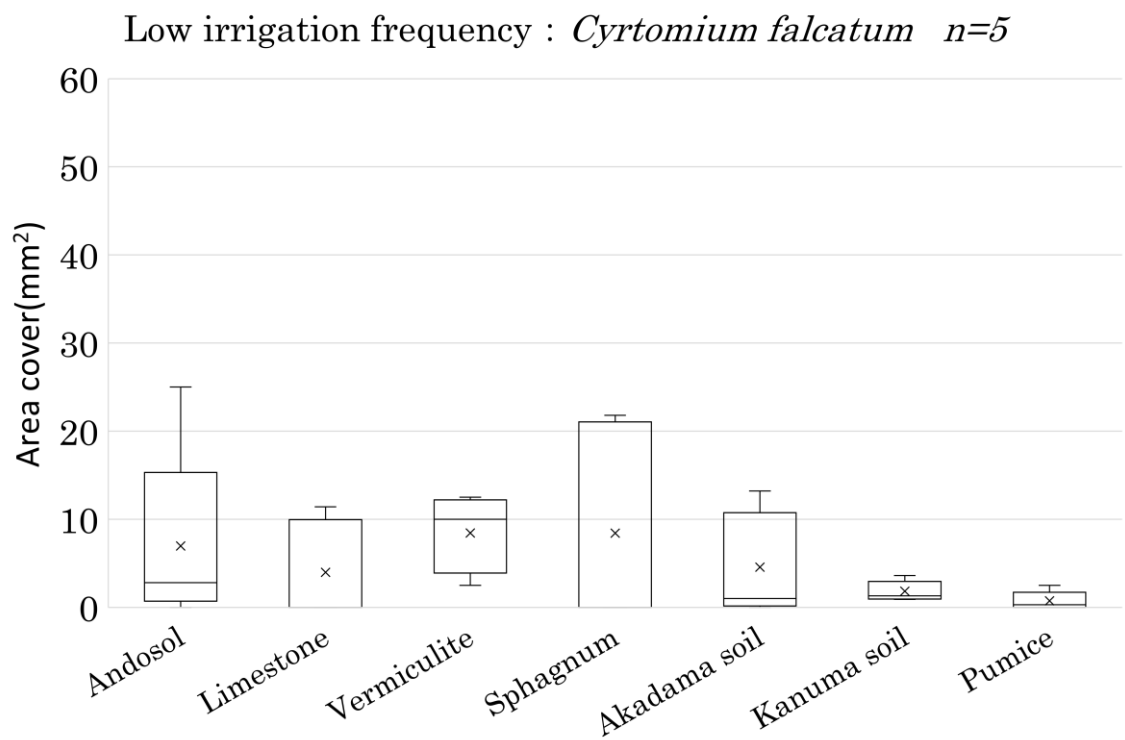
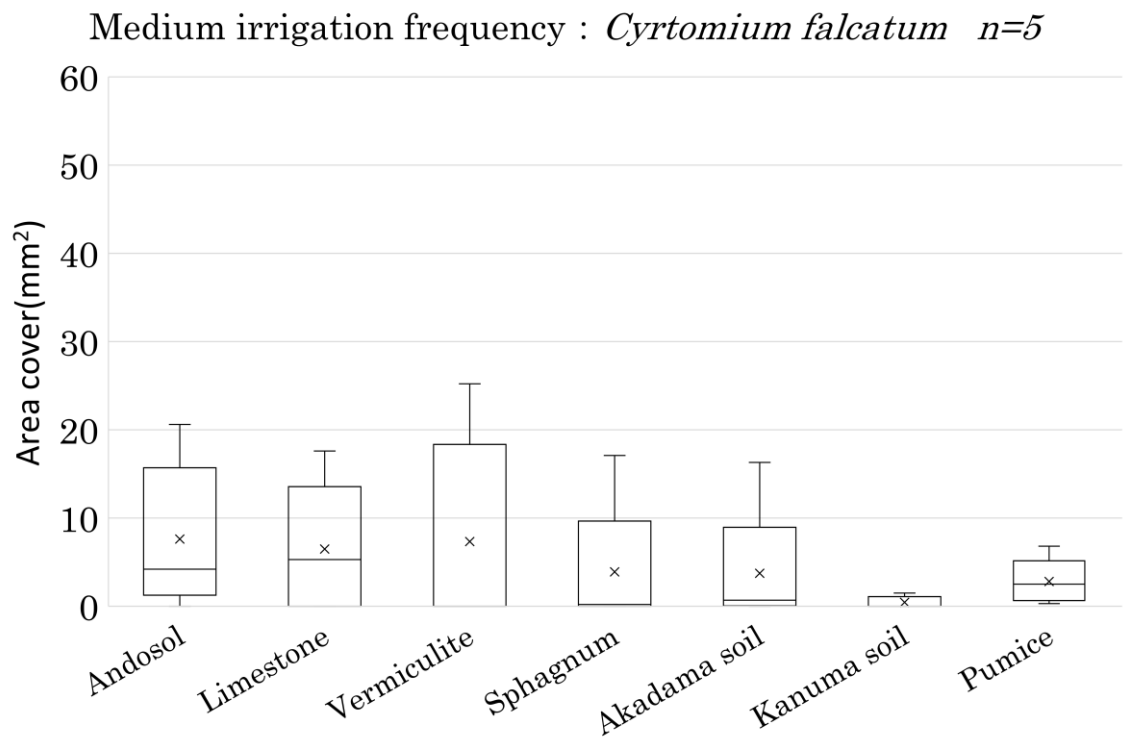


図 II-3-A-4 オニヤブソテツの灌水頻度と各生育基盤の60日後の平均被覆面積の推移

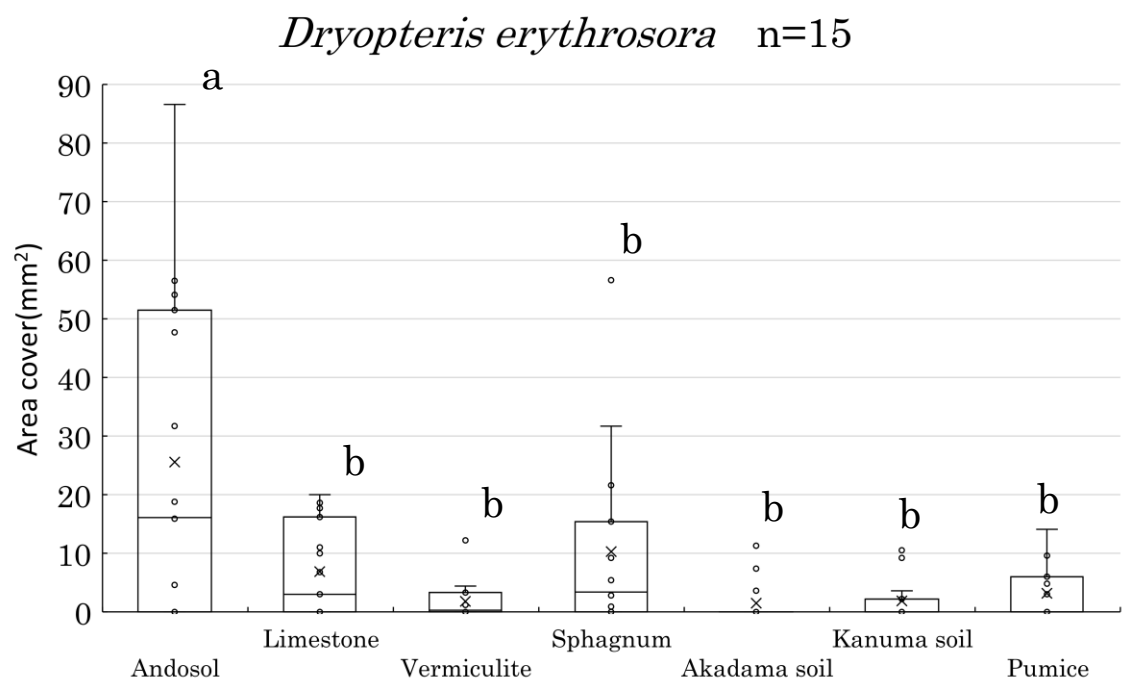


図 II-3-A-5 ベニシダの各生育基盤の 60 日後の平均被覆面積

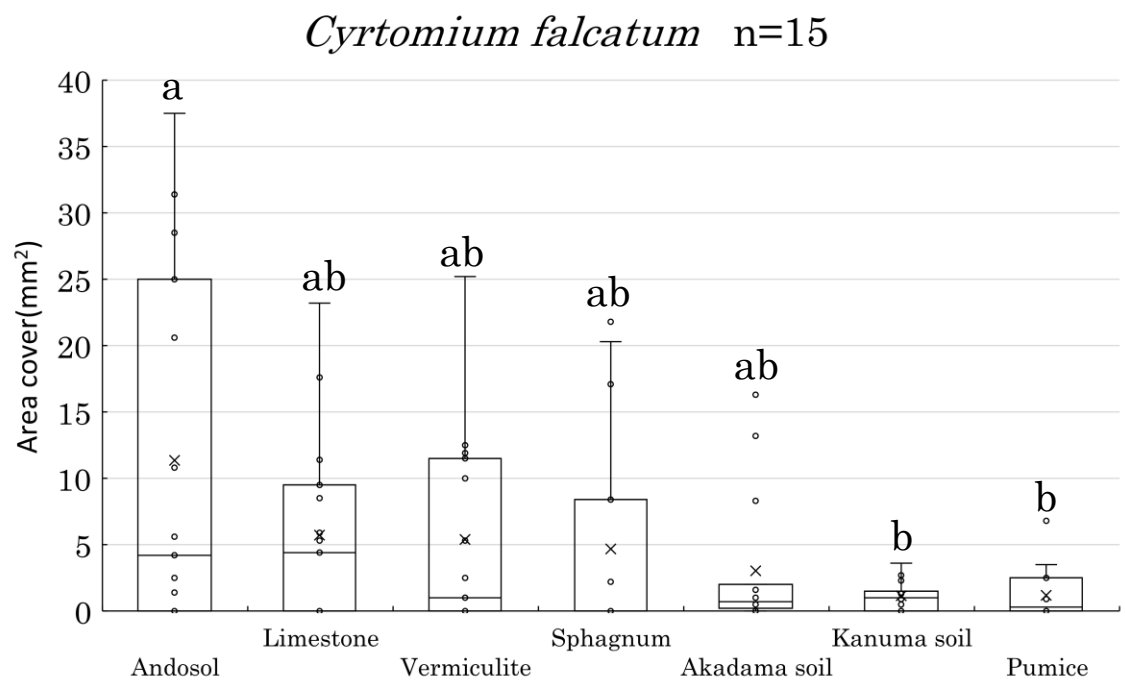


図 II-3-A-6 オニヤブソテツの各生育基盤の 60 日後の平均被覆面積

第3項：小括

各生育基盤における発芽状況は灌水条件によって異なることが判明した。黒ボク土では灌水条件が中と低では60日後の平均被覆面積が約4倍の差が生じて灌水条件中の方が高い値を示した。これらは各生育基盤によって保水性や用水量が違ふと考えられる。例えば、石灰石と軽石は物理性に関して類似した値を示し、粒径も4mlと2~6mlと大きな差はないがベニシダの平均被覆面積では石灰石の方が高い値を示した。また、ベニシダ、オニヤブソテツともに黒ボク土が最も高い平均被覆面積を示すことから、他の基盤が有していない土壤の腐植が影響していると考えられる。既存研究では孢子の発芽にpHが影響することが知られているが(SARAH, 2003)、石灰石とミズゴケとの間に有意差が見られないことからpHの発芽への影響は他の要因と比較すると弱いと考えられる。



写真Ⅱ-3-A-1 地層に沿ってシダが発芽し、前葉体や孢子体が生育している様子

第Ⅱ-3-B：培地の栄養条件と孢子発芽の関係

第1項：実験方法

供試植物は従来から緑化植物として利用されているオシダ科オシダ属のベニシダ (*Dryopteris erythrosora* (D.C.Eaton) Kuntze.)、独特の葉形や耐凍性を有し今後の緑化植物として期待されているオシダ科オシダ属のオシダ、コウヤワラビ科コウヤワラビ属のイヌガンソクとした。ベニシダとオシダは同科同属であるが、暖温帯と冷温帯で分布域が大きく異なる。ベニシダは常緑性で本州から琉球列島（沖永良部島以北）の主に暖温帯の低山地の林下、オシダは夏緑性で南千島から四国（徳島県）の主に冷温帯の山地林下、イヌガンソクは夏緑性で北海道から九州の主に山地林下に生育することが多い(海老原, 2016・2017；田川, 1959)。ベニシダの孢子は2018年6月下旬に東京都町田市、オシダとイヌガンソクの孢子は2018年10月上旬に岩手県一関市にて採取し、実験は2018年11月に東京都世田谷区の東京農業大学構内にて行った。

採取した孢子葉は紙封筒に入れ、室温の暗所にて数日間風乾したのち孢子を採取した。採取した孢子は70%エタノールで殺菌した硼珪酸ガラスのスクリー一瓶（口内径:14.5 mm×胴径: 24.0 mm×高さ:50 mm）に入れ、暗所にて室温で保存した。

孢子の殺菌はクリーンベンチ内で行った。殺菌には12%次亜塩素酸ナトリウム（株式会社松葉薬品）を希釈して、1%次亜塩素酸ナトリウムを作成し、これを孢子の入ったスクリー一瓶に10 ml 入れ5分間攪拌した。孢子は浸漬後、ろ

過して滅菌水で 3 回洗浄した。ろ紙上の孢子を葉さじで集め、滅菌水に浸漬させ、30 分以内に培地へ播種した。

培地はスクロースが添加されていないムラシゲ・スクーグ培地の粉末培地（日本製薬株式会社）を使用した（以下 MS 培地）。蒸留水 1 ℓ に粉末培地を溶かしたものを 1MS 濃度とし、500 ml を別の容器に移し蒸留水を 500 ml 加えることで濃度を 1/4MS, 1/2MS, 1MS の条件区を作成した。また、何も栄養が添加されない区として素寒天培地（0MS）の区も作成した。培地の pH は 5.75 ± 0.05 に調整したのち、寒天粉末を濃度 0.7% になるよう加え、オートクレーブ（121 °C, 20 分間）で滅菌処理を行った。

培地は滅菌処理後にクリーンベンチ内にて滅菌プラスチックシャーレ（直径 50.7 mm, 高さ 14.7 mm）に 15 ml 分注し、常温になるまで放冷した。放冷後、殺菌した孢子をマイクロピペットで吸い取り、培地上の 5 ヶ所が等間隔になるように 1 滴ずつ播種した。なお、播種範囲は 1 滴あたり実体顕微鏡での観測視野（縦 2.5 mm, 横 3 mm）に収まるように設定した。播種後シャーレの周囲に自己粘着フィルム（高機能被覆フィルム ラボピタ 20 mm×30 mm）を 2 周ほど巻き密閉した。播種後にコンタミネーションが発生しても観察ができるように、1 条件につき 5 シャーレ作成した。したがって、1 条件区につき 1 シャーレに 5 滴の孢子播種を行い反復は 5 回とした。播種後のシャーレは恒温 25 °C に設定した温度勾配機（東京理化器械 EYELAMTI-202）内に設置した。温度勾配機内の光量は 3,300 lux（明期 16 時間・暗期 8 時間）とした。

胞子発芽の観察には実体顕微鏡（OLYMPUS SZ61）を使用した。発芽測定は各シャーレに播種した 5 滴のうち 1 カ所を測定箇所とし、顕微鏡用デジタルカメラ（OLYMPUS DP22）でシャーレ毎に播種後 2 日間隔で撮影し、新規の発芽が認められなくなるまで撮影を行った。測定を行わなかった残り 4 箇所はコンタミネーションが発生した、もしくは播種した胞子数が著しく多いか少ない状態であった。また、各シャーレは 90 日が経過するまで一度も開封しておらず、温度勾配機内に設置した際にシャーレが重なった場合は数日おきにその順番を変えることで、シャーレが受ける光量に差が生じないように配慮した。発芽は撮影画像の胞子から緑色の原糸体が突出した時点とした。発芽率は発芽胞子と未発芽胞子を計数して式 1 にて算出した。また、平均発芽日数は式 2(中村ら, 2009) にて算出した。発芽率は逆正弦変換を行い、各温度条件における最終発芽率の差の有無を一元配置分散分析で判定し、有意差を確認したうえで Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。また、平均発芽日数の差の有無も同様に検定を行った。

$$\text{発芽率(\%)} = 100 \times \Sigma n / N \quad (1)$$

$$\text{平均発芽日数(日)} = \Sigma(t \times n) / \Sigma n \quad (2)$$

N : 培地に播種した胞子数, n : 日毎の発芽した胞子数, t : 経過日数

第 2 項 : 実験結果

3 種ともに全ての区で発芽が確認された。どの種においても播種後 16 日以降で発芽率に変化はなかったため、16 日目までの発芽率をグラフで示す。

ベニシダはどの条件区においても 6 日目に発芽が確認された。最終発芽率で

ある 16 日目の発芽率では 0MS で 40.3%, 1/4MS で 38.8%, 1/2MS で 45%, 1MS で 44.1%となった。最大の 1/2MS と最小の 1/4MS の条件間で 7.2%の差があった。しかし、ベニシダでは全条件間で有意な差は認められなかった。

オシダはどの条件区においても 4 日目に発芽が確認された。最終発芽率である 4 日目の発芽率では 0MS で 100.0%, 1/4MS で 100.0%, 1/2MS で 100.0%, 1MS で 100.0%となった。全条件間で有意な差は認められなかった。

イヌガンソクはどの条件においても 8 日目に発芽が確認された。最終発芽率である 16 日目の発芽率では 0MS で 41.9%, 1/4MS で 35.8%, 1/2MS で 33.5%, 1MS で 18.2%となった。イヌガンソクでは 0MS と 1MS が高く, 1MS が低かった。その中でも最大の 0MS と 1MS の条件間で 22.7%の差があり, 1MS はすべての他条件と有意差が認められた($p < 0.01$)。

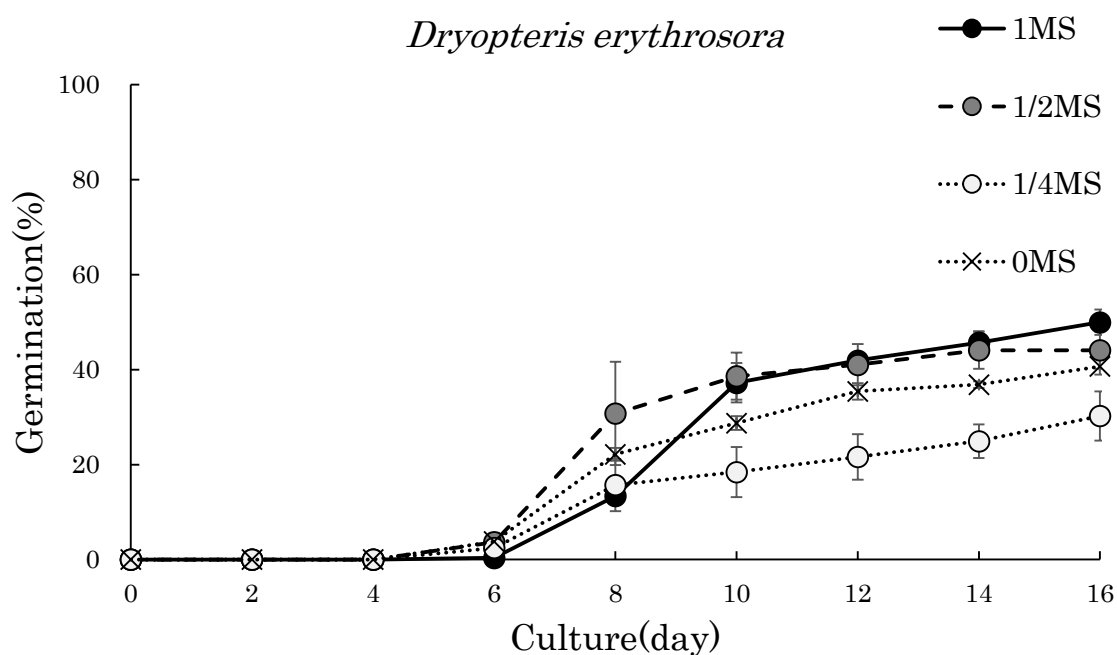


図 II-3-B-1 ベニシダの MS 培地の濃度条件ごとによる平均発芽率の推移 (n=5)

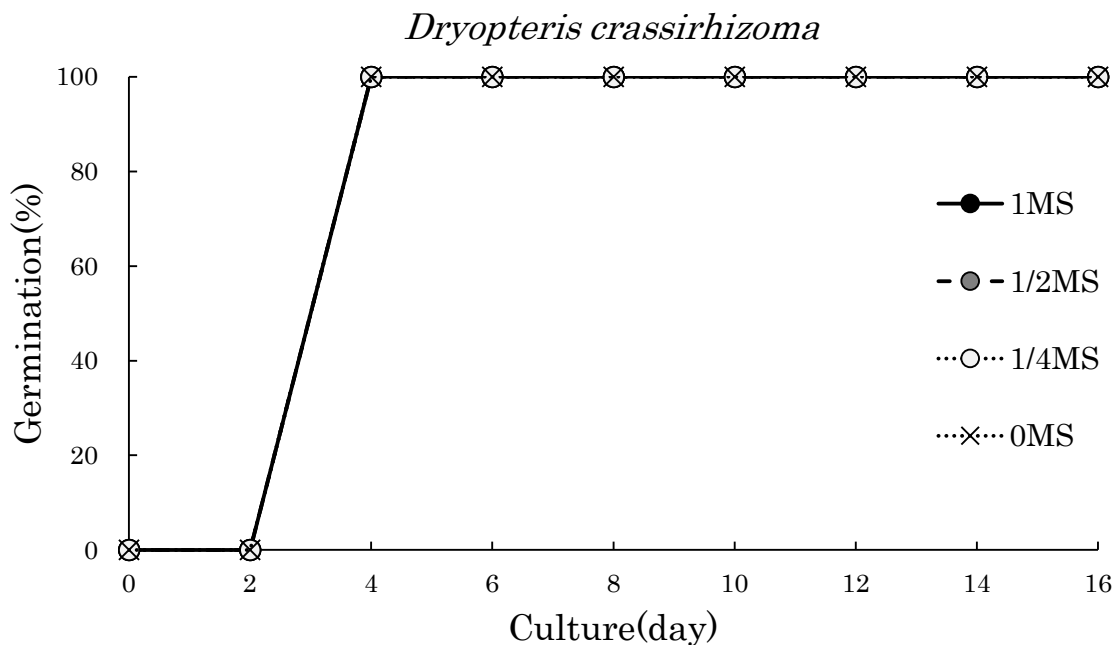


図 II-3-B-2 オンダの MS 培地の濃度条件ごとによる平均発芽率の推移 (n=5)

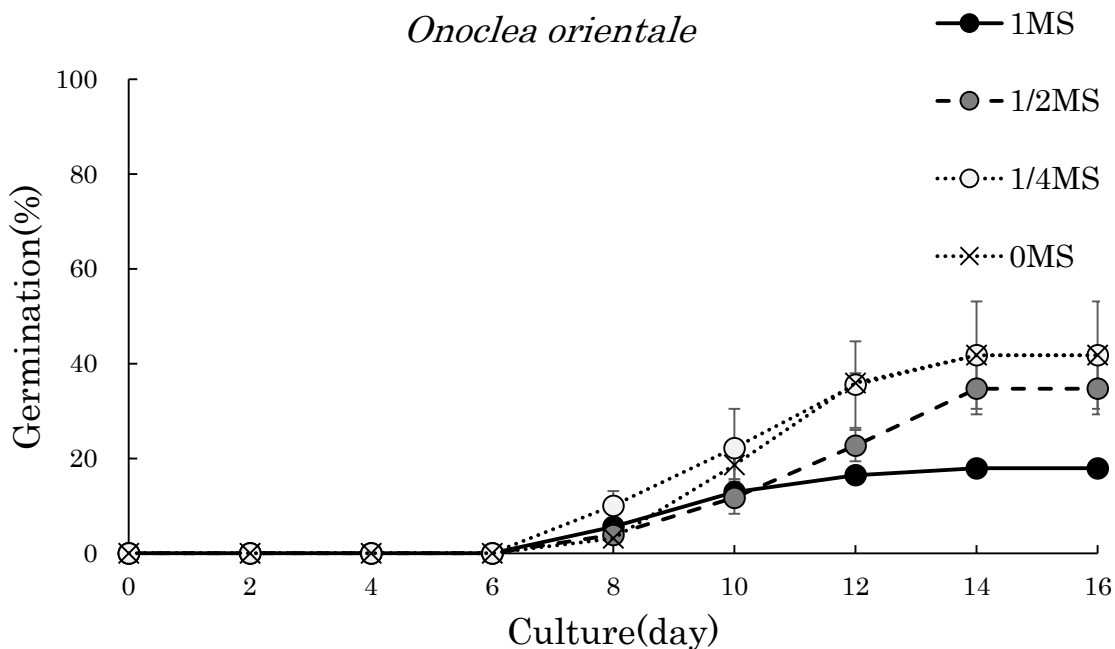


図 II-3-B-3 イヌガンソクの MS 培地の濃度条件ごとによる平均発芽率の推移 (n=5)

第3項：小括

ベニシダの 16 日目の最終発芽率では各条件間で有意な差が認められなかった。また、MS 培地の濃度が高くなるにつれて発芽率が低くなるなどの傾向は確認されなかった。したがって、ベニシダでは 0MS から 1MS の間の濃度条件が発芽率に与える影響は少ないと考えられる。すべての条件区で発芽率が 45%以下だった理由として、胞子の保存期間が長かったことが考えられる。シダ植物であるゼンマイの胞子は、自然状態では胞子嚢から放出されて数日で発芽能力を失うと報告している(古澤, 2015)。中蓋付きの容器にいれ室温で保存した場合には 35 日間は発芽能力が保持できたという研究報告もある(古澤, 2015)。本試験で使用したベニシダは採取から約 5 ヶ月間、蓋付きのスクリュウ瓶での保存だったため胞子が劣化し、発芽能力が失われたと考えられる。

オシダの発芽率は 4 日目にはすべての条件で 100%となった。したがって、オシダでは 0MS から 1MS の間の濃度条件が発芽率に与える影響はないと考えられる。

イヌガンソクにおいて 16 日目の最終発芽率では 1MS の発芽率が他条件に比べて低く、濃度が高くなるにつれて発芽率が低い値を示した。したがって、MS 培地に含まれる何らかの物質がイヌガンソクの阻害し、その物質の濃度が高くなるほど発芽率は低くなると考えられる。また、イヌガンソクの胞子はベニシダとオシダと違い胞子内に葉緑体を含むという特徴があるため、その違いによる影響の可能性も考えられる。他にもハナワラビ科のナツノハナワラビのように

胞子が発芽した後に、前葉体にはならず地下で根茎を形成し、菌類に頼る種類も報告されている(DavidG, 2013)ため、様々な要素を含めて考慮する必要がある。全条件の発芽率が 42%以下と低かった理由としては、温度の影響が考えられる。イヌガンソクは 15℃以上で発芽が阻害される傾向があると示唆されている。そのため今回、設定した恒温 25℃が胞子の発芽を阻害したと考えられる。また、培地に使用される栄養の種類は多岐にわたるため(大澤勝次, 江面浩著, 2005) (養液栽培研究会, 1998), 今後は様々な栄養で実験を行う必要がある。



写真 II-3-B-1 左右：フユノハナワラビ (ハナワラビ科) が生育する様子

第Ⅱ-3-C：培地の pH 条件と孢子発芽の関係

第 1 項：実験方法

供試植物は従来から緑化植物として利用されているオシダ科オシダ属ベニシダ (*Dryopteris erythrosora* (D.C.Eaton) Kuntze) , オシダ科ヤブソテツ属のオニヤブソテツ (*Cyrtomium falcatum* (L.f.) C.Presl subsp.*falcatum*) , ナガバヤブソテツ (*Cyrtomium devexiscapulae* (Koidz.) Ching) , イノモトソウ科イノモトソウ属オオバノイノモトソウ (*Pteris cretica* L.) の 4 種を供試植物とした。

ベニシダは常緑性で本州から琉球列島(沖永良部島以北)の主に暖温帯の低山地の林下, オニヤブソテツは本州から琉球列島の海岸沿いに生育することが多く, ナガバヤブソテツは本州から琉球列島の内陸に生育することが多く, オオバノイノモトソウは常緑性で本州から琉球列島の山地林下や路傍に生育することが多い(海老原, 2016・2017; 田川, 1959)。

ベニシダの孢子は 2019 年 6 月 26 日に東京都町田市で採取, オニヤブソテツの孢子は 2019 年 5 月 25 日に神奈川県真鶴町で採取, ナガバヤブソテツの孢子は 2019 年 8 月 9 日に東京都町田市で採取, オオバノイノモトソウの孢子は 2019 年 6 月 4 日に神奈川県相模原市にて採取した(表Ⅱ-3-C-1)。

採取した孢子葉は紙封筒に入れ, 室温の暗所にて数日間風乾したのち孢子を採取した。採取した孢子は 70%エタノールで殺菌した硼珪酸ガラスのスクリュ一瓶(口内径:14.5 mm×胴径: 24.0 mm×高さ:50 mm)に入れ, 保存は 5℃の冷蔵庫内とした。

胞子の殺菌はクリーンベンチ内で行った。殺菌には 12%次亜塩素酸ナトリウム（株式会社松葉薬品）を希釈して、1%次亜塩素酸ナトリウムを作成し、これを胞子の入ったスクリー瓶に 10 ml 入れ 5 分間攪拌した。胞子は浸漬後、ろ過して滅菌水で 3 回洗浄した。ろ紙上の胞子を葉さじで集め、滅菌水に浸漬させ、30 分以内に培地へ播種した。

培地はスクロースが添加されていないムラシゲ・スクーグ培地の粉末培地（日本製薬株式会社）を使用した（以下 MS 培地）。蒸留水 1 ℓ に粉末培地を溶かしたものを 1MS 濃度とし、500 ml を別の容器に移し蒸留水を 500 ml 加えることで濃度を 1/2MS に調整した。培地の pH は 6.00 ± 0.05 に調整したのち、寒天粉末を濃度 0.7%になるよう加え、オートクレーブ（121 °C, 20 分間）で滅菌処理を行った。

培地の pH 調整は試験 1 では水酸化ナトリウム(NaOH) (pH14.00), 塩酸(HCl) (pH1.70)を使用した。日本の森林土壌や海水などの pH を考慮して、pH は滅菌後の時点で約 5.2, 5.7, 6.3, 7.0 の 4 条件に設定した(気象庁, 2010 ; 清水正元, 1960)。試験 2 ではホウ酸ナトリウム($C_6H_4(COOK)(COOH)$) [pH9.18] とフタル酸水素カリウム($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) [pH4.01] を用いた。pH は約 pH5.0, 5.6, 6.4, 7.1 の 4 条件に設定した（表 II -3-C-2）。また、ホウ酸ナトリウムとフタル酸水素カリウムは文献をもとに JIS 規定に準ずる薬品を使用した(澤田・大森, 2009)。

培地は滅菌処理後にクリーンベンチ内にて滅菌プラスチックシャーレ（直

径 50.7 mm, 高さ 14.7 mm) に 15 ml 分注し, 常温になるまで放冷した。放冷後, 殺菌した胞子をマイクロピペットで吸い取り, 培地上の 5 ヲ所が等間隔になるように 1 滴ずつ播種した。なお, 播種範囲は 1 滴あたり実体顕微鏡での観測視野 (縦 2.5 mm, 横 3 mm) に収まるように設定した。播種後シャーレの周囲に自己粘着フィルム (高機能被覆フィルム ラボピタ 20 mm×30 m) を 2 周ほど巻き密閉した。播種後にコンタミネーションが発生しても観察ができるように, 1 条件につき 5 シャーレ作成した。したがって, 1 温度条件区につき 1 シャーレに 5 滴の胞子播種を行い反復は 5 回とした。

播種後のシャーレは恒温 25 °C に設定した温度勾配機 (東京理化工機 EYELA MTI-202) 内に設置した。温度勾配機内の光量は 3,300 lux (明期 12 時間・暗期 12 時間) とした。

胞子発芽の観察には実体顕微鏡 (OLYMPUS SZ61) を使用した。発芽測定は各シャーレに播種した 5 滴のうち 1 ヲ所を測定箇所とし, 顕微鏡用デジタルカメラ (OLYMPUS DP22) でシャーレ毎に播種後, 第 1, 2 週目は週に 3 回, 第 3 週目以降は週 2 回行い, 30 日以降は発芽が確認されなかったため 30 日で打ち切りとした。測定を行わなかった残り 4 箇所はコンタミネーションが発生した, もしくは播種した胞子数が著しく多いか少ない状態であった。また, 各シャーレは播種後 30 日まで一度も開封しておらず, 温度勾配機内に設置した際にシャーレが重なった場合は数日おきにその順番を変えることで, シャーレが受ける光量に差が生じないように配慮した。発芽は撮影画像の胞子から緑色の原糸

体が突出した時点とした。発芽率は発芽孢子と未発芽孢子を計数して式 1 にて算出した。また、平均発芽日数は式 2(中村・沖・足立, 2009)にて算出した。発芽率は逆正弦変換を行い、各温度条件における最終発芽率の差の有無を一元配置分散分析で判定し、有意差を確認したうえで Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。また、平均発芽日数の差の有無も同様に検定を行った。

$$\text{発芽率(\%)} = 100 \times \Sigma n / N \quad (1)$$

$$\text{平均発芽日数(日)} = \Sigma(t \times n) / \Sigma n \quad (2)$$

N : 培地に播種した孢子数, n : 日毎の発芽した孢子数, t : 経過日数

寒天培地内の pH の測定は試験 1 では孢子播種後 30 日目, 試験 2 では発芽測定と同日に測定を行った。pH の測定はクリーンベンチ内で行った。実験に使用する機材は可能な限り殺菌を行い使用した。pH の測定は発芽測定を行うシャーレとは別のシャーレを用いた。繰り返し数は 10 回とした。

表 II-3-C-1 供試植物と採取地, 採取日時などについて

| Species | <i>Dryopteris erythrosora</i> | <i>Cyrtomium falcatum</i> | <i>Cyrtomium devaxiscapulae</i> | <i>Pteris cretica</i> |
|---------------------|-----------------------------------|---|---|---|
| Family name | Dryopteridaceae | Dryopteridaceae | Dryopteridaceae | Pteridaceae |
| Genus name | Dryopteris | Cyrtomium | Cyrtomium | Pteris |
| Distribution | Honshu-Ryukyu Islands | Honshu-Ryukyu Islands | Honshu-Ryukyu Islands | Honshu-Ryukyu Islands |
| Habitat | Under the forest, on the roadside | Under the forest, on the roadside(Coastal area) | Under the forest, on the roadside(Inland) | Under the forest, on the roadside |
| Reproductive method | Asexual reproduction | Asexual reproduction | Sexual reproduction | Sexual reproduction Asexual reproduction |
| Collection site | Machida, Tokyo | Manazuru Town, Kanagawa Prefecture | Machida, Tokyo | Sagamihara, Kanagawa Prefecture |
| Saved state | Refrigerate | Refrigerate | Refrigerate | Refrigerate |
| Collection date | June 26, 2019 | May 25, 2019 | August 9, 2019 | June 4, 2019 |

表 II-3-C-2 実験条件と使用した溶液について

| | Solution | pH conditions |
|--------------|---|----------------------------|
| Experiment 1 | Hydrochloric acid(HCl) [≒ pH1.70] | pH5.2, pH5.7, pH6.3, pH7.0 |
| | Sodium hydroxide(NaOH) [≒ pH14.00] | |
| Experiment 2 | Potassium biphthalate(Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O) [pH4.01] | pH5.0, pH5.6, pH6.4 pH7.1 |
| | Sodium borate(C ₆ H ₄ (COOK)(COOH) [pH9.18] | |

第 2 項：実験結果

寒天培地の pH は試験 1,2 とともにシダ植物の生育に伴い、変化が確認された。試験 1 では全種全条件で pH の低下がみられた。しかし、試験 2 では全種全条件で pH が低下する傾向がみられているが、全種の pH6.4 の区で pH の上昇が確認された。試験 2 において発芽前から pH の低下が確認され、発芽率が大幅に上昇した孢子播種後 4~11 日の pH の変動が大きい傾向にあったが、発芽率がピークになる孢子播種後 15 日前後で pH の変動が小さくなった。試験 1,2 において pH の低下は条件設定の中では高い pH6.4 と pH7.1 での低下が大きい傾向にあった。

ベニシダの各 pH 条件の発芽率の推移を II-3-C-1~4 に示す。発芽が確認されたのは試験 1 においては全条件で 7 日目であった。試験 2 においては全条件で 6 日目に発芽が確認された。

試験 1 の孢子播種後 7 日目の発芽率は pH5.2 の区で 77%と最も高く、次いで pH5.7 の区で 68%, pH6.3 の区で 50%, pH7.0 の区で最も低く 44%だった。最終発芽率は pH5.2 の区で 97%, pH5.7, 6.3 の区で 96%, pH7.0 の区で最も低く 88%となった。試験 1 の孢子播種後 7,9 日の各条件における発芽率では有意な差が認められたものの($p < 0.01$), 最終発芽率について全条件で有意な差は認められなかった。

試験 2 の孢子播種後 8 日の発芽率は pH5.0 の区で最も高く 34%, 次いで pH6.4 の区が 22%, pH5.6 の区で 16%, pH5.0 の区で最も低く 8%となった。累積発

芽率について pH6.4 の区で最も高く 82%，次いで pH5.0 の区が 75%，pH5.6, 7.1 の区で 72%となった。試験 2 の孢子播種後 6,8 日の発芽率では有意な差が認められたものの(p < 0.01)，播種後 11 日目や最終発芽率では全条件間において有意な差は認められなかった。

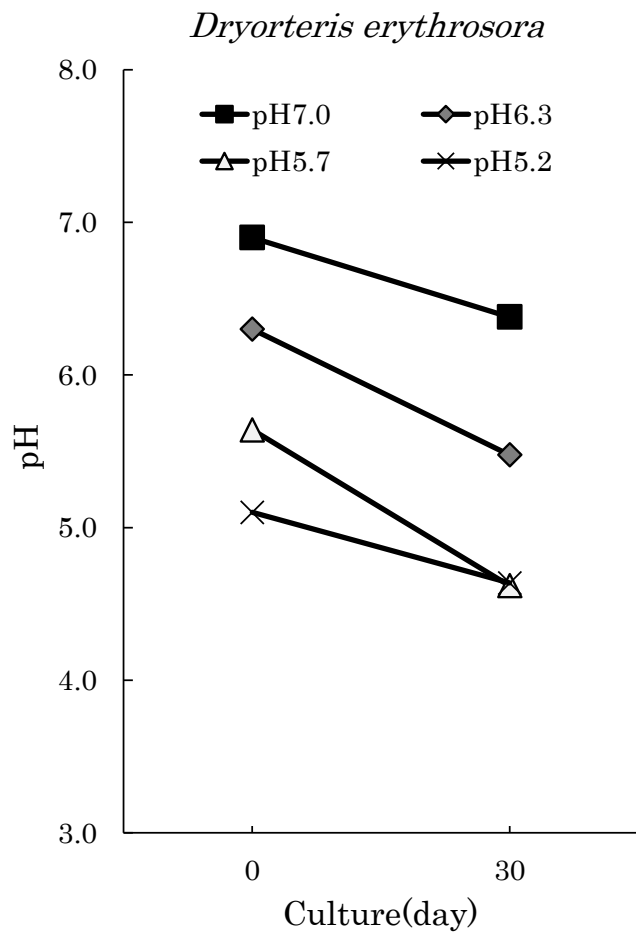


図 II-3-C-1 ベニシダにおける試験 1 の寒天培地内の pH の推移

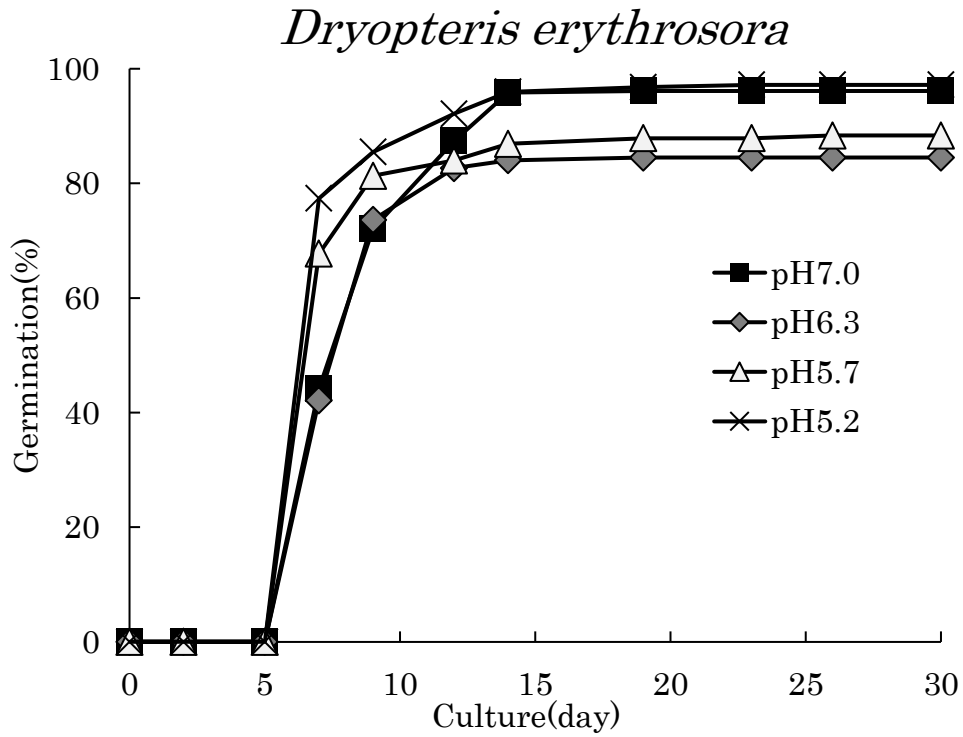


図 II-3-C-2 ベニシダにおける試験1の各pH条件の累積発芽率

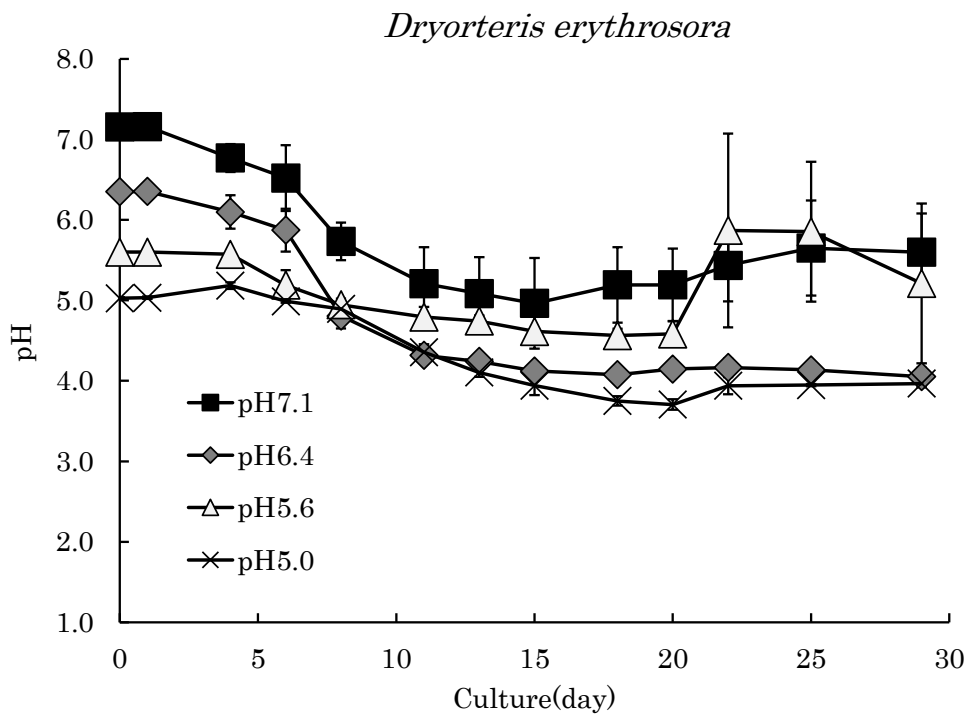


図 II-3-C-3 ベニシダにおける試験2の寒天培地内のpHの推移

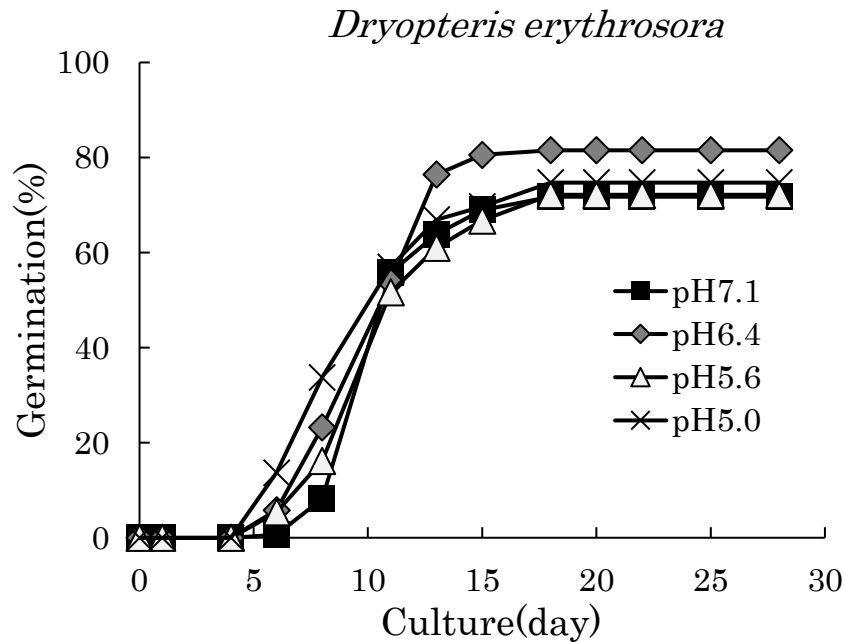


図 II-3-C-4 ベニシダにおける試験 2 の各 pH 条件の累積発芽率

オニヤブソテツの各 pH 条件の発芽率の推移を II-3-C-5~8 に示す。発芽が確認されたのは試験 1 においては pH5.2 と pH6.4 で 7 日目、pH5.7 と pH7.0 で 6 日目であった。試験 2 においては全条件で 7 日目に発芽が確認された。

試験 1 の孢子播種後 7,8 日の発芽率について、pH6.3 の区で 89%と最も高く、次いで pH5.2 の区で 88%、pH5.7 の区で 85%、PH7.1 の区で最も低く 81%だった。累積発芽率について、pH5.2, 5.7, 7.0 の区で 99%と高く、pH6.3 が 96%となった。しかし、孢子播種後 7,8 日の発芽率と累積発芽率について全条件間で有意な差は認められなかった。

試験 2 の孢子播種後 11 日の発芽率について pH7.1 の区で最も高く 72%、次いで pH6.4 の区が 70%、pH5.6 の区で 68%、pH5.0 の区で最も低く、66%とな

った。累積発芽率について pH6.4 の区で最も高く 93%，次いで pH7.1 の区が 93%，pH5.0 が 91%，pH5.6 の区が最も低く 88%となった。しかし，試験 1 の時とは異なり，pH6.4 と pH5.6 の区の発芽率の間には有意な差が認められた。
($p < 0.01$)

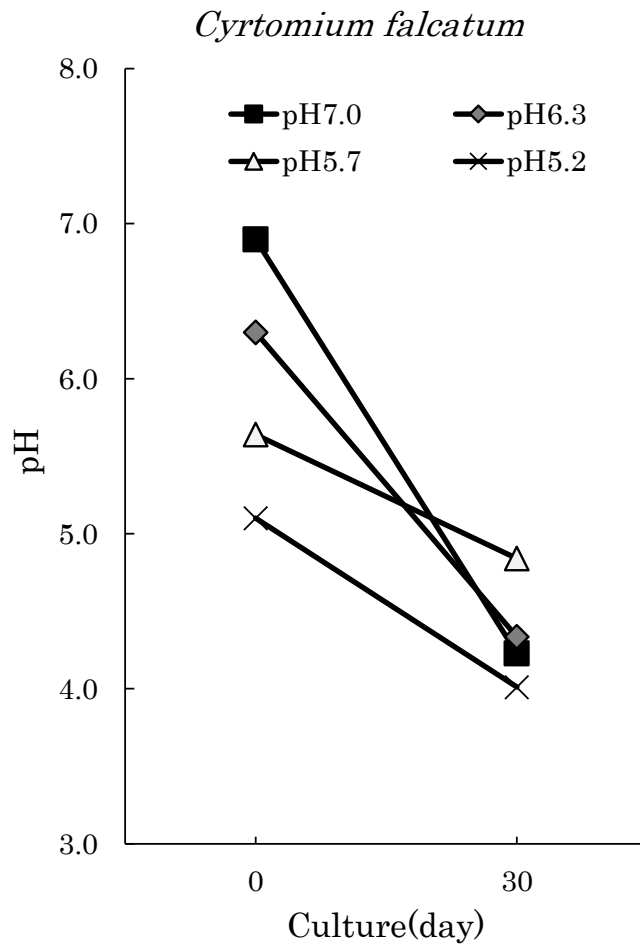


図 II-3-C-5 オニヤブソテツにおける試験 1 の寒天培地内の pH の推移

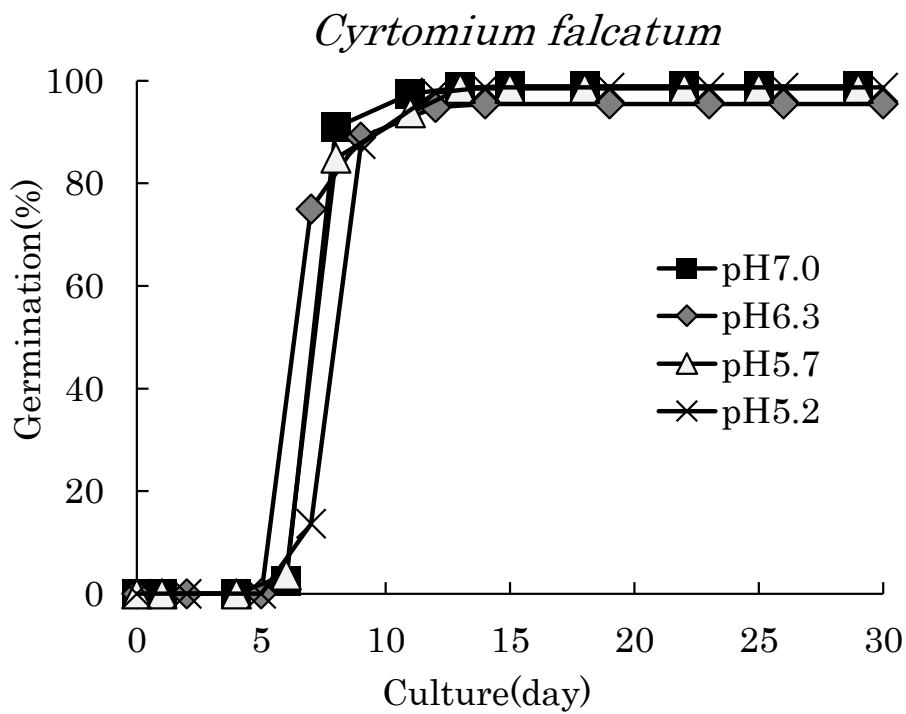


図 II-3-C-6 オニヤブソテツにおける試験1の各pH条件の累積発芽率

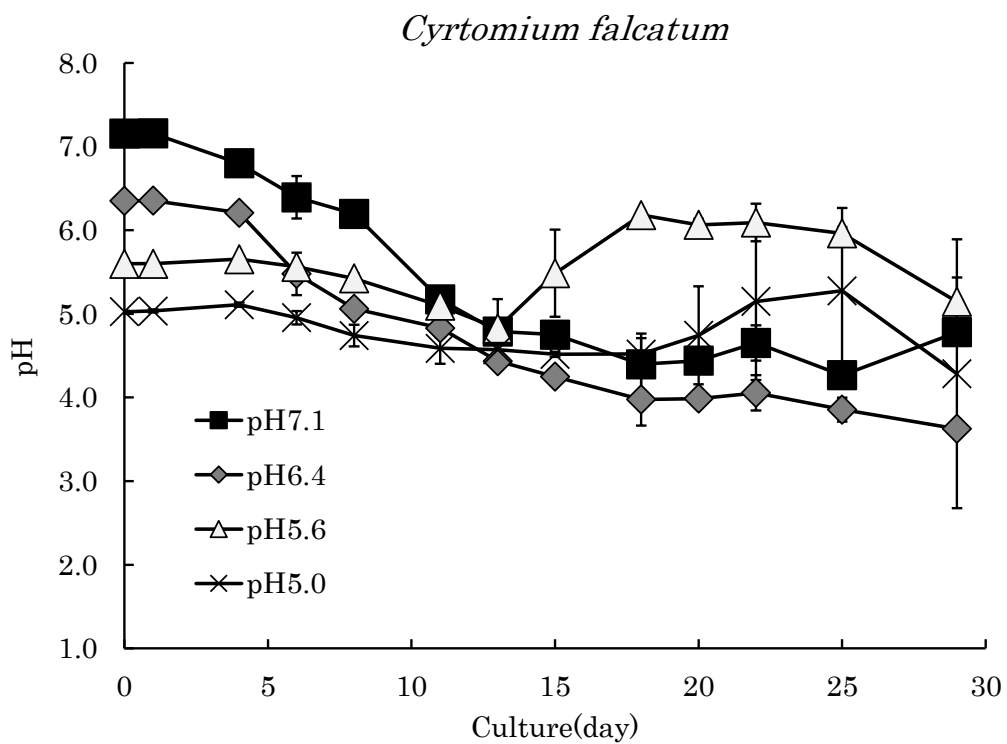


図 II-3-C-7 オニヤブソテツにおける試験2の寒天培地内のpHの推移

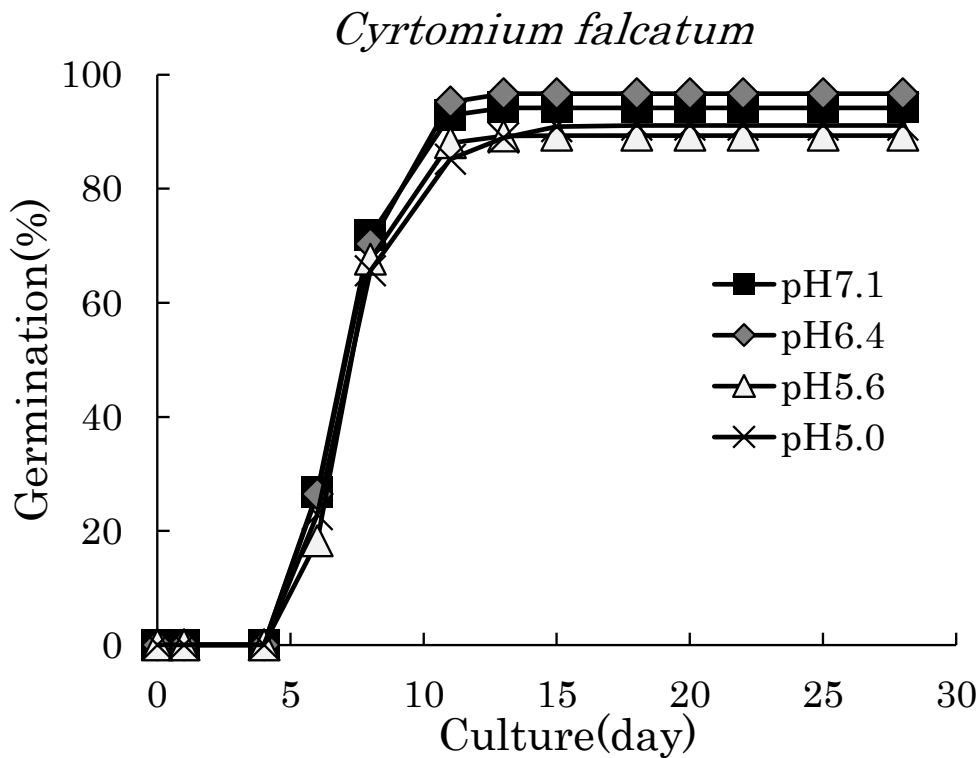


図 II-3-C-8 オニヤブソテツにおける試験 2 の各 pH 条件の累積発芽率

ナガバヤブソテツの各 pH 条件の発芽率の推移を図 II-3-C-9~12 に示す。発芽が確認されたのは試験 1 においては全条件で 6 日目であった。試験 2 においても全条件で 6 日目に発芽が確認された。

試験 1 の孢子播種後 10 日の発芽率について、pH5.2 の区で 58%と最も高く、次いで pH6.3 の区で 53%，pH5.7 の区で 48%，pH7.1 の区で最も低く 43%だった。累積発芽率について、pH5.2 の区で 64%，pH6.3 の区で 54%，pH5.6 の区で 51%，pH7.1 の区で最も低く 44%となった。孢子播種後 11 日と最終の発芽率において pH5.2 と pH7.0 の区で有意な差が認められたが($p < 0.05$)，孢子播種後 6,8 日の発芽率と累積発芽率について全条件間で有意な差は認められな

った。

試験 2 の孢子播種後 11 日の発芽率について pH5.0 の区で最も高く 35%，次いで pH6.4 の区が 27%，pH5.6 の区で 21%，pH5.0 の区で最も低く，7%となった。累積発芽率について pH6.4 の区で最も高く 64%，次いで pH7.1 と pH5.0 の区が 56%，pH5.6 の区が最も低く 44%となった。孢子播種後 11 日の発芽率では pH5.6 と pH6.4 の間以外で有意な差が認められ($p < 0.01$)，と最終の発芽率において pH5.6 と pH6.4 の区で有意な差が認められたが($p < 0.05$)，孢子播種後 8,13 日の発芽率と累積発芽率について全条件間で有意な差は認められなかった。

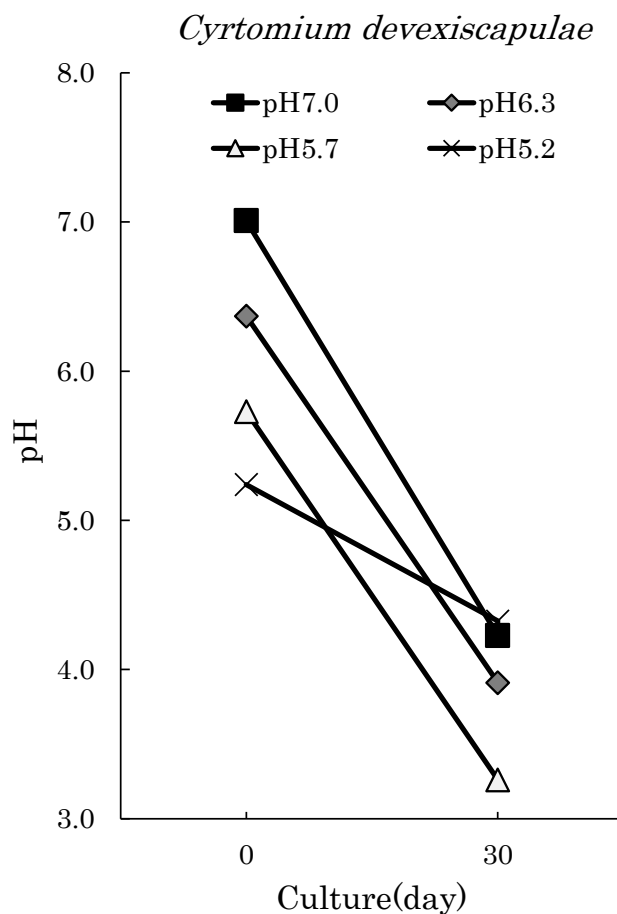


図 II-3-C-9 ナガバヤブソテツにおける寒天培地内の pH の推移

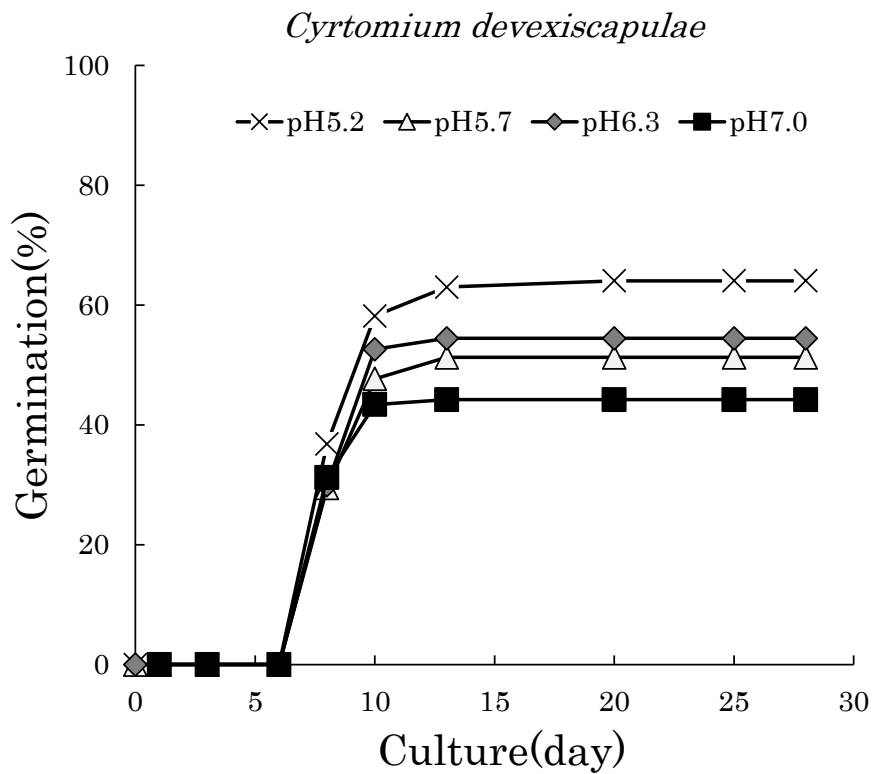


図 II-3-C-10 ナガバヤブソテツにおける試験 1 の各 pH 条件の累積発芽率

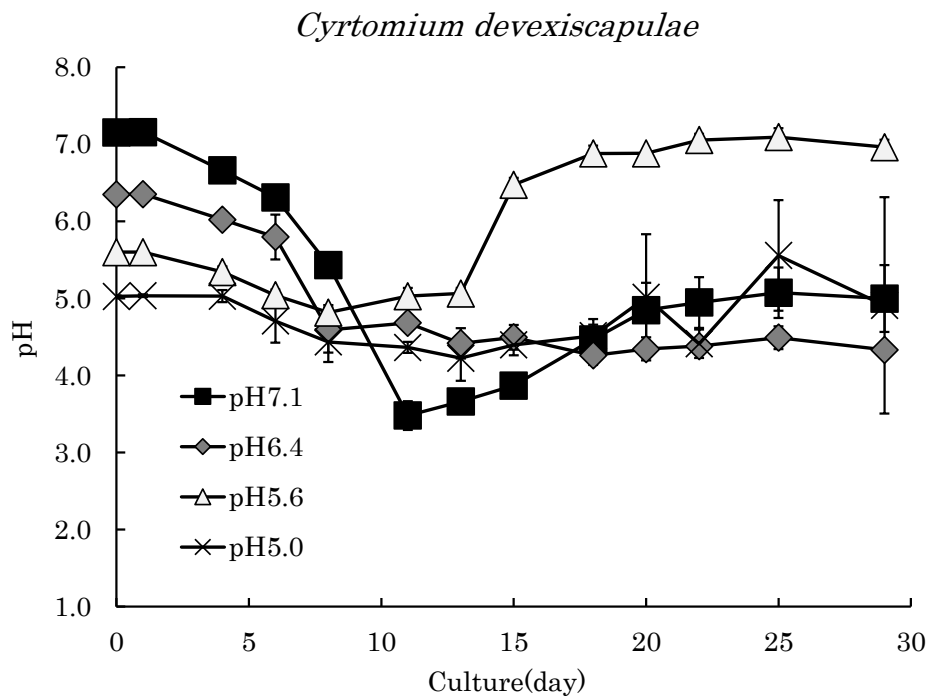


図 II-3-C-11 ナガバヤブソテツにおける試験 2 の寒天培地内の pH の推移

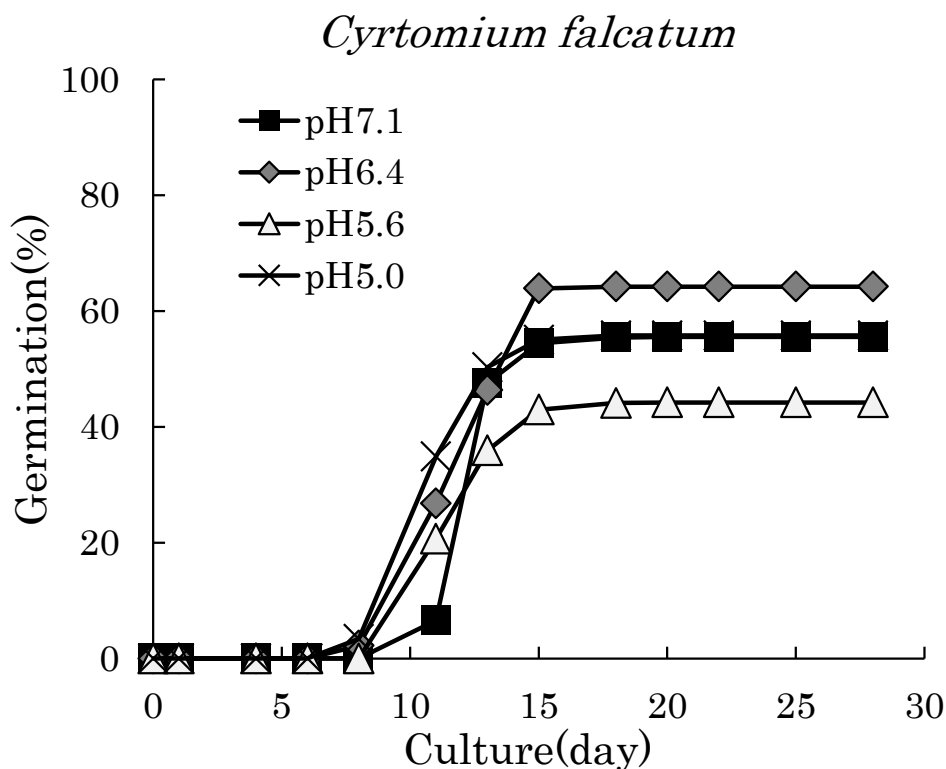


図 II-3-C-12 ナガバヤブソテツにおける試験 2 の各 pH 条件の累積発芽率

オオバノイノモトソウの各 pH 条件の発芽率の推移を図 II-3-C-13~16 に示す。発芽が確認されたのは試験 1 においては pH5.2 と pH6.4 で 7 日目、pH5.7 と pH7.0 で 6 日目であった。試験 2 においては全条件で 7 日目に発芽が確認された。

試験 1 の孢子播種後 7,8 日の発芽率について、pH6.3 の区で 89%と最も高く、次いで pH5.2 の区で 88%，pH5.7 の区で 85%，PH7.1 の区で最も低く 81%だった。累積発芽率については、pH5.2, 5.7, 7.0 の区で 99%と高く、pH6.3 が 96%となった。播種後 6,8 日目の発芽率について全条件で有意な差が認められた($p < 0.01$)。しかし、播種後 11 日の発芽率と最終発芽率について全条件間で有意な

差は認められなかった。

試験 2 の孢子播種後 11 日の発芽率については、pH7.1 の区で最も高く 72%、次いで pH6.4 の区が 70%、pH5.6 の区で 68%、pH5.0 の区で最も低く、66%となった。累積発芽率については、pH6.4 の区で最も高く 93%、次いで pH7.1 の区が 93%、pH5.0 が 91%、pH5.6 の区が最も低く 88%となった。しかし、試験 1 の時とは異なり、pH5.0 と pH5.6 の区が発芽率と pH6.4、pH7.1 の区が発芽率に有意な差が認められた。 $(p < 0.01)$

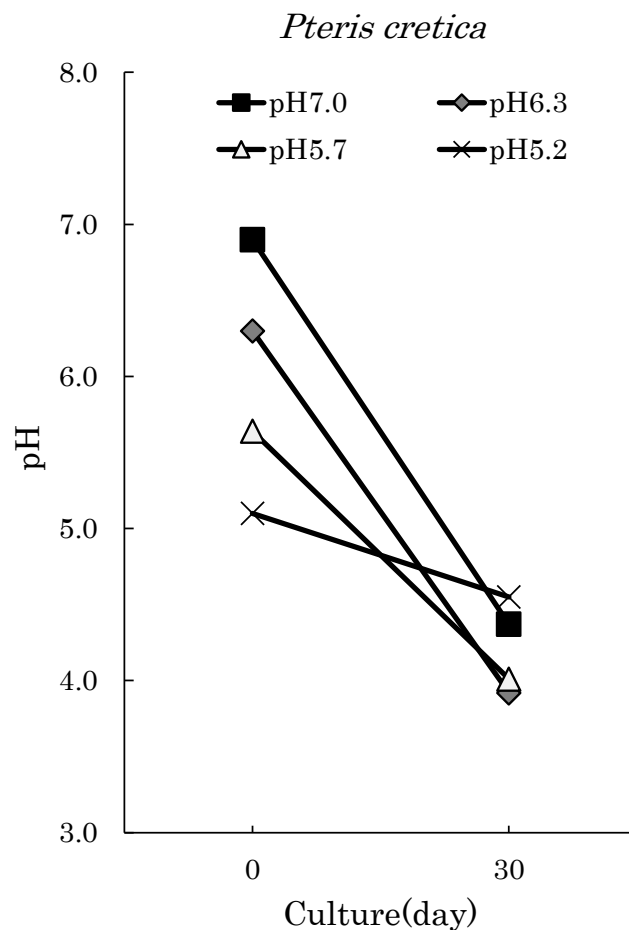


図 II-3-C-13 オオバノイノモトソウにおける寒天培地内の pH の推移

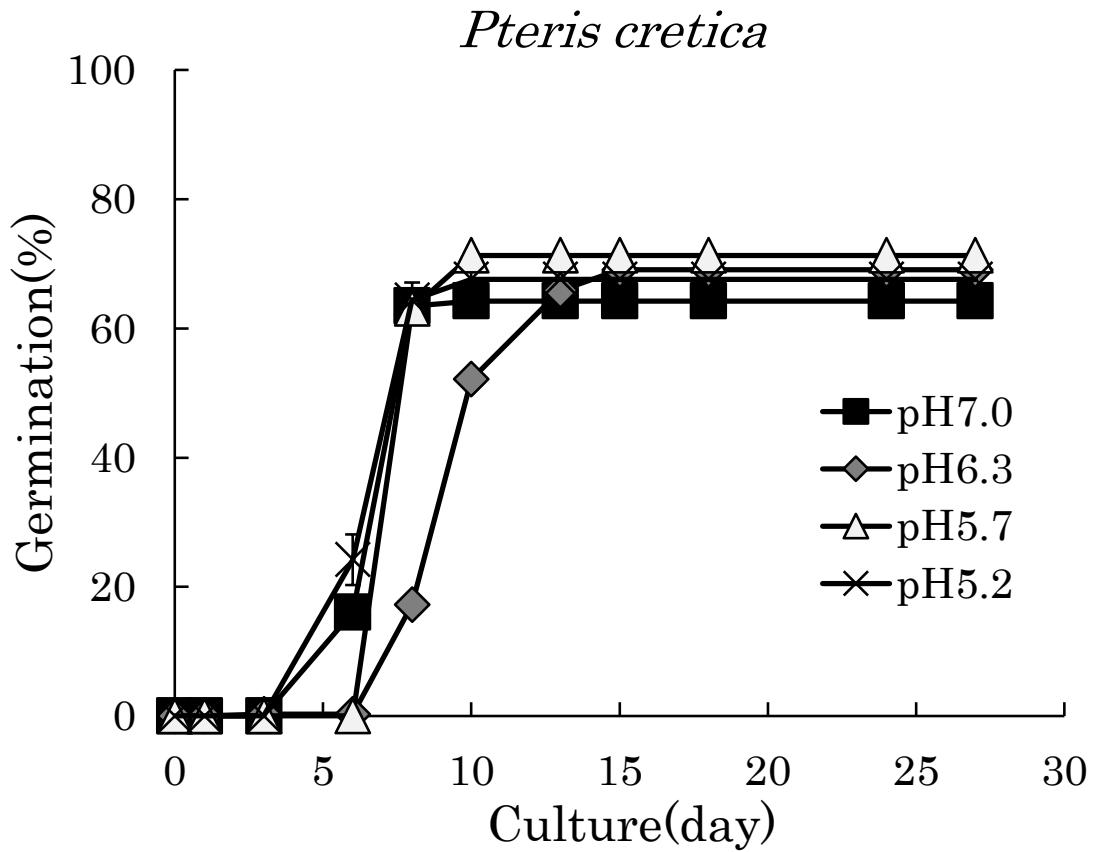


図 II-3-C-14 オオバノイノモトソウにおける試験1の各pH条件の累積発芽率

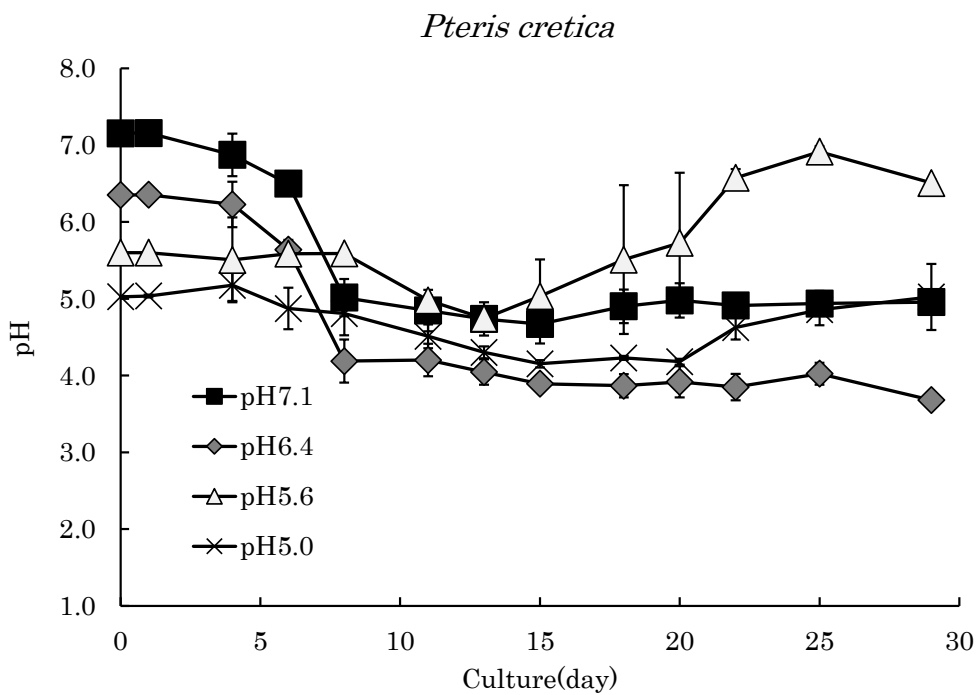


図 II-3-C-15 オオバノイノモトソウにおける試験2の寒天培地内のpHの推移

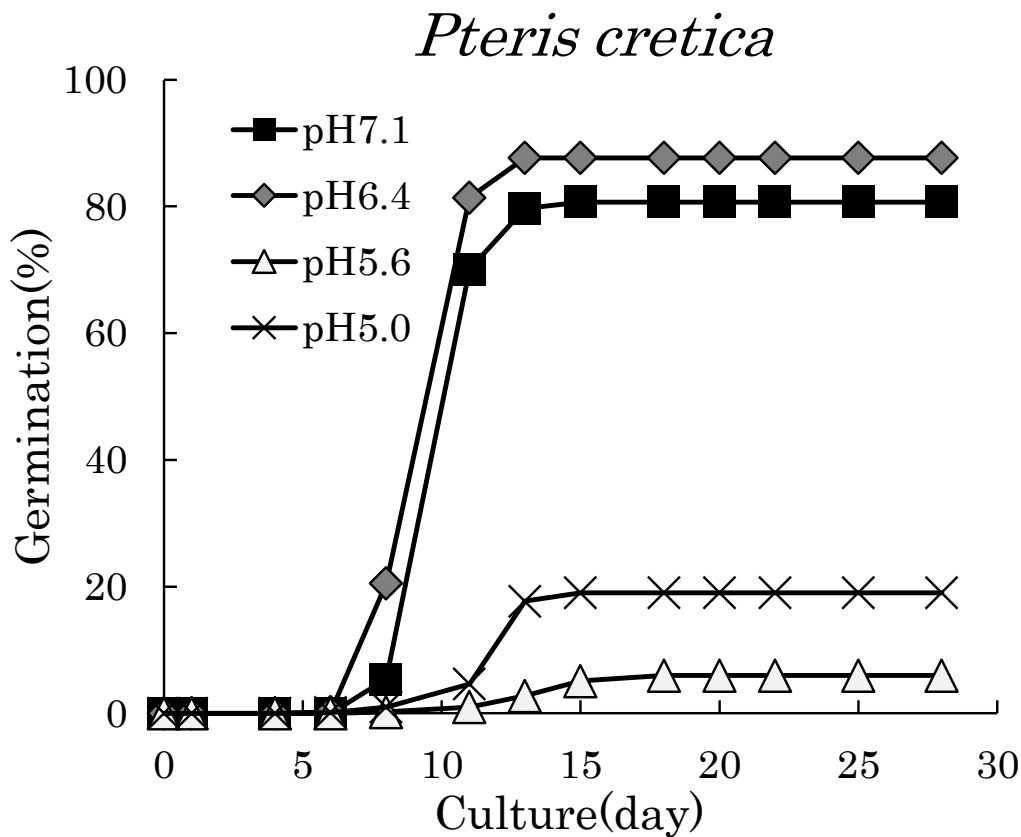


図 II-3-C-16 オオバノイノモトソウにおける試験 2 の各 pH 条件の累積発芽率

第 3 項：小括

ベニシダの発芽率は孢子播種後 4~11 日の各 pH 条件区において、試験 1 では最大 33%、試験 2 では最大 26%の有意な差が認められたが、累積発芽率では有意な差は認められなかった。したがって、ベニシダの孢子発芽は培地の pH の影響を受けると考えられるが、影響を受ける期間が孢子播種後 4~11 日にのみ留まると考えられる。ベニシダはナガバヤブソテツと同様に本来は内陸の森林の林床に生育する種であるため、播種後 4~11 日目の発芽率は生育に適した条件で高くなったと考えられる。ベニシダがナガバヤブソテツと結果が異なるのは、ナガバヤブソテツが 2 つの生殖様式を有することが関係していると考えられる。

オニヤブソテツの発芽率は試験 1, 2 とともに孢子播種後 4~11 日においては大きな違いはみられなかった。したがって、オニヤブソテツは培地の pH の影響を受けにくいと考えられる。オニヤブソテツの生育地は主に海水の飛沫のかかる海岸や、岸壁など他のシダ植物の侵入してこない過酷な環境に生息するシダ植物である。日本の海水の pH は pH8.1 前後を示し(気象庁, 2010) , 本試験の設定以上の高い pH である。したがって、オニヤブソテツは自然状態において pH の影響を受けて生育している可能性がある。しかし、オニヤブソテツはその高い pH でも耐える性質を持っているため、大きな阻害がみられなかったのではないかと考えられる。

また、今回採取した真鶴町のオニヤブソテツは三倍体の無配性生殖を行うことがわかっている(松本, 2003) 。三倍体の無配性生殖種はヘテロの形質を持つため、病害などには弱くなるものの、耐乾性などの形質を持つようになることが既存文献では記されている(松本, 2003)。したがって、オニヤブソテツでも耐塩性や pH 耐性を獲得している可能性が考えられる。また、適した pH は種によって異なることも報告されている(加藤,1966)ため、今後多様な種で同様の実験を行う必要がある。既存研究では布団籠工の施工地が無施工地よりもシダ植物が優占すると報告されていることから、生育基盤がシダ植物の定着に関係していると考えられる(黒田ほか, 2009)。

第Ⅱ-4：常温・冷蔵・冷凍の保存条件と発芽率の関係

植物種子の保存研究については古くから行われているが、近年ではノルウェーに最大 300 万種の種子の保存を目的としてスヴァールバル世界種子貯蔵庫 (Svalbard Global Seed Vault) が 2008 年に開設されたことで話題になった (Fowler, 2008)。また、それ以前の 2000 年にはイギリスの王立キュー植物園 (以下、キュー植物園) が進めているミレニアムシードバンクプロジェクト (Millennium seed bank project) も遺伝資源の保存を進めるシードバンク施設のひとつにあげられる (Van, 2003)。日本については 1985 年 (昭和) に戦前からの優良な林木遺伝資源を確保する思想を受け継ぐことを目的に、農林水産省ジーンバンク事業 (林木遺伝資源部門) が発足し、平成 13 年には独立行政法人化し、それ以降は、林野庁が実施するジーンバンク事業として推進されている (山田, 2018)。平成 29 年時点では、優良形質木や天然記念物等を育種場の保存園に接ぎ木等で保存している成体が 25,637 点、冷蔵庫・冷凍庫の施設で保存している精英樹の種子・花粉等は 13,793 点にのぼる (山田, 2018)。また、種子の収集・保存マニュアルを環境省自然環境局が提言し、その中には「シダ植物の胞子については、組織の超低温保存による長期保存が考えられるが、現段階では保存事業を全国システム的に開始できる段階ではなく、当面、技術開発等を進めることが重要と考える。」と記述されている (環境省自然環境局, 2009)。これらの胞子保存の観点からも、本研究は重要であると考えられる。

シダ植物の胞子発芽に影響を与える要因としては、胞子の保存温度と保存期

間が挙げられる。既存研究より孢子の保存方法によって発芽率が変化すると報告されている(梅林, 1999)。ゼンマイの孢子を常温・冷蔵(4℃)・冷凍保存方法(-18℃)の温度条件で保存し発芽試験を行なった結果、常温で保存した孢子は採取後40日後に発芽が確認されなかったが、冷蔵では140日、冷凍では350日まで発芽が確認された(古澤ほか, 2015)。その一方で、他にも腊葉標本にされたシダ植物の孢子から30年近くが経過しても発芽能力があることが報告されていることから、孢子の保存方法は遺伝子資源の確保や保全対策としても重要な実験に位置付けられている(Windham, 1986; Magrini, 2010, 2011) (平澤ら, 2016)。また、孢子は微小であるため、目視による生存確認が難しいが、播種を行い、その発芽状況と前葉体を実体顕微鏡で観察することで孢子の生存を確認できる。そこで本研究では、緑化植物として有望なシダ植物3種を対象に、孢子の保存条件の影響として特に保存温度と保存期間が孢子発芽に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。



写真Ⅱ-4 孢子葉を室内にて風乾して篩にかけ孢子を採取する様子

第1項：実験方法

供試植物は従来から緑化植物として利用されているオシダ科オシダ属のベニシダ (*Dryopteris erythrosora* (D.C.Eaton) Kuntze.), オシダ科ヤブソテツ属のオニヤブソテツ (*Cyrtomium falcatum* (L.f.) C.Presl subsp.*falcatum*), 昔より山菜として利用されているゼンマイ科ゼンマイ属のゼンマイ (*Osmunda japonica* Thunb.) とした。ベニシダは常緑性で本州から琉球列島 (沖永良部島以北) の主に暖温帯の低山地の林下, オニヤブソテツは本州から琉球列島の海岸沿いに生育することが多く, ゼンマイは夏緑性で, 北海道から九州の山地林下や路傍に生育することが多い(海老原, 2016・2017; 田川, 1959)。ベニシダの胞子は 2019 年 5 月 28 日に東京都町田市で採取し, 2019 年 7 月 10 日に保存を開始した。オニヤブソテツの胞子は 2019 年 5 月 25 日に神奈川県真鶴町で採取し, 2019 年 7 月 17 日に保存を開始した。ゼンマイの胞子は 2019 年 4 月 18 日に東京都町田市にて採取し, 2019 年 4 月 26 日に保存を開始した。本研究においての最長保存期間はベニシダでは 119 日, オニヤブソテツは 170 日, ゼンマイは 202 日とした。

採取した胞子葉は紙封筒に入れ, 室温の暗所にて数日間風乾したのち, 胞子を採取した。採取した胞子は 70%エタノールで殺菌した硼珪酸ガラスのスクリュ一瓶 (口内径:14.5 mm×胴径: 24.0 mm×高さ:50 mm) に入れ, 保存温度は 25°C (常温), 5°C (冷蔵), -18°C (冷凍) を設けた。

胞子の殺菌はクリーンベンチ内で行った。殺菌には 12%次亜塩素酸ナトリウ

ム（株式会社松葉薬品）を希釈して、1%次亜塩素酸ナトリウムを作成し、これを孢子の入ったスクリー瓶に10 ml 入れ、5 分間攪拌した。孢子は浸漬後、ろ紙でろ過して、滅菌水で3 回洗浄した。ろ紙上の孢子を葉さじで集め、滅菌水に浸漬させ、30 分以内に培地へ播種した。孢子播種は保存時より約1 週間後、その後約2 ヶ月ごと、ゼンマイのみ2 回目以降の播種は約1 ヶ月ごとに行った。

培地はスクロースが添加されていないムラシゲ・スクーグ培地の粉末培地（日本製薬株式会社）を使用した（以下MS 培地）。蒸留水1 ℓに粉末培地を溶かしたものを1MS 濃度とし、500 ml を別の容器に移し蒸留水を500 ml 加えることで濃度を1/2MS に調整した。培地のpH は 6.00 ± 0.05 に調整したのち、寒天粉末を濃度0.7%になるよう加え、オートクレーブ（121 °C、20 分間）で滅菌処理を行った。

培地は滅菌処理後にクリーンベンチ内にて滅菌プラスチックシャーレ（直径50.7 mm、高さ14.7 mm）に15 ml 分注し、常温になるまで放冷した。放冷後、殺菌した孢子をマイクロピペットで吸い取り、培地上の5 ヶ所が等間隔になるように1 滴ずつ播種した。なお、播種範囲は1 滴あたり実体顕微鏡での観測視野（縦2.5 mm、横3 mm）に収まるように設定した。播種後シャーレの周囲に自己粘着フィルム（高機能被覆フィルム ラボピタ 20 mm×30 mm）を2 周ほど巻き密閉した。したがって、1 条件区につき1 シャーレに5 滴の孢子播種を行い反復は5 回とした。

播種後のシャーレは恒温25 °Cに設定した温度勾配機（東京理化工機 EYELA

MTI-202) 内に設置した。温度勾配機内の光量は 3,300 lux(明期 12 時間・暗期 12 時間) とした。

胞子発芽の観察には実体顕微鏡 (OLYMPUS SZ61) を使用した。発芽測定は各シャーレに播種した 5 滴のうち 1 カ所を測定箇所とし、顕微鏡用デジタルカメラ (OLYMPUS DP22) でシャーレ毎に播種後、第 1, 2 週目は週に 3 回、第 3 週目以降は週 2 回行い、25 日で打ち切りとした。測定を行わなかった残り 4 箇所はコンタミネーションが発生した、もしくは播種した胞子数が著しく多いか少ない状態であった。また、各シャーレは播種後 25 日まで一度も開封しておらず、温度勾配機内に設置した際にシャーレが重なった場合は数日おきにその順番を変えることで、シャーレが受ける光量に差が生じないように配慮した。胞子播種数は表 II-4-1 に示す。発芽は撮影画像の胞子から緑色の原糸体が突出した時点とした。発芽率は発芽胞子と未発芽胞子を計数して式 1 にて算出した。また、平均発芽日数は式 2(中村ほか, 2009)にて算出した。発芽率は逆正弦変換を行い、各温度条件における最終発芽率の差の有無を一元配置分散分析で判定し、有意差を確認したうえで Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。また、平均発芽日数の差の有無も同様に検定を行った。

$$\text{発芽率(\%)} = 100 \times \Sigma n / N \quad (1)$$

$$\text{平均発芽日数(日)} = \Sigma (t \times n) / \Sigma n \quad (2)$$

N : 培地に播種した胞子数, n : 日毎の発芽した胞子数, t : 経過日数

表 II-4-1 ベニシダの孢子播種数

ベニシダ

| | 常温(7/17) | 常温(9/11) | 冷蔵(9/11) | 冷凍(9/11) | 常温(11/13) | 冷蔵(11/13) | 冷凍(11/13) |
|----|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| A | 74 | 51 | 49 | 51 | 94 | 91 | 67 |
| B | 112 | 52 | 57 | 44 | 122 | 120 | 127 |
| C | 86 | 47 | 38 | 33 | 299 | 262 | 169 |
| D | 113 | 84 | 42 | 83 | 273 | 269 | 57 |
| E | 101 | 62 | 205 | 84 | 341 | 329 | 54 |
| 合計 | 486 | 296 | 391 | 295 | 1129 | 1071 | 474 |
| 平均 | 97 | 59 | 78 | 59 | 226 | 214 | 95 |

表 II-4-2 オニヤブソテツの孢子播種数

オニヤブソテツ

| | 常温(6/6) | 冷蔵(6/6) | 冷凍(6/6) | 常温(7/17) | 冷蔵(7/17) | 冷凍(7/17) | 常温(10/2) | 冷蔵(10/2) | 冷凍(10/2) | 常温(11/13) | 冷蔵(11/13) | 冷凍(11/13) |
|----|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| A | 96 | 19 | 33 | 140 | 384 | 225 | 164 | 67 | 72 | 144 | 156 | 152 |
| B | 103 | 51 | 53 | 174 | 324 | 366 | 149 | 78 | 53 | 144 | 107 | 163 |
| C | 73 | 44 | 73 | 222 | 349 | 110 | 117 | 61 | 49 | 89 | 77 | 281 |
| D | 101 | 53 | 42 | 271 | 182 | 114 | 43 | 112 | 110 | 38 | 287 | 315 |
| E | 104 | 44 | 101 | 91 | 260 | 155 | 46 | 39 | 60 | 42 | 343 | 317 |
| 合計 | 477 | 211 | 302 | 898 | 1499 | 970 | 519 | 357 | 344 | 457 | 970 | 1228 |
| 平均 | 95 | 42 | 60 | 180 | 300 | 194 | 104 | 71 | 69 | 91 | 194 | 246 |

表 II-4-3 ゼンマイの孢子播種数

ゼンマイ

| | 常温(5/3) | 冷蔵(5/3) | 冷凍(5/3) | 常温(5/22) | 冷蔵(5/22) | 冷凍(5/22) | 常温(7/17) | 冷蔵(7/17) | 冷凍(7/17) | 常温(9/11) | 冷蔵(9/11) | 冷凍(9/11) | 常温(11/13) | 冷蔵(11/13) | 冷凍(11/13) |
|----|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| A | 14 | 16 | 48 | 52 | 49 | 191 | 141 | 263 | 222 | 203 | 118 | 73 | 68 | 73 | 339 |
| B | 30 | 14 | 33 | 101 | 54 | 81 | 247 | 132 | 262 | 153 | 132 | 151 | 151 | 76 | 228 |
| C | 35 | 96 | 61 | 139 | 53 | 79 | 230 | 144 | 265 | 238 | 131 | 111 | 22 | 31 | 215 |
| D | 49 | 65 | 95 | 59 | 75 | 36 | 278 | 265 | 112 | 135 | 117 | 99 | 24 | 48 | 56 |
| E | 23 | 50 | 50 | 75 | 71 | 37 | 303 | 259 | 205 | 92 | 95 | 150 | 123 | 200 | 118 |
| 合計 | 151 | 241 | 287 | 426 | 302 | 424 | 1199 | 1063 | 1066 | 821 | 593 | 584 | 388 | 428 | 956 |
| 平均 | 30 | 48 | 57 | 85 | 60 | 85 | 240 | 213 | 213 | 164 | 119 | 117 | 78 | 86 | 191 |

第2項：実験結果

ベニシダの保存期間による発芽率の推移を図Ⅱ-4-1に示す。平均発芽率について、どの保存期間においても冷蔵保存した胞子の発芽率が最も高くなった。保存後119日経過した時点の発芽率について、常温保存した胞子は $6.6\pm 2.5\%$ 、冷蔵保存した胞子は $72.9\pm 4.2\%$ 、冷凍保存した胞子は $40.2\pm 17.8\%$ であり、冷蔵保存した胞子と冷凍保存した胞子の差は 66.3% であった。冷蔵保存とその他の保存条件で有意差がみられた ($p<0.01$)。平均発芽日数について図Ⅱ-4-4に示す。保存後9日経過した時点では常温保存した胞子は 6.2 ± 0.6 日となった。保存後119日経過した時点では常温保存した胞子は 13.9 ± 0.2 日、冷蔵保存した胞子で 6.6 ± 0.1 日、冷凍保存した胞子は 9.0 ± 2.5 日となった。

オニヤブソテツの保存期間による発芽率の推移を図Ⅱ-4-2に示す。平均発芽率について、どの保存期間においても冷蔵保存した胞子の発芽率が最も高くなった。保存後170日経過した時点の発芽率について、常温保存した胞子は $41.5\pm 10.5\%$ 、冷蔵保存した胞子は $70.0\pm 5.5\%$ 、冷凍保存した胞子は $32.2\pm 3.9\%$ であり、冷蔵保存した胞子と冷凍保存した胞子の差は 37.8% であった。冷蔵保存とその他の保存条件で有意差がみられた ($p<0.01$)。平均発芽日数については図Ⅱ-4-5に示す。保存後9日経過した時点では常温保存した胞子は 6.1 ± 0.1 日、冷蔵保存した胞子で 6.7 ± 0.1 日、冷凍保存した胞子は 6.6 ± 0.2 日となった。保存後170日経過した時点では常温保存した胞子は 10.1 ± 1.0 日、冷蔵保存した胞子で 6.8 ± 0.1 日、冷凍保存した胞子は 12.8 ± 0.5 日となった。

ゼンマイの保存期間による発芽率の推移を図 II-4-3 に示す。平均発芽率について、どの保存期間においても冷凍保存した胞子の発芽率が最も高くなった。保存後 202 日経過した時点の発芽率について、常温保存した胞子は 0%，冷蔵保存した胞子は $6.0 \pm 4.4\%$ ，冷凍保存した胞子は $45.8 \pm 3.6\%$ であり、冷凍保存した胞子と常温保存した胞子の差は 45.8%であった。冷凍保存とその他の保存条件で有意差がみられた ($p < 0.01$)。平均発芽日数については図 II-4-6 に示す。保存後 7 日経過した時点では常温保存した胞子は 4.9 ± 1.2 日，冷蔵保存した胞子で 4.1 ± 0.4 日，冷凍保存した胞子は 3.6 ± 0.1 日となった。保存後 202 日経過した時点では常温保存した胞子は発芽せず，冷蔵保存した胞子で 6.4 ± 2.1 日，冷凍保存した胞子は 4.7 ± 0.2 日となった。

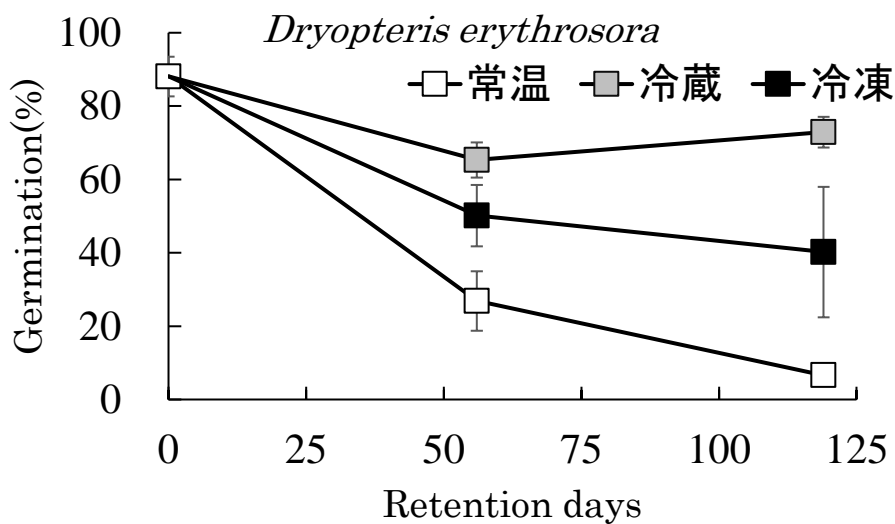


図 II-4-1 ベニシダの保存条件ごとの発芽率の結果 エラーバーは標準偏差を表す (n=5)

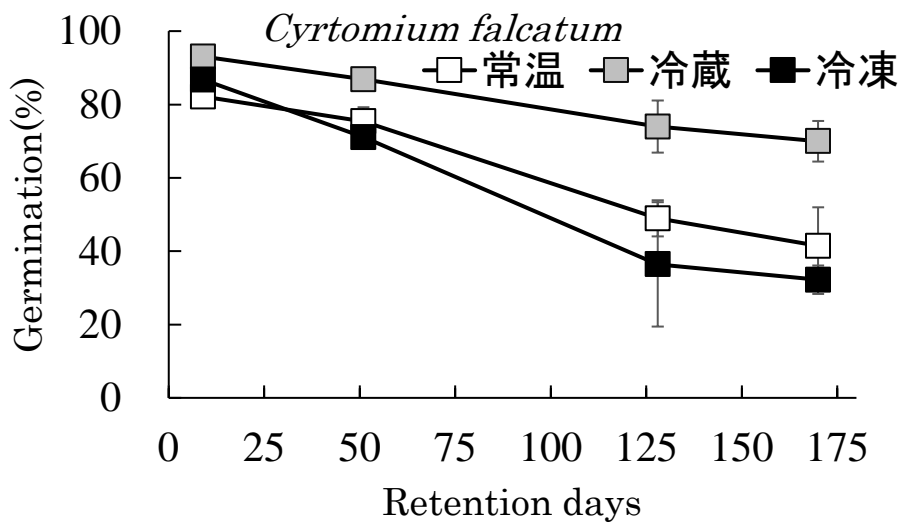


図 II-4-2 オニヤブソテツの保存条件ごとの発芽率の結果 エラーバーは標準偏差を表す (n=5)

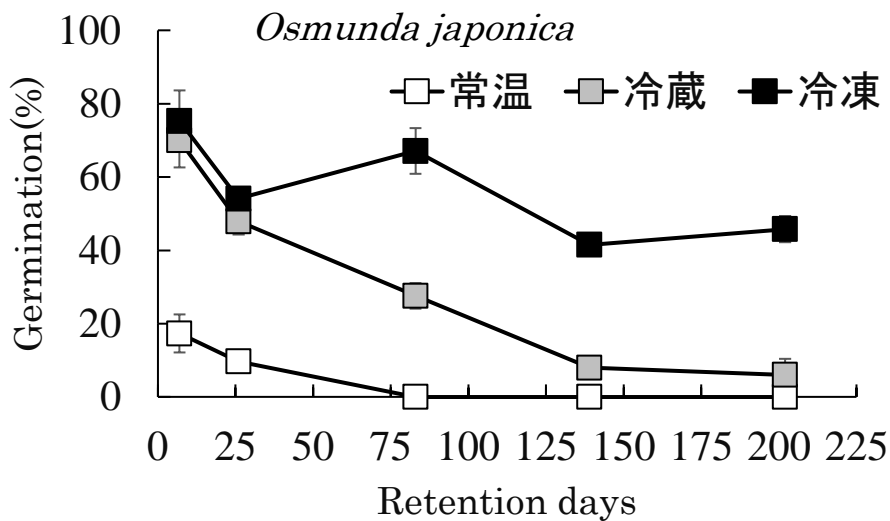


図 II-4-3 ゼンマイの保存条件ごとの発芽率の結果 エラーバーは標準偏差を表す (n=5)

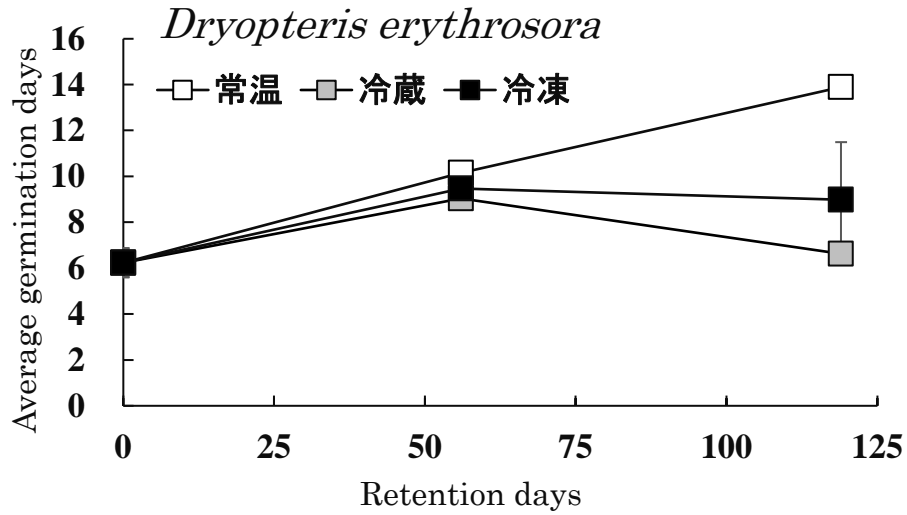


図 II-4-4 ベニシダの保存条件ごとの平均発芽日数の結果 エラーバーは標準偏差を表す (n=5)

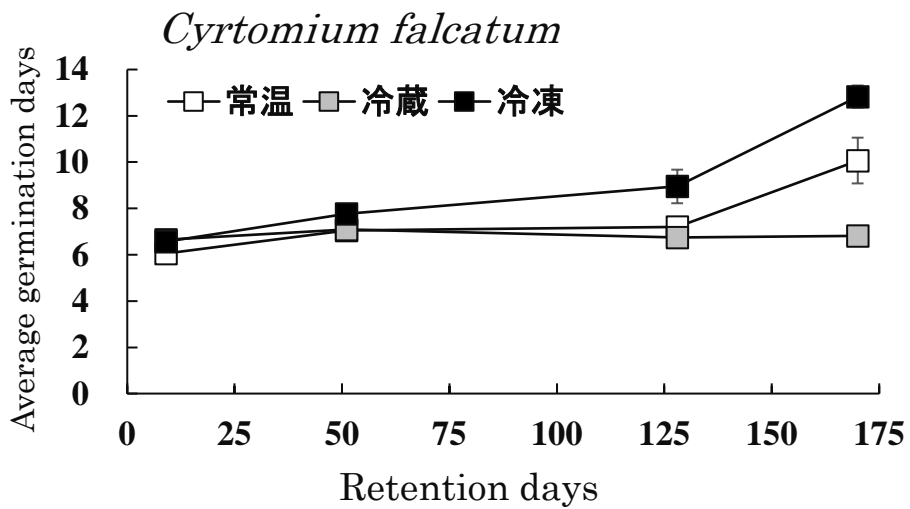


図 II-4-5 オニヤブソテツの保存条件ごとの平均発芽日数の結果 エラーバーは標準偏差を表す (n=5)

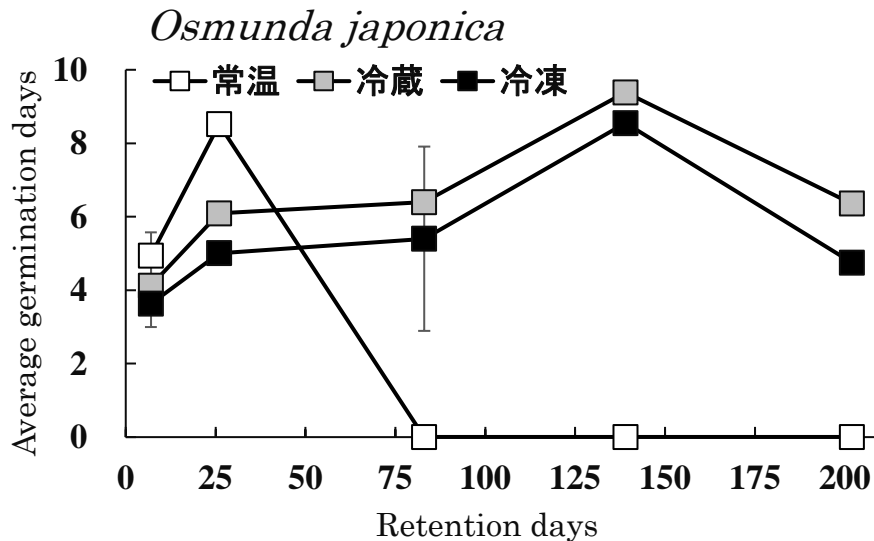


図 II-4-6 ゼンマイの保存条件ごとの平均発芽日数の結果 エラーバーは標準偏差を表す (n=5)

第3項：小括

ベニシダの最終発芽率は、いずれの保存期間においても冷蔵保存で最も高い値を示した ($p<0.01$)。保存期間 119 日経過した胞子の発芽率は、冷蔵保存した胞子が最も高く 72.9%，常温保存した胞子が最も低く 6.6%となった。

オニヤブソテツの最終発芽率は、いずれの保存期間においても冷蔵保存で最も高い値を示した ($p<0.01$)。保存後 170 日の発芽率は、冷蔵保存した胞子が最も高く 70.0%，冷凍保存した胞子が最も低く 32.2%となった。

ゼンマイでは、他の 2 種と異なり、いずれの保存期間においても冷凍保存で最終発芽率が最も高い値を示した ($p<0.01$)。保存後 202 日の発芽率は、冷凍保存した胞子が最も高く 45.8%，冷蔵保存した胞子が最も低く 6%となり、常温

保存した胞子は 83 日以降、発芽が確認されなかった。

胞子の耐凍性は種によって異なる(佐藤・酒井, 1981b)。また、胞子は越冬し翌春に発芽することが確認されているため(佐藤・酒井, 1981a)、胞子の散布時期と本研究での冷凍保存の結果と関係していると考えられる。胞子の発芽率は保存温度と保存期間によって大幅に変化する事が判明したことから、胞子栽培においては保存温度によって胞子の播種時期を考慮する必要があると考えられる。本研究の結果はMSBのような遺伝子保存に関する研究に寄与することも考えられる(木村ほか, 2019)。また、胞子の保存は長期的な実験に関しても求められると考えられる(Raghavan, 2005)。

第Ⅱ-5：胞子の重量と発芽数の関係

第1項：実験方法

供試植物はオシダ科オシダ属のベニシダとオシダ科ヤブソテツ属のオニヤブソテツとした。ベニシダは本州から琉球列島（沖永良部島以北）の常緑広葉樹林帯，オニヤブソテツは本州から琉球列島の海岸沿いに生育することが多い(海老原, 2017)。今回実験で使用するベニシダは3倍体（無配生殖），オニヤブソテツは2倍体（有性生殖），3倍体，4倍体（有性生殖）が確認されている(松本, 2003) (光田, 1986)。一般的に2倍体有性生殖型は1胞子嚢あたり64個，3倍体無配生殖型は1胞子嚢あたり32個の胞子をつくることが知られている(三井, 1982)。今回の実験では，増殖技術の確立を目的とするため，3倍体無配生殖型を両種とも使用した。両種ともに1胞子嚢あたり32個の胞子がある事を確認した。

実験に使う個体は両種とも2015年12月に大分県速見郡で山採りを行い，2017年3月から東京都世田谷区の東京農業大学構内の圃場にてスリットコンテナ（直径15cm，深さ13cm，TO-SC150，東海化成）を使用し育成管理した。育成期間中は全個体とも屋外にて，黒色の遮光率75%の寒冷紗下にて同一の管理を行った。個体ごとの株の大きさやソーラス（胞子嚢群）の色や成熟度合については目視と写真にて観察，記録を行ったが，外見上に大きな差は確認されなかった。2017年6月，1個体からソーラスの総重量が0.010gになるまでパラフィン紙内に集めて封入した。1個体からソーラスの採取を5反復行い，全7個体用

意したため、0.010gのソーラスのセットは計35となった。また、孢子採取は兩種とも1日で行った。採取したソーラスは室内にて4日間風乾し、孢子嚢から裂開して出てきた孢子を実験に用いた。

また、孢子ではなくソーラスの総重量を計測して実験を行なった理由は、孢子栽培を行うにあたり実用性を考慮したからである。そのため、3倍体の個体であることを確認する目的以外では、1孢子嚢中の孢子数は計数していない。

ソーラスの大きさは個体によって異なることから、兩種とも式1により1ソーラスの平均重量(mg)を算出した。また、個体ごとの値における差の有無を一元配置分散分析で判定し、有意差を確認したうえでTukey-KramerのHSD検定を行った。

$$1 \text{ ソーラスの平均重量 (mg) } = 0.010\text{g} / \text{ソーラスの数} \times 1,000 \quad (\text{式 1})$$

孢子を播種した容器はプラスチックシャーレ(滅菌ディスコシャーレ(PS製)直径56mm,高さ16mm)を使用し、容積の半分まで培地として硬質鹿沼土(細粒,粒径2mm)を敷き詰めた。培地に純水を5ml加えた後に、0.010gのソーラスのセット1個を播種した。シャーレは温度条件を25℃恒温,光条件を明条件16時間(11,000lux),暗条件8時間に設定した人工気象器(日本医科器械製作所(株)SK-101R LH-240S)内に設置した。室内実験は同大学構内にて行った。

胞子の発芽は緑色の原糸体が目視にて確認出来た状態を指し、各シャーレ内において無作為に選んだ 10 プロットを計数することで胞子の発芽数とした。1 プロットは 5mm×5mm とし、計数は正方形の紙片（15mm×15mm）の中央にカッターで正方形（5mm×5mm）の穴を開けた紙を用いて行った（図 II-5-1）。測定は無作為のため、原糸体が生育していない部分も選ばれている。測定には実体顕微鏡を用い、最低でも 1 週間に 1 回以上実施した。1 ソーラスあたりの発芽数は式 2 にて算出した。また、胞子の発芽は前葉体の生育密度がピークになるまで観察された。

1 ソーラスあたりの胞子の発芽数=ピーク時の生育密度/ソーラスの数（式 2）

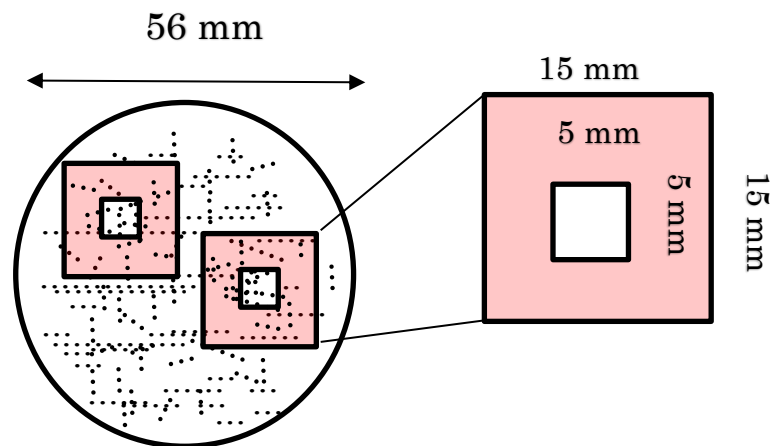


図 II-5-1 胞子の発芽と前葉体の生育密度の測定

無作為に選んだ 10 プロット（1 プロット=5 mm×5 mm）内における発芽数と生育数を計測

第 2 項：実験結果

個体毎の 1 ソーラスの平均重量を図 II-5-2, 3 に示す。1 ソーラスの平均重量が最も軽い個体を A とし、軽い個体から順に A から G のアルファベットを割り当て、凡例の色が濃くなるほどソーラスが重いことを示す。1 ソーラスの平均重量は、ベニシダでは 0.16mg(各個体の平均重量は 0.08mg(A), 0.10mg(B), 0.13mg(C), 0.15mg(D), 0.20mg(E), 0.20mg(F), 0.26mg(G)), オニヤブソテツでは 0.32mg(各個体の平均重量は 0.19mg(A), 0.21mg(B), 0.22mg(C), 0.23mg(D), 0.24mg(E), 0.39mg(F), 0.79mg(G))であった。平均重量は個体によって差が確認され、両種ともに最も軽いソーラスと重いソーラスでは 5 倍程度の差が見られ、両種とも個体 G は独立したグループとして認められた (Tukey-Kramer 法, $p<0.01$)。

式 2 より算出した両種の 1 ソーラスあたりの胞子の発芽数と、1 ソーラスの平均重量との相関を求め、回帰線を表示した図 II-5-4, 5。ベニシダとオニヤブソテツともに 1 ソーラスの平均重量と発芽数の間に正の相関 ($r^2=0.61$, $p<0.01$; $r^2=0.91$, $p<0.01$) が認められた。ベニシダのソーラスの平均重量が約 0.25mg までは発芽数は $0.1/\text{mm}^2$ 以下に含まれ、オニヤブソテツはソーラスの平均重量が約 0.5mg までは発芽数は $0.1/\text{mm}^2$ 以下に含まれていた。また、両種共に個体 G の発芽数が最も多く、各個体における 5 反復での標準偏差は個体 G が最も大きい値を示した。

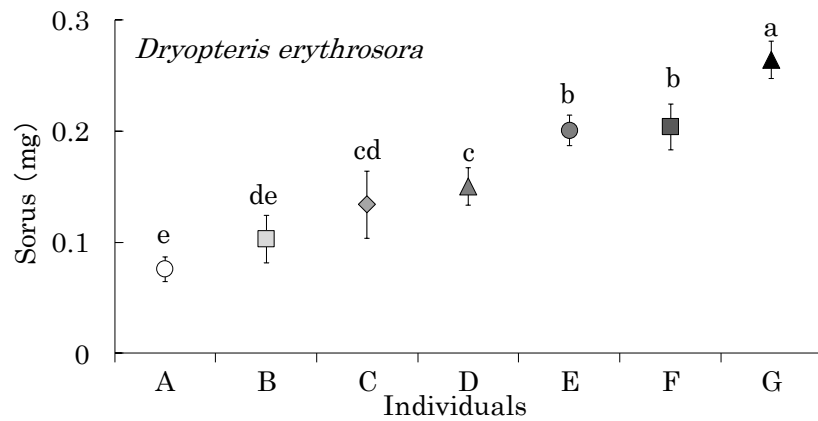


図 II-5-2 ベニシダの 1 ソーラスの重さ (エラーバーは標準偏差を示す。n=5) アルファベットは個体間で平均値に有意差が認められたことを示す。(Tukey-Kramer 法, $p < 0.01$)

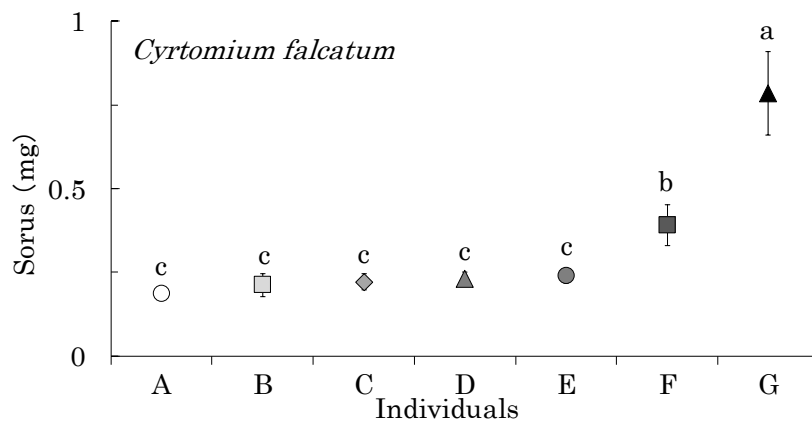


図 II-5-3 オニヤブソテツの 1 ソーラスの重さ (エラーバーは標準偏差を示す。n=5) アルファベットは個体間で平均値に有意差が認められたことを示す。(Tukey-Kramer 法, $p < 0.01$)

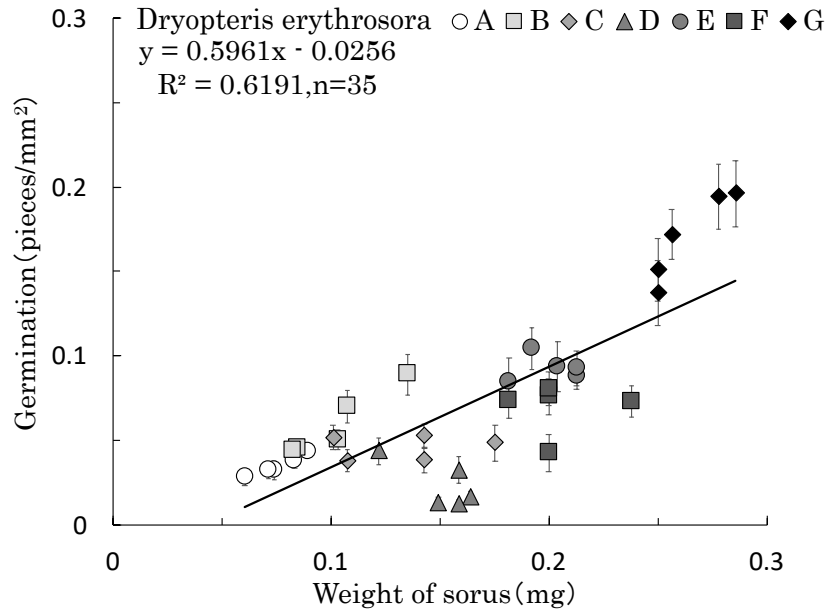


図 II-5-4 ベニシダの1ソーラスの重さと胞子の発芽数

(各点は10プロットの平均値で、エラーバーは標準偏差を示す。n=10)

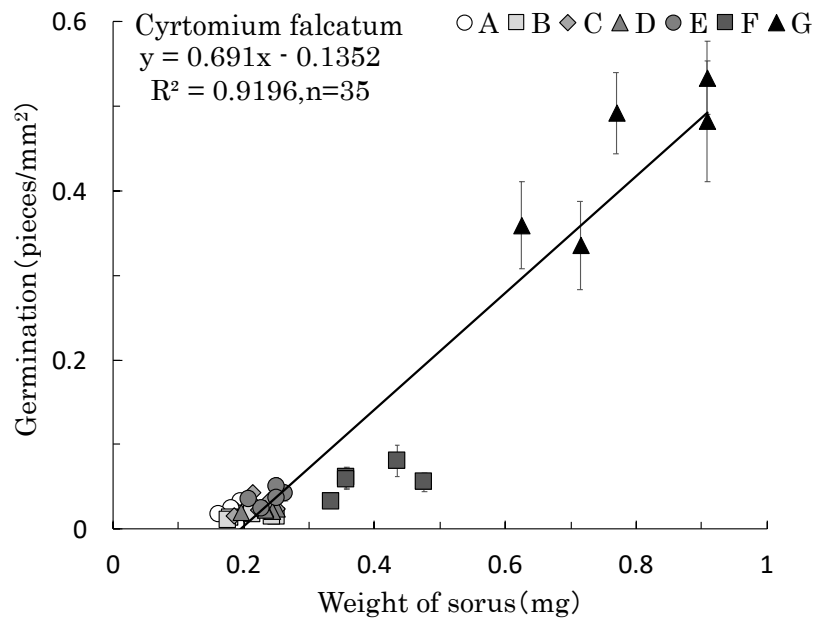


図 II-5-5 オニヤブソテツの1ソーラスの重さと胞子の発芽数

(各点は10プロットの平均値で、エラーバーは標準偏差を示す。n=10)

第3項：小括

ソーラスが重いほど多くの前葉体が得られる傾向が見られたことから、栽培時には重いソーラスを持つ個体を選別することで多くの前葉体を得ることができ、かつ高い精度で生育密度を推定できる可能性がある。また、ソーラスの重さは孢子嚢数や包膜、環帯などの大きさで変動すると考えられる。

既存研究では33種を対象に1ソーラス中の孢子嚢数を数えたところ、全ての種において孢子嚢数の最小値と最大値の間では2倍以上の差は認められなかった(Gastony, 1974)。また、孢子の重量は同一種内でも異なり、チャセンシダ属の一種 (*Asplenium abscissum* Willd.) では最小値と最大値の間では約3倍の差があったと報告している(Gómez et al., 2016)。本研究において1ソーラスの平均重量はベニシダ・オニヤブソテツ両種とも最小値と最大値の間では約5倍の差があった。このことから、ソーラスの孢子嚢数よりも包膜、環帯などの大きさがソーラスの重さに影響していると考えられ、ソーラスの重い個体では1つの孢子が大きく充実しているために前葉体の形成がしやすくなったと考えられる。

ソーラスは個体ごとに肉眼レベルで確認できる個体差があるため、ソーラスの構成要素の体積や密度の変化はソーラス自体の大きさなどの形態上に現れている可能性がある。1ソーラスあたりから得られる前葉体の生育密度の最大値を計測したことで、ベニシダとオニヤブソテツの孢子栽培において、播種段階で最大の生育密度をある程度推定できるようになったと考えられる。また、1ソーラ

スから得られる前葉体の生育密度はベニシダとオニヤブソテツの分類群が異なる両者において、それぞれ異なる値を示した。

今までは一定量の胞子を播種した際に、どれくらいの前葉体 that 得られるか定量的には判明していないが、今回の結果から胞子採取の時にソーラスの数を参考にすることで一定の推定が可能と考えられる。一方で、ソーラスが重いほど多くの前葉体 that 得られる傾向は両者とも確認された。他種でも重いソーラスを持つ個体 that、胞子栽培における優良個体になる可能性がある。同一個体での研究例は少ないが、胞子栽培において年ごとにソーラスの重さと発芽に大きな変化が生じなければ、ソーラスの重い個体から採取することで、安定的かつ多量な生産が可能になると考えられる。また、本実験は日本緑化工学会誌で発表した内容である(西野ほか, 2020)。

第Ⅱ-6：利用頻度の異なる孢子と発芽率の関係

第1項：実験方法

供試植物は昔より山菜として利用されているゼンマイ科ゼンマイ属のゼンマイ (*Osmunda japonica* Thunb.) とした。ゼンマイは夏緑性で北海道から九州の山地林下や路傍，林縁，草地に生育することが多い(海老原, 2016・2017; 田川, 1959)。2倍体有性生殖で染色体基本数 $X=22$ を有している。通常のシダ植物では葉の裏に孢子をつける孢子葉を用いて繁殖を行う。シダ植物の繁殖方法は株によって増える栄養繁殖と，孢子で増える孢子繁殖の2種類が存在する。ゼンマイは2形性という光合成をおこなう栄養葉と孢子をつける孢子葉に分かれる性質を持っている。本試験では山菜として利用される展葉前の栄養葉がつける葉軸の太さのみを測定し，孢子葉は孢子の色が緑色に成熟した状態ものを株毎に分けて採取し，孢子を発芽試験と形質調査に使用した。孢子は通常であれば4面体孢子と呼ばれるほぼ球体をなしている。また，通常は葉緑素を持たないために茶色の孢子であるが，ゼンマイは葉緑素を持つために緑色をなしている。

ゼンマイの孢子は，東北地方の秋田県から九州地方の大分県にかけて利用頻度の違う全6地域から採取した。孢子は2019年4月21日に東京都町田市薬師池と大分県速見郡日出町，2019年4月29日に秋田県大館市山田地区，2019年4月30日に新潟県阿賀町室谷地区，2019年5月4日に秋田県能代市梅内地区，2019年4月29日に山梨県北都留郡小菅村にて採取した。



写真Ⅱ-6-1 ゼンマイにおける採取地の例(大分県)と孢子葉の様子

人の利用頻度が発芽や生育に影響を与えている可能性があるため、地域でのヒアリング調査をもとに利用頻度を3段階に分けた順序で記載した。ゼンマイを採取し販売を行う秋田県大館市山田地区と過去に日本一の太さの室谷ゼンマイとして有名であり現在もゼンマイ文化が地域に根強く残る新潟県阿賀町室谷地区は利用頻度が高いとした。本試験の計測調査は利用頻度の高い毎年採取する場所において調査を行った。また、同じ秋田県でも山菜としての利用が少ない場所(数年に1回程度の利用)にて採取した能代市梅内地区は利用頻度を中とした。最後に、東京都町田市薬師池や、山梨県北都留郡小菅村、大分県日出町川崎地区は山菜としての利用が見られない地域であるため、利用頻度は低いものとして設定した。また、展葉前の葉軸の太さは4月から5月に7~15個体の地際から5cmの高さをノギスで計測した。

採取した孢子葉は紙封筒に入れ、室温の暗所にて数日間風乾したのち孢子を採取した。採取した孢子は70%エタノールで殺菌した硼珪酸ガラスのスクリー一瓶(口内径:14.5 mm×胴径:24.0 mm×高さ:50 mm)に入れ、暗所にて室温で

保存した。

胞子の殺菌はクリーンベンチ内で行った。殺菌には 12%次亜塩素酸ナトリウム（株式会社松葉薬品）を希釈して、1%次亜塩素酸ナトリウムを作成し、これを胞子の入ったスクリュウ瓶に 10 ml 入れ、5 分間攪拌した。胞子は浸漬後、ろ過して滅菌水で 3 回洗浄した。ろ紙上の胞子を葉さじで集め、滅菌水に浸漬させ、30 分以内に培地へ播種した。

培地はスクロースが添加されていないムラシゲ・スクーグ培地の粉末培地（日本製薬株式会社）を使用した（以下 MS 培地）。蒸留水 1 l に粉末培地を溶かしたものを 1MS 濃度とし、500 ml を別の容器に移し蒸留水を 500 ml 加えることで濃度を 1/2MS に調整した。培地の pH は 6.00 ± 0.05 に調整したのち、寒天粉末を濃度 0.7%になるよう加え、オートクレーブ（121 °C, 20 分間）で滅菌処理を行った。

培地は滅菌処理後にクリーンベンチ内にて滅菌プラスチックシャーレ（直径 50.7 mm, 高さ 14.7 mm）に 15 ml 分注し、常温になるまで放冷した。放冷後、殺菌した胞子をマイクロピペットで吸い取り、培地上の 5 ヲ所が等間隔になるように 1 滴ずつ播種した。なお、播種範囲は 1 滴あたり実体顕微鏡での観測視野（縦 2.5 mm, 横 3 mm）に収まるように設定した。播種後シャーレの周囲に自己粘着フィルム（高機能被覆フィルム ラボピタ 20 mm×30 mm）を 2 周ほど巻き密閉した。播種後のシャーレは恒温 25 °C に設定した温度勾配機（東京理化学器械 EYELA MTI-202）内に設置した。温度勾配機内の光量は 3,300 lux（明期

12 時間・暗期 12 時間) とした。

孢子発芽の観察には実体顕微鏡 (OLYMPUS SZ61) を使用した。発芽測定は各シャーレに播種した 5 滴のうち 1 カ所を測定箇所とし、顕微鏡用デジタルカメラ (OLYMPUS DP22) でシャーレ毎に播種後 30 日までは週 3 回の間隔で撮影を行った。発芽は撮影画像の孢子から緑色の原糸体が突出した時点とした。発芽率は発芽孢子と未発芽孢子を計数して式 1 にて算出した。また、平均発芽日数は式 2(中村ほか, 2009)にて算出した。発芽率は逆正弦変換を行い、各温度条件における最終発芽率の差の有無を一元配置分散分析で判定し、有意差を確認したうえで Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。また、平均発芽日数の差の有無も同様に検定を行った。

$$\text{発芽率(\%)} = 100 \times \Sigma n / N \quad (1)$$

$$\text{平均発芽日数(日)} = \Sigma (t \times n) / \Sigma n \quad (2)$$

N : 培地に播種した孢子数, n : 日毎の発芽した孢子数, t : 経過日数



写真 II-6-2 ゼンマイの栄養葉の葉軸の太さを計測する様子

第2項：実験結果

本試験を行った結果、10日前後でピークに達し、27日では変化が見られなかった。本試験の最終平均発芽率は、秋田県山田地区 41.4%、新潟県室谷地区 55.3%、秋田県梅内地区 45.8%、東京都薬師池 23.4%、山梨県小菅村 30.4%、大分県日出町 61.4%であった。

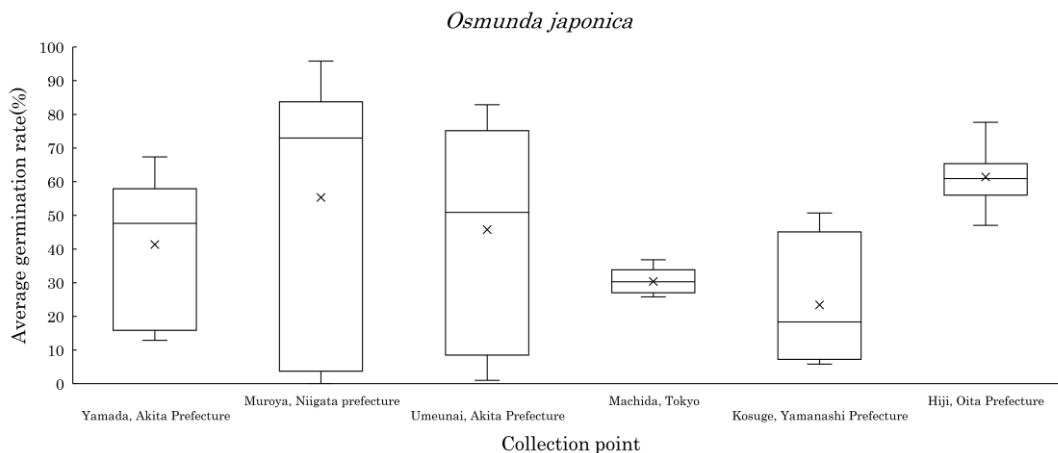
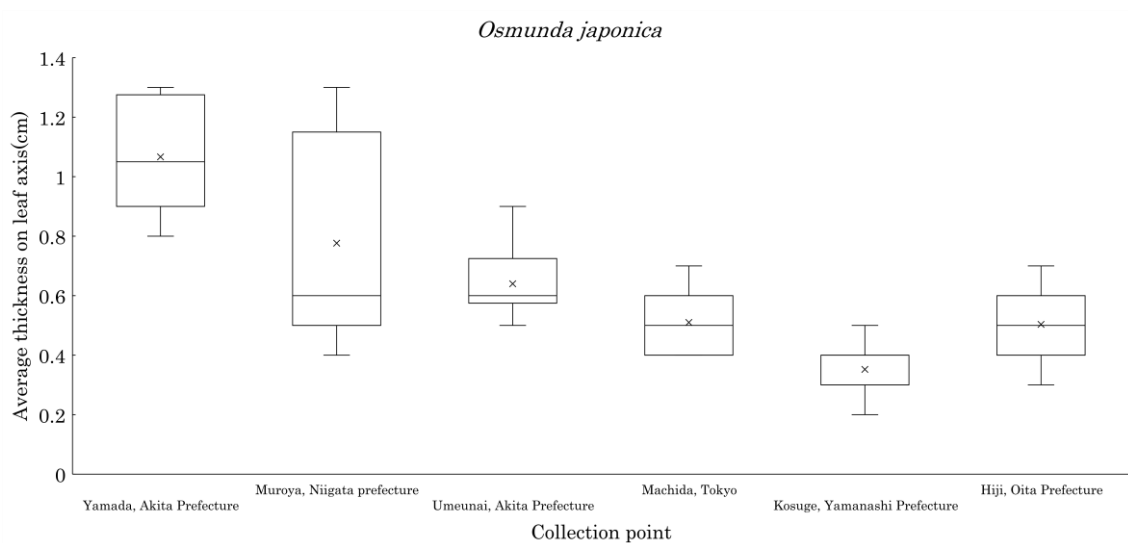


図 II-6-1 ゼンマイにおける採取地ごとの最終発芽率 (町田のみ n=5)

採取地域ごとの葉軸の太さを図 II-6-1 に示した。秋田県山田地区は平均 0.99 cm (n = 12)、新潟県室谷地区は平均 0.78 cm (n = 11)、秋田県梅内地区は平均 0.64 cm (n = 10) であり、山菜としての利用がある以上 3 地域においては、他の地域と比べて比較的葉軸が太くなる傾向があった。また、山菜利用のない東京都薬師池は平均 0.4 cm (n = 7)、山梨県小菅村は平均 0.51 cm (n = 10)、大分県日出町は平均 0.51 cm (n = 15) であった。参考地域として山菜利用のない岩手県遠野市や鹿児島県指宿市でも葉軸の太さを計測したが、岩手県遠野市は平均 0.48 cm (n = 11)、鹿児島県指宿市は 0.33 cm (n = 13) と、いずれも山菜としての利用がある地域よりも細くなる傾向が見られた。



図II-6-2 ゼンマイにおける採取地ごとの葉軸の太さ

第3項：小括

一般的なシダ植物は不稔性や雑種・倍数性に違いがあると、葉軸の肥大化や胞子の形質的な違いが多くなる（伊藤,1972）が、今回の発芽試験で発芽率が著しく低い株が見られたため、雑種・倍数性に違いがあることが示唆された。しかし、ゼンマイはヤシャゼンマイやオクタマゼンマイのような雑種は形態に違いが顕著に表れ、2倍体有性生殖（染色体基本数 $x=22$ ）は変わらないため、不稔性や雑種・倍数性に違いがある可能性はないと考えられる。そこで、ゼンマイは胞子葉と栄養葉の2形性を持ち、繁殖方法には胞子繁殖と栄養繁殖の2つがあることに着目し、利用頻度の違いによって依存する繁殖方法が異なるのではないかと考えた。また、ゼンマイには様々な成分が含まれており（坂巻, 2005）、利用頻度の違いによって胞子に含まれる成分に違いが出る可能性も考えられる。

発芽試験を行った結果、利用頻度が高い地域では同じ地域で採取したにも関

ならず発芽しない個体が確認され、発芽率にばらつきがみられた。このことから、その発芽しなかった個体を何らかの要因からできた外れ値として除したデータで葉軸の太さと発芽率の関係について考察すると、葉軸が太ければ太いほど発芽率が上がる可能性が示唆された。既存研究においてゼンマイは株によって苗高 10 cm 近くの差異がみられるなどの形質変異が認められており、ひとつのゲノム領域にみられる遺伝的分化が差異を生む要因として考えられている。

今後の研究として、葉軸が太く、発芽率が高い個体を選抜することが低コスト早期育苗技術の開発につながると考えられる。また、シダ植物において栄養繁殖をする胞子の大きさは孢子繁殖をする胞子に比べてばらつきが大きい傾向がある(三井,1982)ため、今後の胞子の形質観察でサイズのばらつきが判明すれば、山菜としての利用頻度が高い地域では刈り取りという攪乱によって孢子繁殖ではなく、栄養繁殖へと繁殖形態を変化させた個体が出現している可能性があると考えた。しかし、ゼンマイにおける繁殖活動へのエネルギー投資率の測定方法は未確立のため、繁殖形態の変化に関する研究は今後の課題だと考えられる。

葉軸の太さを計測した結果、利用頻度が高い地域では葉軸の太い個体が多い傾向が見られることが分かった。一方で、同様の地域で採取した個体を発芽試験にかけた結果、利用頻度が高い地域では発芽率にばらつきが見られた。したがって、利用頻度が高いと適度な栄養葉の刈り取りにより栄養繁殖を行う個体が増加する可能性がある一方で、発芽率が著しく低い、もしくは発芽しない株も確認されたことから、孢子繁殖を行う個体が減少している可能性があるのではない

かと考えられる。また、山梨県小菅村が利用頻度の低い地域でありながら発芽しない株が確認された要因として、ゼンマイは杉・ヒノキ林内では2.3年以降の成長が困難であるが、小菅村のゼンマイも腐植の少ないスギの人工林内に生育していたため、もともと生育適地ではなく、発芽しないか、株が出る可能性が十分にあり、実際、葉軸もやせ細った形質が認められた。しかし、こちらも同様に発芽しない株があった日本海側の山田、梅内、室谷地区に関しては広葉樹林内の土地に生育していたため、適地であり葉軸も太い個体であるものの、発芽しない個体が出現したので、山梨県小菅村を除いた山菜としての利用がある地域を中心に考察を進めることとした。栄養繁殖をおこなう個体が増加する可能性については、チシマザサで行われた既存研究で人為的な攪乱によって生産性が高まる(Katayama,2015)ことが明らかとなっているが、シダ植物での既存研究はまだ少ないものと思われる。また、孢子繁殖を行う個体が減少する可能性については既存研究がなかったため、確実な仮説とは言えないが、その可能性について焦点を当てて研究を進める必要があるのではないかと考えられる。地上部の競争と地下部の競争によって成長量は変わると報告されている(Michael Begon *et al.*, 2013)。したがって、本実験においても利用頻度の違いにより、植物が何かしらの影響を受ける可能性があると考えられる。

第III章 前葉体の生育条件に関する研究

ワラビ、ゼンマイ、クサソテツは全て 2 倍体の有性生殖種である。前葉体時に受精を必要とする有性生殖では孢子の発芽、受精に適した環境などをそれぞれ検証する必要がある。そのため、受精過程を省略し、前葉体の一部に孢子体組織が直接分化し、それが幼孢子体へと成長する(益山, 1984) (三井, 1982)無性生殖(以下、無配生殖とする)を行うシダ植物に本研究では着目した。無配生殖種では分化した個体を大量に育成することで、多くの幼孢子体を獲得できると考えられる。また、前葉体に成長する前段階の原糸体に AcPHY3 の DNAi を含んだ原糸体は、赤色光に対して反応しないことが報告されている(河合ほか, 2005)。それに加えて、PHY3 を含む種類はゼンマイやカニクサには含まれず、原始的なシダ類には見られないことから、PHY3 の出現はシダの増殖にとって重要なステップであると考えられる(Kawai *et al.*, 2003)。

第III-1：温度条件と前葉体成長の関係

温度と前葉体の成長は前述したように孢子栽培においては重要な要素となる。孢子が発芽をしても前葉体が成長しなければ緑化植物もしくは山菜などに活用できないため重要であると考えられる。温度と植物の成長における関係については昔から調べられているが、シダ植物については未だに散見されるにすぎない。ほとんどの植物は一般的に 15°C から 30°C の間のある温度でよく成長するとされ、その理由はこの温度域内で植物の様々な生命現象は十分活発に進行し、協

調して働くことが指摘されている(Julius, 1887)。また、植物はある種に適した温度でない場合、温度ストレスを受けることでタンパク質の安定性や酵素反応など様々な生理現象に影響を与えることが報告されている(Lincoln et al., 2017)。例えば、イネ科植物の種子は水の氷点のごく近い温度でも発芽でき、根と芽を伸ばすことができるが、トウモロコシとベニバナインゲンは少なくとも約 9°C の温度、ナツメヤシは 15°C で発芽でき、芽生えが最も速く成長できる温度はイネ科植物では 28°C ないし 29°C だが、前述した植物は 30°C 以上であることが報告されている(Julius, 1887)。したがって、種によって限界温度と最適温度が異なると考えられ、本研究においても同じ温度で栽培しても前葉体の成長に差が生じたのは上記のようなことが関係していると考えられる。

また、他にも温度が 10°C 上昇するごとに起こる呼吸速度を、一般に温度係数 (temperature coefficient: Q_{10}) と呼んでおり、呼吸が短期的な温度変化に対してどのように応答するかを表している。また、昼と夜の温度差 (DIF: Difference) は植物の発達に影響を及ぼすとされ、キクの生長では昼温 18°C 夜温 24°C、昼温 24°C 夜温 18°C の条件に差がないことが報告されている(Ep Heuvelink et al., 2017)。しかし、これは種によって異なることが一般的とされ、この事象が当てはまるのはキクの場合 18~24°C の範囲とされている(Ep Heuvelink et al., 2017)。

温度といっても、その対象カテゴリーは根の温度、茎の温度、生長点の温度、葉の温度、花の温度、果実の温度などがあり、植物生産の分野では作物を主体と

して研究されてきた。本研究では栽培温度に関して実験を行ったが、今後は根・茎・生長点・葉の温度について着目する必要もあると考えられる。例えば、栽培技術において根の温度は 1980 年代より多くの研究が行われてきたが、植物種によっては根だけでなく植物全体を温めるほうが良いとされている(Ep Heuvelink et al., 2017)。また、植物工場では葉の温度に着目して研究を行っており、葉温 25℃付近が光合成の適温と報告している(古在, 2014)。

第 1 項：実験方法

供試植物は従来から緑化植物として利用されているオシダ科オシダ属のベニシダ (*Dryopteris erythrosora* (D.C.Eaton) Kuntze.)、独特の葉形や耐凍性を有し今後の緑化植物として期待されているオシダ科オシダ属のオシダ、コウヤワラビ科コウヤワラビ属のイヌガンソクとした。ベニシダとオシダは同科同属であるが、暖温帯と冷温帯で分布域が大きく異なる。ベニシダは常緑性で、本州から琉球列島(沖永良部島以北)の主に暖温帯の低山地の林下、オシダは夏緑性で、南千島から四国(徳島県)の主に冷温帯の山地林下、イヌガンソクは夏緑性で、北海道から九州の主に山地林下に生育することが多い(海老原, 2016・2017; 田川, 1959)。ベニシダの胞子は 2018 年 6 月下旬に東京都町田市、オシダとイヌガンソクの胞子は 2018 年 10 月上旬に岩手県一関市にて採取し、実験は 2018 年 11 月に東京都世田谷区の東京農業大学構内にて行った。

採取した胞子葉は紙封筒に入れ、室温の暗所にて数日間風乾したのち胞子を

採取した。採取した胞子は 70%エタノールで殺菌した硼珪酸ガラスのスクリー
ー瓶（口内径:14.5 mm×胴径: 24.0 mm×高さ:50 mm）に入れ，暗所にて室温で
保存した。

胞子の殺菌はクリーンベンチ内で行った。殺菌には 12%次亜塩素酸ナトリウ
ム（株式会社松葉薬品）を希釈して，1%次亜塩素酸ナトリウムを作成し，これ
を胞子の入ったスクリー瓶に 10 ml 入れ 5 分間攪拌した。胞子は浸漬後，ろ
過して滅菌水で 3 回洗浄した。ろ紙上の胞子を葉さじで集め，滅菌水に浸漬さ
せ，30 分以内に培地へ播種した。

培地はスクロースが添加されていないムラシゲ・スクーグ培地の粉末培地（日
本製薬株式会社）を使用した（以下 MS 培地）。蒸留水 1 ℓ に粉末培地を溶かし
たものを 1MS 濃度とし，500 ml を別の容器に移し蒸留水を 500 ml 加えること
で濃度を 1/2MS に調整した。培地の pH は 5.75 ± 0.05 に調整したのち，寒天粉
末を濃度 0.7%になるよう加え，オートクレーブ（121 °C，20 分間）で滅菌処
理を行った。

培地は滅菌処理後にクリーンベンチ内にて滅菌プラスチックシャーレ（直径
50.7 mm，高さ 14.7 mm）に 15 ml 分注し，常温になるまで放冷した。放冷後，
殺菌した胞子をマイクロピペットで吸い取り，培地上の 5 ヶ所が等間隔になる
ように 1 滴ずつ播種した。なお，播種範囲は 1 滴あたり実体顕微鏡での観測視
野（縦 2.5 mm，横 3 mm）に収まるように設定した。播種後シャーレの周囲に
自己粘着フィルム（高機能被覆フィルム ラボピタ 20 mm×30 m）を 2 周ほど

巻き密閉した。播種後にコンタミネーションが発生しても観察ができるように、1条件につき5シャーレ作成した。したがって、1温度条件区につき1シャーレに5滴の孢子播種を行い、反復は5回とした。

播種後のシャーレは恒温 10 °C・15 °C・20 °C・25 °C・30°Cに設定した温度勾配機(東京理化器械 EYELAMTI-202)内に設置した。温度勾配機内の光量は3,300 lux(明期 16 時間・暗期 8 時間)とした。孢子播種後 90 日、心臓形に発育した個体(百瀬, 1967), 各温度条件から 30 個体を無作為に 5 シャーレから採取した。採取した前葉体は白色の紙に定規(最小目盛りは 1 mm)と一緒に貼り付け、3,366×2,514, 300 dpi の解像度にてスキャン(.tiff)を行い、画像処理ソフト ImageJ(Schneider et al., 2012)National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA)を用いた画像解析により、前葉体の部分のみを面積の測定範囲として抽出を行い、前葉体以外の部分が抽出された場合は修正を行った。300 dpi の 1 mm におけるピクセル数(11.8 pixels/mm)を設定し、抽出された前葉体のピクセル数をツール機能にてカウントする行うことで面積(mm²)を算出した。各温度条件における前葉体面積の差の有無を一元配置分散分析で判定し、有意差を確認したうえで Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。

第 2 項：実験結果


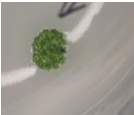





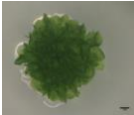
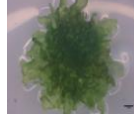


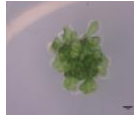


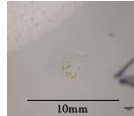
播種後 90 日目の前葉体の様子，前葉体の表面積の値を表 III-1-1 に示す。表 III-1-1 の前葉体の写真は滴下した胞子が成長し，前葉体の集塊した状態となる。前葉体の大きさは目視による観察では，集塊の中心部と縁辺部では大きな差は見られなかった。中心部の前葉体は寒天培地に対して上に伸長し，縁辺部では水平に成長していたが，定量的な判定は行っていない。前葉体の厚みは肉眼レベルで確認できる差は観察できなかった。前葉体の色は 20 °C 区，25 °C 区で他の温度条件区と比べると少し濃いように見えたが，定量的な判定は行わなかった。また，前葉体の形成は全種において 15 °C 区，20 °C 区，25 °C 区で確認されたが，10 °C 区では前葉体が形成されなかった。ベニシダの表面積の最小は 15 °C 区と 30 °C 区で 2.1 mm²，最大は 25 °C 区で 19.2 mm² となった。また，20 °C 区，25 °C 区において平均 10 mm² の表面積となり，15 °C 区，30 °C 区と比べ約 1.5 倍以上の差が確認された。

オシダの表面積の最小は 25 °C 区で 1.3 mm²，最大は 20 °C 区で 22.9 mm² となった。また，20 °C 区において面積が平均 11.2 mm² で，15 °C 区，25 °C 区と比べておよそ 2 倍以上の差が確認された。また，オシダは 30 °C では前葉体の形成はなかったが，原糸体が前葉体になるまでに枯死した。

イヌガンソクの表面積の最小は 25 °C 区で 1.7 mm²，最大は 20 °C 区で 23.1 mm² となった。また，20 °C 区において平均 8.5 mm² の表面積となり，15 °C 区，25 °C 区と比べ約 1.5 倍以上の差が確認された。また，30 °C 区の温度条件

区においては前葉体の形成が一部確認されたが、計測が難しい状態であった。

表 III-1-1 播種後 90 日目の前葉体の様子と表面積（値は平均値，±は標準偏差，異なったアルファベットの文字は統計的有意差があることを示す。Tukey-Kramer test, $p<0.01$ ）

| Temperature (°C) | Average prothallus area(mm ²) | | |
|---------------------|---|---|--|
| | <i>Dryopteris erythrosora</i> | <i>Dryopteris crassirhizoma</i> | <i>Onoclea orientalis</i> |
| 30 |  4.3±1.4 ^b |  無 |  無(一部形成) |
| 25 |  10.6±3.1 ^a |  3.9±2.4 ^b |  5.1±2.1 ^b |
| 20 |  10.9±4.6 ^a |  11.2±4.3 ^a |  8.5±4.1 ^a |
| 15 |  5.5±2.4 ^b |  4.1±1.4 ^b |  4.3±1.6 ^b |
| 10 |  無 |  無 |  無 |

第 3 項：小括

ベニシダの前葉体は、10 °Cでは形成されず、成長が止まっていたが、15 °C～30 °Cにおいては形成が確認された。したがって、ベニシダの前葉体の形成には温度が 15 °C以上必要であると考えられる。

オシダとイヌガンソクの前葉体は 10 °Cでは形成されず、成長が止まっていたが、15～25 °Cにおいては前葉体の形成が確認された。光合成が最も活発になる

のは 25℃と報告されている(古在, 2015)。また, オシダは 30℃では前葉体の形成原糸体が前葉体になるまでに枯死し, イヌガンソクは 30℃では一部を除いて前葉体の形成が確認されなかった。したがって, オシダとイヌガンソクの前葉体の形成には温度が 15℃以上必要であると考えられる。ただし, 30℃以上では前葉体の形成, 原糸体の生育を抑制すると考えられる。主に暖温帯に生育するベニシダでは 30℃でも前葉体は形成されたが, 冷温帯に生育するオシダは原糸体が前葉体になるまでに枯死した。したがって, 主に冷温帯に生育する種は 30℃以上では孢子発芽するものの前葉体の形成は困難と考えられる。そのことから, 分布域は栽培時における温度条件の目安になると考えられる(吉良竜夫, 2012)。

しかし, 今回の実験では 3 種と対象種が少ないため, 今後は対象種を増やすことで分布と温度の関係性がより明瞭になると考えられる。また, ベニシダとオシダは同科同属であるが孢子発芽と前葉体成長の傾向が異なったことから, 孢子栽培においては種ごとに温度条件を検討する必要があると考えられる。また, オシダとイヌガンソクは 30℃では前葉体の形成が殆ど確認されなかったことから, 30℃以上では育成に適していないと考えられる。今回の実験から前葉体成長が可能な温度域はベニシダでは 15~30℃まで, オシダとイヌガンソクでは 15~25℃までと考えられる。孢子栽培において前葉体成長に最適な温度域はベニシダでは 20℃もしくは 25℃, オシダとイヌガンソクは 20℃が最適と考えられる。Hill(1971)によると孢子の状態か前葉体の状態で越冬するかは種によって異なると報告している。したがって, 3 種とも孢子播種は秋期では寒害の影響

を受ける可能性があるため、春期の 3～5 月に行うことが望ましいと考えられる。しかし、オシダとイヌガンソクの孢子採取時期は秋期に限定されてしまうため、今後は孢子の適切な保存方法、活性が保たれる保存期間について明らかにする必要がある。本研究の結果は今後の温暖化による分布の変化などにも寄与できると考えられるが(内嶋,2005),温度以外の要因も考慮する必要がある(鷺谷ほか, 2010)。温度だけではなく光の強弱によって葉緑体の働きが変わるため、今後は複合的な実験が必要だと考えられる(児玉, 2019)。また、本実験は日本緑化工学会誌で発表した内容である(西野ほか, 2020)。

第Ⅲ-2：光条件と前葉体成長の関係

第1項：実験方法

供試植物は従来から緑化植物として利用されているオシダ科オシダ属のベニシダ (*Dryopteris erythrosora* (D.C.Eaton) Kuntze.), オシダ科ヤブソテツ属のオニヤブソテツ (*Cyrtomium falcatum* (L.f.) C.Presl subsp.*falcatum*), 昔より山菜として利用されているゼンマイ科ゼンマイ属のゼンマイ (*Osmunda japonica* Thunb.) とした。ベニシダは常緑性で本州から琉球列島(沖永良部島以北)の主に暖温帯の低山地の林下, オニヤブソテツは本州から琉球列島の海岸沿いに生育することが多く, ゼンマイは夏緑性で, 北海道から九州の山地林下や路傍に生育することが多い(海老原, 2016・2017; 田川, 1959)。ベニシダの胞子は2019年6月26日に東京都町田市で採取し, 冷蔵保存した。オニヤブソテツの胞子は2019年5月25日に神奈川県真鶴町で採取し, 冷蔵保存した。ゼンマイの胞子は2019年4月18日に東京都町田市にて採取し, 冷凍保存した。

採取した胞子葉は紙封筒に入れ, 室温の暗所にて数日間風乾したのち, 胞子を採取した。採取した胞子は70%エタノールで殺菌した硼珪酸ガラスのスクリー一瓶(口内径:14.5 mm×胴径:24.0 mm×高さ:50 mm)に入れ, 保存温度は5℃(冷蔵), -18℃(冷凍)を設けた。

胞子の殺菌はクリーンベンチ内で行った。殺菌には12%次亜塩素酸ナトリウム(株式会社松葉薬品)を希釈して, 1%次亜塩素酸ナトリウムを作成し, これを胞子が入ったスクリー一瓶に10 ml 入れ, 5分間攪拌した。胞子は浸漬後, ろ

過して滅菌水で 3 回洗浄した。ろ紙上の孢子を葉さじで集め、滅菌水に浸漬させ、30 分以内に培地へ播種した。

培地はスクロースが添加されていないムラシゲ・スクーグ培地の粉末培地（日本製薬株式会社）を使用した（以下 MS 培地）。蒸留水 1 ℓ に粉末培地を溶かしたものを 1MS 濃度とし、500 ml を別の容器に移し蒸留水を 500 ml 加えることで濃度を 1/2MS に調整した。培地の pH は 6.00 ± 0.05 に調整したのち、寒天粉末を濃度 0.7% になるよう加え、オートクレーブ（121 °C，20 分間）で滅菌処理を行った。

培地は滅菌処理後にクリーンベンチ内にて滅菌プラスチックシャーレ（直径 50.7 mm，高さ 14.7 mm）に 15 ml 分注し、常温になるまで放冷した。放冷後、殺菌した孢子をマイクロピペットで吸い取り、培地上の 5 ヲ所が等間隔になるように 1 滴ずつ播種した。なお、播種範囲は 1 滴あたり実体顕微鏡での観測視野（縦 2.5 mm，横 3 mm）に収まるように設定した。播種後シャーレの周囲に自己粘着フィルム（高機能被覆フィルム ラボピタ 20 mm×30 mm）を 2 周ほど巻き密閉した。播種後にコンタミネーションが発生しても観察ができるように、1 条件につき 2 シャーレ作成した。したがって、1 条件区につき 1 シャーレに 5 滴の孢子播種を行い反復は 5 回とした。播種後のシャーレは人工気象器（日本医科器械製作所（株）SK-101R LH-240S）内にて（株）MRT の植物育成 LED ライトバー GCR-30-RGB（波長：450nm 青色，660nm 赤色）と GCR-30-NIR（波長：730nm 遠赤色）の前にシャーレを設置し、温度条件は恒温 25 °C とし

た。

試験の実施は播種翌日の 2019 年 7 月 20 日，2019 年 7 月 24 日から行い，試験開始まで個々のシャーレをアルミホイルで包み光の照射を受けないようにした。試験期間は 7 日間とし，孢子播種後 8 日目以降は各波長条件下において 24 時間照射に切り替えた。光の波長の設定は青色（450nm），赤色（660nm），遠赤色（730nm）の 3 条件とし，1 日当たりの照射時間は 0,3,6,9,12,15,18,21,24 時間の計 9 条件とした。また，試験の開始時間は午前 7 時 30 分，終了時間は午後 7 時 30 分とした（作業は±30 分以内とした）。例えば，照射 6 時間の条件は毎 7 時 30 分にシャーレをアルミホイルから外し，各波長条件下において照射を行い，毎 13 時 30 分にアルミホイルで個々のシャーレを包み，暗期の状態をつくった。加えて，試験期間中の 7 日間は 1 日おきにシャーレの配置を並び替えることで，ライトの距離などによる影響が生じないように操作した。また，孢子播種後 8 日目以降は各光の波長条件下において，照射時間が短いものから順に光源に近い場所へ設置し，幼孢子体の経過観察を行うまでの期間中，固定の位置に設置し光環境に差が生じないように設置した。

各シャーレは播種後から前葉体計測まで一度も開封しておらず，ベニシダとオニヤブソテツは孢子播種後 76 日後，ゼンマイは孢子播種後 80 日後に目視で前葉体の形状と幼孢子体の個体数を計数した。温度勾配機内に設置した際にシャーレが重なった場合は数日おきにその順番を変えることで，シャーレが受ける光量に差が生じないように配慮した。

第2項：実験結果

ベニシダは青色光と赤色光の照射 3 時間から 24 時間で幼胞子体の形成が確認された。遠赤色光では照射 3 時間 (A) を除き、前葉体が全く形成されず、寒天培地が乾いて枯死する個体が見られ、健全に生育する状態ではなかった。

オニヤブソテツは青色光の照射 3 時間から 18 時間と赤色光の照射 3 時間、12 時間、15 時間で幼胞子体の形成が確認され、18 時間と 24 時間では胞子播種地点から離れた地点で前葉体を形成している様子が見られた。また、遠赤色光照射では幼胞子体の形成はなかった。

ゼンマイは青色光と赤色光の照射 3 時間から 24 時間で幼胞子体の形成が確認されたが、遠赤色光照射では寒天培地が乾き枯死する個体が多く見られ、健全に生育する状態ではなかった。

表 III-2-1 全種の波長条件ごとの前葉体の形成 (○：正常な前葉体，△：一部で確認，×：確認されず)

| Species | Wavelength of light | 0h | 3h | 6h | 9h | 12h | 15h | 18h | 21h | 24h |
|-------------------------------|---------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>Dryopteris erythrosora</i> | Blue(450nm) | × | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| | Red(660nm) | × | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| | Far(730nm) | × | ○ | × | × | × | × | × | × | × |
| <i>Cyrtomium falcatum</i> | Blue(450nm) | × | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × |
| | Red(660nm) | × | ○ | × | × | ○ | ○ | △ | × | △ |
| | Far(730nm) | × | × | × | × | × | × | × | × | × |
| <i>Osmunda japonica</i> | Blue(450nm) | × | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| | Red(660nm) | × | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| | Far(730nm) | × | × | × | × | × | × | × | × | × |

青色光 (450nm) では、オニヤブソテツの照射 3,6 時間で各 55,51 個体の幼胞子体を形成した。赤色光 (660nm) では、ベニシダの照射 6,9,12 時間で各 16,32,35 個体、オニヤブソテツの照射 3 時間で 42 個体の幼胞子体を形成した。遠赤色光 (730nm) では、ベニシダの照射 3 時間のみ 3 個体の幼胞子体を形成

した。また、ゼンマイについて青色光と赤色光の照射 3 時間から 24 時間で前葉体が確認されたものの幼胞子体は全く形成されなかった。

表 III-2-2 全種の波長条件ごとの幼胞子体の形成数

| Species | Wavelength of light | 0h | 3h | 6h | 9h | 12h | 15h | 18h | 21h | 24h |
|-------------------------------|---------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>Dryopteris erythrosora</i> | Blue(450nm) | 0 | 4 | 1 | 3 | 10 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | Red(660nm) | 0 | 0 | 16 | 32 | 35 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | Far(730nm) | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Cyrtomium falcatum</i> | Blue(450nm) | 0 | 55 | 51 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Red(660nm) | 0 | 42 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Far(730nm) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Osmunda japonica</i> | Blue(450nm) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Red(660nm) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Far(730nm) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

第3項：小括

ベニシダの前葉体成長は青色光と赤色光では、照射 3～24 時間で前葉体を形成した。青色光は正常な形の前葉体形成を行い、反対に赤色光は主に伸長成長のみが行われ、糸状体の前葉体しかつくり、ハート状に発生していかない(加藤, 1962)とあるが、ベニシダでは赤色光においてもハート形の典型的な前葉体が形成された。遠赤色光では照射 3 時間のみ前葉体の形成が見られたが、照射 6～24 時間では形成されず、原糸体のまま成長が止まっていた。したがって、ベニシダが前葉体を形成するための光の波長は青色光、赤色光が適していると考えられる。また、遠赤色光照射は原糸体を透明にし、さらに原糸体が同一方向に向かって伸長する作用が見られた。フィトクロムの作用の内の原糸体の伸長や光屈性が前葉体成長に悪影響を及ぼしたことが考えられる(久松, 2014)。ベニシダの幼胞子体形成は青色光では照射 3～15 時間、赤色光では照射 6～15 時間、遠赤色光では照射 3 時間でのみ幼胞子体が形成された。赤色光 (660nm) では、照射

6, 9, 12 時間で各 16, 32, 35 個体の幼胞子体を形成した。これは光受容体の一種であるフィトクロムがもつ、胞子の発芽や原糸体の伸長, 光屈性, 葉緑体光定位運動等の生理現象を制御する働きが活性化したことが要因であると考えられる(写真Ⅲ-2-1)。

以上のことから, ベニシダが幼胞子体を形成するための光の波長は青色光, 赤色光が適していると推察され, 照射時間が 15 時間以下で形成しやすい傾向があると考えられる。

オニヤブソテツの前葉体成長は青色光では, 照射 3~18 時間で前葉体が形成された。赤色光では, 照射 3, 12, 15 時間で前葉体が形成され, 照射 18, 24 時間については播種箇所から離れた地点での形成が観察された。胞子播種が密集していない場所に前葉体が観察できたことから前葉体成長に密度の影響もあると考えられる。赤色光照射は糸状成長のみ(加藤, 1962)であると報告されているが, 赤色光下でも光が十分強ければ前葉体の形成が起こることが報告されており, 光の当たる位置や距離による影響もあり, 照射時間ごとで前葉体の有無にはばらつきがでたと考えられる。遠赤色光では, 全照射時間条件で前葉体が形成されず, 原糸体のまま成長が止まっていて, 原糸体が透明の状態であった。したがって, オニヤブソテツが前葉体を形成するための光の波長は青色光, 赤色光の順に適していると考えられる。オニヤブソテツの幼胞子体形成は青色光では照射 3~12 時間, 赤色光では照射 3, 12 時間で形成され, 遠赤色光は形成されなかった。青色光 (450nm) において, 照射 3, 6 時間でそれぞれ 55,51 個体の幼胞子体を

形成した。これは光受容体の一種であるフォトトロピンがもつ働きが活性化されたことが要因であると考えられる(末次・和田, 2013)。赤色光(660nm)では、照射3時間で42個体の幼孢子体を形成した。これはフィトクロムがもつ働きが活性化されたことが要因であると考えられる。

以上のことから、オニヤブソテツが幼孢子体を形成するための光の波長は青色光が最も適し、次いで赤色光であると考えられ、照射時間が12時間以下で形成しやすい傾向があると考えられる(写真Ⅲ-2-1~4)。

ゼンマイの前葉体成長は青色光と赤色光では、照射3~24時間で前葉体が形成された。正常な形態形成は青色光下で初めて起こり、反対に赤色光は主に伸長成長のみが行われる(加藤, 1962)と報告されているが、ゼンマイにおいては赤色光下でも健全に前葉体を形成した。遠赤色光では全照射時間条件で前葉体が形成されず、原糸体のまま成長が止まっていた。したがって、ゼンマイが前葉体を形成するための光の波長は青色光、赤色光が適していると考えられ、遠赤色光照射では原糸体は透明の状態であった。遠赤色光照射では、フィトクロムの作用内の原糸体の伸長が著しく発揮され、前葉体形成に至らなかったと考えられる。ゼンマイの幼孢子体形成は青色光、赤色光、遠赤色光の全照射時間条件で幼孢子体は一個体も確認することができなかった。ゼンマイは孢子の寿命が短く、孢子葉を採取後、試験を開始するまで約3か月が経過し、その間に孢子の生存数が減少したことが原因であると考えられる。青色光と赤色光においては、照射3~24時間で前葉体が形成されていることから、前葉体から幼孢子体の形成の間に

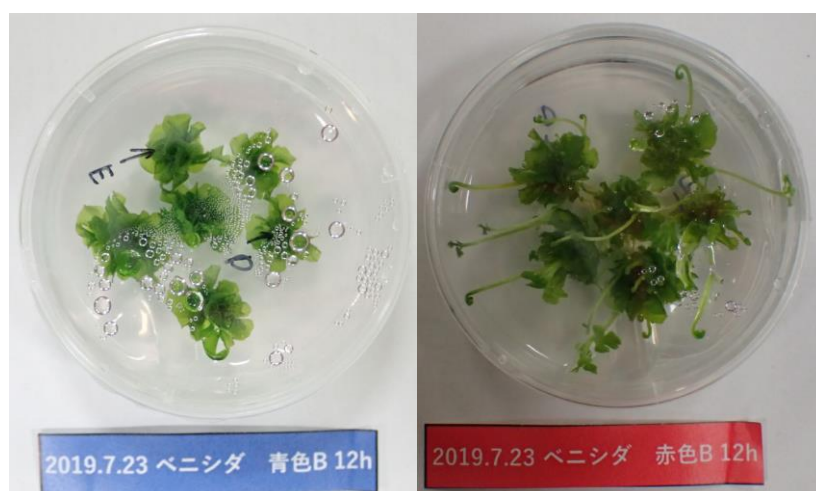
培地の栄養が無くなるなどの問題により、幼胞子体の形成に至らなかったことが考えられる。また、前葉体に含まれる葉緑素の種類によって吸収する波長は異なるため、本研究の結果はそのことが関係しているとも考えられる(嶋田・萱原, 2015) (森ほか, 2013) (高辻ほか, 2011)。シダ植物しか持たないスーパークロムと言われる *phy3* が関係していると考えられる(和田, 2001)。また、光合成には葉緑体の定位運動が関係していることも考えられる(グスタフ・ゼン, 2015)。林床の光に含まれる波長は通常の波長とは異なっており(森川, 2018b)、ベニシダとオニヤブソテツの生育立地が本研究の結果に反映されている可能性が示唆された。また、植物の成長には波長だけでなく、PPFD なども関係していると報告されている(森川, 2018a)。以上から、ゼンマイが幼胞子体を形成するための光の波長、照射時間は本試験の結果からは不明であった。

| 条件の 単波長光 (nm) | | 胞子播種後7日間の照射時間 (h/day) | | | | | | | | |
|-------------------------|----|-----------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| A | 0h | 3h | 6h | 9h | 12h | 15h | 18h | 21h | 24h | |
| 青色光 450nm 380lux | | | | | | | | | | |
| 赤色光 660nm 250lux | | | | | | | | | | |
| 遠赤色光 730nm 330lux | | | | | | | | | | |
| B | 0h | 3h | 6h | 9h | 12h | 15h | 18h | 21h | 24h | |
| 青色光 450nm 380lux | | | | | | | | | | |
| 赤色光 660nm 250lux | | | | | | | | | | |
| 遠赤色光 730nm 330lux | | | | | | | | | | |

写真Ⅲ-2-1 胞子播種後 76 日目のベニシダの前葉体

(胞子播種日 2019 年 7 月 23 日, 撮影日 2019 年 10 月 6 日)

○ : 前葉体が形成されていた △ : 一部で確認された × : 形成されていなかった



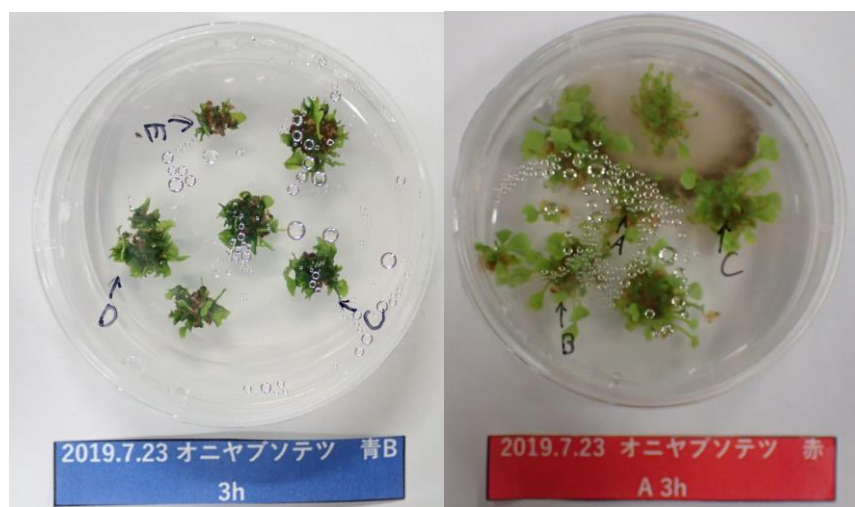
写真Ⅲ-2-2 播種後 76 日目の波長条件ごとの幼胞子体を形成している様子

| 条件① | | 胞子播種後7日間の照射時間 (h/day) | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|-----------------------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 単波長光 (nm) | A | 0h | 3h | 6h | 9h | 12h | 15h | 18h | 21h | 24h | |
| 青色光 450nm 380lux | | | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | |
| 赤色光 660nm 250lux | | | ○ | × | × | ○ | ○ | △ | × | △ | |
| 遠赤色光 730nm 330lux | | | × | × | × | × | × | × | × | × | |
| 条件② | | B | 0h | 3h | 6h | 9h | 12h | 15h | 18h | 21h | 24h |
| 青色光 450nm 380lux | | | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | |
| 赤色光 660nm 250lux | | | ○ | × | × | ○ | ○ | △ | × | △ | |
| 遠赤色光 730nm 330lux | | | × | × | × | × | × | × | × | × | |

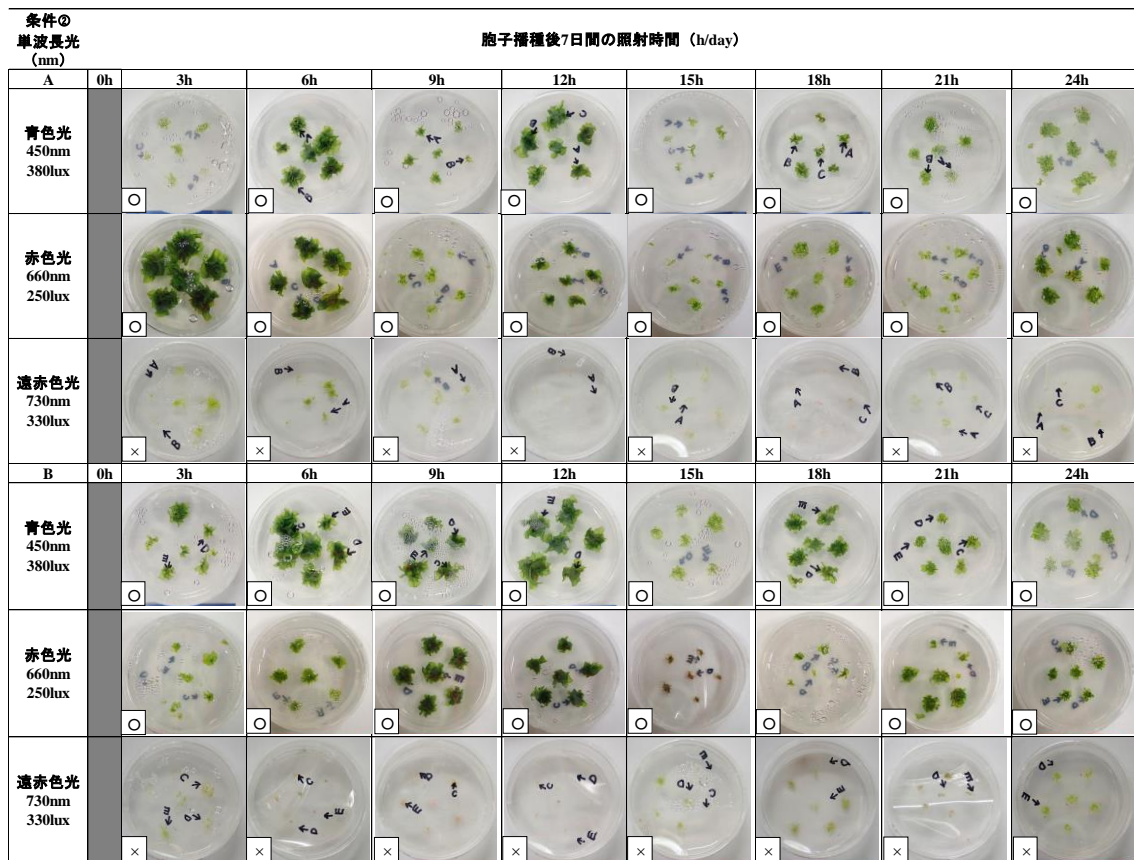
写真Ⅲ-2-3 胞子播種後 76 日目のオニヤブソテツの前葉体

(胞子播種日 2019 年 7 月 23 日, 撮影日 2019 年 10 月 6 日)

○ : 前葉体が形成されていた △ : 一部で確認された × : 形成されていなかった



写真Ⅲ-2-4 播種後 76 日目の波長条件ごとの幼胞子体を形成している様子



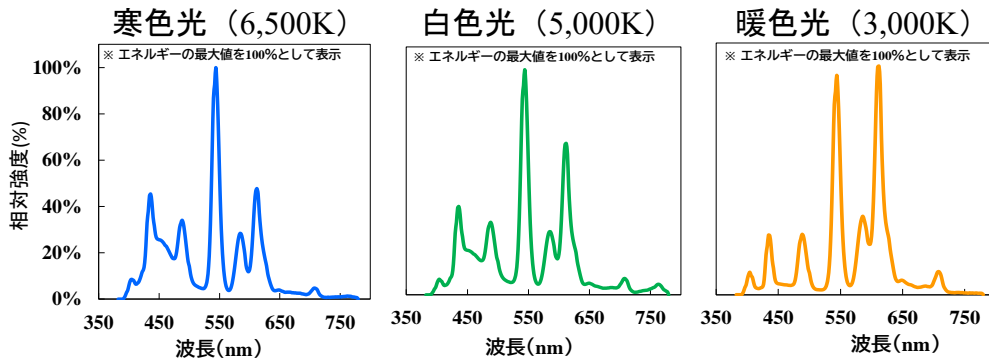
写真Ⅲ-2-3 胞子播種後 76 日目のゼンマイの前葉体

(胞子播種日 2019 年 7 月 23 日, 撮影日 2019 年 10 月 6 日)

○ : 前葉体が形成されていた △ : 一部で確認された × : 形成されていなかった

また、本論文にて詳細な実験条件を記載していないが、赤色光と青色光と緑色光の割合を変えて実験を行った(表Ⅲ-2-3)。その結果、ベニシダでは、昼光色 (R:23% G:52% B:25% ,6500K) 照射で 11 個体、昼白色 (R:33% G:48% B:19% ,5000K) 照射で 0 個体、電球色 (R:45% G:43% B:12% ,3000K) 照射で 79 個体の幼胞子体を形成した。オニヤブソテツでは、昼光色 (R:23% G:52% B:25% ,6500K) 照射で 150 個体、昼白色 (R:33% G:48% B:19% ,5000K) 照射

で9個体、電球色 (R:45% G:43% B:12%, 3000K) 照射で105個体の幼孢子体を形成した(表Ⅲ-2-4) (写真Ⅲ-2-2,3)。



図Ⅲ-2-1 光源の色温度とスペクトル分布

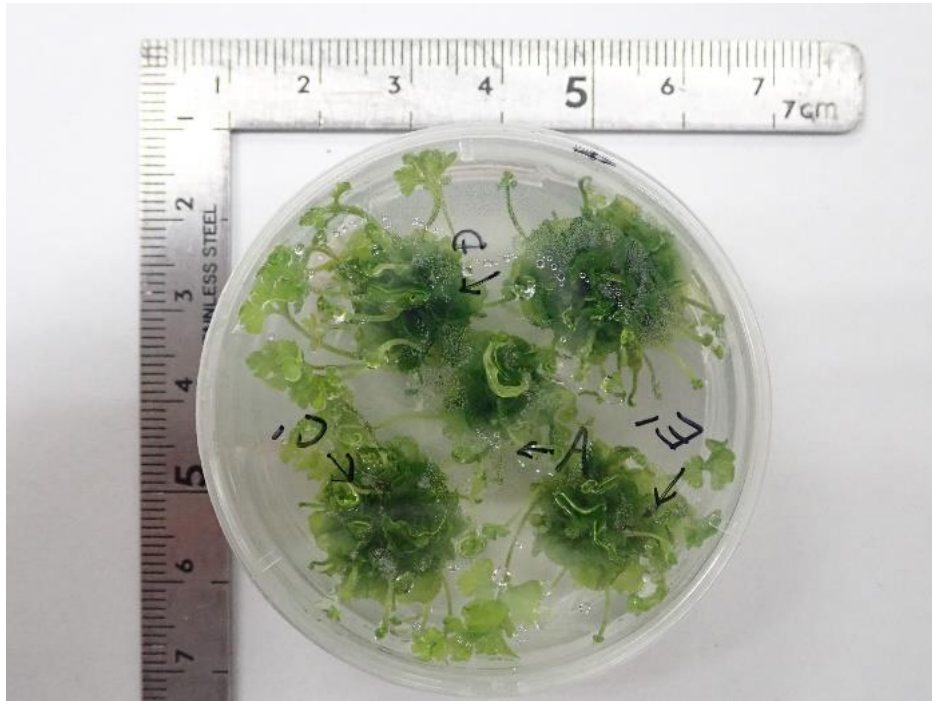
表Ⅲ-2-3 全種の波長条件ごとの幼孢子体の形成数

| 種名 | 学名 | 科名 | 属名 | 生育地 | 葉緑体の有無 | 保存方法 | 採取日 |
|---------|---------------------------------|-------|--------|--------------|--------|------|-----------|
| ベニシダ | <i>Dryopteris erythrosora</i> | オシダ科 | オシダ属 | 林床、路傍 | なし | 冷蔵 | 2020/7/2 |
| オニヤブソテツ | <i>Cyrtomium falcatum</i> | オシダ科 | ヤブソテツ属 | 林縁(主に沿岸部)、路傍 | なし | 冷蔵 | 2019/5/25 |
| オシダ | <i>Dryopteris crassirhizoma</i> | オシダ科 | オシダ属 | 林床、路傍 | なし | 冷蔵 | 2020/8/28 |
| ゼンマイ | <i>Osmunda japonica</i> | ゼンマイ科 | ゼンマイ属 | 草地、林縁 | あり | 冷凍 | 2020/4/23 |

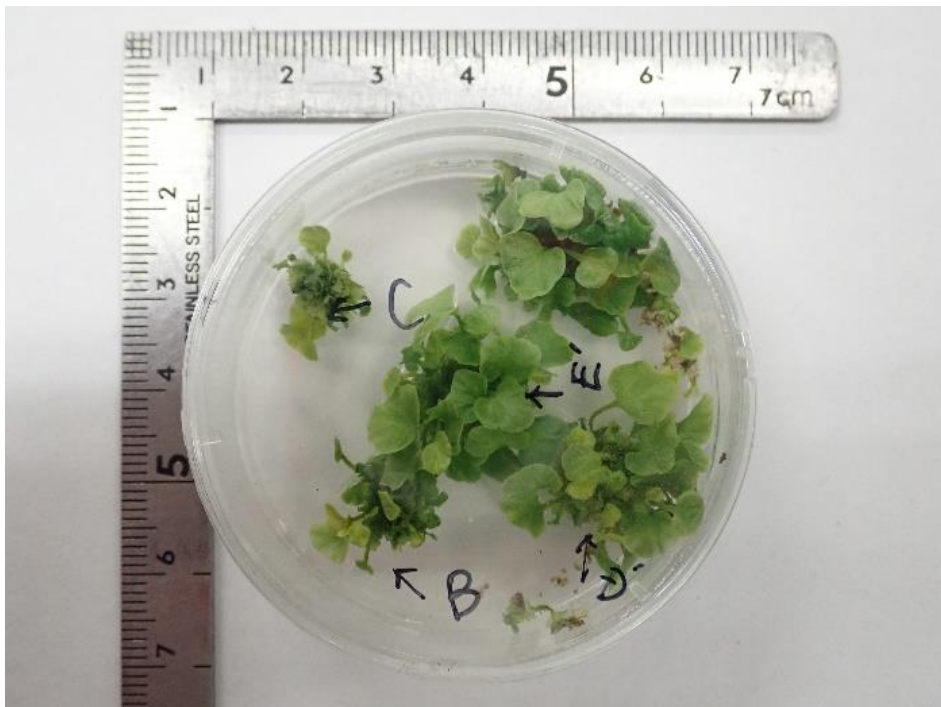
表Ⅲ-2-4 幼孢子体数 (孢子播種後97日目に計数)

| 種類 | 白色蛍光灯 | ① | ② | ③ | 合計 |
|---------|-------------------------|----|----|----|-----|
| ベニシダ | 昼光色 (R:23% G:52% B:25%) | 0 | 0 | 11 | 11 |
| | 昼白色 (R:33% G:48% B:19%) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 電球色 (R:45% G:43% B:12%) | 0 | 67 | 12 | 79 |
| オニヤブソテツ | 昼光色 (R:23% G:52% B:25%) | 50 | 79 | 21 | 150 |
| | 昼白色 (R:33% G:48% B:19%) | 0 | 0 | 9 | 9 |
| | 電球色 (R:45% G:43% B:12%) | 83 | 17 | 5 | 105 |

(①、②、③はシャーレの繰り返し数とした。)



写真Ⅲ-2-2 ベニシダにおける播種後 97 日目の様子 (電球色)



写真Ⅲ-2-3 オニヤブソテツにおける播種後 97 日目の様子 (昼光色)

第Ⅲ-3：生育基盤条件と前葉体成長の関係

植物の生育に不可欠な「多量要素」は、窒素，リン酸，カリウム，カルシウム，マグネシウム，イオウ，炭素，水素，酸素が存在し，植物体にあまり含まれないものを必須微量元素と呼び，鉄，マンガン，亜鉛，銅，塩素，モリブデン，ニッケル，ホウ素が存在する(古在, 1998)。この中で炭素，水素，酸素は空気中の二酸化炭素や酸素，水分から供給される。本実験で使用する前葉体は発芽試験にて成立した前葉体となる。実際の植え替えを想定して行ったため，生育基盤は市販で手に入る資材を中心として実験を行った。前葉体植え替え後の成長や枯死，孢子体形成を調べることを目的とした。

第 1 項：実験方法

供試植物はオシダ科オシダ属のベニシダとオシダ科ヤブソテツ属のオニヤブソテツとした。第Ⅱ-3-A の発芽試験より成立した横幅 1mm 程度の両種の前葉体を，ピンセットと実体顕微鏡を用いて植え替えを行った。発芽試験と同様の方法を用いて用意した同じ条件の区に植え替えた。プラスチックシャーレ（滅菌デイスコシャーレ（PS 製）直径 56mm，高さ 16mm）にミズゴケ，バーミキュライト，石灰石，赤玉土，軽石，鹿沼土，黒ボク土の基盤をそれぞれ充填した（表Ⅲ-3-1）。ミズゴケは既存の状態だと形が揃っていないため，乾燥させた状態で 1.00g 計測し一昼夜浸水させ，ミキサーで粉碎しシャーレに充填した。これらのシャーレに孢子を均等に播き，温度条件を 25℃恒温，光条件を明条件 16 時間

(11,000lux), 暗条件 8 時間に設定した人工気象器 (日本医科器械製作所 (株), SK-101R LH-240S) 内に設置した。室内実験は同大学構内にて行った。また, 灌水は高・中・低の灌水条件に分け, 灌水頻度を高では 2 日毎に 1 ml 灌水し, 中では 5 日毎に 2.5ml 灌水し, 低では 10 日毎に 5ml 灌水した (表 III-3-2)。植え替えは 30 日目, 45 日目, 60 日目に行った。植え替え可能なサイズになるまで 60 日以上必要な基盤はシダ植物の発芽, 生育に不適と考えて 60 日以降の植え替えは行わなかった。1 反復につき前葉体 15 個体, 反復を 3 から 5 として実験を行った。前葉体生育に関する測定は, 前葉体の横幅(mm), 前葉体の個体数, 孢子体形成数の 3 つとした。石灰石の生育基盤では両種共に灌水条件によらず発芽が良好であったが, 前葉体は 1mm まで成長しなかったため, 前葉体の植え替えを行えなかった。

表 III-3-1 各生育基盤の理化学性について

| | Andosol | Limestone | Vermiculite | Sphagnum | Akadama soil | Kanuma soil | Pumice |
|-------------|---------|-----------|-------------|----------|--------------|-------------|--------|
| pH | 5.4 | 8.42 | 6~7 | 4.8 | 6 | 6.02 | 6.42 |
| EC(ms/cm) | 0.42 | 0.03 | 0.19 | 0.13 | 0.58 | 0.28 | 0.09 |
| C/N ratio | 12.9 | - | - | 67.7 | 8.2 | 5.2 | - |
| Total N | 0.52 | 0 | 0 | 0.63 | 0.28 | 0.2 | 0 |
| Porosity(%) | 83 | 70.7 | 70.7 | 95.4 | 84.4 | 91.9 | 69.4 |

表 III-3-2 灌水条件について

| Irrigation conditions | frequency | amount(ml) |
|-----------------------|----------------|------------|
| High | Once in 2days | 1 |
| Middle | Once in 5days | 2.5 |
| Low | Once in 10days | 5 |

表 III-3-3 前葉体を植え替えるまでの日数について（※は n=3）

| Species | Irrigation conditions | Andosol | Limestone | Vermiculite | Sphagnum | Akadama soil | Kanuma soil | Pumice |
|-------------------------------|-----------------------|---------|-----------|-------------|----------|--------------|-------------|--------|
| <i>Dryopteris erythrosora</i> | High | 30 | - | 45 | 45 | 60※ | - | 30 |
| | Middle | 30 | - | - | 45 | - | 45 | 30 |
| | Low | 30 | - | 45 | 45 | - | - | 30 |
| <i>Cyrtomium falcatum</i> | High | 30※ | - | 45 | 60 | - | - | - |
| | Middle | 60 | - | 60 | 60※ | 60※ | - | 60※ |
| | Low | 60 | - | 60 | 45 | - | - | - |

第 2 項：実験結果

植え替え後 90 日間の前葉体の平均個体数を条件ごとにまとめたグラフをベニシダでは図 III-3-1, オニヤブソテツでは図 III-3-2 に示した。両種においては黒ボク土とミズゴケの生育基盤では平均個体数の減少はほとんど見られなかった。

植え替え後 90 日間の前葉体の平均面積を条件ごとにまとめたグラフをベニシダでは図 III-3-3, オニヤブソテツでは図 III-3-4 に示した。また、植え替え後に発生した幼孢子体形成率を図 III-3-5, 図 III-3-6 に示した。ベニシダでは黒ボク土とミズゴケ, 赤玉土の生育基盤のみ幼孢子体の形成が確認された。また, ミズゴケと赤玉土では灌水条件高のみ幼孢子体の形成が確認された。オニヤブソテツでは黒ボク土とミズゴケ, バーミキュライトの生育基盤のみ幼孢子体の形成が確認された。黒ボク土とミズゴケでは灌水条件の 3 つともに幼孢子体の形成が

確認されたが、バーミキュライトでは灌水条件低では幼胞子体の形成が確認できなかつた。

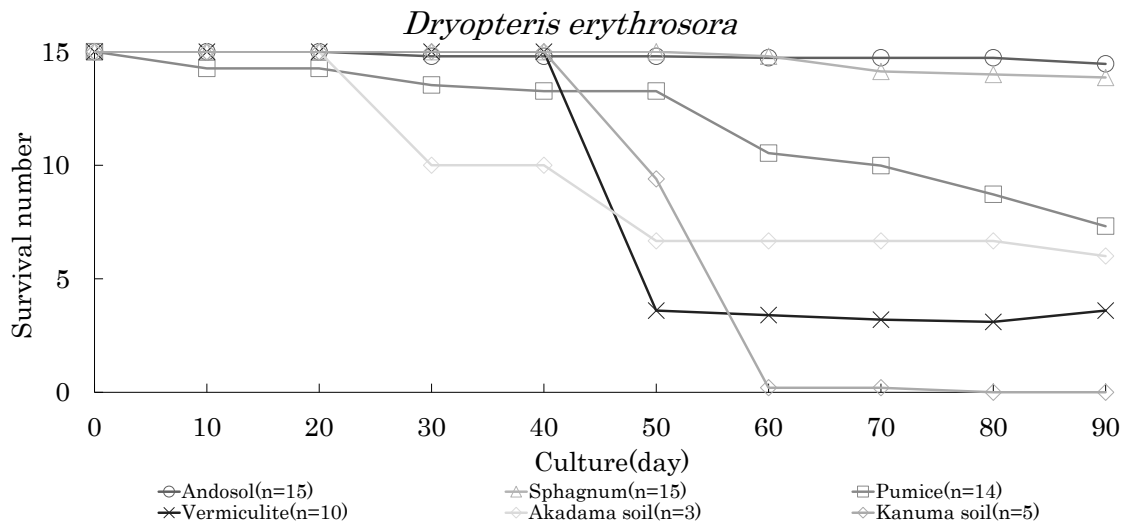


図 III-3-1 ベニシダにおける植え替え後の前葉体の平均個体数

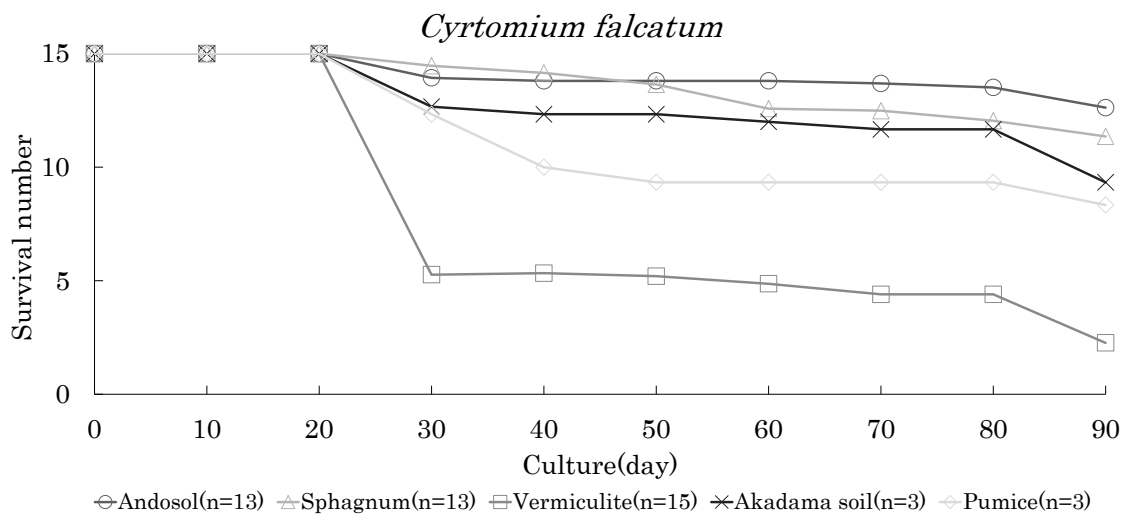


図 III-3-2 オニヤブソテツにおける植え替え後の前葉体の平均個体数

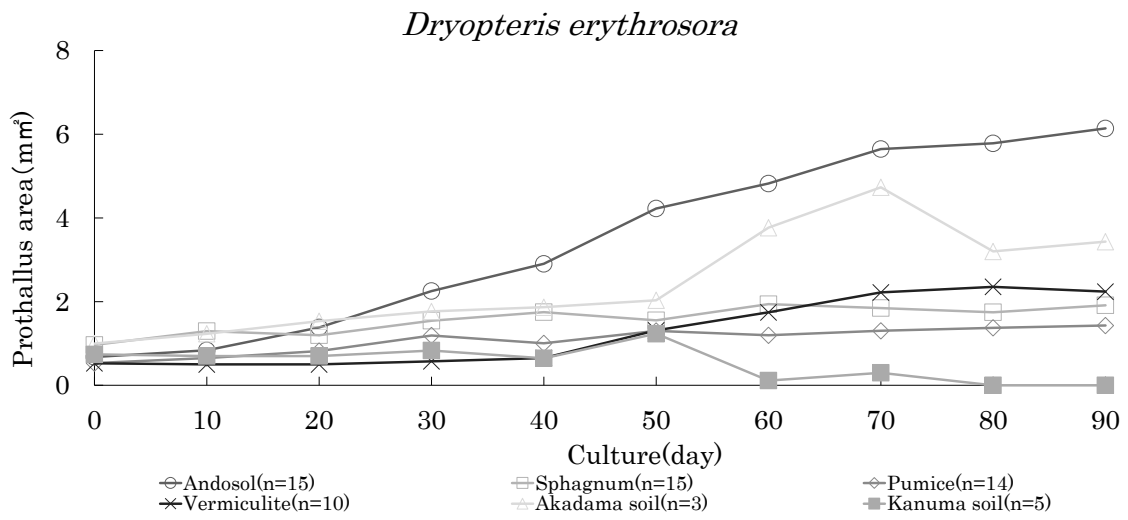


図 III-3-3 ベニシダにおける植え替え後の前葉体面積の推移

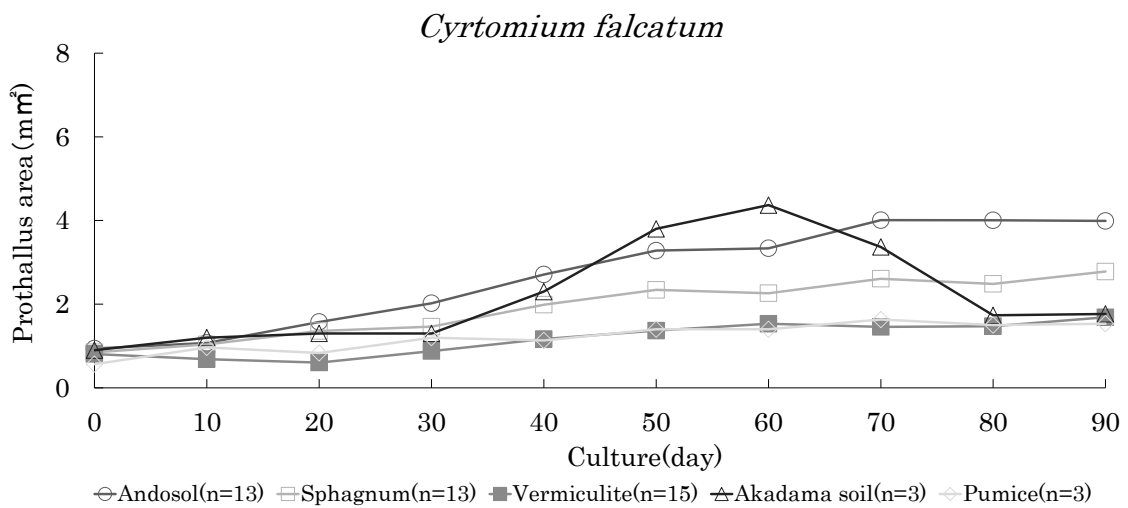


図 III-3-4 オニヤブソテツにおける植え替え後の前葉体面積の推移

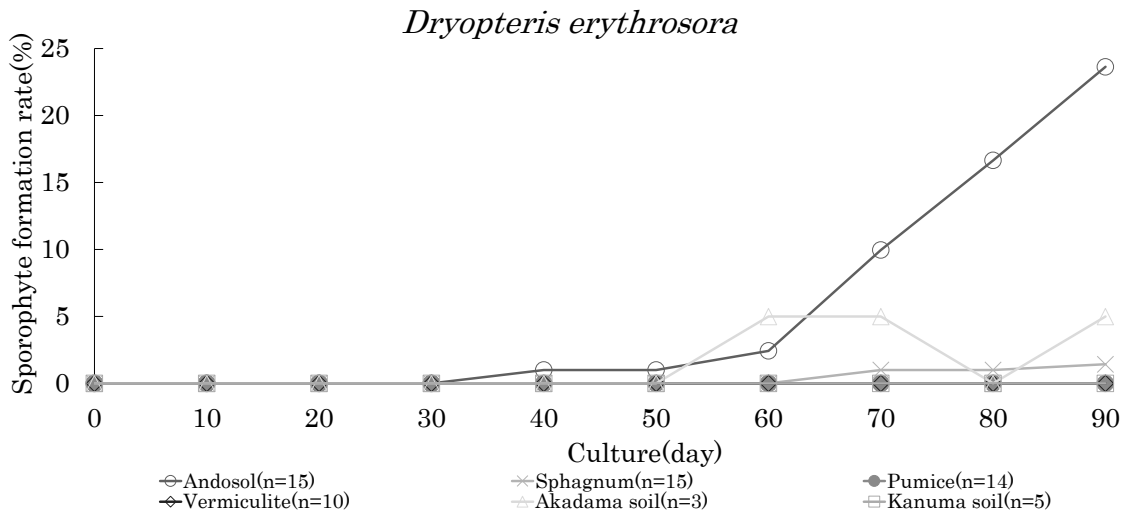


図 III-3-5 ベニシダにおける植え替え後の幼孢子体形成率の推移

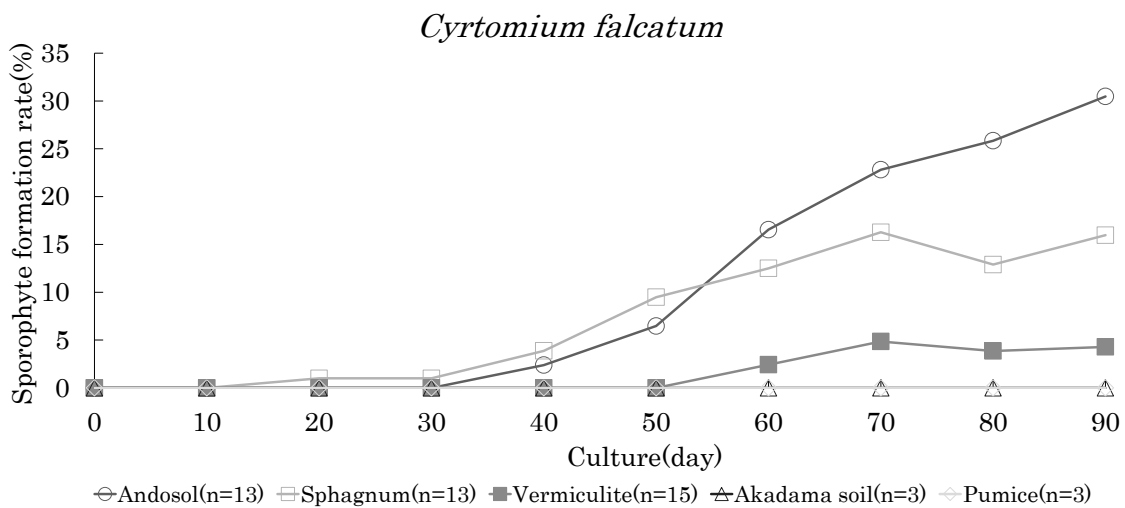


図 III-3-6 オニヤブソテツにおける植え替え後の幼孢子体形成率の推移

第3項：小括

石灰石の基盤では両種共に、灌水条件によらず、発芽が良好であったが、植え替え可能なサイズまで成長しなかった。このことから、炭酸カルシウムもしくは塩基性基盤が前葉体の成長を阻害することが考えられる(加藤,1966)。ただし、酸性基盤のミズゴケと中性基盤のバーミキュライトが同程度の成長速度と成長

量のため、基盤の pH が酸性になるほど成長が良好になるとは考えられない。

個体の生存に関しては両種共に、黒ボク土とミズゴケの基盤のみ 10 個体以上生存し、他の基盤は 40~50 日以降から個体数が減った。よって、前葉体の生存に何らかの土壤有機質、あるいは基盤の pH が影響していることが考えられる。

前葉体の孢子体形成はベニシダでは黒ボク土のみが高い孢子体形成率を示したことから、黒ボク土が有する何等かの土壤有機質が影響したのではないかと考えられる。既存研究においても、培地の窒素源、特に KNO_3 が孢子体形成の制限要因となることが知られている (Akira, 2004)。一方で、オニヤブソテツに関してはミズゴケやバーミキュライトなどでも孢子体形成が確認されている。これはオニヤブソテツがベニシダと比較して土壤の少ない環境でも生育できる可能性があることを示唆していると考えられる。実際に野外の生育地においてオニヤブソテツは岩場などの土壤層の薄い立地でも生育している。既存研究ではヘゴ材やイワヒバの根茎を適当に切ったものが使用されているため(行方沼東, 1961)、今後は様々な資材での実験が求められる。



写真 III-3-6 土壤がほとんど無い緑化施工地後に侵入するオニヤブソテツ類

第Ⅲ-4：栄養条件と前葉体成長の関係

第1項：実験方法

供試植物は従来から緑化植物として利用されているオシダ科オシダ属のベニシダ (*Dryopteris erythrosora* (D.C.Eaton) Kuntze.)、独特の葉形や耐凍性を有し今後の緑化植物として期待されているオシダ科オシダ属のオシダ、コウヤワラビ科コウヤワラビ属のイヌガンソクとした。ベニシダとオシダは同科同属であるが、暖温帯と冷温帯で分布域が大きく異なる。ベニシダは常緑性で、本州から琉球列島(沖永良部島以北)の主に暖温帯の低山地の林下、オシダは夏緑性で、南千島から四国(徳島県)の主に冷温帯の山地林下、イヌガンソクは夏緑性で、北海道から九州の主に山地林下に生育することが多い(海老原, 2016・2017; 田川, 1959)。ベニシダの胞子は2018年6月下旬に東京都町田市、オシダとイヌガンソクの胞子は2018年10月上旬に岩手県一関市にて採取し、実験は2018年11月に東京都世田谷区の東京農業大学構内にて行った。

採取した胞子葉は紙封筒に入れ、室温の暗所にて数日間風乾したのち胞子を採取した。採取した胞子は70%エタノールで殺菌した硼珪酸ガラスのスクリー一瓶(口内径:14.5 mm×胴径:24.0 mm×高さ:50 mm)に入れ、暗所にて室温で保存した。

胞子の殺菌はクリーンベンチ内で行った。殺菌には12%次亜塩素酸ナトリウム(株式会社松葉薬品)を希釈して、1%次亜塩素酸ナトリウムを作成し、これを胞子が入ったスクリー一瓶に10 ml入れ5分間攪拌した。胞子は浸漬後、ろ

過して滅菌水で 3 回洗浄した。ろ紙上の孢子を葉さじで集め、滅菌水に浸漬させ、30 分以内に培地へ播種した。

培地はスクロースが添加されていないムラシゲ・スクーグ培地の粉末培地（日本製薬株式会社）を使用した（以下 MS 培地）。蒸留水 1 ℓ に粉末培地を溶かしたものを 1MS 濃度とし、500 ml を別の容器に移し蒸留水を 500 ml 加えることで濃度を 1/4MS, 1/2MS, 1MS の条件区を作成した。また、何も栄養が添加されない区として素寒天培地（0MS）の区も作成した。培地の pH は 5.75 ± 0.05 に調整したのち、寒天粉末を濃度 0.7% になるよう加え、オートクレーブ（121 °C, 20 分間）で滅菌処理を行った。

培地は滅菌処理後にクリーンベンチ内にて滅菌プラスチックシャーレ（直径 50.7 mm, 高さ 14.7 mm）に 15 ml 分注し、常温になるまで放冷した。放冷後、殺菌した孢子をマイクロピペットで吸い取り、培地上の 5 ヶ所が等間隔になるように 1 滴ずつ播種した。なお、播種範囲は 1 滴あたり実体顕微鏡での観測視野（縦 2.5 mm, 横 3 mm）に収まるように設定した。播種後シャーレの周囲に自己粘着フィルム（高機能被覆フィルム ラボピタ 20 mm×30 mm）を 2 周ほど巻き密閉した。播種後にコンタミネーションが発生しても観察ができるように、1 条件につき 5 シャーレ作成した。したがって、1 条件区につき 1 シャーレに 5 滴の孢子播種を行い反復は 5 回とした。播種後のシャーレは恒温 25 °C に設定した温度勾配機（東京理化器械 EYELAMTI-202）内に設置した。温度勾配機内の光量は 3,300 lux（明期 16 時間・暗期 8 時間）とした。

各シャーレは 90 日が経過するまで一度も開封しておらず，温度勾配機内に設置した際にシャーレが重なった場合は数日おきにその順番を変えることで，シャーレが受ける光量に差が生じないように配慮した。

第 2 項：実験結果

前葉体の掘り取り作業が難航したため，面積の算出まで至っていない。播種後 90 日目のベニシダの前葉体の様子は下記の写真にて示す。

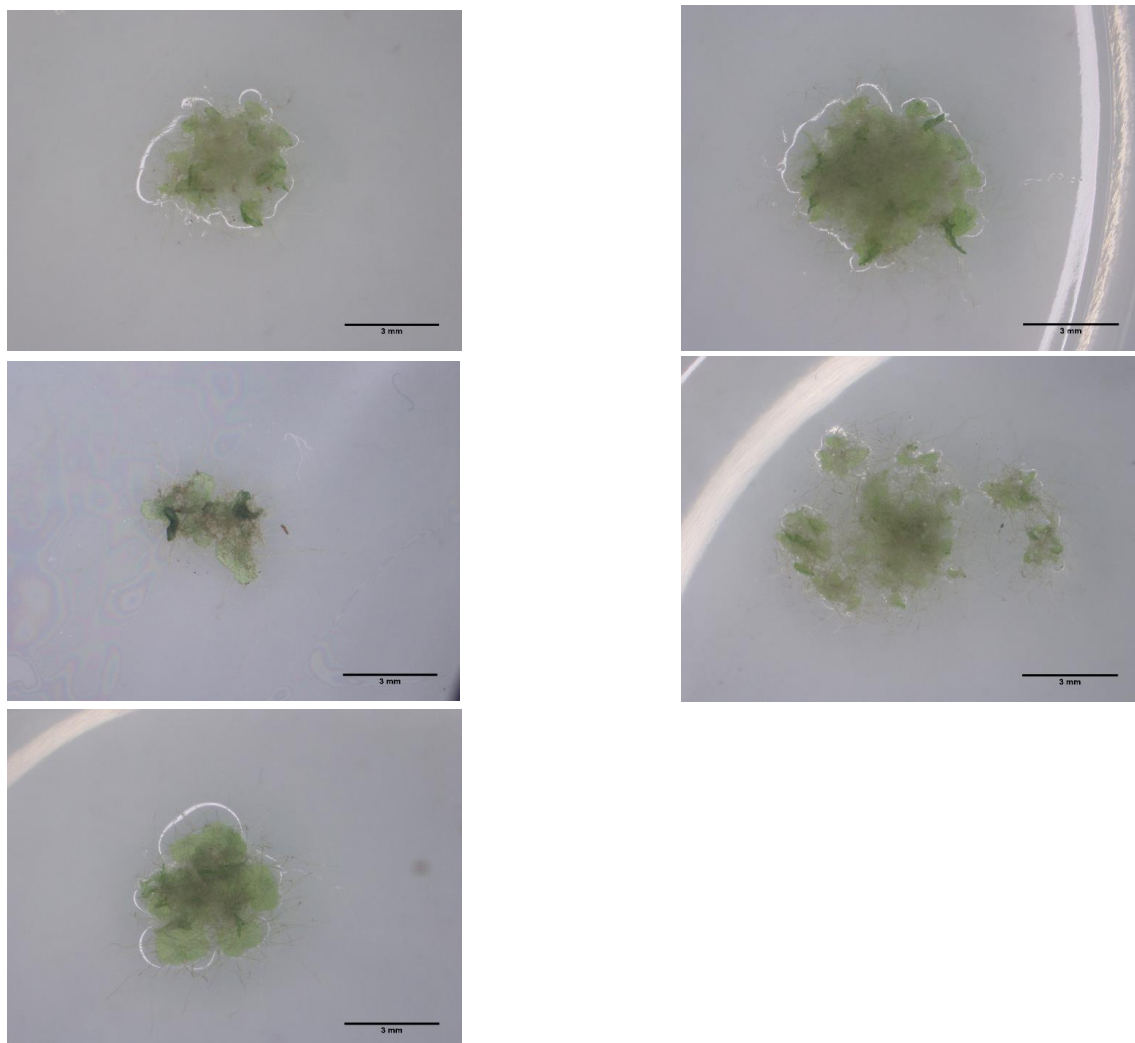


図 III-4-1 OMS における播種後 90 日目のベニシダの前葉体の様子（スケールは 3mm）

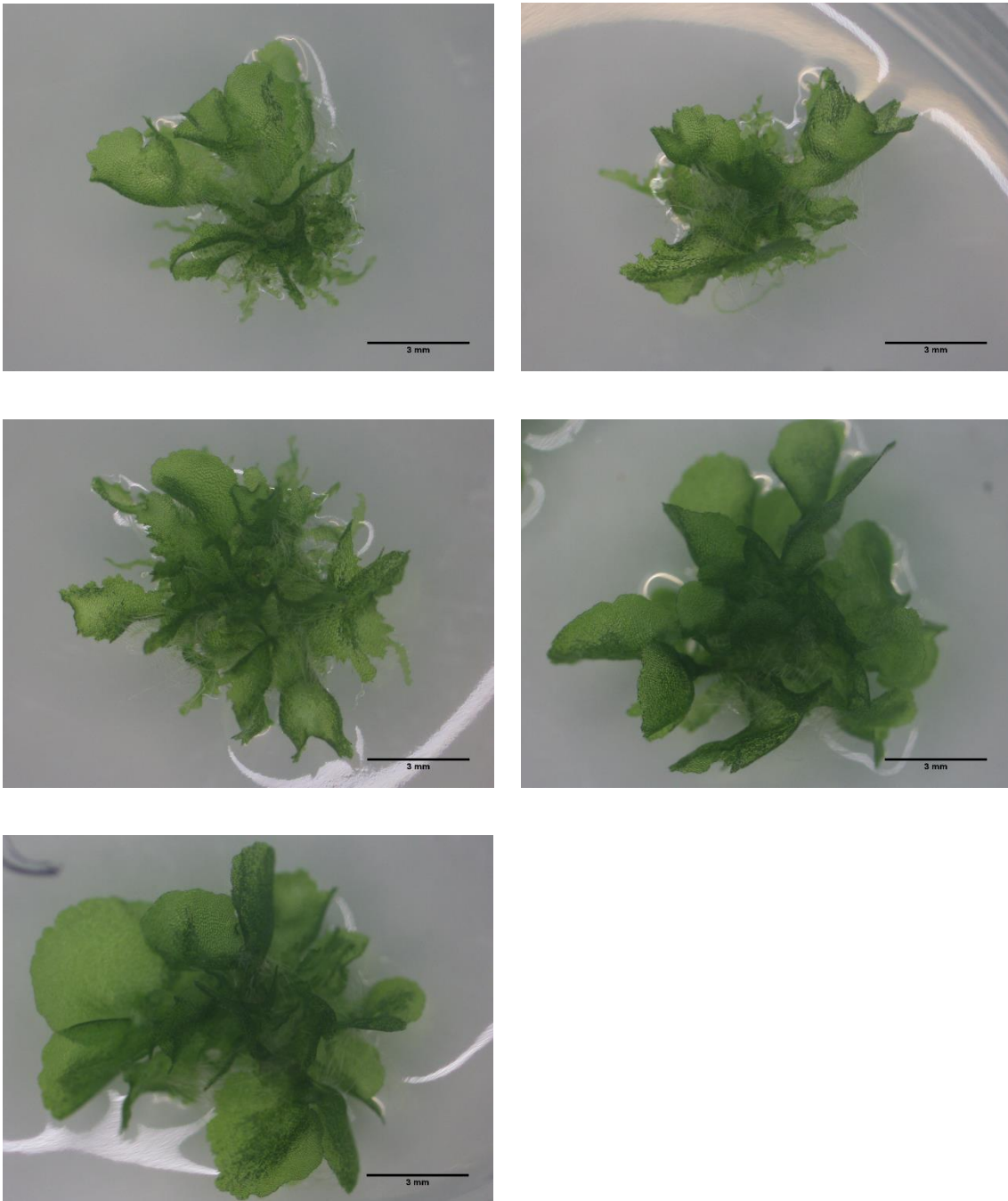


図 III-4-2 1/4MS における播種後 90 日目のベニシダの前葉体の様子 (スケールは 3mm)

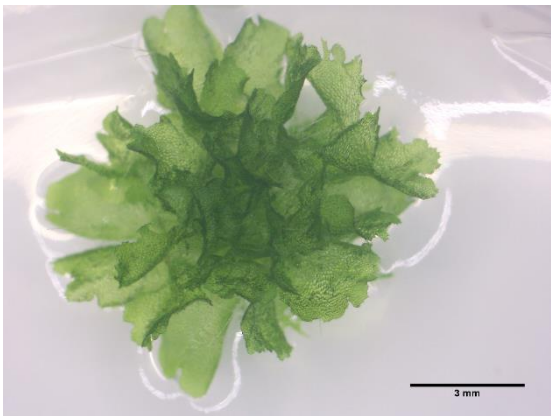
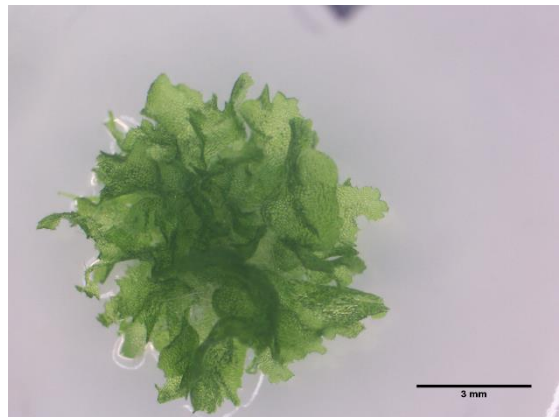
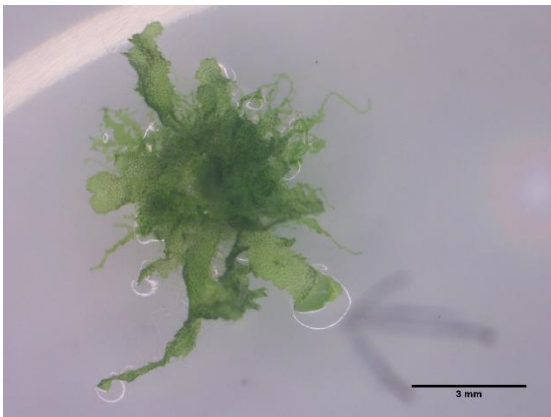
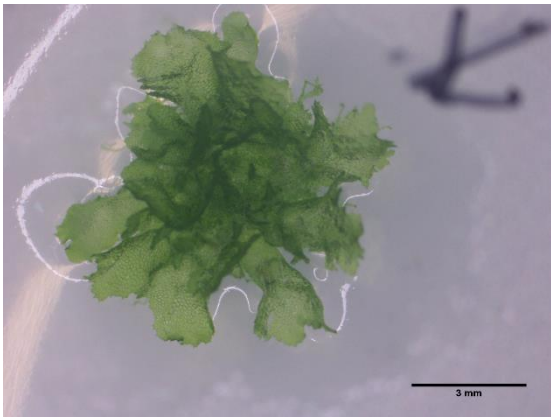


図 III-4-3 1/2MS における播種後 90 日目のベニシダの前葉体の様子 (スケールは 3mm)

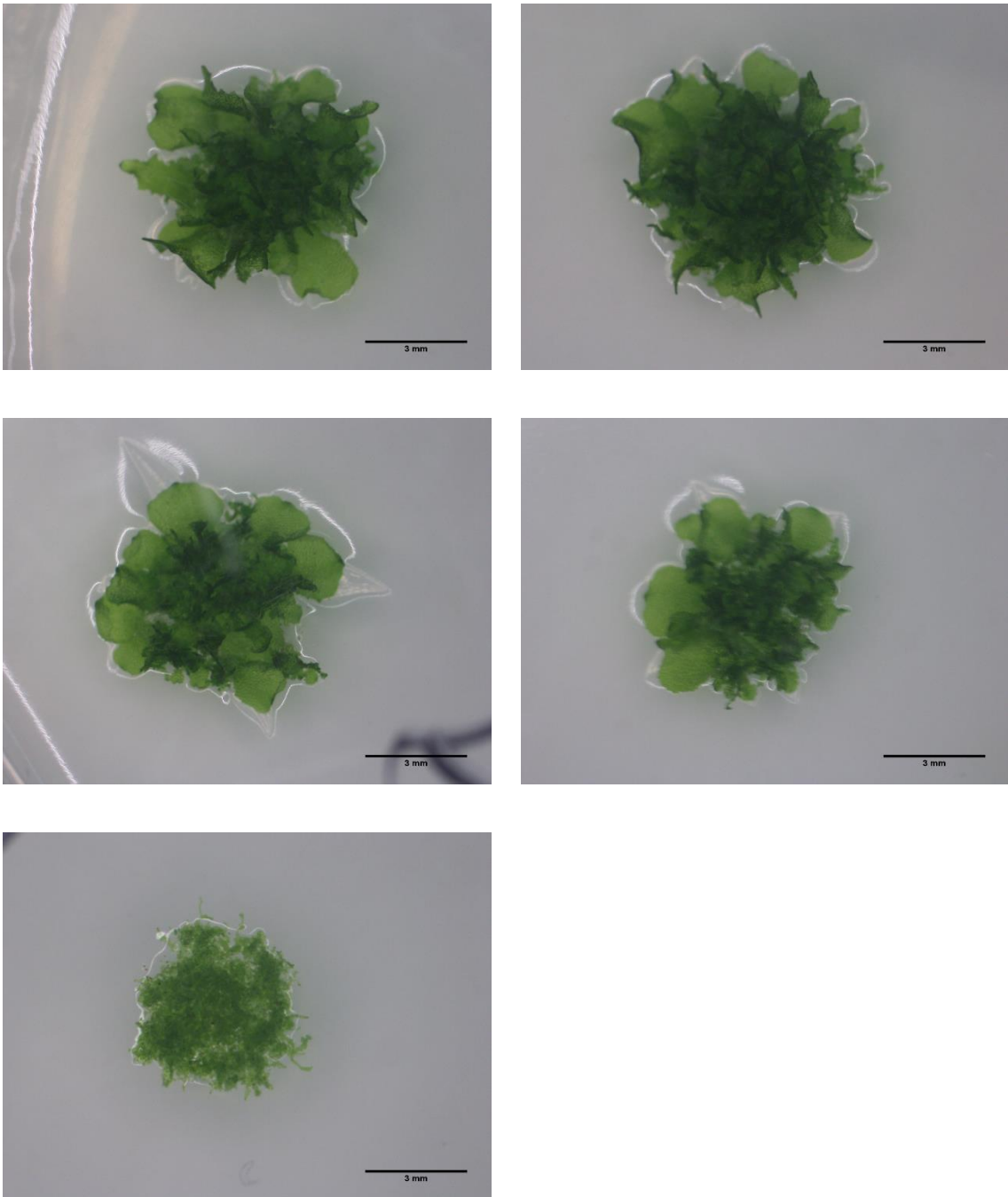


図 III-4-4 1MS における播種後 90 日目のベニシダの前葉体の様子 (スケールは 3mm)

オシダにおける播種後 90 日目の前葉体の様子は下記の写真にて示す。

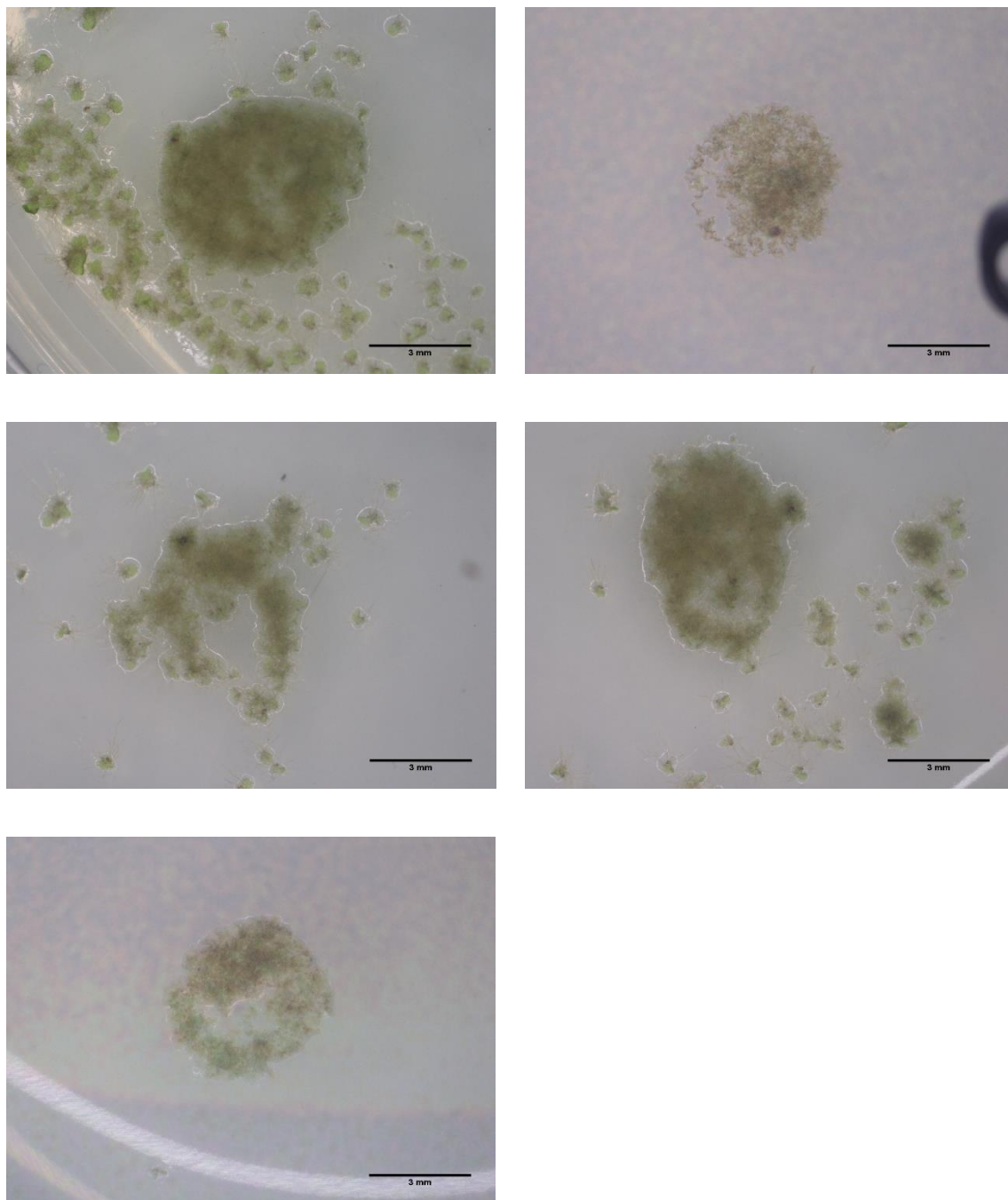


図 III-4-5 1MS における播種後 90 日目のオシダの前葉体の様子 (スケールは 3mm)

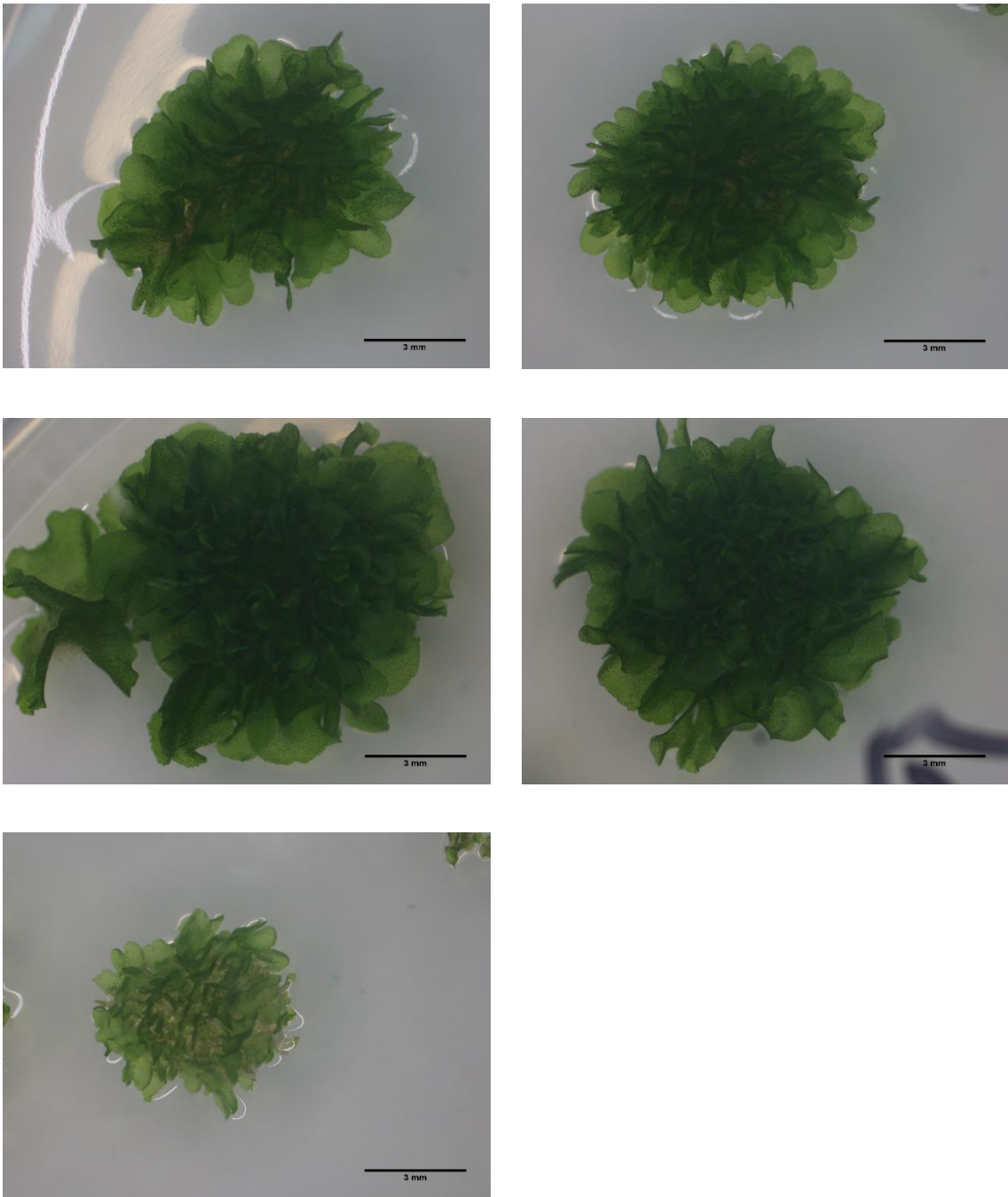


図 III-4-6 1/4MS における播種後 90 日目のオシダの前葉体の様子 (スケールは 3mm)

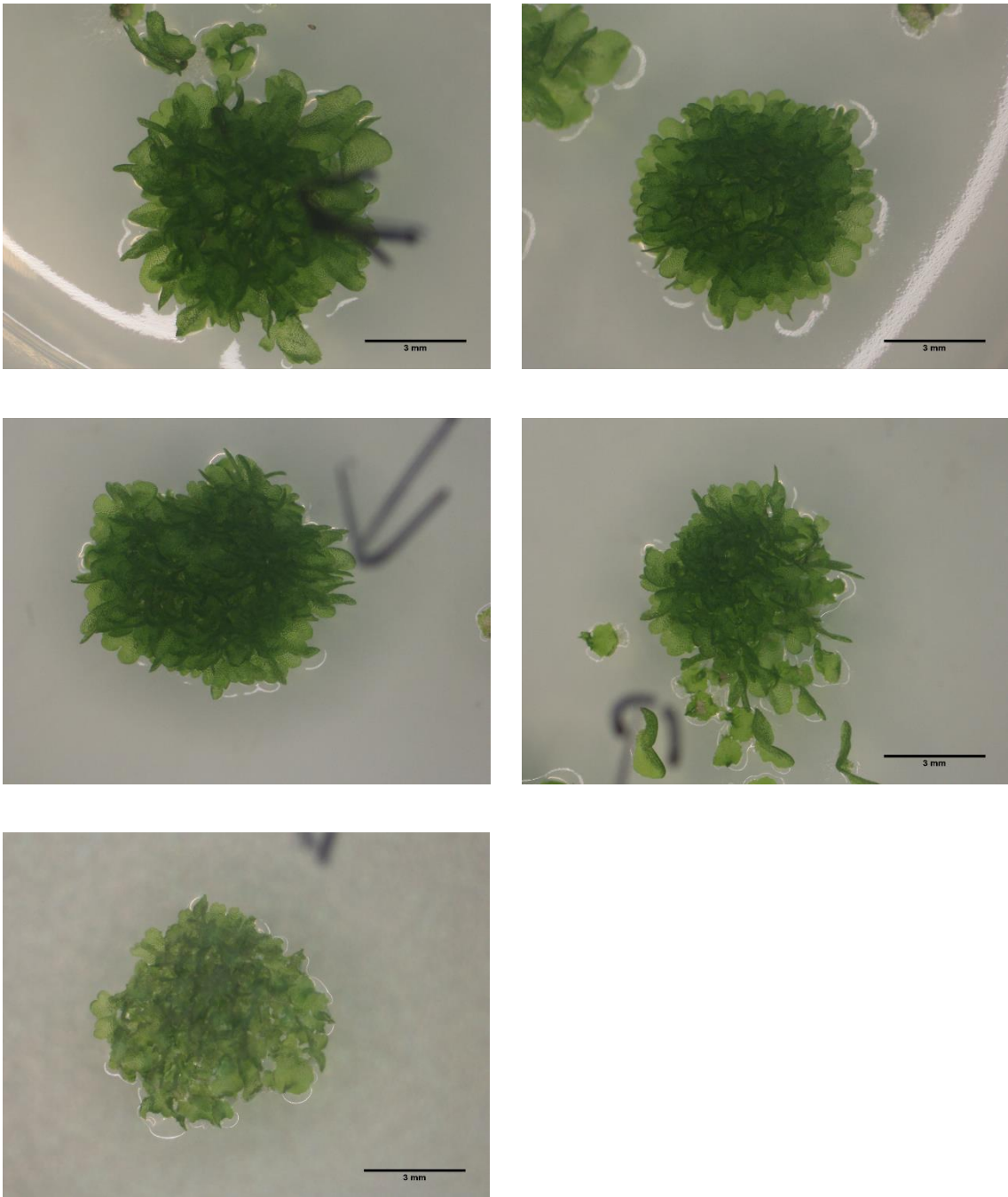


図 III-4-7 1/2MS における播種後 90 日目のオシダの前葉体の様子 (スケールは 3mm)

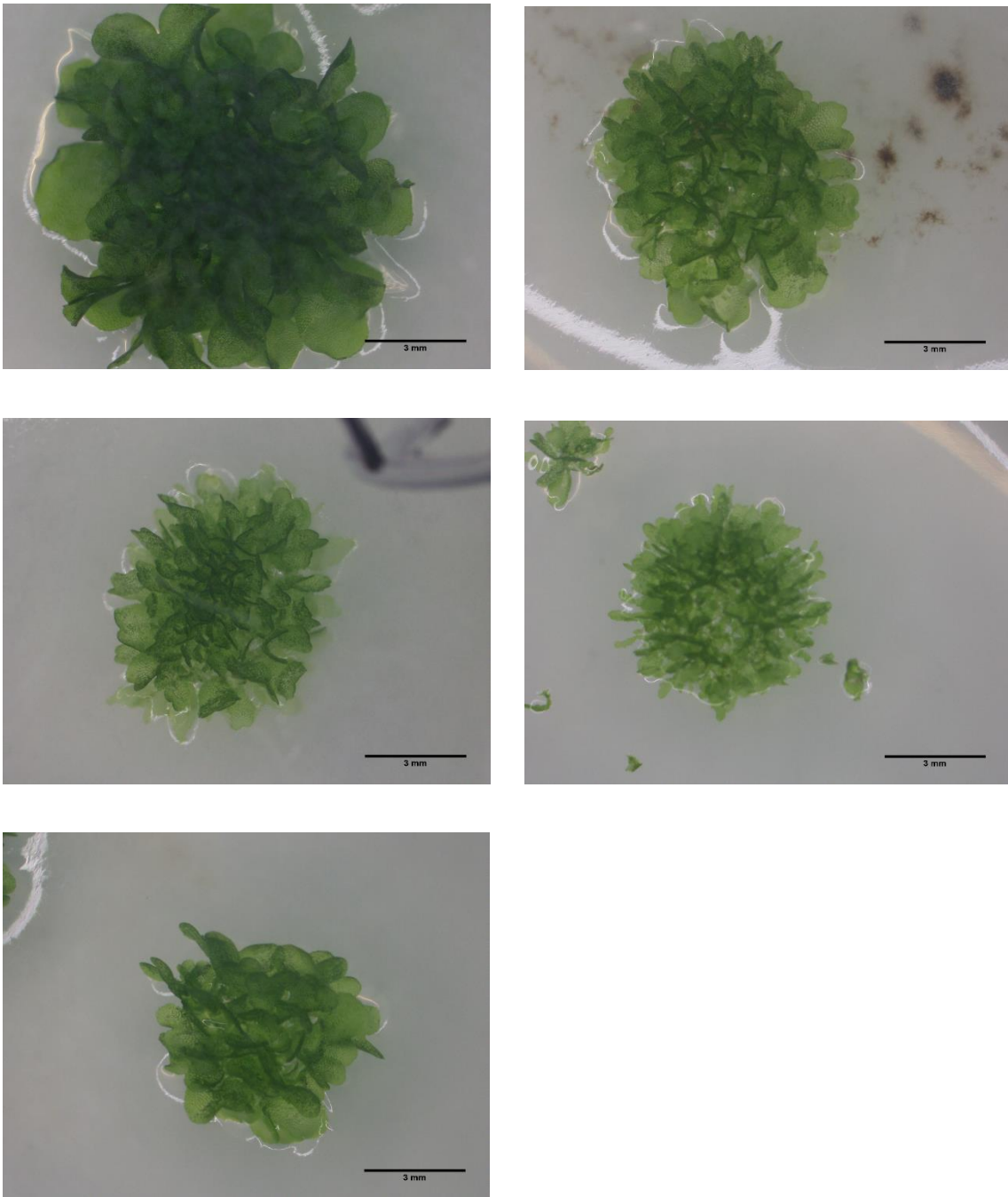


図 III-4-8 1MSにおける播種後90日目のオシダの前葉体の様子（スケールは3mm）

イヌガンソクにおける播種後 90 日目の前葉体の様子は下記の写真にて示す。

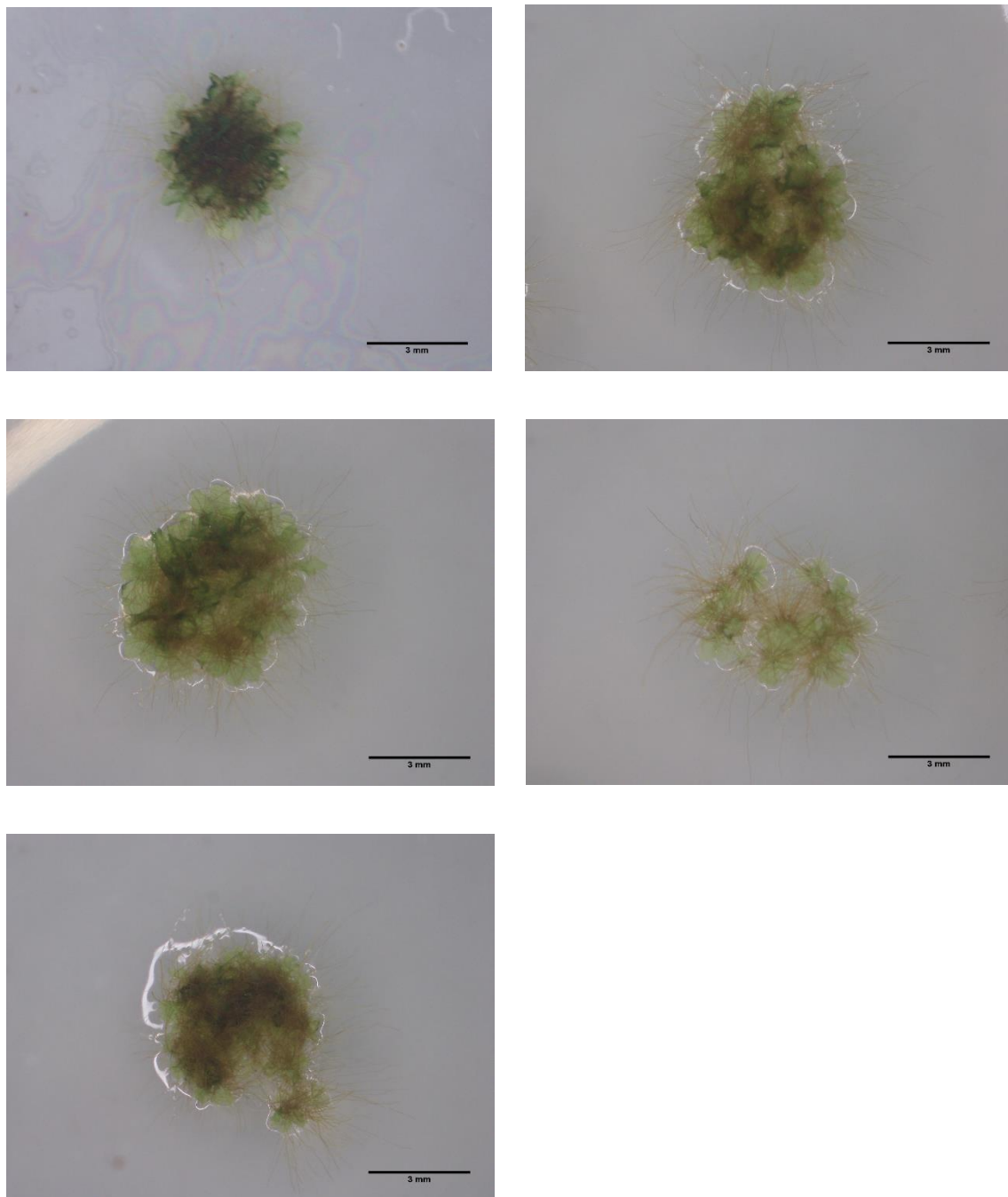


図 III-4-9 OMS における播種後 90 日目のイヌガンソクの前葉体の様子(スケールは 3mm)

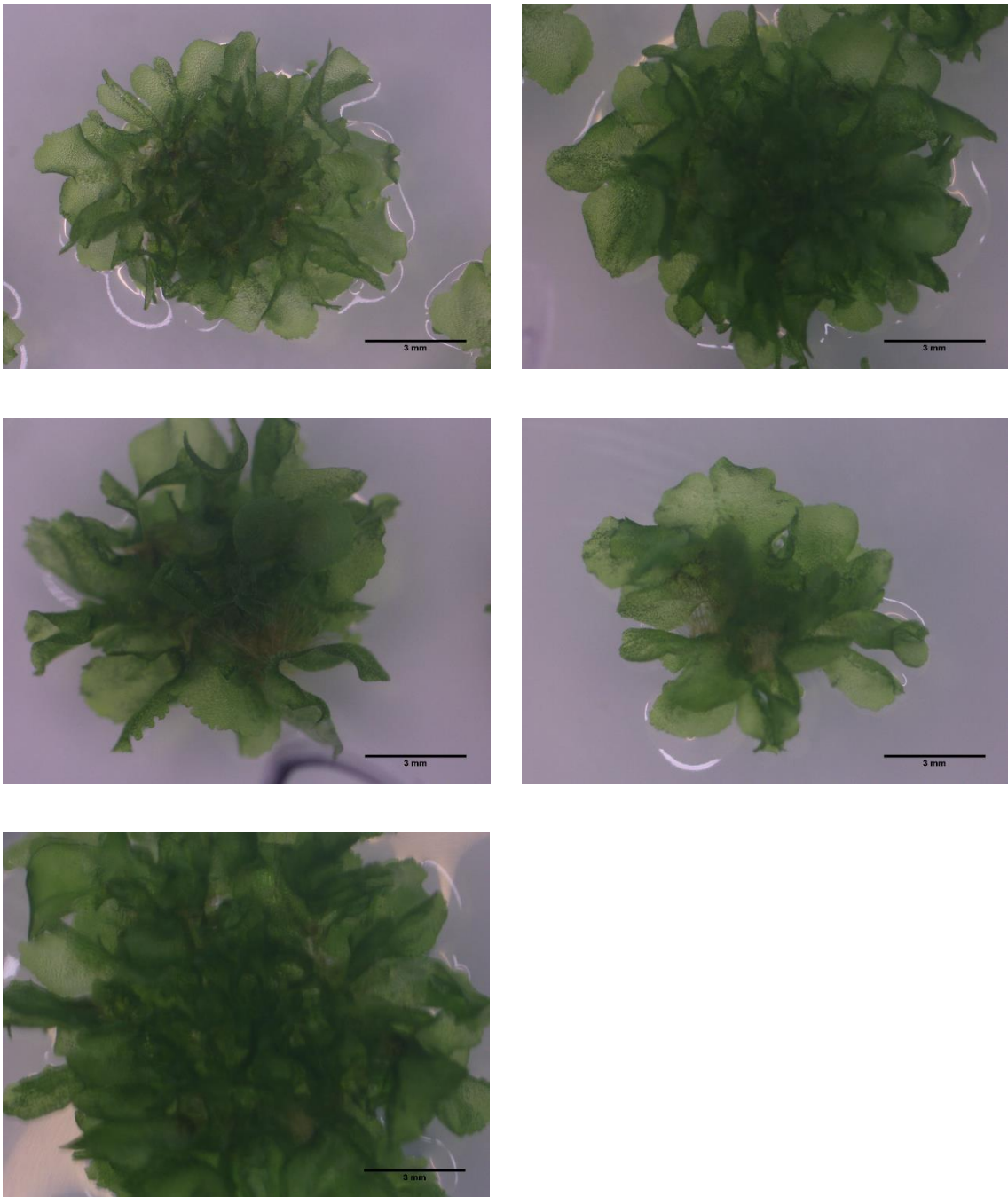


図 III-4-10 1/4MS における播種後 90 日目のイヌガンソクの前葉体の様子 (スケールは 3mm)

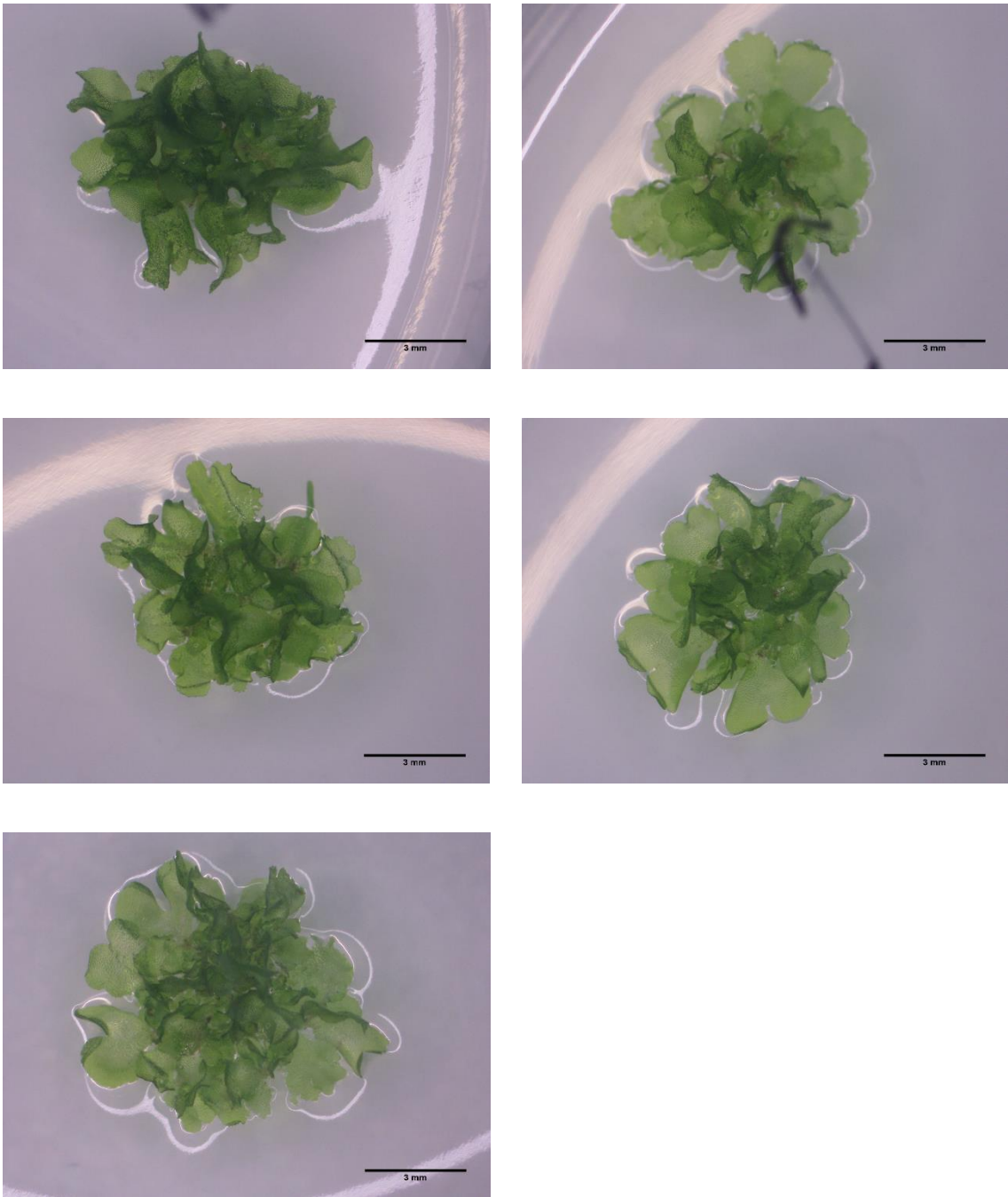


図 III-4-11 1/2MS における播種後 90 日目のイヌガンソクの前葉体の様子(スケールは 3mm)

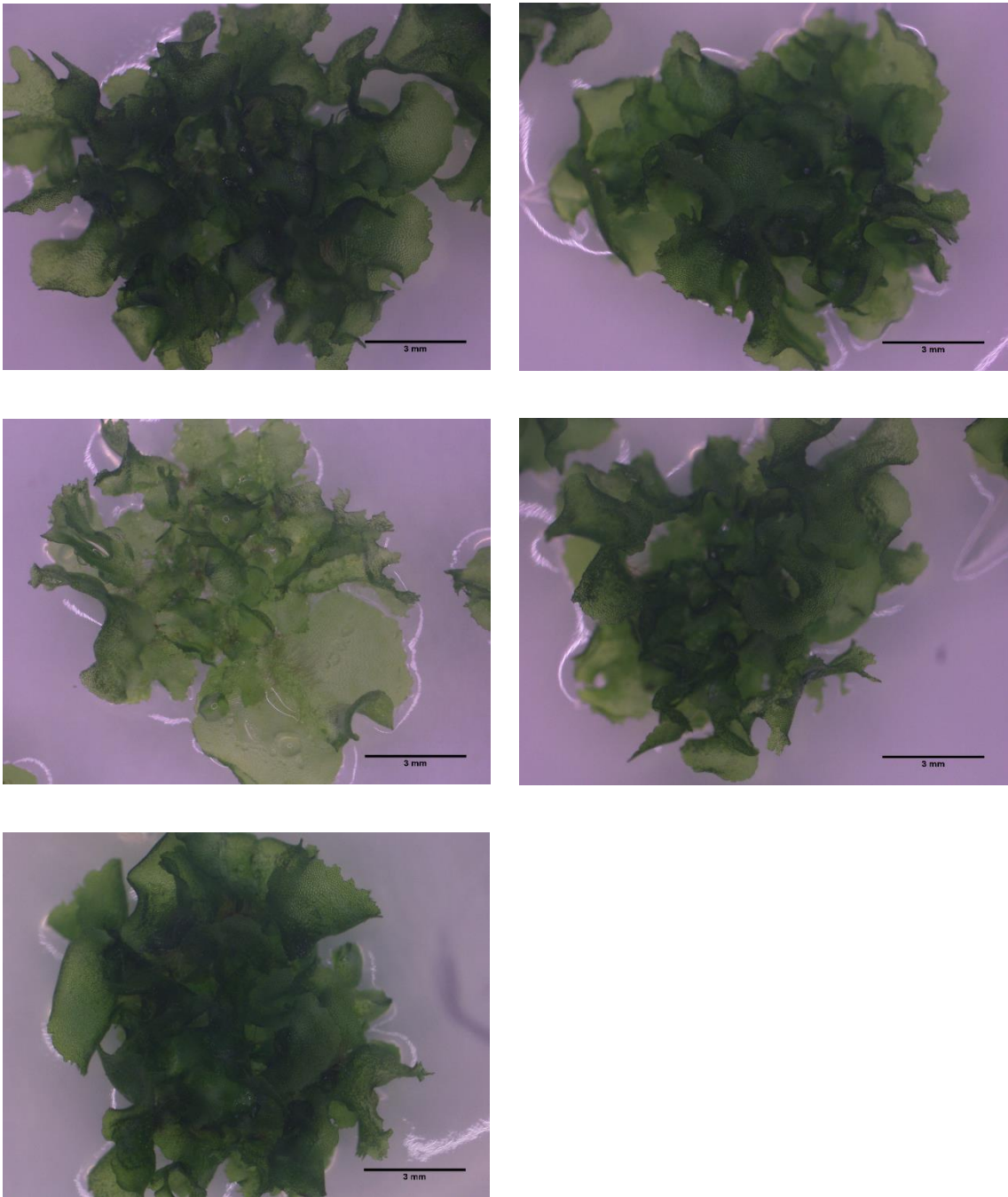


図 III-4-12 1MS における播種後 90 日目のイヌガンソクの前葉体の様子 (スケールは 3mm)

第3項：小括

ベニシダとオシダは OMS の培地のみ正常な前葉体の成長がみられず、他条件と比べ仮根が伸びていた。したがって、ベニシダとオシダの前葉体生長には少しでも栄養があることが必要であると考えられる。また、栄養が含まれた場合の培地濃度が前葉体生長に与える影響については今回の濃度条件では明らかにならなかった。

イヌガンソクは OMS の培地のみ正常な前葉体の成長がみられず、他条件と比べ仮根が伸びていた。したがって、イヌガンソクの前葉体生長には少しでも栄養があることが必要であると考えられる。胞子の発芽率が低かった 1MS においても生長が良好だったことから、発芽と前葉体生長の各段階に MS 濃度が与える影響は異なると考えられる。本実験では MS 培地を使用した。他の培地についても検討する必要があると考えられる(檜垣, 1984) (樋口, 1990)。

III-5 : 生育密度と前葉体成長の関係

第 1 項 : 実験方法

供試植物はオシダ科オシダ属のベニシダとオシダ科ヤブソテツ属のオニヤブソテツとした。ベニシダは本州から琉球列島（沖永良部島以北）の常緑広葉樹林帯，オニヤブソテツは本州から琉球列島の海岸沿いに生育することが多い(海老原淳, 2017)。今回実験で使用するベニシダは 3 倍体（無配生殖），オニヤブソテツは 2 倍体（有性生殖），3 倍体，4 倍体（有性生殖）が確認されている(松本, 2003) (光田, 1986)。一般的に 2 倍体有性生殖型は 1 胞子囊あたり 64 個，3 倍体無配生殖型は 1 胞子囊あたり 32 個の胞子をつくることが知られている(三井, 1982)。今回の実験では，増殖技術の確立を目的とするため，3 倍体無配生殖型を両種とも使用した。両種ともに 1 胞子囊あたり 32 個の胞子がある事を確認した。

実験に使う個体は両種とも 2015 年 12 月に大分県速見郡で山採りを行い，2017 年 3 月から東京都世田谷区の東京農業大学構内の圃場にてスリットコンテナ（直径 15cm，深さ 13cm，TO-SC150，東海化成）を使用し育成管理した。育成期間中は全個体とも屋外かつ黒色の遮光率 75%の寒冷紗下にて同一の管理を行った。個体ごとの株の大きさやソーラスの色や成熟度合については目視と写真にて観察，記録を行ったが外見上に大きな差は確認されなかった。2017 年 6 月，1 個体からソーラスの総重量が 0.010g になるまでパラフィン紙内に集めて封入した。1 個体からソーラスの採取を 5 反復行い，全 7 個体用意したため

0.010g のソーラスのセットは計 35 となった。また、孢子採取は両種とも 1 日で行った。採取したソーラスは室内にて 4 日間風乾し、孢子嚢から裂開して出てきた孢子を実験に用いた。

また、孢子ではなくソーラスの総重量を計測して実験を行なった理由は、孢子栽培を行うにあたり実用性を考慮したからである。そのため、3 倍体の個体であることを確認する目的以外では、1 孢子嚢中の孢子数は計数していない。

ソーラスの大きさは個体によって異なることから、両種とも式 1 により 1 ソーラスの平均重量 (mg) を算出した。また、個体ごとの値における差の有無を一元配置分散分析で判定し、有意差を確認したうえで Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。

$$1 \text{ ソーラスの平均重量 (mg)} = 0.010\text{g} / \text{ソーラスの数} \times 1,000 \quad (\text{式 1})$$

孢子を播種した容器はプラスチックシャーレ (滅菌ディスコシャーレ (PS 製) 直径 56mm, 高さ 16mm) を使用し、容積の半分まで培地として硬質鹿沼土 (細粒, 粒径 2mm) を敷き詰めた。培地に純水を 5ml 加えた後に、0.010g のソーラスのセット 1 個を播種した。シャーレは温度条件を 25°C 恒温, 光条件を明条件 16 時間 (11,000lux), 暗条件 8 時間に設定した人工気象器 (日本医科器械製作所 (株) SK-101R LH-240S) 内に設置した。室内実験は同大学構内にて行った。

胞子の発芽は緑色の原糸体が目視にて確認出来た状態を指し、各シャーレ内において無作為に選んだ 10 プロットを計数することで胞子の発芽数とした。1 プロットは 5mm×5mm とし、計数は正方形の紙片（15mm×15mm）の中央にカッターで正方形（5mm×5mm）の穴を開けた紙を用いて行った（図-2）。測定は無作為のため、原糸体が生えていない部分も選ばれている。測定には実体顕微鏡を用い、最低でも 1 週間に 1 回以上実施した。1 ソーラスあたりの発芽数は式 2 にて算出した。また、胞子の発芽は前葉体の生育密度がピークになるまで観察された。

1 ソーラスあたりの胞子の発芽数=ピーク時の生育密度/ソーラスの数（式 2）

通常、前葉体は原糸体がハート型に成長した姿を指すが、本実験ではシャーレ内において発芽が疎に生じているため、今回は原糸体の状態から前葉体として扱った。前葉体の生育密度の計測方法は胞子の発芽数の計測と同様に行い、式 3 にて算出した。また、前葉体の計測基準は前葉体の一部が含まれていればカウントとした。計測期間は個体数と個体サイズに変化が見られなくなった 90 日で終了とした。また、Tukey-Kramer 法にて 90 日目の生育密度に差があるか検定を行った。

1 ソーラスあたりの生育密度=ピーク時の生育密度/播種したソーラスの総数（式 3）

第 2 項：実験結果

前葉体の生育密度の推移を図Ⅲ-5-1, 2 に示す。播種後 90 日目には前葉体の生育密度が概ね安定した。ベニシダの生育密度がピークに達したのは平均で 13 日目, オニヤブソテツでは 24 日目となった。ピーク時の生育密度は, ベニシダでは 4.4/mm² (A), 5.6/mm²(B), 3.4/mm²(C), 1.5/mm²(D), 4.4/mm²(E), 3.3/mm²(F), 6.1/mm²(G), オニヤブソテツでは 1.2/mm² (A), 0.6/mm²(B), 1.1/mm²(C), 0.9/mm²(D), 1.2/mm²(E), 1.3/mm²(F), 5.6/mm²(G)となり, 生育密度が最も高い個体は両種共に個体 G であった。90 日目のベニシダの生育密度は個体間において差が見られ, オニヤブソテツは個体 G とそれ以外の個体との間に 2 倍以上の差が見られた (Tukey-Kramer 法, $p<0.05$)。

前葉体の生育密度と 90 日目における生存率を図Ⅲ-5-3, 4 に示す。両種ともに生育密度と生存率との間に負の相関が認められた ($r^2=0.63$, $p<0.01$; $r^2=0.36$, $p<0.01$)。両種とも生存率は各個体とも 25%以上の値を示した。ベニシダにおいて最も高い生存率は個体 D で約 70%の値を示し, オニヤブソテツにおいて最も高い生存率は個体 B で約 70%の値を示した。ベニシダにおいて最も低い生存率は個体 B で約 25%の値を示し, オニヤブソテツにおいて最も低い生存率は個体 F で約 30%の値を示した。

また, 両種の個体 G においては, 生存率が 50%以下の値を示し, 両種ともソーラスの重さでは有意差が認められているものの, ソーラスの重さと生存率については明瞭な関係性が見られなかった。

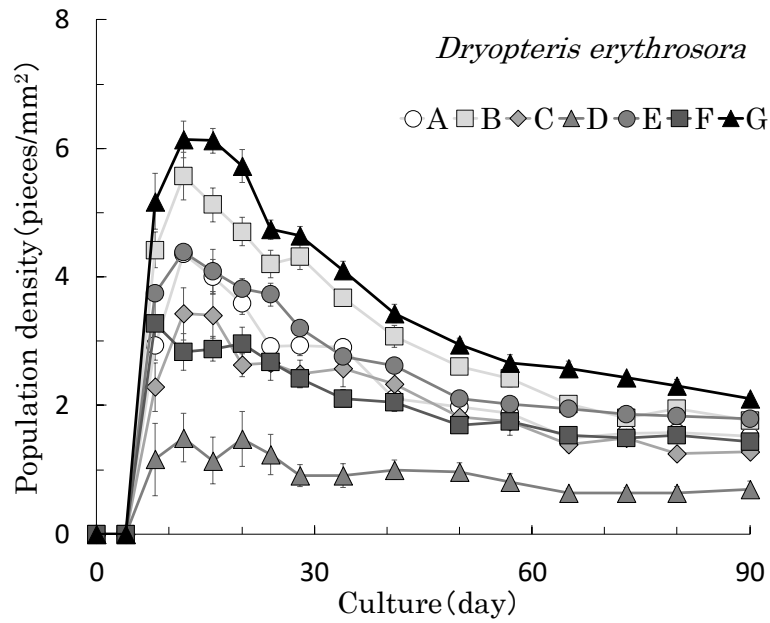


図 III-5-1 ベニシダにおける前葉体の生育密度の推移
 (各点は 10 プロットの平均値で、エラーバーは標準偏差を示す。n=10)

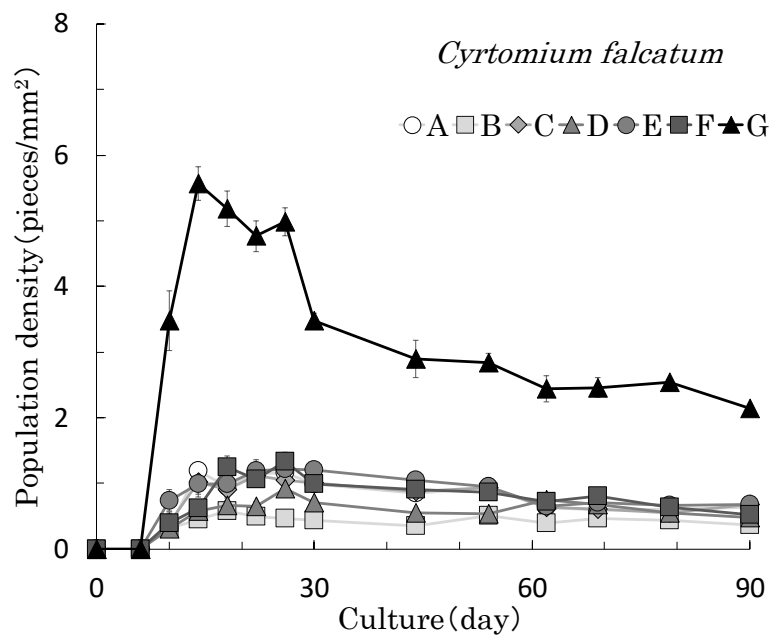


図 III-5-2 オニヤブソテツにおける前葉体の生育密度の推移
 (各点は 10 プロットの平均値で、エラーバーは標準偏差を示す。n=10)

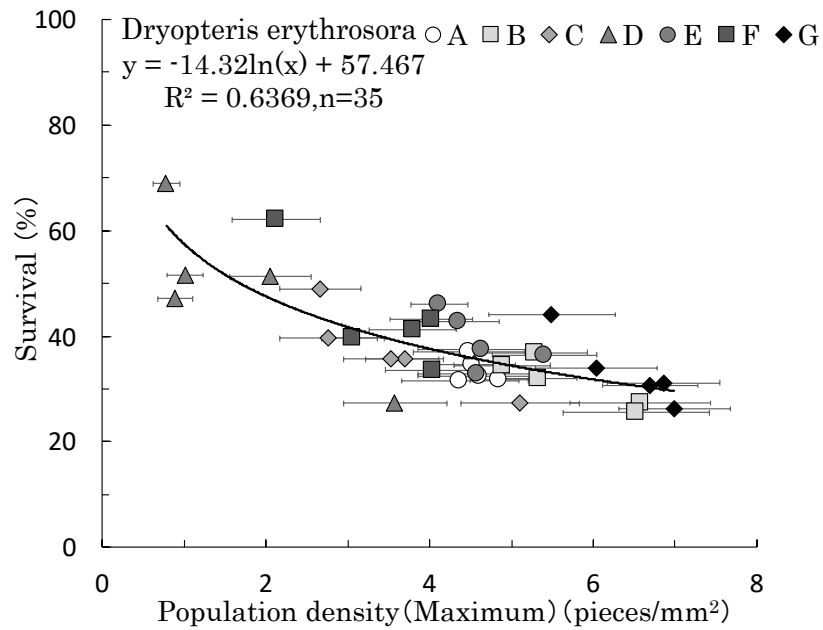


図 III-5-3 ベニシダにおける前葉体の生育密度と 90 日目における生存率
 (各点は 10 プロットの平均値で、エラーバーは標準偏差を示す。n=10)

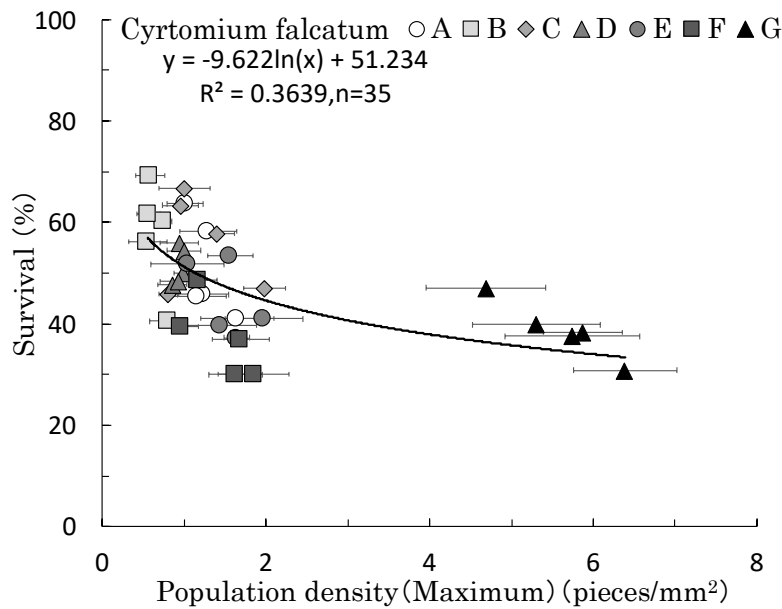


図 III-5-4 オニヤブソテツにおける前葉体の生育密度と 90 日目における生存率
 (各点は 10 プロットの平均値で、エラーバーは標準偏差を示す。n=10)

第3項：小括

既存研究より、前葉体の成長は生育密度と強い関係があることが分かっている(Huang *et al.*, 2015)。このため、過密による生育不良をさけるには、一定量の胞子を播種した際にどれくらい前葉体が得られるのか、そして、前葉体の成長に伴って生育密度がどう変化するのかを把握する必要がある。しかし、一定量の胞子を播種した際にどれくらい前葉体が得られるのかについての定量的な研究はほとんど見当たらない。前葉体の成長に伴う生育密度の変化についてはWatkins ほか(Watkins *et al.*, 2007)が野外に生育する数種の前葉体の観察から、着生シダ植物の前葉体と陸生シダ植物の前葉体とでは選択圧の違いとそれに対する適応戦略の違いによって、死亡率や寿命が異なる可能性を示した。しかし、発芽直後における前葉体の個体群密度の変化については示されていない。そこで、本研究で前葉体の生育密度の推移と生存率が明らかになったことで、緑化植物として利用されているベニシダとオニヤブソテツの鉢上げ時期の検討を行った。今回の実験結果から両種ともに胞子栽培において前葉体を多量に獲得したい場合は、結果図Ⅲ-5-1,2 で示した通り、生育密度がピークになる胞子播種後 10 日から 30 日の間で鉢上げすることが好ましいと考えられる。しかし、小さい前葉体の鉢上げは作業的に難しいうえに、鉢上げ後の前葉体から幼胞子体が発生するとは限らない。また、生育密度が高い場合、生存率が低くなるため鉢上げ後に枯死する可能性も考えられる。

10 種のシダの胞子を用いて発芽に関する実験を行い、胞子播種後 15 日以降

は孢子の発芽が確認されなかったこと、発芽した孢子のうち 90%以上が 30 日以内に前葉体へ成長したことが報告されている(Ballesteros *et al.*, 2012)。今回の実験では両種ともにほぼ全ての個体の生育密度が 30 日以内にピークに達することから、既存研究(Ballesteros *et al.*, 2012)と同様に前葉体成長には初期成長が関係していると考えられる (図Ⅲ-5-1,2)。

今回の供試植物であるベニシダとオニヤブソテツは両種共に 3 倍体無配生殖型のため受精過程を省略する。そのため、両種ともに前葉体から幼孢子体が多く発生する条件の検討に適していると考えられる。前葉体は配偶体世代、幼孢子体は孢子体世代に分けられ、各世代での資源配分や栄養条件など生理特性が種によって違うことが本研究からも考えられる。また、孢子播種後 90 日の前葉体から幼孢子体が発生し円滑に成長することで、数年後には孢子由来の個体を緑化植物として使用できる可能性がある。

今回の実験結果から孢子栽培は株分けに比べると一度の作業で大量に栽培できるため増殖技術として効率的であり、さらに希少種で株分けが難しい種に対しては保全技術として貢献できる可能性があると考えられる。また、本実験は日本緑化工学会誌で発表した内容である(西野ほか, 2020)。

第IV章 植栽の生育条件に関する研究

本研究は緑化植物として使用することを目的にしているため、発芽から前葉体の成長の実験だけでなく、幼胞子体の生育実験も必要であると考えられる。しかし、幼胞子体から胞子体への成長は数年かかるのが一般的とされており、今回は予備的な実験しか実施できなかった。予備実験の方法や材料に関しては、第IV-1, 2の結果から考慮して実施した。

幼胞子体から胞子体への成長に関する予備実験は2020年10月27日から2021年2月9日の105日間行った。供試植物は、オシダ科オシダ属ベニシダ、オシダ科ヤブソテツ属オニヤブソテツの2種とした。植え替える幼胞子体には、2019年7月23日に胞子を播種し、幼胞子体が形成させたベニシダとオニヤブソテツを主として使用した。植え替える個体は、第II-2-A,Bで発生した前葉体を使用した。2020年9月15日に白色光1,000lux条件の照射24時間で、1ヶ月ほど白色光に晒したのち2020年10月27日に植え替えを行った。

幼胞子体を植え替える容器には、切り取ったプラスチック製セルトレイシリーズ（黒色・穴径23.5mm×23.5mm 深さ44mm）を用いた。用土にはバーミキュライトのみ使用した。セルトレイ1穴が満杯になるまで用土を入れてから、散水して湿らせた用土に幼胞子体を植え替えた。幼胞子体を植え替える際は、ピンセットを用いて寒天培地から摘出するが、植物体の仮根に付着した寒天培地を無理に取り除かずに、寒天が植物体にある程度残った状態でバーミキュライトに植え替えた（図IV-1）。植え替えた後のセルトレイは、70%エタノールで殺

菌消毒したポリプロピレン製密閉容器（株式会社エンティック ハイパックシリーズ丸形 187φ×140mm）に入れ、250ml ほど腰水させた状態で生育させた。灌水頻度は、週に1度とした。腰水の入替えと各セルに約50ml ずつ散水し、新鮮な水と入れ替わるように配慮した。本実験では、青色光（450 nm、2600 lux）、赤色光（660 nm、1,100 lux）の照射24時間の光条件を設けた。植え替え後は各光条件で生育させ、週に1回程度植物体を上部から撮影し、植え替え後78日目まで幼胞子体の形成数を記録した。1区画に植え替えた個体群の前葉体形成数は、個体同士が重なっていたため記録できなかった。また、植え替える際に元の条件が不明な個体については記載していない。予備実験の結果として、105日目は生育した個体の写真と地上高を示す（図 IV-2～5）。

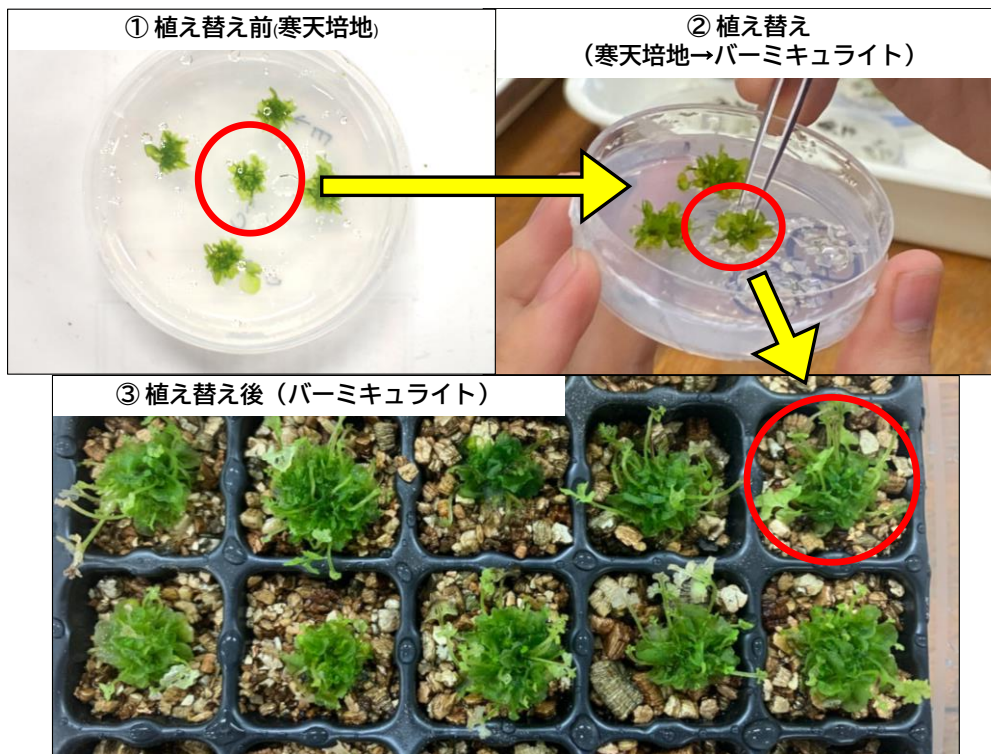


図 IV-1 幼胞子体の順化試験 幼胞子体植え替えの流れ

| | | | | |
|-----------------|--------------------|----------------------------------|-----------------------|--------------------|
| | ベニシダC 青色光照射0時間 | オニヤブソテツA 白色光1,000 lux 21時間 | オニヤブソテツB 青色光照射6時間 | |
| ベニシダA 光照射_時間 | ベニシダD 青色光照射15時間 | コウヤワラビ | オニヤブソテツC 青色光照射3時間 | オニヤブソテツG 光照射_時間 |
| ベニシダB 光照射_時間 | ベニシダE 青色光照射6時間 | — | オニヤブソテツD 青色光照射3時間 | オニヤブソテツH 光照射_時間 |
| — | ベニシダF 青色光照射6時間 | ベニシダH 白色光100 lux 18時間 | オニヤブソテツE 青色光照射9時間 | オニヤブソテツI 光照射_時間 |
| | ベニシダG 青色光照射24時間 | ベニシダI 白色光1,000 lux 24時間 | オニヤブソテツF 青色光照射15時間 | |

図 IV-2 植え替え後のセルトレイの模式図と個体ナンバー

※2行目にある光条件と照射時間は植え替え前まで生育させていた光条件を示す

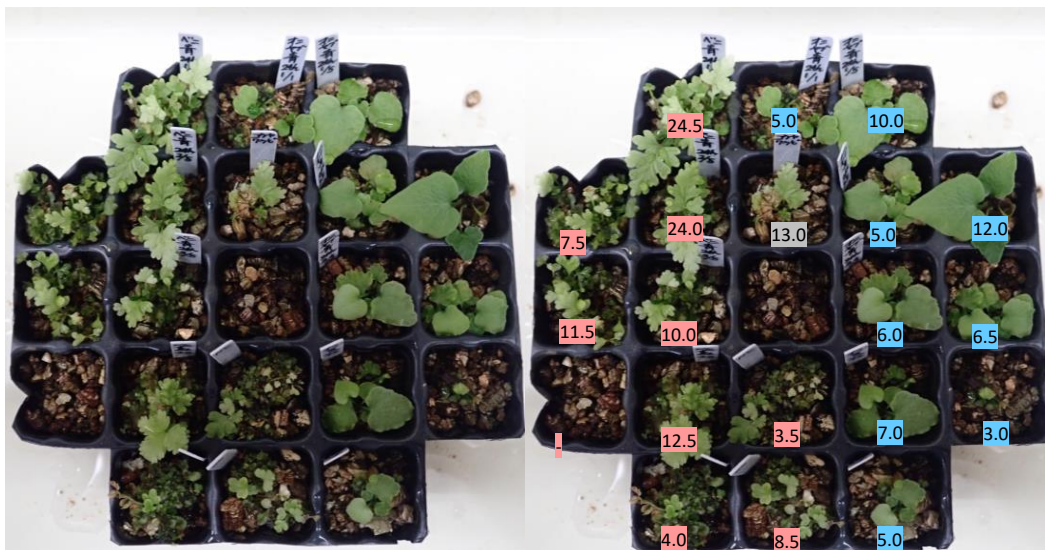


図 IV-3 青色光で生育した 105 日目の幼胞子体の様子 (左) とその地上高 (mm) (右)

| | | | | |
|--------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| | ベニシダD 青色光照射15時間 | オニヤブソテツA 白色光1,000 lux 21時間 | オニヤブソテツB 青色光照射6時間 | |
| | ベニシダE 青色光照射6時間 | コウヤワラビ | オニヤブソテツC 青色光照射3時間 | オニヤブソテツG 白色光100 lux 24時間 |
| ベニシダA __光照射__時間 | ベニシダF 青色光照射9時間 | — | オニヤブソテツD 青色光照射3時間 | オニヤブソテツH __光照射__時間 |
| ベニシダC __光照射__時間 | ベニシダG 青色光照射6時間 | ベニシダI 白色光100 lux 18時間 | オニヤブソテツE 青色光照射9時間 | オニヤブソテツI __光照射__時間 |
| | ベニシダH 青色光照射6時間 | ベニシダJ 白色光1,000 lux 24時間 | オニヤブソテツF 青色光照射24時間 | |

図 IV-4 植え替え後のセルトレイの模式図と個体ナンバー

※2行目にある光条件と照射時間は植え替え前まで生育させていた光条件を示す



図 IV-5 赤色光で生育した105日目の幼胞子体の様子（左）とその地上高（mm）（右）

第IV-1：植栽密度の条件と前葉体成長の関係

第1項：実験方法

供試植物はオシダ科オシダ属のベニシダとオシダ科ヤブソテツ属のオニヤブソテツとした。ベニシダは本州から琉球列島（沖永良部島以北）の常緑広葉樹林帯，オニヤブソテツは本州から琉球列島の海岸沿いに生育することが多い(海老原淳，2017)。今回実験で使用するベニシダは3倍体（無配生殖），オニヤブソテツは2倍体（有性生殖），3倍体，4倍体（有性生殖）が確認されている(松本，2003) (光田，1986)。一般的に2倍体有性生殖型は1胞子囊あたり64個，3倍体無配生殖型は1胞子囊あたり32個の胞子をつくることが知られている(三井，1982)。今回の実験では，増殖技術の確立を目的とするため，3倍体無配生殖型を両種とも使用した。両種ともに1胞子囊あたり32個の胞子がある事を確認した。

実験に使う個体は両種とも2015年12月に大分県速見郡で山採りを行い，2017年3月から東京都世田谷区の東京農業大学構内の圃場にてスリットコンテナ（直径15cm，深さ13cm，TO-SC150，東海化成）を使用し，育成管理した。育成期間中は全個体とも屋外かつ黒色の遮光率75%の寒冷紗下にて同一の管理を行った。個体ごとの株の大きさやソーラスの色や成熟度合については目視と写真にて観察，記録を行ったが外見上に大きな差は確認されなかった。2017年6月，1個体からソーラスを10個採取し，それを薬包紙に包み3日間風乾させた後にガラスシャーレ上に薄く均等になるように散布した。1種あたりの繰返し

は 5 回とした。予備として、ソーラスの数を 10 個以上にし、同じ工程で胞子を散布したガラスシャーレを各植物種に 1 つ設けた。

ソーラスの総重量が 0.010g になるまでパラフィン紙内に集めて封入した。1 個体からソーラスの採取を 5 反復行い、全 7 個体用意したため 0.010g のソーラスのセットは計 35 となった。また、胞子採取は両種とも 1 日で行った。採取したソーラスは室内にて 4 日間風乾し、胞子嚢から裂開して出てきた胞子を実験に用いた。

また、胞子ではなくソーラスの総重量を計測して実験を行なった理由は、胞子栽培を行うにあたり実用性を考慮したからである。そのため、3 倍体の個体であることを確認する目的以外では、1 胞子嚢中の胞子数は計数していない。

植え替え前ではガラスシャーレを、植え替え後ではプラスチックシャーレを使用した。ガラスシャーレは直径 90mm、高さ 20mm、面積約 6361.7mm²、植え替え後ではプラスチックシャーレ（滅菌ディスコシャーレ（PS 製）直径 50.7mm、高さ 14.7mm、面積約 2018.9mm²）を使用した。植え替え前では植え替えに必要な前葉体を十分な量確保する必要があるため面積の大きいガラスシャーレで生育を行った。植え替え後では植栽密度の高い条件を作るときに、必要な個体数や作業量が必要以上に多くなることを避けるため面積の小さいプラスチックシャーレで生育を行った。生育基盤はバーミキュライトを使用した。選定理由は既存研究にて一般に用いられ、前葉体発生時に識別しやすいことがあげられる。バーミキュライトの充填量は、植え替え前ではガラスシャーレに半分程

度を充填した。植え替え後ではプラスチックシャーレの半分程度の量となる約 8g の充填を統一して行った。初期灌水量は植え替え前では全体が十分に湿る程度灌水し、植え替え後では 5g に統一し灌水した。5g の水でバーミキュライト 8g が十分に湿らせることができ、成長を大きく阻害することは起こらないと判断したため初期灌水量を 5g にした。その後の灌水はガラスシャーレに対しては全体が十分に湿る程度適宜行い、プラスチックシャーレに対しては全体の重量が 16g になるように適宜行った。16g の内訳はプラスチックシャーレの重量が 3g、バーミキュライトの重量が 8g、初期灌水量が 5g となっている。この 16g を維持するように灌水を行った。シャーレは温度条件を 25°C 恒温，光条件を明条件 16 時間 (11,000lux)，暗条件 8 時間に設定した人工気象器（日本医科器械製作所（株）SK-101R LH-240S）内に設置した。室内実験は同大学構内にて行った。

植え替えをする個体はベニシダでは前葉体の大きさが約 0.6 mm²になった個体，オニヤブソテツでは約 1 mm²になったものを選定した。大きさが異なる理由は種によって成長速度や個体サイズが異なるためである。植え替え数は 1 つのプラスチックシャーレに対し前葉体を 3 個，15 個，30 個，50 個植え替えた。単位面積にすると前葉体 1 つあたり 673.0 mm²，134.6 mm²，67.3 mm²，40.4 mm²となる。植え替えはプラスチックシャーレの中央から放射線状を目安に，前葉体同士が等間隔になるよう植え替えた。図IV-1-1 は模式的に植え替え場所の目安を示したものである。繰り返しは前葉体の数が 3 個，15 個，30 個の条件

では 5 回で 50 個の条件のみ 3 回とした。50 個の条件を繰り返し 3 回としたのは、植え替えを行うのに十分な大きさの前葉体を十分な量を確保することができなかつたため 3 回とした。また、後述の掘り取りを計 4 回行うため、3 個、15 個、30 個の条件では 20 シャーレを 1 条件で植え替えた。50 個の条件では繰り返しが 3 回なので 12 シャーレとなった。

植え替えを行った日を 0 日とし、最長 120 日間生育させた。30 日経過するごとに 3 個、15 個、30 個の条件では 5 シャーレを、50 個の条件では 3 シャーレを掘り取った。また、植え替えを行う個体がどの程度の大きさなのかを把握するために、植え替え日にベニシダ、オニヤブソテツともに 10 個ずつ掘り取りを行った。今回の試験では植え替えを行った後も、ガラスシャーレに数多く残る前葉体を植替えなしの条件として生育を続けた。植替えなしの条件の掘り取りは他の条件と同様に、植替えを行った日から 30 日経過するごとに行い 120 日間生育させた。

掘り取りはシャーレ内の存在する前葉体あるいは胞子体全てが対象だが、植替えなしの条件では一回の掘り取りで 25 個体を無作為に選択し掘り取りを行った。掘り取った個体は A4 のコピー用紙にセロハンテープで張り付けた。掘り取った前葉体は 3,366×2,514, 300 dpi の解像度にてスキャン (.tiff) を行い、画像処理ソフト ImageJ(Schneider et al., 2012)National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) を用いた画像解析により、前葉体の部分のみを面積の測定範囲として抽出を行い、前葉体以外の部分が抽出された場合は修正を

行った。300 dpi の 1 mm におけるピクセル数 (11.8 pixels/mm) を設定し、抽出された前葉体のピクセル数をツール機能にてカウントする行うことで面積 (mm^2) を算出した。各条件における前葉体面積の差の有無を一元配置分散分析で判定し、有意差を確認したうえで Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。

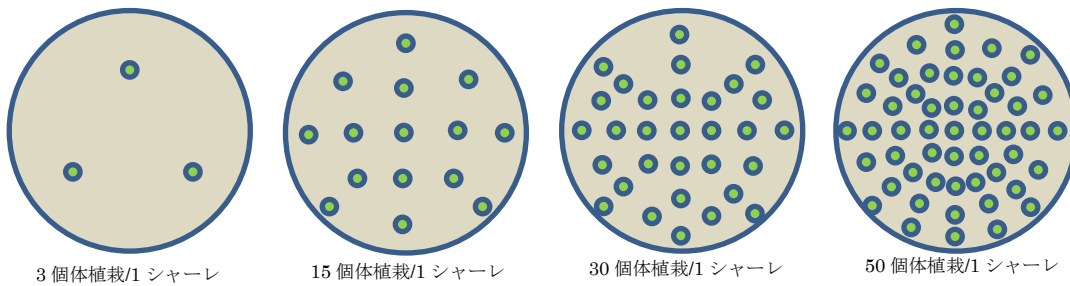


図 IV-1-1 植栽密度の設定について



図 IV-1-2 掘り取り方法と前葉体面積の算出方法

第 2 項：実験結果

ベニシダの平均前葉体サイズを表IV-1-1, 図IV-1-3 に示す。0 日は植え替え時の前葉体の平均個体サイズを示している。120 日経過時, 3 個条件と 15 個条件の間では, 3 個条件で有意に成長が促進された ($p < 0.01$)。15 個条件と 30 個条件の間では有意差は認められなかった。30 個条件と 50 個条件の間では 30 個条件で有意に成長が促進された ($p < 0.01$)。植替えなしの条件では 120 日の生育で

前葉体の成長が確認できなかったが、前葉体が死亡している様子は見られなかった。3個条件と植替えなし条件の間では、植替えなし条件に対し約48.7倍3個条件の成長が促進された。

表 IV-1-1 ベニシダの前葉体の各条件の平均サイズ(mm²)

| Culture(day) | 3 plants/50mm petri dish | 15 plants/50mm petri dish | 30 plants/50mm petri dish | 50 plants/50mm petri dish | No replanting |
|--------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------|
| 0 | 0.60 | 0.60 | 0.60 | 0.60 | 0.60 |
| 30 | 1.63 | 1.15 | 1.41 | 1.49 | 0.65 |
| 60 | 4.13 | 3.67 | 3.44 | 3.45 | 0.57 |
| 90 | 10.15 | 12.33 | 8.60 | 5.47 | 0.60 |
| 120 | 28.02 | 11.84 | 10.75 | 6.19 | 0.58 |

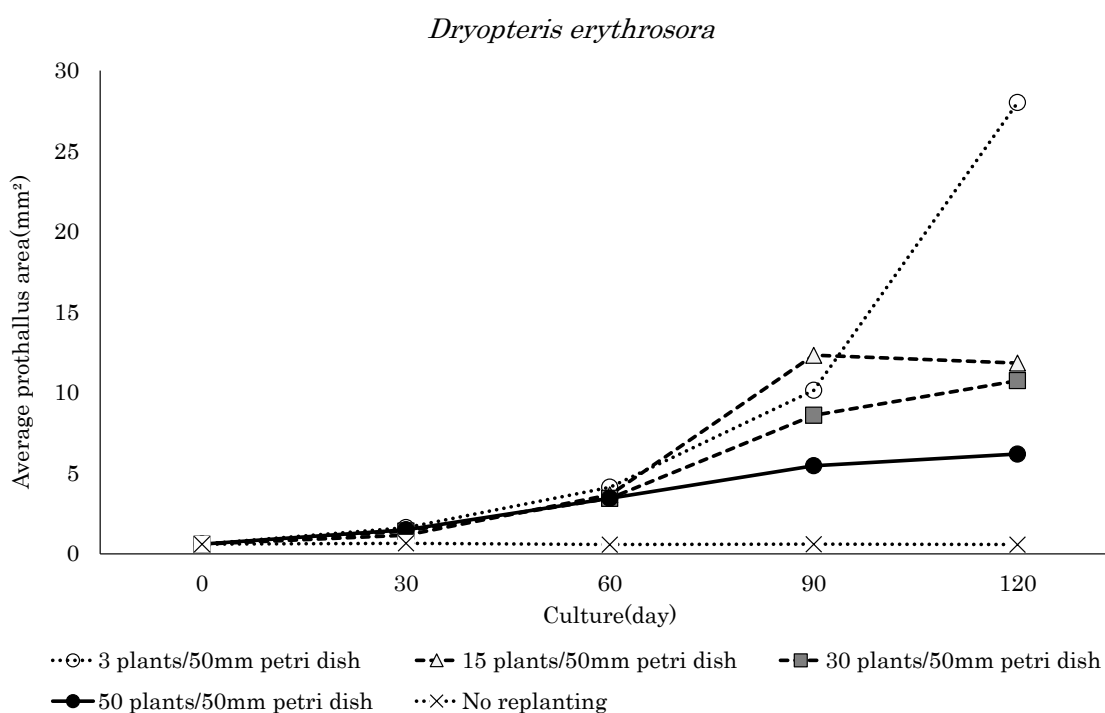


図 IV-1-3 ベニシダの前葉体の各条件の平均サイズの推移(mm²)

ベニシダの孢子体発生数を表IV-1-2に示す。ベニシダでは50個条件で90日経過時に掘り取った個体の中に1つ孢子体が発生したが、それ以外に孢子体は

発生しなかった。発生率は 50 個条件のみ 0.2%で、その他の条件は発生率 0%だった。また、植替えなし条件で胞子体は発生しなかった。

表 IV-1-2 ベニシダの各条件における幼胞子体発生数

| Culture(day) | 3 plants/50mm petri dish | 15 plants/50mm petri dish | 30 plants/50mm petri dish | 50 plants/50mm petri dish | No replanting |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------|
| 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 60 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 90 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 120 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total (individual) | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Frequency (%) | 0 | 0 | 0 | 0.2 | 0 |

ベニシダの死亡数と死亡率を表IV-1-3 に示す。3 個条件では合計で 5 個体の前葉体が死亡し、死亡率は 8.33%だった。15 個条件では合計で 13 個体の前葉体が死亡し、死亡率は 4.33%だった。30 個条件では合計で 7 個体の前葉体が死亡し、死亡率は 1.17%だった。50 個条件では合計で 44 個体の前葉体が死亡し、死亡率は 7.33%だった。

表 IV-1-3 ベニシダの各条件における死亡数・率

| Culture(day) | 3 plants/50mm petri dish | 15 plants/50mm petri dish | 30 plants/50mm petri dish | 50 plants/50mm petri dish | No replanting |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------|
| 30 | 2 | 10 | 0 | 7 | 0 |
| 60 | 3 | 1 | 0 | 8 | 0 |
| 90 | 0 | 1 | 3 | 15 | 0 |
| 120 | 0 | 1 | 4 | 14 | 0 |
| Total (individual) | 5 | 13 | 7 | 44 | 0 |
| Frequency (%) | 8.3 | 4.3 | 1.2 | 7.3 | 0.0 |

オニヤブソテツの平均前葉体サイズを表IV-1-4, 図IV-1-4 に示す。120 日経過時, 3 個条件と 15 個条件の間では, 3 個条件で有意に成長が促進された ($p<0.01$)。15 個条件と 30 個条件の間では, 15 個条件で有意に成長が促進された ($p<0.01$)。

30個条件と50個条件の間では30個条件で有意に成長が促進された($p<0.05$)。ベニシダと同様に、植替えなしの条件では120日の生育で前葉体の成長が確認できなかったが、前葉体が死亡している様子は見られなかった。3個条件と植替えなし条件の間では、植替えなし条件に対し約45.4倍3個条件の成長が促進された。

表 IV-1-4 オニヤブソテツの前葉体の各条件の平均サイズ(mm²)

| Culture(day) | 3 plants/50mm petri dish | 15 plants/50mm petri dish | 30 plants/50mm petri dish | 50 plants/50mm petri dish | No replanting |
|--------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------|
| 0 | 0.95 | 0.95 | 0.95 | 0.95 | 0.95 |
| 30 | 1.68 | 1.08 | 1.37 | 1.44 | 1.05 |
| 60 | 5.71 | 3.72 | 1.70 | 2.47 | 1.16 |
| 90 | 11.73 | 7.42 | 5.79 | 3.55 | 0.84 |
| 120 | 39.60 | 9.43 | 4.79 | 3.91 | 0.87 |

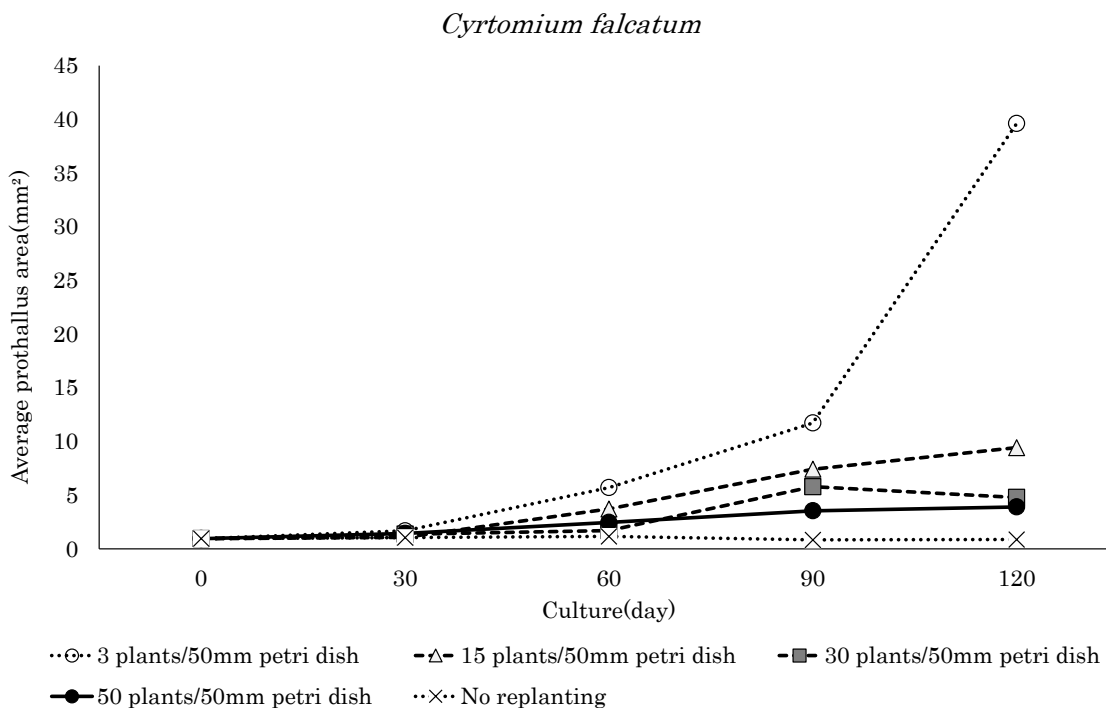


図 IV-1-4 オニヤブソテツの前葉体の各条件の平均サイズの推移(mm²)

オニヤブソテツの胞子体発生数を表IV-1-5 に示す。オニヤブソテツでは全体を通して 3 個条件で 10 個体, 15 個条件と 30 個条件で 7 個体, 50 個条件で 1 個体の胞子体が発生した。発生率は 3 個条件で 16.7%, 15 個条件で 2.3%, 30 個条件で 1.2%, 50 個条件で 0.2%だった。またベニシダと同様に植替えなし条件で胞子体は発生しなかった。

表 IV-1-5 ベニシダの各条件における幼胞子体発生数

| Culture(day) | 3 plants/50mm petri dish | 15 plants/50mm petri dish | 30 plants/50mm petri dish | 50 plants/50mm petri dish | No replanting |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------|
| 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 60 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 90 | 0 | 1 | 5 | 0 | 0 |
| 120 | 10 | 6 | 2 | 1 | 0 |
| Total (individual) | 10 | 7 | 7 | 1 | 0 |
| Frequency (%) | 16.7 | 2.3 | 1.2 | 0.2 | 0.0 |

オニヤブソテツの死亡数と死亡率を表IV-1-6 に示す。3 個条件では合計で 4 個体の前葉体が死亡し, 死亡率は 6.67%だった。15 個条件では合計で 36 個体の前葉体が死亡し, 死亡率は 12.00%だった。30 個条件では合計で 86 個体の前葉体が死亡し, 死亡率は 14.33%だった。50 個条件では合計で 115 個体の前葉体が死亡し, 死亡率は 19.17%だった。

表 IV-1-6 オニヤブソテツの各条件における死亡数・率

| Culture(day) | 3 plants/50mm petri dish | 15 plants/50mm petri dish | 30 plants/50mm petri dish | 50 plants/50mm petri dish | No replanting |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------|
| 30 | 2 | 26 | 16 | 19 | 0 |
| 60 | 1 | 7 | 47 | 29 | 0 |
| 90 | 1 | 0 | 3 | 12 | 0 |
| 120 | 0 | 3 | 20 | 55 | 0 |
| Total (individual) | 4 | 36 | 86 | 115 | 0 |
| Frequency (%) | 6.7 | 12.0 | 14.3 | 19.2 | 0.0 |

第3項：小括

ベニシダにおいて植栽密度が低いほど前葉体が大きくなる傾向がみられた。オニヤブソテツにおいてもベニシダと同様に植栽密度が低いほど前葉体が大きくなる傾向がみられた。このことから前葉体の成長は2種ともに低密度条件で促進されることが示唆され、他のシダ植物でも概ね同様な傾向がみられると思われる。

実験開始前の予想では一定の値を超えるまでは同様の成長度合いをとり、ある密度より高くなったところから成長度合いに差が生じ始めるものと考えていたが、今回の試験からはそのような傾向は見られなかった。しかし今回の試験は単位密度に直すと3個条件では1前葉体当たり 637.0mm^2 、15個条件では1前葉体当たり 134.6mm^2 と大きく離れた密度設定にしているため予想していたような結果が現れなかっただけであることも考えられる。そのため1シャーレに対して単位面積当たりの前葉体の個数を基に密度条件の設定を行うべきであった。また植替えなし条件で、死亡こそしていないものの前葉体の成長が停滞してしまった原因として胞子の散布量が多く、超高密度となってしまったことが考えられる。今回の試験で植替えなし条件を対照区のような扱いをしてみたが、植替えを行う前葉体を用意するためだけのものであり、植え替え後の他の条件と比較をするには不要な混乱を招くため避けるべきであった。意味合いとしてはほぼ同様であっても細部まで条件をそろえた植替えなし条件を設定すべきであったと考えられる。

ベニシダでは胞子体の発生はほとんど確認できなかった。前葉体は植栽密度の低い条件で成長が促進されていながらも胞子体の発生に至らなかったことから、ベニシダの胞子体の発生には密度条件以外の要因が強く影響を及ぼすことが考えられる。オニヤブソテツでは植栽密度が低いほど胞子体の発生率が高くなる傾向がみられた。このことから胞子体の発生は低密度条件で促進されることが示唆される。

実験開始前の予想では前葉体のサイズが一定の値を超えたら胞子体が発生するものと考えていたが、前葉体の大きいものでも胞子体の発生が起こらない個体は珍しくなかった。また、前葉体のサイズと胞子体の発生の関係は不明であり、今後の課題となった。

データを得るとき、前葉体は小さいものでは横幅が 1mm にも満たないため、手で測定する場合には少しの誤差が大きく結果を左右する恐れがある他、微細な作業になるため労力もかかる。そのため今回の試験は画像解析によってデータを得た。解析をかける画像データをカメラによる撮影で用意するのは、立体の前葉体をうまく撮影することができないため困難であった。したがって、掘り取りによって画像データを用意することとした。これにより、より正確な数値をより低い労力で得ることができた。しかし、一度掘り取ってしまったものは元に戻すことができないため、同一の個体やシャーレから継続してデータを得ることができず、同条件の経時変化によるデータの信憑性が低くなってしまった。

今回の試験ではオニヤブソテツの 30 個条件で 90 日経過時に掘り取った個体

の中には胞子体の発生しているものが 5 個あったが、同条件で 120 日経過時に掘り取った個体の中には胞子体は 2 個しかなかった。同一のシャーレを継続し観測した場合、胞子体が死亡する以外にこのような事態は起こらない。同条件で試験を行っても、個体差によって結果が異なる恐れのある植物を相手に継続的に掘り取りを行う方法によってデータを得ようとするのは不適切であったと思われる。同一個体の経時変化を観測でき、細かい作業でも人的ミスが発生が起りにくい実験方法を模索することが今後試験を行う上で必要になると思われる。

ベニシダでは植栽密度による死亡率の変化の傾向は明らかにすることができなかった。シャーレによって死亡数が大きく異なる場合もあり、植え替え時に前葉体が活着不良を起こしたことや、何らかの人的ミスをしていた可能性が考えられるが、その原因はわからなかった。

オニヤブソテツでは密度が低いほど死亡率が低くなる傾向がみられた。またベニシダと比較しオニヤブソテツは死亡率が高くなった。前葉体の大きいものや胞子体が発生したものがベニシダと比べ多く見られたことから、死亡した個体が多い分密度が低下し成長が促進されたこと、それにより自己間引きが行われたことも考えられるが、ベニシダと同様にシャーレによって死亡数が大きく異なるものもみられたため、どのような要因で死亡数、死亡率が変化したのかわからなかった。

死亡率に関しては実験を開始する前は考えておらず、実験開始後にデータが得られることに気づき、副次的に求めたものであるため、確実なデータを得るに

は至らなかった。オニヤブソテツの 15 個条件では 30 日が経過し掘り取ったときには、26 個の前葉体が死亡していたのに対し、60 日が経過した掘り取り時には、死亡数は 7 個だった。同一のシャーレの経時変化を追っていく場合はこのような事態は起こりえず、今回の実験方法が死亡率を求めるうえで不適切であったことがうかがえる。

これらのことから前葉体の死亡率についても、胞子体発生のもと同様に今後試験を行う場合別の試験方法を模索するようになってくると思われる。また、植栽時の滅菌方法も今後は吟味する必要があると考えられる(R.A. Dixon (著), 遠山 益 (翻訳), 久世 洋子 (翻訳), 1989)。植物の活力度などについてはクロロフィル量や葉の厚さで評価することも考えられなければいけない(牛島忠広, 1981)。植栽密度によって植物ホルモンの分泌が変わることも考えられるため、その点についても今後考慮する必要があると計測することで明らかにできる可能性がある(山本良一, 1999)。また、植栽に関しては耐寒性(山根昭美, 1996) (岩手大学 21 世紀 COE プログラム事業, 2009)なども関係するため、今後は植栽密度との複合的な実験も必要だと考えられる。また、植栽密度によって植物の背丈は変わらないが、バイオマス量は密度が低いほど大きくなるといわれ、密度に応じて植物の形態が変わるとも報告されている(鷺谷いづみ監修・編著, 2016)。地上部の競争と地下部の競争によって成長量は変わると報告されている(マイケルベゴンら, 2013)。

第IV-2：栽培容器の条件と前葉体成長の関係

第1項：実験方法

供試植物はイワデンダ科シケシダ属オオヒメワラビ (*Deparia okuboana* (Makino) M.Kato.) とシシガシラ科コモチシダ属コモチシダ (*Woodwardia orientalis* Sw.) を用いた。オオヒメワラビの分布は本州・四国・九州で、林縁や、林内の明るい場所に生育している。コモチシダの分布はオオヒメワラビと同様に、本州・四国・九州で、やや湿った崖地に葉を垂らすように生育している。オオヒメワラビの胞子は2018年6月上旬に埼玉県入間郡、コモチシダの胞子は2018年4月下旬に神奈川県横須賀市にて採取した。

採取した胞子葉は紙封筒に入れ、室温の暗所にて数日間風乾したのち胞子を採取した。採取した胞子は70%エタノールで殺菌した硼珪酸ガラスのスクリュウ瓶（口内径:14.5 mm×胴径: 24.0 mm×高さ:50 mm）に入れ、暗所にて室温で保存した。植え替え前ではガラスシャーレを、植え替え後ではプラスチックシャーレ、100ml ビーカー、スクリュウ瓶を使用した。ガラスシャーレは直径 90mm, 高さ 20mm, 面積約 6361.7mm², 植え替え後ではプラスチックシャーレが直径 50.7mm, 高さ 14.7mm, 体積約 29,660mm³。100ml が直径 55mm, 高さ 70mm, 体積約 166,220mm³。スクリュウ瓶が直径 30mm, 高さ 65mm, 体積約 45,920mm³ のものを使用した。植え替え前では植え替えに必要な前葉体を十分な量確保する必要があるため、栽培の管理が容易であるガラスシャーレを用いた。

栽培用土は黒ボク土を使用した。選定理由としては、複数の栽培用土で栽培し

た前葉体の大きさを比較すると、第Ⅲ章の実験にあるように黒ボク土で栽培した前葉体が大きくなったことや、比較的安価で栽培・園芸において広く利用されていることから、本研究の栽培用土に適していると考えた。

黒ボク土を充填した量は、ガラスシャーレでは容器の半分程度、プラスチックシャーレとスクリュウ瓶 8g に統一して充填を行った。100ml ビーカーはスクリュウ瓶に充填した土の高さと等しくなるように充填した (32g)。ガラスシャーレでは、試験開始前の小さな前葉体を育てることから容器に充填する用土の量を統一しなかった。一方で、プラスチックシャーレ、100ml ビーカー、スクリュウ瓶では、前葉体の十分な生育空間を確保することと、各シャーレの環境条件に違いが生まれないようにするため、容器に充填する用土の量を統一した。

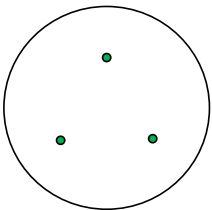
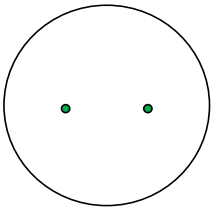
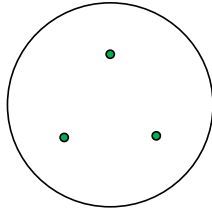



灌水はガラスシャーレに対しては全体が十分に湿る程度適宜行い、灌水は 2～3 日に一度全体が湿る程度に適宜行った。

シャーレは温度条件を 25℃恒温、光条件を明条件 16 時間 (3,300lux)、暗条件 8 時間に設定した人工気象器 (日本医科器械製作所 (株) SK-101R LH-240S) 内に設置した。室内実験は同大学構内にて行った。本試験では幼胞子体を植え替えることで植栽密度を設定した (表Ⅳ-2-1)。

繰り返しはプラスチックシャーレとスクリュウ瓶で 5 回、100ml ビーカーで 3 回とした。この回数は植え替えた幼胞子体の個体数ではなく、栽培容器 1 つにつきの繰り返し回数である。

表 IV-2-1 栽培容器・植栽密度・植え替え位置について

| | Plastic petri dish | Screw bottle | 100ml beaker |
|---|--------------------|--------------|--------------|
| Cultivation container capacity (cm ³) | 9,890 | 22,960 | 55,400 |
| Container size per individual (cm ³) | 30 | 46 | 170 |
| Number of replanted individuals | 3 | 2 | 3 |

| | | | |
|---------------------|--|---|--|
| Replanting position |  |  |  |
| Replanting position |  |  |  |

試験開始日（植え替えを行った日）を0日とし、30日間生育させた。30日経過後に幼胞子体を栽培容器から掘り取った。


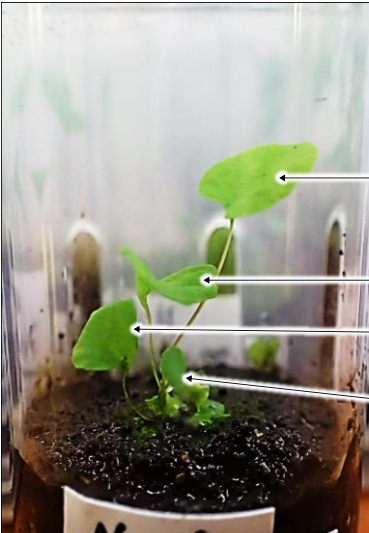
図IV-2-1は掘り取りの流れを示したものである。掘り取った個体はA4の白紙にセロハンテープで張り付け、スキャンで画像データにすることで、幼胞子体地上部の面積を解析できるようにした。



図 IV-2-1 幼胞子体の面積の測定方法

幼孢子体の地上部長（mm）と，展葉数を記録した。地上部長の測定は表IV-2-2 のように行った。また，展葉は表IV-2-2 のようにカウントし，地上部長は植え替えた幼孢子体に加え，展葉した葉についても測定した。幼孢子体の地上部の葉面積を求めて各条件と比較した。掘り取った個体は A4 のコピー用紙にセロハンテープで張り付けた。掘り取った前葉体は 3,366×2,514，300 dpi の解像度にてスキャン（.tiff）を行い，画像処理ソフト ImageJ(Schneider et al., 2012) (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) を用いた画像解析により，前葉体の部分のみを面積の測定範囲として抽出を行い，前葉体以外の部分が抽出された場合は修正を行った。300 dpi の 1 mm におけるピクセル数(11.8 pixels/mm) を設定し，抽出された前葉体のピクセル数をツール機能にてカウントする行うことで面積(mm²)を算出した。各条件における前葉体面積の差の有無を一元配置分散分析で判定し，有意差を確認したうえで Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。

表 IV-2-2 幼胞子体の地上部と展葉数の測定方法

| How to measure plant height | How to measure the number of spread leaves |
|---|--|
|  |  |
| ex)10.1mm | ex)4 spread leaves |

第 2 項：実験結果

オオヒメワラビの試験開始から 30 日後の幼胞子体の平均面積を図IV-2-2, 表IV-2-3 に示す。幼胞子体地上部の平均値（葉が先枯した個体を除く）を求めた。オオヒメワラビでは 100ml ビーカー（以下、ビーカー）とプラスチックシャーレ（以下、シャーレ）で栽培した幼胞子体で有意差が認められ ($p<0.05$), はシャーレの幼胞子体よりも 1.62 倍良好な生長であることが示された。試験開始日を 0 日目として 7 日ごとの測定記録を示す。植え替えた幼胞子体から展葉を確認した後、その展葉した葉は別個体としてカウントし各幼胞子体の地上部長を測定した。はじめに、幼胞子体の地上部長の合計値を表IV-2-3 に示す。次に、幼胞子体の地上部長の平均値を図IV-2-3 に示す。植え替えた幼胞子体から展葉を確認したところ、その展葉した葉は別個体としてカウントし地上部長を測定

していたため、植え替えた幼胞子体数ではなく、表IV-2-3に記載した展葉数で
平均値を求めた。

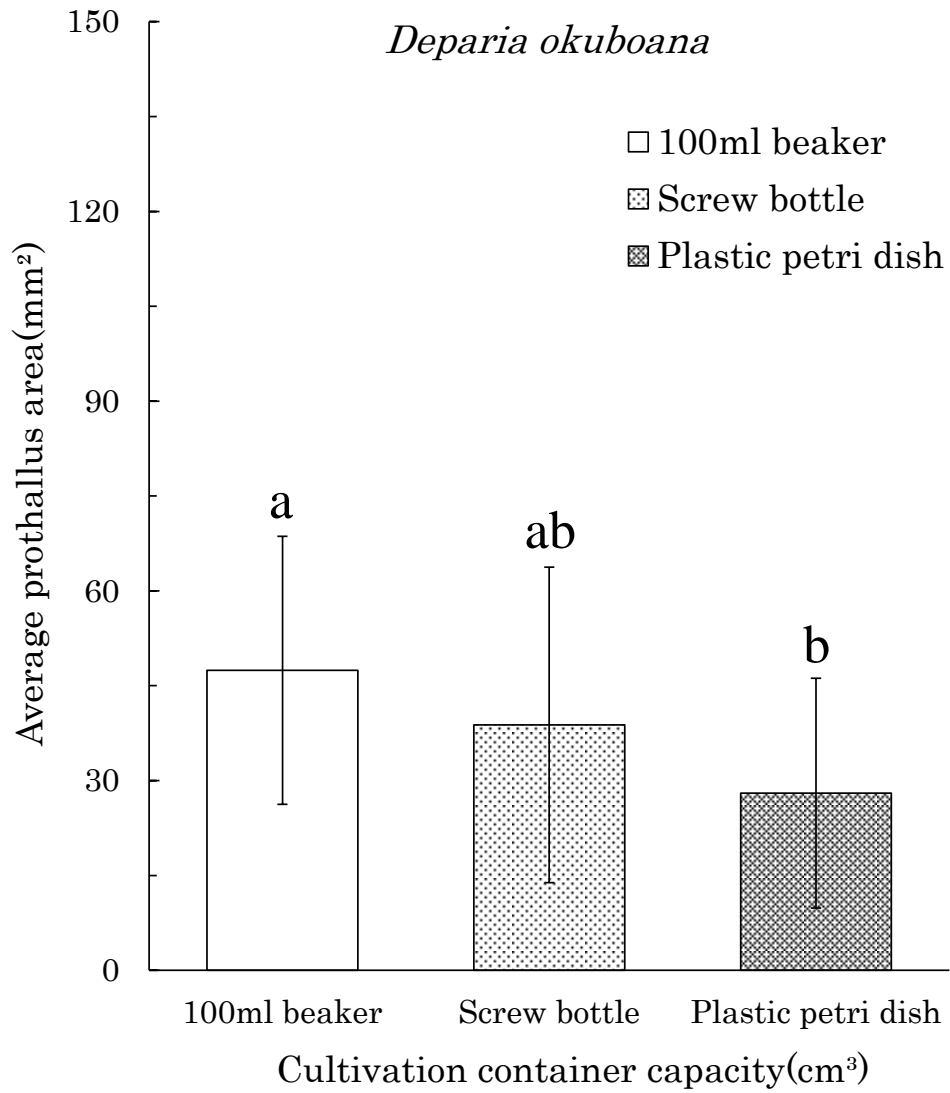


図 IV-2-2 試験開始 30 日後の幼胞子体地上部の平均面積

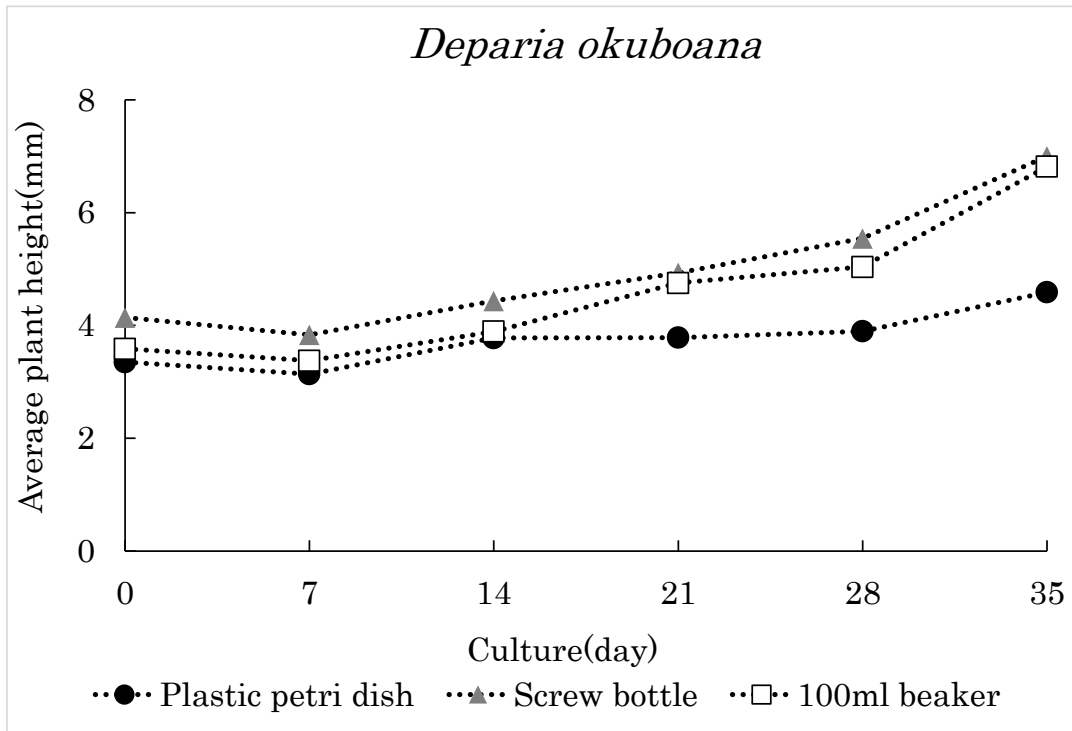


図 IV-2-3 試験期間中の幼孢子体地上部における平均の成長推移

表 IV-2-3 各容器における幼孢子体地上部と展葉数

| Species name | Measurement item | 0day | 7day | 14day | 21day | 28day | 35day |
|--------------------|----------------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| Plastic petri dish | Total(mm) | 53.6 | 59.6 | 79.3 | 90.8 | 101.3 | 146.8 |
| | Average(mm) | 3.4 | 3.1 | 3.8 | 3.8 | 3.9 | 4.6 |
| | Exhibition leaves | 0.0 | 3.0 | 5.0 | 8.0 | 10.0 | 16.0 |
| | Total of exhibition leaves | 16 | 19 | 21 | 24 | 26 | 32 |
| Screw bottle | Total(mm) | 53.8 | 57.5 | 79.8 | 108.5 | 133 | 203 |
| | Average(mm) | 4.1 | 3.8 | 4.4 | 4.9 | 5.5 | 7.0 |
| | Exhibition leaves | 0.0 | 2.0 | 5.0 | 9.0 | 11.0 | 16.0 |
| | Total of exhibition leaves | 13 | 15 | 18 | 22 | 24 | 29 |
| 100ml beaker | Total(mm) | 25.1 | 27 | 42.8 | 61.8 | 65.5 | 129.5 |
| | Average(mm) | 3.6 | 3.4 | 3.9 | 4.8 | 5.0 | 6.8 |
| | Exhibition leaves | 0.0 | 1.0 | 4.0 | 6.0 | 6.0 | 12.0 |
| | Total of exhibition leaves | 7.0 | 8.0 | 11.0 | 13.0 | 13.0 | 19.0 |

Deparia okuboana

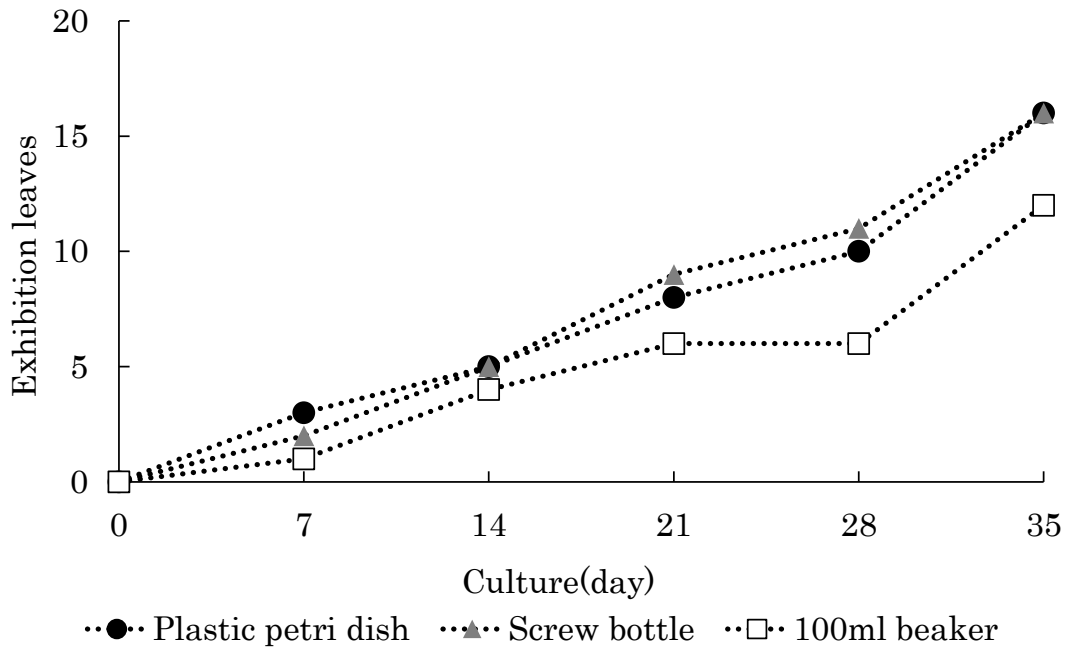


図 IV-2-4 試験期間中の展葉数の推移

コモチシダの試験開始から 30 日後の幼胞子体の平均面積を図IV-2-5 に示す。幼胞子体地上部の平均値（葉が先枯した個体を除く）を求めた。コモチシダではビーカー、スクリュー瓶（以下、ビン）とシャーレで栽培した幼胞子体で有意差が認められ（ $p<0.05$ ），ビーカーはシャーレの幼胞子体よりも 2.20 倍，ビンではシャーレの幼胞子体よりも 1.26 倍良好な生長であることが示された。試験開始日を 0 日目として 7 日ごとの測定記録を示す。植え替えた幼胞子体から展葉を確認したら，その展葉した葉は別個体としてカウントし各幼胞子体の地上部長を測定した。はじめに，幼胞子体の地上部長の合計値を表IV-2-4 に示す。次に，幼胞子体の地上部長の平均値を図IV-2-5 に示す。植え替えた幼胞子体から

展葉を確認したら、その展葉した葉は別個体としてカウントし地上部長を測定しているため、植え替えた幼孢子体数ではなく、表IV-2-4に記載した展葉数で平均値を求めた。また、図IV-2-7は測定中の展葉数の増加推移を示す。

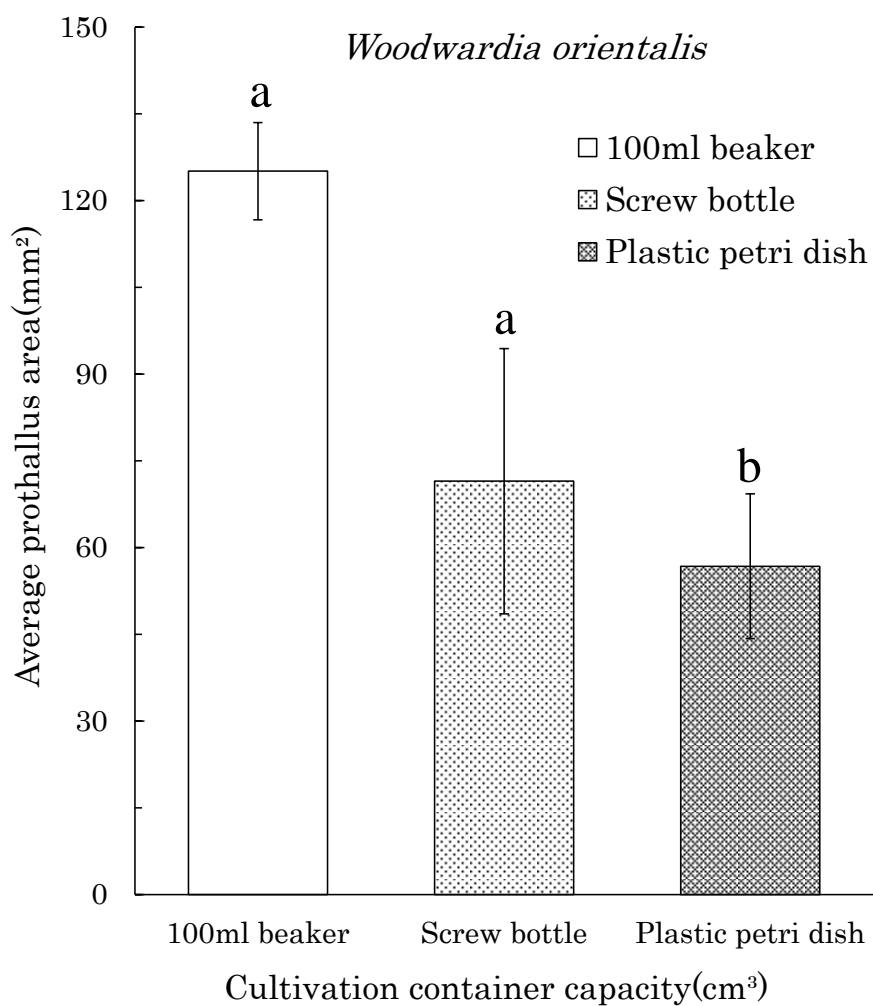


図 IV-2-5 試験開始 30 日後の幼孢子体地上部の平均面積

Woodwardia orientalis

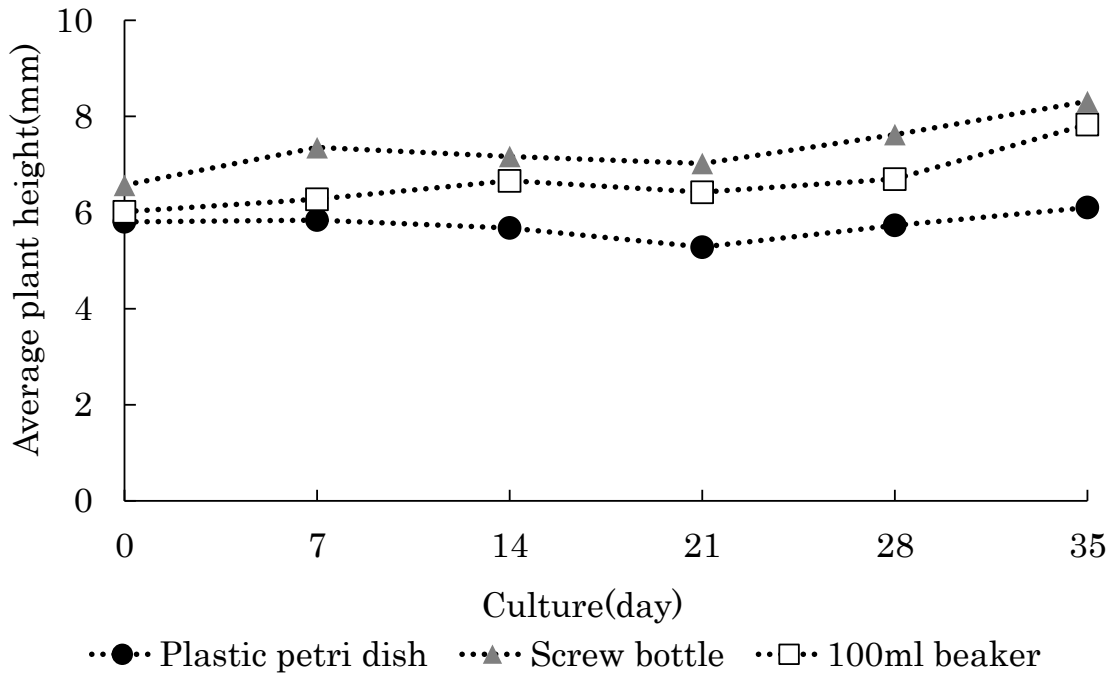


図 IV-2-6 試験期間中の幼孢子体地上部における平均の成長推移

表 IV-2-4 各容器における幼孢子体地上部と展葉数

| Species name | Measurement item | 0day | 7day | 14day | 21day | 28day | 35day |
|--------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Plastic petri dish | Total(mm) | 92.9 | 93.5 | 113.6 | 142.6 | 235.1 | 329.6 |
| | Average(mm) | 5.8 | 5.8 | 5.7 | 5.3 | 5.7 | 6.1 |
| | Exhibition leaves | 0 | 0 | 4 | 11 | 25 | 38 |
| | Total of exhibition leaves | 16 | 16 | 20 | 27 | 41 | 54 |
| Screw bottle | Total(mm) | 85.4 | 95.6 | 129 | 161.5 | 244 | 332.5 |
| | Average(mm) | 6.6 | 7.4 | 7.2 | 7.0 | 7.6 | 8.3 |
| | Exhibition leaves | 0 | 0 | 5 | 10 | 19 | 27 |
| | Total of exhibition leaves | 13 | 13 | 18 | 23 | 32 | 40 |
| 100ml beaker | Total(mm) | 108.3 | 119.3 | 133.2 | 154.2 | 227.7 | 297.7 |
| | Average(mm) | 6.0 | 6.3 | 6.7 | 6.4 | 6.7 | 7.8 |
| | Exhibition leaves | 0 | 1 | 2 | 6 | 16 | 18 |
| | Total of exhibition leaves | 18 | 19 | 20 | 24 | 34 | 38 |

Woodwardia orientalis

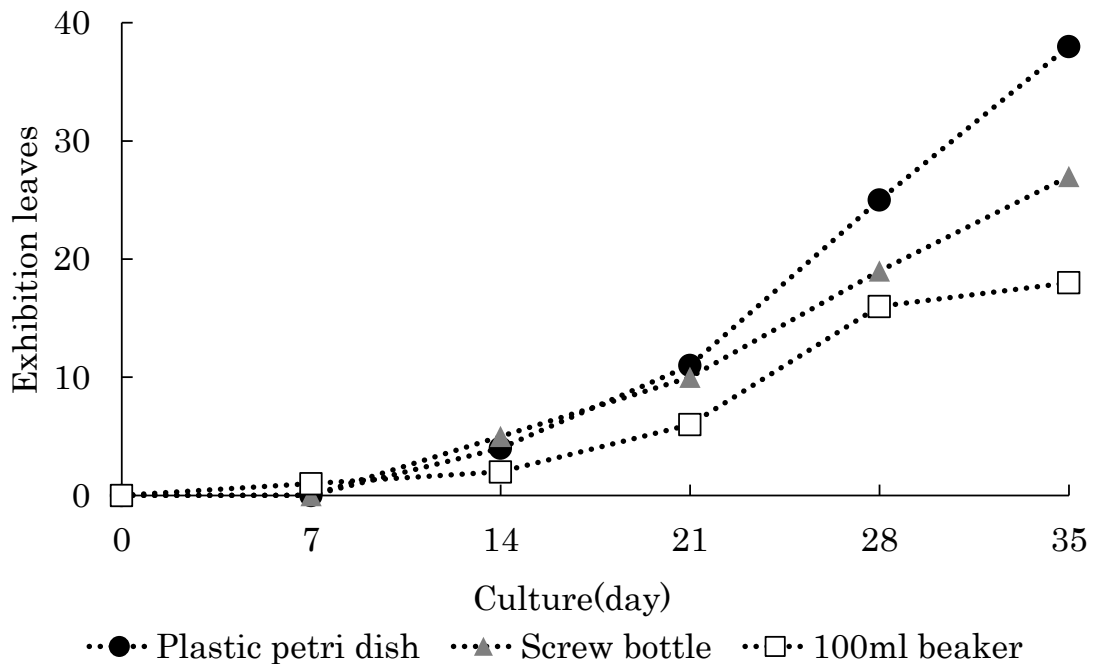


図 IV-2-7 試験期間中の展葉数の推移

第3項：小括

科が異なるイワデンダ科オオヒメワラビとシシガシラ科コモチシダの幼胞子体を用いて試験を行った。両種ともに幼胞子体地上部の平均面積は 100ml ビーカーが最も大きな値を示した。その理由として、100ml ビーカーに比べプラスチックシャーレは容積が約 5 倍あることから、植栽した容器サイズが異なることがあげられる。成長量としては 100ml ビーカーが最も高い傾向を示したが、展葉数に関しては 100ml ビーカーが最も低い値を示した。幼胞子体が地上部の高さが成長した分、展葉数は少なくなったと考えられる。また、栽培容器が大きくなるほど葉面積の成長が促進され、展葉数は減少すると考えられる。栽培容器

が大きいほど幼孢子体から展葉する葉が展開する場所が確保できるので、100ml ビーカーでは葉が横方向（面的）に広がったと考える。また、地上部の高さがスクリュウ瓶において大きくなったのはスクリュウ瓶が 100ml ビーカーと比べて横幅が小さく縦長の容器だったため、展葉した葉が水平方向に成長することができずに上方向に成長したことが考えられる。

両種ともに同様の結果が得られたことから、前葉体もしくは幼孢子体の成長において栽培容器の条件がその後の成長の仕方に影響を与えることが判明した。また、順化に関しては光環境や波長が関わっていると考えられるため(太田, 1987), 今後は複合的な実験が必要である。展葉した葉の枚数や形についても注目すべきだと考えられる(太田, 1987)。植物の活力度などについてはクロロフィル量や葉の厚さで評価することも考えられなければいけない(牛島, 1981) (福嶋, 2009) (福田ほか, 2006)。植物の活力度については地上部だけでなく、地下部も考慮して判断する必要がある(山本, 1997)。また、植物の生死を判断するには様々なやり方があるが、堀取ると枯死してしまうため、今後は非破壊にて生死する方法を追求する必要があると考えられる。

第V章 総合考察

シダ植物の胞子を用いた栽培・繁殖方法について、第II章～IV章まで胞子の発芽と前葉体の成長について実験を行ってきた。本研究の実験では既存研究で得られなかった結果が明らかになり、また実験方法についてもより確立できたものと考えられる。例えば、胞子の詳細な発芽率を算出できたことは、胞子を寒天培地に播種し実体顕微鏡で観察するという新規性のある実験から得られた。寒天培地での胞子播種と前葉体の生育は技術として、クリーンベンチやオートクレーブなどの機材を必要とするため、本研究ではミズゴケや黒ボク土などの資材を使用した実験も行った。寒天培地での実験の結果、胞子の発芽に与える様々な影響が既存研究に比べてより詳細に示されたと考えられる。例えば、既存研究ではある種の胞子発芽には20℃が適していると報告されているが、本研究では寒天培地に胞子を播種し、長期的に同一条件下にて実験できたことで、日数さえかければ最終発芽率は他の温度条件と変わらないことが判明した。このような結果は、胞子を用いた栽培・繁殖方法と技術確立において重要な要素となるだろう。例えば、イヌガンソクは野外で胞子葉をつけるのが秋から冬とされ、春に胞子嚢が開裂し空気中に散布されるが、栽培するためには胞子が散布される前の胞子葉を春より前に採取する必要がある。その際に、野外の温度が20℃以上では発芽するまでに時間を有し、15～20℃で播種することで胞子栽培が円滑に進むと考えられる。したがって、発芽に適した温度と発芽が可能な温度の両方を知ることが重要だと考えられる。また、イヌガンソクとは対照的にオシダでは

どの温度でも発芽率が変わらないことが、本研究より明らかになった。これは20～25℃が発芽に適している(百瀬, 1967)という既存研究からの報告とは異なる結果である。この場合、オシダの発芽の最適温度と発芽の可能温度は同じである。それに加えて、第Ⅲ章の変温条件に関する実験の結果から、35℃/25℃や15℃/5℃の変温条件では25℃・30℃恒温条件に比べて発芽していないことから、ある温度以上になると発芽せず、発芽に抑制効果を有することが示唆された。

本研究では孢子の保存技術についても新たな知見を得ることができた。環境省では種の保存マニュアルを策定しているが、シダ植物の孢子保存については具体的に述べておらず、問題提起としての記述のみである(環境省, 2009)。本研究では、シダ植物は種によって孢子の保存方法を変える必要があることが判明した。したがって、本研究で得られた結果は社会的にも有意義だと考えられる。

次に本研究では光条件が孢子の発芽もしくは前葉体に与える影響についても実験を行ってきた。本研究での成果は温度条件での実験同様に有意なものであると考えられる。近年、緑化において生物多様性の観点から在来種の使用が推奨されている。室内緑化についても同様の傾向を示しているが、今現在ではアオキ、ヤツデなどの数種しか使用が確認されていない。しかし、アオキやヤツデは重力屈折するため、室内の壁面に使用した際には施工年数が経過するにつれて斜上してしまい、管理が困難な植物に挙げられている。その中で、シダ植物は耐陰性を有し、施工年数が経過しても斜上しないことからベニシダ、オニヤブソテツなどの種が施工地にて確認されており、さらなる使用が期待されている。その

際には、室内緑化では屋外と違い、日射量が限られるもしくは蛍光灯などの照明器具のみで植物を生育する必要がある。したがって、本研究で得られた照度、光質の実験結果は有意義なものであると考えられる。例えば、室内の一般的な照明器具では照度が 100 ルクス以上であることが、JIS より規定されている(日本規格協会, 2010)が、本研究よりベニシダやオニヤブソテツでは生育が可能であることを示している。この結果は既存研究では明確に示されておらず、栽培または実際に施工後に生育させるためには重要な結果だと考えられる。

シダ植物の繁殖方法においては幼孢子体を前葉体より多く発生させることが重要だと考えられる。ベニシダでは前葉体に赤色の波長を照射することで幼孢子体を多く発生させることが本研究より判明した。また、ベニシダとは対照にオニヤブソテツでは青色の波長を照射することで幼孢子体を多く発生させることが本研究より判明した。この結果は既存研究では明確に示されていなかったため、繁殖において重要な要素だと考えられる。

また、栄養条件による孢子発芽と前葉体成長の実験では、栽培において施肥は前葉体成長の阻害になることが判明した。本研究の結果から、自然界で孢子が土壌層の薄いもしくは貧栄養な立地では成長が遅く、前葉体が成長しない可能性が示唆された。また、野外で何年も前葉体の大きさが変化せずに成長が見られない個体は多く見られることは前述した理由が関係していると考えられる。

おわりに

シダ植物の主な増やし方としては自生地にて親株を採取し、株分けという地下茎を分割することで個体を増やす方法が行われてきている。しかし、この方法では一度に大量生産ができないことや自生地の個体数が減少する可能性が考えられる。また、ウラジロやコシダなど移植を行っても栽培が難しい種類、コタニワタリやイノデ、イワヒバなど株分け自体が難しい種類もあり、株分けだけでは対応できない種類も多い。本研究ではそのような種に対して実行可能な孢子栽培の技術の一助になったものと考えられ、本研究での成果は生態系の保全にも寄与するものと考えられる。また、他国におけるシダ植物の孢子栽培の状況はアメリカ、タイ、オランダなどで確認されているが、光条件や温度条件は企業秘密のものが多くかつその種が日本と大きく異なるため、本研究で得られた知見は重要なものだと考えられる。特に日本ではシダ植物が約 700 種生育しており、絶滅危惧種への指定される割合も高いため、本研究での成果は種の保全の観点から考えても重要だといえる。また、タマシダやモエジマシダなどは株分けによって栽培できることが知られているが、生物多様性の概念の中の一つにある遺伝子の多様性の観点から考えると孢子を用いた栽培は、有性生殖のため遺伝子が異なるため重要な栽培方法であると考えられる。今後は単一的な条件での孢子発芽や前葉体成長の実験を行うだけでなく、光条件や温度条件の複合的な実験を行うことで、シダ植物の生理生態が解明されることが考えられ、野外の気象条件などとの照らし合わせることで精度が向上すると考えられる。

本研究を行うきっかけになったのは、鍾乳洞を訪れた際に明かりがほとんど無い中、蛍光灯の下でシダ植物が生育している様子を見た時である。シダ植物が土や雨水のない劣悪とも言える環境下で生育している様子から、シダ植物の生命力を感じたと同時に室内緑化などで使用できる可能性が考えられた。その後、実際にベニシダやオニヤブソテツなどが使用されている現場はあるが、増殖方法に課題があるため生産量は少なく、未だに山採りが行われていることが判明した。また、それは海外においても同様の事情を抱えており、本研究は社会的に有意義なもので展開があると考えられる。

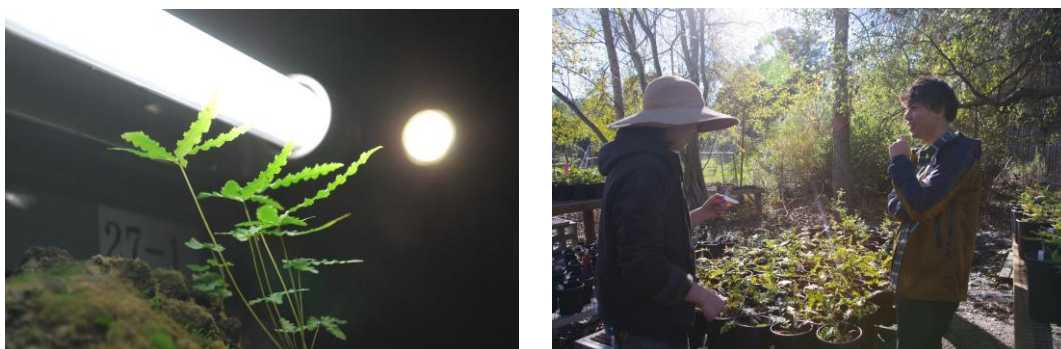


写真 1 左：鍾乳洞で生育する様子，右：カリフォルニア州のナーセリー責任者と討議する様子

海外における孢子栽培を調べたところ、オランダで行われており、会社に電話し栽培現場の見学させていただいた。そこでは数種類のシダ植物が試行錯誤の中で栽培され、栽培技術は 50 年かけて培ったと教えていただいた。シダ大国の日本に希望を見出したが、オランダで栽培されたシダ植物を輸入していることが判明し、生物多様性の観点から考えると遺伝子汚染の危機を感じた。今後の日本のシダ植物のためにも本研究の結果が孢子栽培の技術確立に寄与することを望む。

著者が初めてシダ植物を学問的に意識したのは、学部 1 年生時に奥多摩で野外実習中にエビラシダを中村幸人教授に教えていただいた時である。その時はシダ植物を対象に研究するとは想像にもつかないが、今思えばそういう運命だったのかもしれない。自然界では孢子が大量に散布されているにもかかわらず、希少種になる種もあれば、都市域に生育する種もある。それは種の特性によるものなのか、それとも進化の歴史の中ではそういう運命なのか、シャーレの中で孢子が発芽し、前葉体が成長する度に頭の中に様々な思考が巡る。

答えは必ず自然界（現場）に転がっており、「現場が一番」、「自然が教科書」、それを忘れてはならず、好奇心と探究心の目を閉じてはいけない。



写真 2 左：エビラシダ，右：シャーレ内で孢子が発芽した様子

最後に、本研究は科学論文の考えと理念(羽田, 2018) (山崎, 2007) (山崎, 2013) と 2017 年に国際医学雑誌編集委員会 (ICMJE) で唱えられているオーサーシップの定義など(東北大学高度教養教育・学生支援機構【編】, 2017) (山崎, 2002) (近江, 2012)を参考にして実験を行った。研究チームのメンバーはもちろんだが、実験のデータ取得者、実験の協力者については謝辞にて記述することにした。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、東京農業大学 地域環境科学部森林総合科学科 造林学研究室の上原巖教授には研究を多方面から考察する姿勢と学問への探究に対して根幹からのご指導を賜った。治山緑化工学研究室の福永健司教授には研究に対する考え方と姿勢のご指導を、同研究室の橘隆一教授には自然科学に対する考え方をはじめ、論文執筆時の心得や取り纏め方など、特別研究員時代のアフリカ調査の時から多岐に渡って懇切丁寧なご指導ご鞭撻を賜った。また、森林生態学研究室の今井伸夫准教授には研究と論文執筆へ鋭いご指摘を、同研究室の中村幸人名誉教授には植生・生態学を踏まえたシダ植物への考え方と研究者、教育者としての姿勢と行動のご指導を賜った。東京農業大学非常勤講師の相澤健実先生には論文執筆の際に統計手法等のご指導を賜った。

本研究における実験器具は造林学研究室の上原巖教授、田中恵准教授の承諾を得て貸していただき、ご協力を賜った。また、日本シダの会 関東支部にはシダ植物に関する基礎知識から面白さを野外観察と室内勉強会でご教授賜った。

以上の方々に多大なるご助言、ご支援、ご協力を賜った。この場を借りて関係者も含め、深い敬意と心から感謝申し上げます。

東京農業大学 治山緑化学研究室においては、多くの諸先輩方、後輩方の皆様にご迷惑をおかけしながらも、惜しみないお手伝いのご助言を頂き、ここに感謝申し上げます。同研究室の博士後期課程である武井理臣氏には、研究の討議を幾度となく行い、有益なご意見をいただきました。本研究は多くの方々に実験の測定や記録を実施していただき、以下に記載する同志がいなければ成し遂げることはできず、ここに記す(敬称略)ことで心から深謝を申し上げます。

前島洸大(Ⅱ-5,Ⅲ-5), 和田悠希(Ⅳ-1), 吉永黄哉(Ⅱ-3-A,Ⅲ-3), 大島功暉(Ⅱ-3-B,Ⅲ-4), 清澤賢司(Ⅱ-1-A,Ⅲ-1), 安原菜々子(Ⅱ-2-A,Ⅲ-2,Ⅳ-2), 井口春海(Ⅱ-6), 小川裕人(Ⅱ-4), 島田美菜(Ⅱ-2-B,Ⅲ-2), 高野公志(Ⅱ-3-C,Ⅱ-1-B), 綱川香菜(Ⅲ-2)

また、研究チームの活動が円滑で有意義になったのは、同大学院生である安原菜々子氏の優秀な情報整理能力かつ独創的な研究視点、高野公志氏の堅実な研究姿勢かつ貪欲な探究心、この2人が同志にいたからであり、ここに改めて心から厚謝申し上げます。

経済的・精神的に支えて下さった株式会社グリーンエルムをはじめ、西野浩行、西野友貴、萱島美枝子に深く感謝申し上げます。

最後に、自然科学に出逢えた運命と著者の人生を豊かにしたシダ植物に甚謝申し上げますと共に、今後も豆と人参のような関係であることを誓い、ここに記す。

引用文献

アルファベット順

- 1) 安部文貴・森達也・田中大介・栗山昭(2016) シダ植物カルスの低温保存の試み. 低温生物工学会誌, 62(1): 53-56 I -2
- 2) 阿部清(2003) クサソテツ(コゴミ) 計画的な株増殖による安定栽培と利用. 農文協, 157 p p I -3
- 3) 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 I -3, III-3
- 4) Ballesteros, D., Estrelles, E., Walters, C. and Ibars, A.M. (2012) Effects of temperature and desiccation on ex situ conservation of nongreen fern spores..American Journal of Botany, 99(4):721-729 III-5
- 5) Barrington, D. S.(1993) Ecological and historical factors in fern biogeography. Journal of Biogeography, 20(3): 275-280 I -2
- 6) Boysen-Jensen(Editor) 門司正三, 野本宣夫 (共訳)(1982) 植物の物質生産 . 東海大学出版会, 248pp II -2- A
- 7) David G. Haskell (著), 三木直子 (翻訳)(2013) ミクロの森: 1m² の原生林が語る生命・進化・地球. 築地書館, 336pp II -3- B
- 8) 海老原淳(2010) 昆虫とは(たぶん)だいぶ異なる植物の多様性研究事情～多様性情報の豊富な分類群シダ植物を例に～. 昆蟲(ニューシリーズ)日本昆虫学会, 13(2): 77-82 全体
- 9) 海老原淳(2016) 日本産シダ植物標準図鑑 I. 共同印刷株式会社・芳賀靖彦編 株式会社学研プラス, 475pp 全体
- 10) 海老原淳(2017) 日本産シダ植物標準図鑑 II. 共同印刷株式会社・芳賀靖彦編 株式会社学研プラス, 507pp 全体
- 11) Ep Heuvelink・Tijds Kierkels 他 著・中野明正 監訳(2017) 環境制御のための植物生理 オランダ最新研究. 農山漁村文化協会, 228pp IV-2
- 12) Ernest M.Gifford, Adriance S.Foster, 長谷部光泰 (翻訳), 鈴木武 (翻訳), 植田邦彦 (翻訳)(2002) 維管束植物の形態と進化 原著第3版. 株式会社 文一

総合出版, 22-27 I -1

13) Fowler C(2008) The svalbard seed vault and crop security.BioScience, 58(3):190-191 III

14) 福田裕穂,西村幹夫,中野明彦(2006) 植物の細胞を観る実験プロトコールー顕微鏡観察の基本から最新バイオイメージング技術まで (細胞工学別冊—植物細胞工学シリーズ) .学研メディカル秀潤社, 243pp IV-2

15) 福嶋邦彦(2009) 植物工場とその照明技術.サイエンス&テクノロジー株式会社, 303 p p IV-2

16) 古澤優佳・中村人史(2015) ゼンマイの孢子保存による効率的な増殖および育苗過程の改良による育成期間の短縮. 山形県森林研究研修センター研究報告, 32: 49-56 I -2, I -4, II -3-B, II -4

17) Galán, J. M. G. Y., Migliaro, G. and Lahoz-Beltrá, R. (2011) Effect of temperature and dark pretreatment on the germination of three species of *Jamesonia* (Pteridaceae, Polypodiopsida). *Plant Species Biology*, 26: 254-258 I -2, II -1-A

18) Gastony, G.J.(1974) Spore Morphology in the Cyatheaceae. I. The Perine and Sporangial Capacity: General Considerations.American Fern J, 61(6):672-680 II -5

19) Gómez, N.F., Pérez, G.B., Mehltreter, K., Orozco, S.A. and Rosas, I. (2016) Spore mass and morphometry of some fern species.FLORA, 223:99-105 I -4, II -5

20) GREENHOUSE GROWER(1992) DIF(ディフ)で花の草丈調節—昼夜の温度差を利用する.農山漁村文化協会(農文協), 87pp II -1-B

21) グスタフ・ゼン著 ; 片岡博尚翻訳注釈(2015) 葉緑体の変形と定位運動 .東北大学出版会, 446pp III-2

22) 服部保・石田弘明・小舘誓治・南山典子(2001) 照葉樹林フロラの特徴と絶滅のおそれのある照葉樹林構成種の現状.ランドスケープ研究, 65(5):609-614 I -2

23) 羽田貴史(2018) 研究倫理マネジメントの手引き.東北大学高度教養教育・学生支援機構, 157 p p おわりに

- 24) 長谷川 啓一・上野裕介・大城 温・神田真由美・井上隆司・西廣 淳(2016) 全国の道路事業における希少植物の保全対策としての移植の現状と工夫：移植困難植物（着生・混合栄養・菌従属栄養）に着目して. 応用生態工学, 19(1):79-90 I -2
- 25) 飛田範夫(2009) 江戸の庭園-将軍から庶民まで.京都大学学術出版会, 270pp I -2
- 26) 飛田範夫(2002) 日本庭園の植栽史.京都大学学術出版会, 435pp I -2
- 27) 樋口春三 (1990) 植物組織培養の世界—専門家のためのその技法と実際.柴田ハリオ硝子, 351ppIII-4
- 28) Hill, R. H. (1971) Comparative Habitat Requirements for Spore Germination and Prothallial Growth of Three Ferns in Southeastern Michigan. *American Fern J*, 61(4): 171-182III-1
- 29) 檜垣寅雄(1984) 植物組織培養とファインケミカルズ.株式会社シ-エムシ-, 243ppIII-4
- 30) 平田良樹(1993) 室内緑化植物の選定基準. 照明学会誌, 77: 203-204 I -2
- 31) 平澤優輝・港 翼・長谷川 匡弘・志賀 隆標(2016) 本種子の発芽可能性の評価と標本作製および管理方法の種子寿命への影響(これからの標本室～ハーバリウムの管理・運営や情報発信 利用に関する新しい流れ～. 日本植物分類学会第14回大会(福島)公開シンポジウム講演記録, 16(1):39-46 II -4
- 32) 久松完監修(2014) 電照栽培の基礎と実践：光の質・量・タイミングで植物をコントロール .誠文堂新光社, III-2
- 33) 本田真也・坂梨二郎(2018) 胞子を用いたクサソテツ(コゴミ)の低コスト大量苗生産技術開発. 熊本県農業研究センター研究報告, 26 I -2, 3
- 34) Hoshizaki, J. B. and Moran, C. R.(2001) FERN GROWER'S MANUAL. Timber Press, Portland, 624pp I -2, II -4
- 35) Huang, Y.M., Amoroso, V.B., Coritico, F.P., Ko, C.W., Kao, T.T., Callado, J.R. and Chiou, W.L. (2015) Reproductive Biology of *Aglaomorpha cornucopia* (Copel.) M.C. Roos, a Rare and Endemic Fern from the Philippines. *American Fern J*, 105(1):31-44III-5
- 36) 井上浩(1975) シダ・コケ類の生態と観察. 株式会社 築地書館, 11-12 I -1

- 37) 石川茂雄・大房 剛(1954) シダの胞子の発芽におよぼす光の影響 I. 植物学雑誌, 67(793-794):193-197 I -2, 3, II -2
- 38) 石井 龍一 (編集), 竹中 明夫 (編集), 土橋 豊 (編集), 岩槻 邦男 (編集), 矢原 徹一 (編集), 長谷部 光泰 (編集), 和田 正三 (編集)(2009) 植物の百科事典. 朝倉書店, 548 II -2- B
- 39) 伊藤洋(1972) シダ学入門. ニュー・サイエンス社, 177pp I -2~4, II -1~2
- 40) 岩手大学 21 世紀 COE プログラム事業(2009) 温度と生命システムの相関学. 東海大学出版会, 330pp IV -1
- 41) 岩槻邦男(1996) シダ植物の自然史. 財団法人 東京大学出版会, 259pp I -1
- 42) Julius von Sachs, 渡辺仁 (1997 年訳) (1887) 植物生理学 講義 (Lectures on the Physiology of Plants) . 森北出版株式会社, 849pp III -1
- 43) 環境省自然環境局(2009) 絶滅危惧植物種子の収集・保存等に関するマニュアル. 環境省自然環境局, 61pp II -3- C, V
- "44) Noboru Katayama, Osamu Kishidab, Chikako Miyoshi, Shintaro Hayakashi, Kinya Ito, Rei Sakai, Aiko Naniwa, Hiroyuki Takahashi, Kentaro Takagi(2015) Demography and productivity during the recovery time sequence of a wild edible bamboo after large-scale anthropogenic disturbance. PLoS ONE, 10(12) II -6"
- 45) 加藤幸雄(1962) シダ植物の蛋白質および核酸代謝 植物の形態形成に関する一つの論争. 化学と生物, 381-388 II -2- B, III -2
- 46) 加藤幸雄 (1966) 植物組織培養法—実際と応用. 誠文堂新光社, 280pp II -3- C, III -3
- 47) 勝田 柁・森徳典・横山敏孝(1998) 日本の樹木種子(広葉樹編). 林木育種協会, 403 II -1
- 48) 河原 孝行(2014) APG に基づく植物の新しい分類体系. 森林遺伝育種, 3:15-22 I -1
- 49) Hiroko Kawai, Takeshi Kanegae, Steen Christensen, Tomohiro Kiyosue, Yoshikatsu Sato, Takato Imaizumi, Akeo Kadot & Masamitsu Wada(2003) Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor. Nature, 421:287-290 III

- 50) 河合・豊岡博子, 和田正三(2005) シダ植物・コケ植物における RNAi と DNAi. 化学と生物, 43(9):589-594 III
- 51) 木村正信・岩本篤彦・夏目祥吾・井上あゆみ(2000) 粉砕材吹付け法面での植生復元状況と生育基盤特性について. 日本緑化工学会誌, 25(4):645-648 I-4
- 52) 木村恵・古本良・遠藤圭太(2019) シードバンクにおける野生種保存の現状と課題—イギリス王立キュー植物園のミレニアムシードバンクの紹介から—. 森林遺伝育種, 8:78-84 II-4
- 53) 吉良竜夫(2012) 植物の地理的分布—生物的自然の見直し. 新樹社, 388pp III-1
- 54) 児玉豊(2019) 植物が温度を感じる仕組み—ようやく発見! 植物の温度センサー分子. 化学と生物, 57(1):21-28 III-1
- 55) 近藤哲也(1993) 野生草花が咲く草地づくり—種子発芽と群落形成. 高橋理喜男監修. 信州社出版株式会社, 97pp II-1-B
- 56) 近藤三雄(2007) グラウンドカバープランツによる緑化の課題と展望—学会の領域の拡大と興隆のための新たな戦略—. 芝草研究, 36(1):1-6 I-2
- 57) 近江 幸治(2012) 学術論文の作法—(付)小論文・答案の書き方. 成文堂, 136pp おわりに
- 58) 古在豊樹(2014) 図解でよくわかる—植物工場のきほん— 設備投資・生産コストから, 養液栽培の技術, 流通, 販売, 経営まで. 株式会社 誠文堂新光社, 159pp III-1
- 59) 古在 豊樹(2015) よくわかる植物工場—何をどうやって、育てているの?. PHP 研究所, 63pp III-1
- 60) 古在豊樹(1998) 植物組織培養の新段階 : 培養器環境から地球環境へ. 農山漁村文化協会(農文協), 172pp III-3
- 61) 気象庁(2010) 表面海水中の pH の長期変化傾向(全球). 気象庁 HP, https://www.data.jma.go.jp/kaiyou/shindan/a_3/pHglob/pH-pac_sub.html(2020年11月15日) II-3-C
- 62) 黒田 有寿茂, 石田 弘明, 岩切 康二, 服部 保(2009) 布団籠工の表層におけるシダ群落の成立とその要因について. ランドスケープ研究, 72(5):493-496 II-3-C

- 63) Lincoln Taiz · Eduardo Zeiger · Ian Max Moller and Angus Murphy(2017) *Plant Physiology and Development, Sixth Edition*(植物生理学・発生学 原著 第6版).講談社, 832pp II-2, III-1
- 64) Magrini, S.(2011) Herbaria as useful spore banks for integrated conservation strategies of pteridophytic diversity. *Plant Biosyst*, 145:635-637 II-4
- 65) Magrini, S., C. Olmati, S. Onofri and A. Scoppola(2010) Recovery of viable germplasm from herbarium specimens of *Osmunda regalis* L. *American Fern J*, 100:159-166 II-4
- 66) Michael Begon (原著), コリン タウンゼンド (著), ジョン ハーパー (著), & 6 more(2013) 生態学—個体から生態系へ. 京都大学学術出版会, 987pp IV-1
- 67) 益山樹生(1984) シダ類の生殖. 株式会社 豊饒書館, 206pp III
- 68) 松井理恵・村上健太郎・森本幸裕(2003) 都市近郊における大規模造成樹林地の自然回復度評価—シダ植物を指標として—. *日本緑化工学会誌*, 29(1): 119-124 I-2
- 69) 松本定(2003) 日本列島におけるオニヤブソテツ複合種(オシダ科)の繁殖様式と種分化に関する種生態学的研究. 筑波実験植物園研報, 22:1-141 II-3-C, II-5
- 70) 光田重幸(1986) ヤブソテツ属の種の生殖様式. *日本植物分類学会*, 37:117-122 II-5, III-5, IV-1
- 71) 三井邦男(1982) シダ植物の孢子. 株式会社豊饒書館, 206pp 全体, II-6
- 72) 宮脇昭・奥田重俊(1990) 日本植物群落図説. 至文堂, 800pp I-2
- 73) 水上久男(1985) ワラビ 人工栽培の実際. 農山漁村文化協会, 149pp I-3
- 74) 水野 大樹, 竹崎 大悟, 百原 新, 沖津 進(2012) ミツデウラボシの幼孢子体の定着における蘇苔類群落の役割. *植生学会*, 29(2)105-109 I-1
- 75) 百瀬静男(1967) 日本産シダの前葉体. 東京大学出版会, 627pp I-2~4, III-1, V
- 76) 森川 靖(2018b) 植物生理生態学への招待 (2) .*海外の森林と林業*, 102:34-36 III-2
- 77) 森川 靖(2018a) 植物生理生態学への招待 (1) .*海外の森林と林業*, 101:29-

33Ⅲ-2

- 78) 森 康裕 (著), 高辻 正基 (著)(2013) LED 植物工場の立ち上げ方・進め方. 日刊工業新聞社, 160ppⅢ-2
- 79) 村上健太郎(2019) シダ類の生育地としての都市域及び都市郊外域のハードスケープ-中部地方のデータセットからの考察-. 日本緑化工学会誌, 45(2): 299-307 I -2
- 80) 村上健太郎・森本幸裕・堀川真弘(2011) 近畿地方の市街地に生育するシダ類の種組成と気候要因との関係. 日本緑化工学会誌, 37(1): 38-43 II -1-A
- 81) 中村潤一・沖陽子・足立忠司(2009) ツルヨシおよびセイコノヨシの種子発芽特性. 雑草研究, 54(1): 21-24 全体
- 82) 中谷敬子・野口勝可・草薙得一(1996) スギナ胞子の発芽および前葉体の形成条件. 雑草研究, 41(3): 184-188 II -1, II -1-A
- 83) 行方沼東(1961) シダの採集と培養.加島書店, 357p p Ⅲ-3
- 84) 根子昭(1986) ゼンマイ 条件に合わせた栽培法. 農山漁村文化協会, 110pp I -3, II -1
- 85) 日本施設園芸協会 (編集)(2015) 施設園芸・植物工場ハンドブック.農山漁村文化協会, 569pp II -2-A, II -3-A
- 86) 一般社団法人日本種苗協会 監修(2017) 種選び・種まき・育苗から、種苗の生産・流通、品種改良、家庭菜園での利用法まで. 誠文堂新光社, 160pp II -1-B
- 87) 西田 誠(1978) 陸上植物の起源,朝日新聞社・伊藤道人編,朝日百科 世界の植物. 朝日新聞社, 3076-3077 I -1
- 88) 西村公宏(2015) 創設期の東京帝国大学附属植物園日光分園におけるロックガーデンの整備について. ランドスケープ研究, 78(5):449-454 I -2
- 89) 西野文貴, 清澤賢司, 橘 隆一, 福永健司(2020) 異なる温度条件におけるベニシダ, オシダ, イヌガンソクの胞子発芽と前葉体成長.日本緑化工学会誌, 46(1)3-8 II -1, III-1
- 90) 西野文貴, 前島洗大, 橘 隆一, 福永健司(2020) ベニシダおよびオニヤブソテツ胞子の発芽数と前葉体の生育密度の違いによる生存率.日本緑化工学会誌, 46(2)226-231 II -5, III-5
- 91) 農文協 編(2019) 農家が教える 野菜の発芽・育苗 コツと裏ワザ. 農山漁

- 村文化協会(農文協), 148 II-1
- 92) 大澤勝次, 江面浩著(2005) 図集・植物バイオテックの基礎知識 .農山漁村文化協会(農文協), II-3-B
- 93) 太田行人(1987) 植物発生生理学.岩波書店, 187ppIV-2
- 94) Ootsuki Ryo(2011) Genetic variation in an apogamous fern species *Cyrtomium fortunei* (Dryopteridaceae) and its acquisition mechanisms.首都大学東京, 73 I-1
- 95) 大槻涼(2011) 無配生殖をおこなうヤブソテツ類(オシダ科) にみられる遺伝的多様性とその獲得メカニズムの解明.日本植物分類学会, 11(2)161-164 I-1
- 96) Quintanilla, L. G., Pajarón, S., Pangua, E. and Amigo, J.(2000) Effect of Temperature on Germination in Northernmost Populations of *Culcita macrocarpa* and *Woodwardia radicans*. *Plant Biol*, 2: 612-617 I-2, II-1-A
- 97) R.A. Dixon (著), 遠山 益 (翻訳), 久世 洋子 (翻訳)(1989) 植物細胞・組織培養の実際.丸善, 288ppIV-1
- 98) Raghavan, V. (2005) *Developmental Biology of Fern Gametophytes*.Cambridge University Press, 361pp II-4
- 99) Ranal ,M. A.(1999) Effects of Temperature on Spore Germination in Some Fern Species from Semideciduous Mesophytic Forest. *American Fern J*, 89(2): 149-158 I-2
- 100) 坂巻義章(2005) シダ植物の物質生産に基づく成長の生理生態学的研究.早稲田大学, 155 II-2-B, II-6
- "101) SARAH L. NONDORF, MELISSA A. DOOLEY, MARIA PALMIERI, and LUCINDA J. SWATZELL(2003) The Effects of pH, Temperature, Light Intensity, Light Quality, and Moisture Levels on Spore Germination in *Cheilanthes feei* of Southeast Missouri.*American Fern J*, 93(2):56-59 II-3-A"
- 102) 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, 59228-231 I-3
- 103) 佐藤利幸・酒井昭(1981a) 北海道のシダ植物の孢子散布時期. 日本生態学

会誌, 31: 91-97 I -2, II-4

104) 佐藤利幸・酒井昭(1981b) 生育場所に着目した北海道のシダ植物の孢子体の耐凍性. 日本生態学会誌, 31: 191-199 I -2, II-1, 4

105) 澤田清・大森大二郎(2009) 緩衝液：その原理と選び方・作り方. 講談社, 192pp II -3-C

106) Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *NatureMethods*, 9: 671-675 全体

107) 嶋田幸久, 萱原正嗣(2015) 植物の体の中では何が起きているのか：動かない植物が生きていくためのしくみ . *BERET SCIENCE*, 351pp III-2

108) 嶋田饒(1962) ワラビ孢子の発芽試験. 日本草地学会, 8(2): 152-153 I -3, II-1-A, B

109) 清水健太郎, 長谷部光泰(2007) 植物の進化—基本概念からモデル生物を活用した比較・進化ゲノム学まで. 学研メディカル秀潤社, 212pp I -1

110) 清水正元(1960) 土壌反応と植物の生育. 日本草地研究会誌, 5(2):78-80 II -3-C

111) 末次 憲之・和田 正三(2013) 陸上植物の光応答戦略-陸上植物における葉緑体の運動メカニズムの新機軸- . *植物科学最前線*, 445-60 III-2

112) 菅井道三(1973) 光による発芽制御 シダ孢子とレタス種子の場合を中心として. *化学と生物*, 11(1):2-12 I -3, II-2

113) 田川基二 (1959) 原色日本羊歯植物図鑑. 保育社, 270pp 全体

114) 高辻 正基 (著), 森 康裕 (著)(2011) LED 植物工場. 日刊工業新聞社, 141pp III-2

115) 武田宏(2017) 新潟県北部におけるタブノキの発芽特性. 新潟県森林研究所報告, 58:1-3 I -4

116) 武田宏(2017) 新潟県北部におけるタブノキの発芽特性. 新潟県森林研究所研究報告, 58:1-3 I -4

117) 竹内正幸(1987) 植物の組織培養 (基礎生物学選書). 裳華房, 167pp I -2

118) 東北大学高度教養教育・学生支援機構【編】(2017) 責任ある研究のための発表倫理を考える. 東北大学出版会, 163pp おわりに

119) 内嶋善兵衛 (2005) 新・地球温暖化とその影響—生命の星と人類の明日の

ために.ポピュラー・サイエンス, 216 p p III-1

120) 梅林智美(1999) クサソテツ(コゴミ)の孢子からの苗生産北陸農業の新技术. 中央農業総合研究センター北陸研究センター編(通号 12), 09:49-51 II-4

121) 牛島忠広 (1981) 植物の生産過程測定法 (生態学研究法講座 7).共立出版, 212ppIV-1, 2

122) Van Slageren, M. W.(2003) The Millennium Seed Bank: Building partnerships in arid regions for the conservation of wild species.Journal of Arid Environments, 54(1):195-201 II-3-C

123) 和田正三 監修(2001) 植物の光センシング 光情報の受容とシグナル伝達. 学研メディカル秀潤社, 192ppIII-2

124) 鷺谷 いづみ(1996) 休眠・発芽特性と土壌シードバンク調査・実験法(連載第1回)(保全「発芽生態学」マニュアル).保全生態学研究, 1(1)89-98 II-1-B

125) 鷺谷 いづみ(1997) 休眠・発芽特性と土壌シードバンク調査・実験法(連載第3回)(保全「発芽生態学」マニュアル).保全生態学研究, 2(1)77-86 II-1-B

126) 鷺谷 いづみ (著), 夏原 由博 (著), 松田 裕之 (著), 椿 宣高 (著)(2010) 地球環境と保全生物学 (現代生物科学入門 第6巻).岩波書店, 208ppIII-1

127) 鷺谷いづみ監修・編著 ; 一ノ瀬友博 [ほか] 共著(2016) 生態学—基礎から保全へ.培風館, 289ppIV-1

128) Watkins, J.E., Mack, M.K., Mulkey, S.S. (2007) Gametophyte ecology and demography of epiphytic and terrestrial tropical ferns.American Journal of Botany, 94(4):701-8III-5

129) Weinberg, Eric S.; Voeller, Bruce R.(1969) “Induction of Fern Spore Germination” . Proceedings of the National Academy of Sciences, 64:835-842 I-4, II-2

130) Windham,M.D.,P.G.Wolf and T.A.Ranker.(1986) Factors affecting prolonged spore viability in herbarium collections of three species of Pellaea. American Fern J, 76:141-148 II-4

131) 山田浩雄(2018) 林木ジーンバンク事業の成果と今後の方向.森林遺伝育種, 7:156-158 II-4

132) 山田 (川合) 真紀(2006) 植物細胞死の検出法.日本作物学会紀事,

75(2):226-228IV-2

133) 山本由徳(1997) 作物にとって移植とはなにか：苗の活着生態と生育相 . 農山漁村文化協会(農文協), 210ppIV-2

134) 山本良一(1999) 植物細胞の生長.培風館, 211 p p IV-1

135) 山根昭美(1996) 氷温貯蔵の科学：食味・品質向上の革新技術 .農山漁村文化協会(農文協), 173ppIV-1

136) 山崎茂明(2013) 科学者の発表倫理：不正のない論文発表を考える.丸善出版 , 160pp おわりに

137) 山崎茂明(2007) パブリッシュ・オア・ペリッシュー科学者の発表倫理.みすず書房, 192pp おわりに

138) 山崎茂明(2002) 科学者の不正行為—捏造・偽造・盗用.丸善出版 , 195pp おわりに

139) 吉田剛(2016) トマトの長期多段どり栽培：生育診断と温度・環境制御.農山漁村文化協会(農文協), 171pp II-1-B

140) 吉岡俊人, 藤茂雄, 川上直人(2009) 「発芽と温度：巡りくる季節を感じ取る」発芽生物学 種子発芽の生理・生態・分子機構. 文一総合出版, 49-63 II-1

141) 養液栽培研究会(1998) 養液栽培マニュアル 21.誠文堂新光社, 175pp II-3-B

章ごと

I-1(Ernest M.Gifford, Adriance S.Foster, 長谷部 光泰 (翻訳), 鈴木 武 (翻訳), 植田 邦彦 (翻訳), 2002) 維管束植物の形態と進化 原著第3版

I-1(井上浩, 1975) シダ・コケ類の生態と観察

I-1(岩槻邦男, 1996) シダ植物の自然史

I-1(河原 孝行, 2014) APGに基づく植物の新しい分類体系

I-1(水野 大樹, 竹崎 大悟, 百原 新, 沖津 進, 2012) ミツデウラボシの幼孢子体の定着における蘇苔類群落の役割

I-1(西田 誠, 1978) 陸上植物の起源, 朝日新聞社・伊藤道人編, 朝日百科 世界の植物

I-1(Ootsuki Ryo, 2011) Genetic variation in an apogamous fern species

Cyrtomium fortunei (Dryopteridaceae) and its acquisition mechanisms

I-1(大槻涼, 2011) 無配生殖をおこなうヤブソテツ類 (オシダ科) にみられる遺伝的多様性とその獲得メカニズムの解明

I-1(清水健太郎, 長谷部光泰, 2007) 植物の進化—基本概念からモデル生物を活用した比較・進化ゲノム学まで

I-2(安部文貴・森達也・田中大介・栗山昭, 2016) シダ植物カルスの低温保存の試み

I-2(Barrington, D. S., 1993) Ecological and historical factors in fern biogeography

I-2(服部保・石田弘明・小舘誓治・南山典子, 2001) 照葉樹林フロラの特徴と絶滅のおそれのある照葉樹林構成種の現状

I-2(長谷川 啓一・上野裕介・大城 温・神田真由美・井上隆司・西廣 淳, 2016) 全国の道路事業における希少植物の保全対策としての移植の現状と工夫：移植困難植物 (着生・混合栄養・菌従属栄養) に着目して

I-2(飛田範夫, 2009) 江戸の庭園-将軍から庶民まで

I-2(飛田範夫, 2002) 日本庭園の植栽史

I-2(平田良樹, 1993) 室内緑化植物の選定基準

I-2(近藤三雄, 2007) グラウンドカバープランツによる緑化の課題と展望—学会の領域の拡大と興隆のための新たな戦略—

I-2(松井理恵・村上健太郎・森本幸裕, 2003) 都市近郊における大規模造成樹林地の自然回復度評価—シダ植物を指標として—

I-2(宮脇昭・奥田重俊, 1990) 日本植物群落図説

- I -2(村上健太郎, 2019) シダ類の生育地としての都市域及び都市郊外域のハードスケープ-中部地方のデータセットからの考察-
- I -2(西村公宏, 2015) 創設期の東京帝国大学附属植物園日光分園におけるロックガーデンの整備について
- I -2(Ranal ,M. A., 1999) Effects of Temperature on Spore Germination in Some Fern Species from Semideciduous Mesophytic Forest
- I -2(竹内正幸, 1987) 植物の組織培養 (基礎生物学選書)
- I -2, 3(本田真也・坂梨二郎, 2018) 胞子を用いたクサソテツ(コゴミ)の低コスト大量苗生産技術開発
- I -2, 3, II -2(石川茂雄・大房 剛, 1954) シダの胞子の発芽におよぼす光の影響 I
- I -2, I -4, II -3-B, II -4(古澤優佳・中村人史, 2015) ゼンマイの胞子保存による効率的な増殖および育苗過程の改良による育成期間の短縮
- I -2, II -1, 4(佐藤利幸・酒井昭, 1981b) 生育場所に着目した北海道のシダ植物の胞子体の耐凍性
- I -2, II -1-A(Galán, J. M. G. Y., Migliaro, G. and Lahoz-Beltrá, R. , 2011) Effect of temperature and dark pretreatment on the germination of three species of *Jamesonia* (Pteridaceae, Polypodiopsida)
- I -2, II -1-A(Quintanilla, L. G., Pajarón, S., Pangua, E. and Amigo, J., 2000) Effect of Temperature on Germination in Northernmost Populations of *Culcita macrocarpa* and *Woodwardia radicans*
- I -2, II -4(Hoshizaki, J. B. and Moran, C. R., 2001) FERN GROWER'S MANUAL
- I -2, II -4(佐藤利幸・酒井昭, 1981a) 北海道のシダ植物の胞子散布時期
- I -2~4, II -1~2(伊藤洋, 1972) シダ学入門
- I -2~4, III -1, V(百瀬静男, 1967) 日本産シダの前葉体
- I -3(阿部清, 2003) クサソテツ(コゴミ) 計画的な株増殖による安定栽培と利用
- I -3(水上久男, 1985) ワラビ 人工栽培の実際
- I -3(佐々木義則, 2006) 組織培養によるゼンマイ苗の増殖
- I -3, II -1(根子昭, 1986) ゼンマイ 条件に合わせた栽培法
- I -3, II -1-A, B(嶋田饒, 1962) ワラビ胞子の発芽試験
- I -3, II -2(菅井道三, 1973) 光による発芽制御 シダ胞子とレタス種子の場合を中心と

して

I -3, III-3(Akira Kuriyama, 2004) Medium Composition for the Production of Sporephytes of the Fern *Adiantum capillus veneris*J

I -4(木村正信・岩本篤彦・夏目祥吾・井上あゆみ, 2000) 粉碎材吹付け法面での植生復元状況と生育基盤特性について

I -4(武田宏, 2017) 新潟県北部におけるタブノキの発芽特性

I -4(武田宏, 2017) 新潟県北部におけるタブノキの発芽特性

I -4, II -2(Weinberg, Eric S.; Voeller, Bruce R., 1969) “Induction of Fern Spore Germination”

I -4, II -5(Gómez, N.F., Pérez, G.B., Mehltreter, K., Orozco, S.A. and Rosas, I. , 2016) Spore mass and morphometry of some fern species

II -1(勝田 昶・森徳典・横山敏孝, 1998) 日本の樹木種子(広葉樹編)

II -1(農文協 編, 2019) 農家が教える 野菜の発芽・育苗 コツと裏ワザ

II -1(吉岡俊人, 藤茂雄, 川上直人, 2009) 「発芽と温度：巡りくる季節を感じ取る」
発芽生物学 種子発芽の生理・生態・分子機構

II -1, II -1-A(中谷敬子・野口勝可・草薙得一, 1996) スギナ胞子の発芽および前葉体の形成条件

II -1, III-1(西野文貴, 清澤賢司, 橘 隆一, 福永健司, 2020) 異なる温度条件におけるベニシダ, オシダ, イヌガンソクの胞子発芽と前葉体成長

II -1-A(村上健太郎・森本幸裕・堀川真弘, 2011) 近畿地方の市街地に生育するシダ類の種組成と気候要因との関係

II -1-B(GREENHOUSE GROWER, 1992) DIF(ディフ)で花の草丈調節一昼夜の温度差を利用する

II -1-B(近藤哲也, 1993) 野生草花が咲く草地づくり-種子発芽と群落形成.高橋理喜男
監修

II -1-B(一般社団法人日本種苗協会 監修, 2017) 種選び・種まき・育苗から、種苗の生産・流通、品種改良、家庭菜園での利用法まで

II -1-B(鷺谷 いづみ, 1996) 休眠・発芽特性と土壌シードバンク調査・実験法(連載第1回)(保全「発芽生態学」マニュアル)

II -1-B(鷺谷 いづみ, 1997) 休眠・発芽特性と土壌シードバンク調査・実験法(連載第

3回)(保全「発芽生態学」マニュアル)

II-1-B(吉田剛, 2016) トマトの長期多段どり栽培: 生育診断と温度・環境制御

II-2, III-1(Lincoln Taiz・Eduardo Zeiger・Ian Max Moller and Angus Murphy, 2017) Plant Physiology and Development, Sixth Edition(植物生理学・発生学 原著 第6版)

II-2-A(Boysen-Jensen(Editor) 門司正三, 野本宣夫(共訳), 1982) 植物の物質生産

II-2-A, II-3-A(日本施設園芸協会(編集), 2015) 施設園芸・植物工場ハンドブック

II-2-B(石井 龍一(編集), 竹中 明夫(編集), 土橋 豊(編集), 岩槻 邦男(編集), 矢原 徹一(編集), 長谷部 光泰(編集), 和田 正三(編集), 2009) 植物の百科事典

II-2-B, II-6(坂巻義章, 2005) シダ植物の物質生産に基づく成長の生理生態学的研究

II-2-B, III-2(加藤幸雄, 1962) シダ植物の蛋白質および核酸代謝 植物の形態形成に関する一つの論争

"II-3-A(SARAH L. NONDORF, MELISSA A. DOOLEY, MARIA PALMIERI, and LUCINDA J. SWATZELL, 2003) The Effects of pH, Temperature, Light Intensity, Light Quality, and Moisture Levels on Spore Germination in *Cheilanthes feei* of Southeast Missouri"

II-3-B(David G. Haskell(著), 三木 直子(翻訳), 2013) ミクロの森: 1m²の原生林が語る生命・進化・地球

II-3-B(大澤勝次, 江面浩著, 2005) 図集・植物バイオテクの基礎知識

II-3-B(養液栽培研究会, 1998) 養液栽培マニュアル 21

II-3-C(気象庁, 2010) 表面海水中の pH の長期変化傾向(全球)

II-3-C(黒田 有寿茂, 石田 弘明, 岩切 康二, 服部 保, 2009) 布団籠工の表層におけるシダ群落の成立とその要因について

II-3-C(澤田清・大森大二郎, 2009) 緩衝液: その原理と選び方・作り方

II-3-C(清水正元, 1960) 土壌反応と植物の生育

II-3-C(Van Slageren, M. W., 2003) The Millennium Seed Bank: Building partnerships in arid regions for the conservation of wild species

II-3-C, II-5(松本定, 2003) 日本列島におけるオニヤブソテツ複合種(オンダ科)の繁殖様式と種分化に関する種生態学的研究

II-3-C, III-3(加藤幸雄, 1966) 植物組織培養法—実際と応用

- II-3-C, V(環境省自然環境局, 2009) 絶滅危惧植物種子の収集・保存等に関するマニュアル
- II-4(平澤優輝・港 翼・長谷川 匡弘・志賀 隆標, 2016) 本種子の発芽可能性の評価と標本作製および管理方法の種子寿命への影響(これからの標本室～ハーバリウムの管理・運営や情報発信 利用に関する新しい流れ～
- II-4(木村恵・古本良・遠藤圭太, 2019) シードバンクにおける野生種保存の現状と課題ーイギリス王立キュー植物園のミレニアムシードバンクの紹介からー
- II-4(Magrini,S., 2011) Herbaria as useful spore banks for integrated conservation strategies of pteridophytic diversity
- II-4(Magrini,S.,C.Olmati,S.Onofri and A.Scoppola, 2010) Recovery of viable germplasm from herbarium specimens of *Osmunda regalis* L
- II-4(Raghavan, V. , 2005) Developmental Biology of Fern Gametophytes
- II-4(梅林智美, 1999) クサソテツ(コゴミ)の孢子からの苗生産北陸農業の新技术
- II-4(Windham,M.D.,P.G.Wolf and T.A.Ranker., 1986) Factors affecting prolonged spore viability in herbarium collections of three species of *Pellaea*
- II-4(山田浩雄, 2018) 林木ジーンバンク事業の成果と今後の方向
- II-5(Gastony, G.J., 1974) Spore Morphology in the Cyatheaceae. I. The Perine and Sporangial Capacity: General Considerations
- II-5, III-5(西野文貴, 前島洸大, 橘 隆一, 福永健司, 2020) ベニシダおよびオニヤブソテツ孢子の発芽数と前葉体の生育密度の違いによる生存率
- II-5, III-5, IV-1(光田重幸, 1986) ヤブソテツ属の種の生殖様式
- "II-6(Noboru Katayama, Osamu Kishidab, Chikako Miyoshi, Shintaro Hayakashi,Kinya Ito, Rei Sakai, Aiko Naniwa, Hiroyuki Takahashi, Kentaro Takagi, 2015) Demography and productivity during the recovery time sequence of a wild edible bamboo after large-scale anthropogenic disturbance"
- III(Fowler C, 2008) The svalbard seed vault and crop security
- III(Hiroko Kawai, Takeshi Kanegae, Steen Christensen,Tomohiro Kiyosue, Yoshikatsu Sato, Takato Imaizumi,Akeo Kadot & Masamitsu Wada, 2003) Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor
- III(河合・豊岡博子, 和田正三, 2005) シダ植物・コケ植物における RNAi と DNAi

- Ⅲ(益山樹生, 1984) シダ類の生殖
- Ⅲ-1(Hill, R. H. , 1971) Comparative Habitat Requirements for Spore Germination and Prothallial Growth of Three Ferns in Southeastern Michigan
- Ⅲ-1(Julius von Sachs, 渡辺仁 (1997年訳), 1887) 植物生理学 講義 (Lectures on the Physiology of Plants)
- Ⅲ-1(吉良竜夫, 2012) 植物の地理的分布—生物的自然の見直し
- Ⅲ-1(児玉豊, 2019) 植物が温度を感じる仕組み ようやく発見! 植物の温度センサー分子
- Ⅲ-1(古在豊樹, 2014) 図解でよくわかる 植物工場のきほん 設備投資・生産コストから, 養液栽培の技術, 流通, 販売, 経営まで
- Ⅲ-1(古在 豊樹, 2015) よくわかる植物工場 何をどうやって、育てているの?
- Ⅲ-1(内嶋善兵衛 , 2005) 新・地球温暖化とその影響—生命の星と人類の明日のために
- Ⅲ-1(鷺谷 いづみ (著), 夏原 由博 (著), 松田 裕之 (著), 椿 宣高 (著), 2010) 地球環境と保全生物学 (現代生物科学入門 第6巻)
- Ⅲ-2(グスタフ・ゼン著; 片岡博尚翻訳注釈, 2015) 葉緑体の変形と定位運動
- Ⅲ-2(久松完監修, 2014) 電照栽培の基礎と実践: 光の質・量・タイミングで植物をコントロール
- Ⅲ-2(森川 靖, 2018b) 植物生理生態学への招待 (2)
- Ⅲ-2(森川 靖, 2018a) 植物生理生態学への招待 (1)
- Ⅲ-2(森 康裕 (著), 高辻 正基 (著), 2013) LED 植物工場の立ち上げ方・進め方
- Ⅲ-2(嶋田幸久, 萱原正嗣, 2015) 植物の体の中では何が起きているのか: 動かない植物が生きていくためのしくみ
- Ⅲ-2(末次 憲之・和田 正三, 2013) 陸上植物の光応答戦略-陸上植物における葉緑体の運動メカニズムの新機軸-
- Ⅲ-2(高辻 正基 (著), 森 康裕 (著), 2011) LED 植物工場
- Ⅲ-2(和田正三 監修, 2001) 植物の光センシング 光情報の受容とシグナル伝達
- Ⅲ-3(古在豊樹, 1998) 植物組織培養の新段階: 培養器環境から地球環境へ
- Ⅲ-3(行方沼東, 1961) シダの採集と培養
- Ⅲ-4(樋口春三 , 1990) 植物組織培養の世界—専門家のためのその技法と実際
- Ⅲ-4(檜垣寅雄, 1984) 植物組織培養とファインケミカルズ

- III-5(Ballesteros, D., Estrelles, E., Walters, C. and Ibars, A.M. , 2012) Effects of temperature and desiccation on ex situ conservation of nongreen fern spores.
- III-5(Huang, Y.M., Amoroso, V.B., Coritico, F.P., Ko, C.W., Kao, T.T., Callado, J.R. and Chiou, W.L. , 2015) Reproductive Biology of *Aglaomorpha cornucopia* (Copel.) M.C. Roos, a Rare and Endemic Fern from the Philippines
- III-5(Watkins, J.E., Mack, M.K., Mulkey, S.S. , 2007) Gametophyte ecology and demography of epiphytic and terrestrial tropical ferns
- IV-1(岩手大学 21 世紀 COE プログラム事業, 2009) 温度と生命システムの相関学
- IV-1(Michael Begon (原著), コリン タウンゼンド (著), ジョン ハーパー (著), & 6 more, 2013) 生態学—個体から生態系へ
- IV-1(R.A. Dixon (著), 遠山 益 (翻訳), 久世 洋子 (翻訳), 1989) 植物細胞・組織培養の実際
- IV-1(鷺谷いづみ監修・編著 ; 一ノ瀬友博 [ほか] 共著, 2016) 生態学—基礎から保全へ
- IV-1(山本良一, 1999) 植物細胞の生長
- IV-1(山根昭美, 1996) 氷温貯蔵の科学 : 食味・品質向上の革新技術
- IV-1, 2(牛島忠広 , 1981) 植物の生産過程測定法 (生態学研究法講座 7)
- IV-2(Ep Heuvelink・Tijs Kierkels 他 著・中野明正 監訳, 2017) 環境制御のための植物生理 オランダ最新研究
- IV-2(福田裕穂, 西村幹夫, 中野明彦, 2006) 植物の細胞を観る実験プロトコール—顕微鏡観察の基本から最新バイオイメージング技術まで (細胞工学別冊—植物細胞工学シリーズ)
- IV-2(福嶋邦彦, 2009) 植物工場とその照明技術
- IV-2(太田行人, 1987) 植物発生生理学
- IV-2(山田 (川合) 真紀, 2006) 植物細胞死の検出法
- IV-2(山本由徳, 1997) 作物にとって移植とはなにか : 苗の活着生態と生育相
- おわりに(羽田貴史, 2018) 研究倫理マネジメントの手引き
- おわりに(近江 幸治, 2012) 学術論文の作法—(付)小論文・答案の書き方
- おわりに(東北大学高度教養教育・学生支援機構【編】, 2017) 責任ある研究のための発表倫理を考える

おわりに(山崎茂明, 2013) 科学者の発表倫理: 不正のない論文発表を考える
おわりに(山崎茂明, 2007) パブリッシュ・オア・ペリッシュー科学者の発表倫理
おわりに(山崎茂明, 2002) 科学者の不正行為—捏造・偽造・盗用
全体(海老原淳, 2010) 昆虫とは(たぶん)だいぶ異なる植物の多様性研究事情～多様性情報の豊富な分類群シダ植物を例に～
全体(海老原淳, 2016) 日本産シダ植物標準図鑑 I
全体(海老原淳, 2017) 日本産シダ植物標準図鑑 II
全体(中村潤一・沖陽子・足立忠司, 2009) ツルヨシおよびセイコノヨシの種子発芽特性
全体(Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. , 2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis
全体(田川基二 , 1959) 原色日本羊歯植物図鑑
全体, II -6(三井邦男, 1982) シダ植物の孢子

令和 3 年 3 月

東京農業大学大学院

農学研究科

林学専攻

治山緑化工学研究室

西野文貴

要旨

日本にはシダ植物が約 700 種生育し (海老原 2010), 特徴的な葉形を持つ種や耐陰性を有する種など多種多様な種が存在することから, 都市域などの緑化植物として有望視されている (平田 1993, 村上 2019)。しかし, 現在, 緑化に利用されている種類はベニシダ類やヤブソテツ類など十数種程度で, 1800 年代の造園工事で用いられていた種類と比較しても大きく変わっていない (近藤, 2007) (西村, 2015) (飛田, 2002) (飛田, 2009)。シダ植物の大半は孢子で繁殖するが, 実際には株分けによって増殖させることが一般的である。ただし, 株分けは増殖技術として簡易である一方で, 大量増殖には不向きであり, またオシダやイヌガンソクなど地中の根茎が匍匐しない種では適用が難しいことから, 多種多様なシダ植物の緑化植物としての利用展開は見込めない。そこで, この問題点を解決する糸口として, これまで主流であった株分け技術とは根本的に異なる孢子を用いた増殖技術に着目するに至った。

これまで, シダ植物の孢子は適度の水, 温度, 光さえあれば発芽して成長するが, その発芽条件は種によって異なる (伊藤 1972) ことは知られているものの, 増殖技術に応用が期待できる研究例はほとんどない。そこで本研究では, 緑化植物として有望と考えられるシダ植物 9 種を対象として, 孢子の発芽とその後の前葉体の成長を満たす要件として主に温度および光条件を明らかにし, 増殖技術に応用することを目的として実験を行った。

【第 I 章】では, シダ植物の系統分類と生活環を中心に整理し, 増殖技術に関

する研究史を纏めることで本研究の意義を示した。そのうえで、対象種は屋内外に限らず都市域などの修景的な緑化に利用しやすい種を前提とし、実験に使用した種の選定理由を述べた。

修景的な緑化では分布域が広い種、冬季でも葉を保持する常緑性の種、大きく広がった葉形で緑被の効果が高い種などが好まれる。そこで、供試植物として国内で身近に生育するシダ植物 90 種（村田 2006）の中から、まず本州～九州に分布する常緑性のシダ植物の中から現在緑化植物としてすでに利用されているベニシダとオニヤブソテツと、それに加えナガバヤブソテツ、オオバノイノモトソウ、コモチシダを選定した。また、夏緑性ではあるがほぼ全国的に分布し、葉身がシダ植物の中では比較的大きくなる特徴を有することから、ゼンマイ、オシダ、イヌガンソク、オオヒメワラビを選定した。

【第Ⅱ章】では、孢子発芽に必要な温度条件、光条件のほかに、培地の種類、保存方法、孢子の重量、山菜としての利用頻度が与える影響を調べた。主に暖温帯に生育するベニシダとオニヤブソテツ、主に冷温帯に生育するオシダ、両気候帯に生育するゼンマイ、イヌガンソクの 5 種を対象として恒温 5 条件（10℃、15℃、20℃、25℃、30℃）で孢子の発芽試験を行った。その結果、平均発芽日数は 2～55 日と種によって異なるが、ゼンマイを除く 4 種では 25℃で最も早く、5 種ともに 10℃で最も遅かった。最終発芽率は 19～100%と各種で異なるが概ね 25℃で最大値を示した。ただし、イヌガンソクに限っては 20℃以下で 80%以上の値を示した。したがって、恒温条件下でも発芽は可能だと推察され、分布域は孢子

の発芽には影響しないと考えられた。また、10℃での平均発芽日数は遅いものの、最終発芽率は高くなることから、積算温度が明瞭な目安になる可能性も認められた。

さらに、イヌガンソク以外の4種を対象に、12時間ごとに温度を変えた変温3条件（15℃/5℃、25℃/15℃、35℃/25℃）で発芽試験を行った。その結果、平均発芽日数は2～27日と各種異なるが4種とも25℃/15℃で最も早く、15℃/5℃の条件が15℃恒温と10℃恒温に比べて遅かった。最終発芽率は0～95%と各種で異なるが4種とも25℃/15℃で最も高い値を示し、35℃/25℃で0～27%と30℃恒温よりも低い値を示した。

つぎに、光が孢子の発芽に影響するか調べるため、照度3条件（100 lux, 1,000 lux, 10,000 lux）と1日あたりの照射時間を3時間ずつ増やした9条件を組み合わせ、ベニシダとオニヤブソテツとゼンマイを対象に7日間の発芽試験を行った。最終発芽率は3種とも全照度条件において3 hr/dayの照射で最も低い値を示した。最終発芽率は0～75%と各種で異なったが、ベニシダは100 lux, 21hr/dayで71%、オニヤブソテツは1,000 lux, 21hr/dayで75%、ゼンマイは1,000 lux, 24hr/dayで42%とそれぞれ最も高い値を示した。3種とも照度に関係なく3hr/day以上の照射で発芽した。最高発芽率を得るには種によって照度は異なるが、21hr/day以上の照射が必要なが判明した。

また、光の波長（青色光、赤色光、遠赤色光）と照射時間の孢子発芽への影響を確認した。その結果、最終発芽率は0～89%と各種で異なるが、ベニシダでは赤

色光 (660nm) の 24hr/day 照射で 44%, オニヤブソテツでは赤色光の 24hr/day 照射で 89%, ゼンマイでは青色光 (450nm) の 21hr/day 照射で 27%とそれぞれ最も高い値を示し, 遠赤色光 (730nm) ではベニシダを除く 2 種で全照射時間において約 10%以下の値を示した。モエジマシダは赤色光 (660nm) によって孢子発芽が促進される (菅井 1973) ことから, ベニシダとオニヤブソテツも同様の傾向に当てはまると考えられる。一方でゼンマイの孢子は葉緑体を有するため, そこに含まれるフォトトロピンが青色光に反応する (末次ら 2013) ことで発芽が促されていると考えられる。

【第Ⅲ章】では, 前葉体成長に必要な温度・光条件の他に, 培地の種類, 播種密度の条件が与える影響を調べた。第Ⅱ章の実験にて得られたベニシダ, オシダ, イヌガンソクの前葉体を, 恒温 5 条件下で 90 日間生育させ前葉体形成までの経過を観察した。その結果, 前葉体の形成はベニシダでは 15~30°C, オシダとイヌガンソクでは 15~25°Cで確認された。主に暖温帯に生育するベニシダでは 30°Cでも前葉体は形成されたが, 主に冷温帯に生育するオシダは 30°Cでは原葉体が前葉体になるまでに枯死した。したがって, 主に冷温帯に生育する種は 30°C以上でも孢子発芽するものの前葉体の形成は困難である場合が考えられた。つまり, 分布域は前葉体形成時の温度条件の目安となる可能性がある。

また, 光条件が前葉体成長に影響するか調べるため, 第Ⅱ章の実験にて得られたベニシダ, オニヤブソテツ, ゼンマイの前葉体を用いて, 照度 (lux) と光の波長 (nm) による前葉体成長の関係を見た。照度条件において 100lux と

10,000lux では幼胞子体の形成は確認されなかったことから、前葉体の成長には 1,000lux が適していると考えられる。また、ゼンマイは全波長条件下にて幼胞子体の形成は確認されなかった。いずれの幼胞子体の形成数も遠赤色光照射で著しく少なかった原因には、フィトクロムなどの作用により（石崎 2013）原糸体の伸長が正常に行われず、前葉体形成に至らなかったことが考えられる。よって、前葉体の成長には青色光、赤色光が適していると考えられる。

【第IV章】では、幼胞子体を成長させるための密度条件、栽培容器の容量による実験を行った。ベニシダとオニヤブソテツを対象に密度（3, 15, 30, 50 個/1シャーレ）と前葉体成長の関係を調べた結果、両種とも密度が低いほど前葉体が大きくなる傾向が見られた。

【第V章】では、総合考察を行い本研究の総括をした。本研究では、緑化植物として有望と考えられるシダ植物 9 種を対象として、胞子の発芽とその後の前葉体の成長に与える主に温度および光条件の効果について実験し、検討した。その結果、胞子の発芽条件は、イヌガンソクを除く 8 種では 25°C前後が最適温度で、10°C未満では発芽が抑制され、30°Cを超えると胞子が死滅する可能性が考えられた。イヌガンソクはこれらの傾向とは異なり、より低い 10~20°Cが最適温度だったことから、生理特性が他の 8 種とは大きく異なることが考えられた。発芽率は、種によって 53~100%と大きく異なったが、胞子の採取量は一般に大量となることが多いことから、最低でも 20%程度認められれば、発芽後の個体数確保には支障はないと判断する。前葉体の成長は全 9 種とも 15~25°Cが適し、

幼孢子体の形成には青色光, 赤色光を照射することで, 孢子発芽から円滑に栽培できることが判明した。以上より, 孢子発芽と前葉体成長に関する本研究はシダ植物の増殖技術に応用できると考え, 従来ではオシダやイヌガンソクなど地中の根茎が匍匐しない株分けが難しい種でも増殖可能なことを示し, シダ植物を緑化植物として利用展開できる可能性を示唆した。

SUMMARY

Approximately 700 species of ferns grow in Japan (Ebihara 2010), and these species show wide variations, such as characteristic leaf shapes and shade tolerance, making them promising candidates as green plants in urban areas (Hirata, 1993; Murakami, 2019). However, at present, there are more than a dozen species used for greening, such as *Dryopteris* and *Cyrtomium*, which are not significantly different from the species used in landscaping work in the 1800s (Nishimura 2015). While most fern plants can propagate by spores, in practice they are generally propagated by straining. However, while strain division is a simple breeding technique, it is not suitable for mass breeding, and it is difficult to apply to species such as *Dryopteris crassirhizoma* and *Onoclea orientalis*, whose rhizomes do not crawl. The use of the technique is not expected to expand. Therefore, I have focused on a proliferation technology using spores to solve this problem, which is fundamentally different from the stock division technology that has been the mainstream approach used until now.

To date, spores of ferns germinate and grow if there is appropriate water, temperature, and light. It is known that the germination conditions differ depending on the species (Ito 1972), and it is expected that this will be applied to breeding technology. Few research studies have been conducted. Therefore, in this study, I will clarify the temperature and light conditions as requirements to satisfy the germination of spores and the subsequent growth of the prothallus of nine fern species that are considered as promising green plants and apply these to proliferation technology. An experiment was conducted for this purpose.

The significance of this study has been demonstrated in **Chapter I**, wherein the phylogenetic classification of fern plants and their life cycles have been described and the history of breeding technology has been summarized. The species used in this experiment were selected on the premise that the target

species were not limited by the necessity for an indoor or outdoor environment and could be easily used to achieve scenic greening in urban areas.

For scenic greening, species with a wide distribution area, evergreen species that retain their leaves even in the winter, and species with a wide leaf shape, that significantly contribute to the green cover were preferred. Species were selected from 90 species of locally occurring fern plants (Murata 2006) in Japan and were considered to be test plants. First, among the evergreen fern plants distributed from Honshu to Kyushu, the *Dryopteris erythrosora* plant, which has already been used as a greening plant, was selected, along with *Cyrtomium falcatum*, *Pteris cretica*, and *Woodwardia orientalis*. Almost nationwide and has relatively larger leaf blades compared to other ferns, *Dryopteris crassirhizoma*, *Osmunda japonica*, *Onoclea orientalis*, and *Deparia okuboana* were selected as the test plants.

Chapter II describes how the optimal temperature and light conditions required for spore germination, medium type, storage method, spore weight, and frequency of use as wild plants were determined. The following five species were targeted at constant temperatures (10 °C, 15 °C, 20 °C, and 25 °C, 30 °C): *Cyrtomium falcatum*, *Dryopteris erythrosora*, which grow mainly in warm temperate zones; and *Dryopteris crassirhizoma* which grow mainly in cold temperate zones; and *Onoclea orientalis*, *Osmunda japonica*, which grows in both climate zones. A spore germination test was also performed. The average germination time varied from 2 to 55 days, depending on the species; however, four species, with the exception of the mainspring, were the earliest to germinate at 25 °C, and germination was the slowest in all five species at 10 °C. The final germination rate varied from 19% to 100%, but was maximal at approximately 25 °C; however, *Onoclea orientalis* had a germination rate of $\geq 80\%$ at a temperature ≤ 20 °C. Therefore, it was inferred that germination was possible even under homeothermic conditions, and the distribution area did not affect spore germination. In addition, although, on an average, germination occurred slowly at 10 °C, the final germination rate

was high; hence, it is possible that an integrated temperature control system could act as a useful guide.

Furthermore, germination tests were conducted on four species other than *Onoclea orientalis*, after changing the temperatures thrice (15 °C / 5 °C, 25 °C / 15 °C, 35 °C / 25 °C) every 12 h/12h. The average germination time varied from 2 to 27 days, but optimum germination temperature for all four species was the same, *i.e.*, 25 °C / 15 °C; temperatures of 15 °C / 5 °C resulted in slower germination than that observed at constant temperatures of 15 °C and 10 °C. The final germination rate was 0%–95%, and it was different for each species; however, all four species showed the highest germination rates at 25 °C / 15 °C. On the contrary, germination rates of 0%–27% were observed at temperatures of 35 °C / 25 °C, which were lower than those observed at a constant temperature of 30 °C.

Next, I investigated whether light affects spore germination at three illuminance conditions (100 lx, 1,000 lx, and 10,000 lx) and nine conditions under which the irradiation time per day was increased by 3 h, using the *Dryopteris erythrosora* and *Cyrtomium falcatum*. A 7-day germination test was conducted on the mainspring. The final germination rate of all three species was the lowest after they were irradiated for 3 h/day under all illuminance conditions. The final germination rate varied from 0 to 75%, with the germination rate of the *Dryopteris erythrosora* receiving 100 lx of illuminance 21 h/day being 71%. The germination rate of *Cyrtomium falcatum* receiving 1,000 lx of illuminance 21 h/day was 75%, and that of the spring plant receiving 1,000 lx of illuminance 24 h/day was 42%. Each sample showed the highest value. All three species were germinated via irradiation for a period ≥ 3 h/day, regardless of the level of illuminance. It was found that irradiation for a period of ≥ 21 h/day was required to achieve the maximum germination rate, although the level of illuminance required varied depending on the species.

I also confirmed the effects of light wavelengths (blue light, red light, and

far-red light) and irradiation periods on spore germination. The final sprouting rate varied from 0% to 89%, but in the *Dryopteris erythrosora*, sprouting rate was 44% with red light (660 nm) and 24 h/day irradiation, and *Cyrtomium falcatum* sprouting rate was 89% with red light and 24 h/day irradiation. In *Osmunda japonica*, the use of blue light and 21 h/day irradiation at 450 nm resulted in the highest value of 27%, and the use of far-red light (730 nm) resulted in a value of approximately $\leq 10\%$ in the total irradiation time for the *Dryopteris erythrosora*, *Cyrtomium falcatum*). Since spore germination in *Pteris vittata* is promoted by exposure to red light (660 nm) (Sugai 1973), the same tendency is considered to be applicable to the *Dryopteris erythrosora* and *Cyrtomium falcatum*. On the other hand, since the spores of the mainspring have chloroplasts, the phototropin contained therein was considered to have reacted with blue light (Suetsugu et al. 2013), to promote germination.

In Chapter III, the effects of the medium type and seeding density conditions were investigated, along with the temperature and light conditions required for prothallus growth. The protonemata of the *Dryopteris erythrosoras*, *Dryopteris crassirhizoma*, and *Onoclea orientalis*, obtained from the experiments described in Chapter II, were grown for 90 days under five constant temperature conditions and progress was observed until prothallus formation occurred. Formation of the prothallus was confirmed at 15–30 °C in the *Dryopteris erythrosoras* and at 15–25 °C in *Dryopteris crassirhizoma* and *Onoclea orientalis*. The prothallus pituitary was formed even at 30 °C in the *Dryopteris erythrosora*, which grows mainly in warm temperate zones; *Dryopteris crassirhizoma*, which grows mainly in cool temperate zones, died before the protonema became the prothallus pituitary at 30 °C. Therefore, it was thought that though the spores of species that grow mainly in the cool temperate zone could germinate even at temperatures ≥ 30 °C, it may be difficult for prothallus formation to occur in such species. In other words, the distribution area may enable us to understand the optimal temperature

conditions during prothallus formation.

Additionally, in order to investigate whether light conditions affect the growth of the prothallus, the protonema of the *Dryopteris erythrosora*, *Cyrtomium falcatum*, and the *Osmunda japonica* obtained from the experiments described in Chapter II were used, and species were subjected to a certain illuminance (lux) and wavelength of light (nm). Furthermore, I observed the relationship between prothallus growth and young sporophyte growth density. Since young sporophyte formation was not confirmed at illuminance values of 100 lx and 10,000 lx, an illuminance value of 1,000 lx was considered to be suitable for prothallus growth. In addition, the formation of young sporophytes was not confirmed in the mainspring under all wavelength conditions. The formation of an extremely small number of young sporophytes after irradiation with far-red light was attributable to the protonema not stretching normally due to the action of the phytochrome (Ishizaki 2013), which resulted in no prothallus pituitary formation. Therefore, illumination with blue and red light was considered to be suitable for the growth of the prothallus.

The experiments described in **Chapter IV** were based on the density of young sporophyte growth and cultivation container capacity. Investigation of the relationship between the density (3, 15, 30, 50 pieces/petri dish) and prothallus growth in the *Dryopteris erythrosora* and *Cyrtomium falcatum* showed that the lower the density of both species, the larger the size of the prothallus.

Chapter V, I conducted experiments to examine the effects of temperature and light conditions on spore germination and the subsequent prothallus growth of these selected nine fern species. As a result, the optimum temperature for the germination of spores was around 25°C for eight species except *Onoclea orientalis*, germination was suppressed below 10°C, and spores may die above 30°C. Unlike these species, *O. orientalis* had an optimum temperature of 10–20°C, which suggests that its physiological

characteristics are significantly different from those of the other eight species. The germination rate varied greatly from 53% to 100% depending on the species, but since the number of spores collected is generally large, if at least 20% germinate, there will be no problem securing a sufficient number of germinating individuals. It was found that the growth of the prothallus at 15–25 °C was suitable for all nine species, and that the formation of young sporophytes can be smoothly cultivated from prothallus by irradiation with blue and red light. Based on the above, I believe that this study on spore germination and prothallus growth can be applied to the growth technology of ferns and showed that it is possible to even grow species that are difficult to divide, such as *D. crassirhizoma* and *O. orientalis*. I suggest that the plants could be developed and used as green plants.