

緑色胞子を持つシダ植物3種（スギナ、ゼンマイ、クサソテツ）における 標本胞子の発芽可能性の評価

Germination potential of herbarium specimen spores of three green-spored fern species: *Equisetum arvense*, *Osmunda japonica* and *Matteuccia struthiopteris*

石黒 皓大^{1,2}, 大場 拓郎^{1,3}, 志賀 隆¹
Kodai Ishiguro^{1,2}, Takuro Oba^{1,3}, Takashi Shiga¹

Abstract

This study aimed to clarify the germination potential of fern spores and the relationship between time elapsed since preparation and decrease in germinability. In general, green spores have a shorter viability compared to non-green spores. The spore viability of several green-spored fern lineages (*Equisetum arvense* L., Equisetaceae; *Osmunda japonica* Thunb., Osmundaceae; *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod., Onocleaceae) was assessed using the tetrazolium salt staining test and spore germinability was directly estimated through germination tests. Eighteen specimens of *E. arvense*, 22 specimens of *O. japonica*, and 16 specimens of *M. struthiopteris* were obtained from five herbaria (NGU, OSA, TNS, TUS, SAPS). The specimen spores of *E. arvense* and *O. japonica* did not germinate and were not stained by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). Only one spore from the specimen *M. struthiopteris*, which was collected 21 years (255 months) ago, germinated.

Key words: Chlorophyll-containing spore, Herbarium specimen, Tetrazolium staining test, Triphenyltetrazolium chloride

1. はじめに

植物標本とは対象植物の持つ果実の有無や個体差などの特徴が半永久的に保存されるように処理され、「いつ」「どこで」「だれが」採集したものであるか等の情報が記述されたラベルが付されたもので

ある (Bridson and Forman 1998)。これらの植物標本は生物名の根拠としてのタイプ標本や、学術研究の証拠、同定のための資料として製作・保存されている。それだけではなく、分類学的研究や生態学的研究、分子生物学的研究に使用されるなど、植物標本は高い学術的価値を有している (例えば、鈴木 2007, Wandeler et al. 2007, 兼子ほか 2013, 坪田ほか 2014)。博物館や大学の標本庫には100年以上前から現在に至るまで、膨大な植物標本が収められており、全世界に少なくとも3.98億点の標本が存在する (Thiers 2022)。

また、植物標本に残されている種子や胞子 (以下それぞれを「標本種子」、「標本胞子」と呼ぶ) の一部は発芽能力を有していることが知られている (例えば、Johnson 1985, Magrini et al. 2010, Magrini

2023.10.23 受理

¹ 新潟大学教育学部 (Faculty of Education, Niigata University)

² 現在の所属：新潟大学大学院教育実践学研究科 (Professional School of Teacher Education, Niigata University)

³ 現在の所属：農山漁村文化協会 (Rural Culture Association Japan)

2011, 平澤ほか 2016, Wolkis et al. 2021)。このような発芽能力を持つ標本種子や標本胞子から新たに植物体を得て、絶滅した種の復元や、種内の遺伝的多様性を回復させる取り組みも検討されている(例えば, Molnár et al. 2015, Nakahama et al. 2015)。志賀ほか(2017)では、131種の種子植物において発芽試験による発芽可能性の評価と、テトラゾリウム染色試験による生存識別が行われており、約18%の種(24種)で発芽が確認され、約61%の種(84種)の標本種子の生存が確認されている。

しかし、標本種子の発芽可能性の検討が進展する一方、シダ植物・蘚苔類といった胞子繁殖を行う植物について、標本胞子の発芽可能性を検討した例は、*Osmunda regalis* L. (ゼンマイ科Osmundaceae; Magrini et al. 2010) や、*Marsilea oligospora* Goodd. (デンジソウ科Marsileaceae; Johnson 1985), *Pellaea truncate* Goodd. (イノモトソウ科Pteridaceae; Windham et al. 1986) などに限られる。また、これらの研究で用いられた標本胞子は年代に偏りが見られ、*O. regalis*では、標本作製後の時間経過が5年と17年という比較的新しい標本胞子のみを(Magrini et al. 2010)、*M. oligospora*では、時間経過が71年、77年、89年といった古い標本胞子を用いて行われている(Johnson 1985)。これらでは、標本胞子の発芽の報告に重点が置かれており、標本作製後の時間経過と胞子の発芽能力喪失の関係の詳細は明らかにされていない。更に、これらの研究は胞子繁殖を行う維管束植物の中でも一部の分類群を対象としている。そのため、ヒカゲノカズラ類や大葉シダ類全体における標本胞子の発芽可能性を評価するためには、系統を幅広く網羅して標本胞子の発芽可能性を明らかにする必要がある。

また、シダ植物の中には胞子内部に葉緑体を持つ緑色胞子を持つ種が存在することが知られている(Raghavan 1989)。トクサ科(Equisetaceae)、コケシノブ科(Hymenophyllaceae)、コウヤワラビ科(Onocleaceae)、ゼンマイ科、ウラボシ科(Polypodiaceae)を中心に1,000種以上、イノモトソウ科、シシガシラ科(Blechnaceae)、ツルキジノオ科(Lomariopsidaceae)からも緑色胞子を持つ種が報告されている(Sundue et al. 2011)。この緑色胞子は成熟して散布されて以降の生存期間が非緑色胞子と比較して短いことが指摘されている(Lloyd and Klekowski 1970)。そのため、緑色胞子を持つ種では、乾燥処理や長期保存処理を受けている博物館標本の胞子から発芽個体を得ることは難しいと予

想されるが、前述の様に緑色胞子を持つゼンマイ科の*O. regalis* (Magrini et al. 2010) では10年以上経過した標本胞子からの発芽が確認されている。他の緑色胞子を持つ種においても、博物館標本に残された胞子から発芽が確認されるかもしれない。

そこで本研究では、シダ植物の標本胞子の発芽可能性や、標本作製年からの時間経過と発芽能力の低下の関係を明らかにするために、胞子寿命が短いと考えられる緑色胞子を持つシダ植物に注目し、スギナ*Equisetum arvense* L. (トクサ科)、ゼンマイ*Osmunda japonica* Thunb. (ゼンマイ科)、クサソテツ*Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. (コウヤワラビ科)の標本胞子について、1) テトラゾリウム塩による胞子の簡易的な生存評価、2) 発芽試験による発芽能力の直接評価を行った。

2. 材料と方法

2-1. 研究対象種

本研究では、系統群横断的に試験を行うために、日本全国に広く分布している2倍体種であるスギナ(トクサ科、生殖様式不明)、ゼンマイ(ゼンマイ科、有性生殖種)、クサソテツ(コウヤワラビ科、有性生殖種)の3種(海老原 2016)を対象種とした(Tables 1~3)。これら3種は緑色胞子を持つことが知られている(Lloyd and Klekowski 1970, 倉田・中池 1990, Sundue et al. 2011)。

2-2. 胞子の収集

標本胞子は新潟大学植物標本庫(NGU)、大阪市立自然史博物館植物標本庫(OSA)、国立科学博物館植物標本庫(TNS)、北海道大学総合博物館植物標本庫(SAPS)、東北大学植物園(TUS)より標本経過月数0~1,095ヶ月(経過年数0~91年)の標本、計59標本から胞子を採集した(Tables 1~3)。

胞子を採集するにあたり標本を破壊しないよう以下の点に留意した。すなわち、同年代の標本であれば、種子袋が貼付された標本を優先し、種子袋内の葉包紙に包まれた胞子の採集を行った。また、種子袋が貼付されていない標本から胞子を採集する場合は、十分に成熟した胞子嚢を付けた羽片の下に葉包紙を置き、柄付き針やピンセットで胞子嚢群をなでるように胞子をこそぎ落として採集した。なお、違う標本由来の胞子の混入を避けるため、柄付き針とピンセットを70%エタノールで拭き取った後、手と作業台も同様にエタノール消毒を行い、次の採集作

Table 1. The herbarium specimens of *Equisetum arvense* L. (Equisetaceae) were used for the experiments. The specimens are listed from newest to oldest. The time elapsed since specimen preparation and ratios of germination and staining (%) are also shown. Specimen no. 1 was used as a control sample. Abbreviations of herbaria: NGU, The Niigata University Herbarium; TNS, National Museum of Nature and Science.

No.	Locality	Date	Elapsed Time [years (month)]	Germination (%)	Staining (%)	Voucher information
1	Niigata Pref., Niigata-shi	Mar. 30, 2023	0 (0)	92.0 ± 4.3	76.8 ± 2.6	K. Ishiguro K4003 (NGU14838)
2	Niigata Pref., Niigata-shi	Apr. 7, 2022	0.42 (5)	0 ± 0	0 ± 0	K. Ishiguro K3002-3005 (NGU14586-14589)
3	Niigata Pref., Niigata-shi	Mar. 30, 2021	1.42 (17)	0 ± 0	0 ± 0	T. Oba s.n. (NGU)
4	Niigata Pref., Niigata-shi	Apr. 5, 2021	1.50 (18)	0 ± 0	0 ± 0	T. Oba s.n. (NGU)
5	Saitama Pref., Chichibu-shi	Apr. 12, 2002	20.42 (245)	0 ± 0	0 ± 0	T. Iwata 64615 (TNS1145222)
6	Kanagawa Pref., Yokohama-shi	Sep. 16, 1993	29.00 (348)	0 ± 0	0 ± 0	Toma s.n. (TNS1169389)
7	Saitama Pref., Chichibu-shi	Apr. 17, 1988	34.42 (413)	0 ± 0	0 ± 0	T. Iwata 8364 (TNS1145568)
8	Shizuoka Pref., Susono-shi	Apr. 11, 1987	35.42 (425)	0 ± 0	0 ± 0	F. Konta & T. Miyazawa 67 (TNS924451)
9	Saitama Pref., Nagatoro-machi	Apr. 8, 1985	37.42 (449)	0 ± 0	0 ± 0	T. Iwata 4150 (TNS1145625)
10	Gifu Pref., Hida-shi	Apr. 16, 1983	39.42 (473)	0 ± 0	0 ± 0	H. Nagase s.n. (TNS537416)
11	Yamaguchi Pref., Shimonoseki-shi	Mar. 30, 1983	39.50 (474)	0 ± 0	0 ± 0	A. Minami 38332 (TNS446183)
12	Fukuoka Pref., Munakata-shi	Mar. 26, 1977	45.50 (546)	0 ± 0	0 ± 0	S. Tsutsui 13528 (TNS555487)
13	Kagoshima Pref., Kagoshima-shi	Mar. 31, 1975	47.50 (570)	0 ± 0	0 ± 0	Y. Jotani 36210 (TNS834651)
14	Shizuoka Pref., Shizuoka-shi	Apr. 12, 1974	48.42 (581)	0 ± 0	0 ± 0	F. Konta 10246 (TNS924449)
15	Oita Pref., Shonai-cho	May 5, 1973	49.33 (592)	0 ± 0	0 ± 0	S. Tsutsui 9205 (TNS516661)
16	Nagano Pref., Ooshika-mura	Jul. 28, 1971	51.17 (614)	0 ± 0	0 ± 0	M. Fukuhara 3468 (TNS932563)
17	Nara Pref.	Apr. 3, 1962	60.42 (725)	0 ± 0	0 ± 0	T. Okamoto 5301 (TNS1017464)
18	Yamagata Pref., Fujishima-machi	Apr. 29, 1959	63.42 (761)	0 ± 0	0 ± 0	N. Kato s.n. (TNS1231250)
19	Tokyo Pref., Oshima-machi	Mar. 27, 1937	85.50 (1026)	0 ± 0	0 ± 0	M. Kikutsugi 3249 (TNS801354)

Table 2. The herbarium specimens of *Osmunda japonica* Thunb. (Osmundaceae) were used for the experiments. The specimens are listed from newest to oldest. The time elapsed since specimen preparation and ratios of germination and staining (%) are also shown. Specimen no. 1 was used as a control sample. Abbreviations of herbaria: NGU, The Niigata University Herbarium; OSA, Osaka Museum of Natural History; TNS, National Museum of Nature and Science.

No.	Locality	Date	Elapsed Time [years (month)]	Germination (%)	Staining (%)	Voucher information
1	Niigata Pref., Shibata-shi	May 13, 2023	0 (0)	67.8 ± 5.1	87.1 ± 7.1	K. Ishiguro K4000 (NGU014835)
2	Niigata Pref., Niigata-shi	May 1, 2022	0.25 (3)	0 ± 0	0 ± 0	K. Ishiguro K3000, K3001 (NGU14584, 14585)
3	Niigata Pref., Niigata-shi	Apr. 28, 2022	0.33 (4)	0 ± 0	0 ± 0	K. Ishiguro s.n. (NGU)
4	Niigata Pref., Niigata-shi	May 10, 2021	1.25 (15)	0 ± 0	0 ± 0	T. Oba s.n. (NGU12979-12983)
5	Osaka Pref., Nose-cho	Sep. 4, 2020	1.92 (23)	0 ± 0	0 ± 0	T. Umehara 11292 (OSA321897)
6	Fukushima Pref., Fukushima-shi	Apr. 25, 2015	7.33 (88)	0 ± 0	0 ± 0	K. Shutoh & M. Yamaguchi 1385 (NGU5233)
7	Nara Pref., Nara-shi	Sep. 11, 2006	15.92 (191)	0 ± 0	0 ± 0	K. Seto 64874 (OSA242406)
8	Mie Pref., Shinoda-shi	Apr. 26, 2006	16.33 (196)	0 ± 0	0 ± 0	K. Seto 64245 (OSA)
9	Nara Pref., Nara-shi	Aug. 14, 2004	18.00 (216)	0 ± 0	0 ± 0	K. Seto 62481 (OSA242694)
10	Nara Pref., Tsuge-mura	May 18, 2003	19.17 (230)	0 ± 0	0 ± 0	K. Seto 60675 (OSA196466)
11	Nara Pref., Uekitayama-mura	Jun. 6, 2003	19.25 (231)	0 ± 0	0 ± 0	K. Seto & N. Morimoto 60827 (OSA242546)
12	Hyogo Pref., Miki-shi	Apr. 22, 2002	20.33 (244)	0 ± 0	0 ± 0	T. Shiga 3051 (OSA234662)
13	Mie Pref., Owase-shi	Apr. 1, 2001	21.33 (256)	0 ± 0	0 ± 0	K. Seto 54536 (OSA160105)
14	Mie Pref., Kameyama-shi	Apr. 29, 2000	22.33 (268)	0 ± 0	0 ± 0	K. Seto 52743 (OSA196129)
15	Nara Pref., Haibara-cho	May 11, 1997	25.25 (303)	0 ± 0	0 ± 0	K. Seto 47256 (OSA103212)
16	Shiga Pref., Minaluchi-cho	Apr. 24, 1990	32.33 (388)	0 ± 0	0 ± 0	T. Umehara 3626 (OSA85565)
17	Giftu Pref., Takayama-shi	Apr. 29, 1983	39.33 (472)	0 ± 0	0 ± 0	H. Nagase s.n. (TNS54569)
18	Fukuoka Pref., Tagawa-shi	Apr. 28, 1974	48.33 (580)	0 ± 0	0 ± 0	S. Tsutsui 10081 (TNS486380)
19	Osaka Pref., Kanran-cho	Apr. 27, 1968	54.33 (652)	0 ± 0	0 ± 0	K. Seto 17148 (OSA5233)
20	Osaka Pref., Osaka-shi	Apr. 23, 1961	61.33 (736)	0 ± 0	0 ± 0	T. Kodama 8977 (OSA)
21	Kyoto Pref., Kyoto-shi	May 5, 1957	65.25 (783)	0 ± 0	0 ± 0	M. Tagawa & K. Iwatsuki 781 (OSA140527)
22	Osaka Pref., Yao-shi	Apr. 22, 1956	66.33 (796)	0 ± 0	0 ± 0	M. Hori s.n. (OSA)
23	Shiga Pref., Otsu-shi	May 17, 1931	91.25 (1095)	0 ± 0	0 ± 0	M. Tagawa s.n. (OSA52473)

Table 3. The herbarium specimens of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. (Onocleaceae) were used for the experiments. The specimens are listed from newest to oldest. The time elapsed since specimen preparation and ratios of germination and staining (%; average \pm SD) are also shown. Specimen no. 1 was used as a control sample. Abbreviations of herbaria: NGU, The Niigata University Herbarium; SAPS, Herbarium of Hokkaido University Museum; TUS, Graduate School of Science, Tohoku University. The asterisk (*) indicates that one spore of this specimen germinated (see text).

No.	Locality	Date	Elapsed Time [years (month)]	Germination (%)	Staining (%)	Voucher information
1	Niigata Pref., Niigata-shi	Nov. 11, 2022	0 (0)	55.8 \pm 3.4	26.2 \pm 4.2	T. Shiga 12223 (NGU12988)
2	Aomori Pref., Towada-shi	Oct. 12, 2016	7.00 (84)	0 \pm 0	0 \pm 0	K. Yonekura et al. 23903 (TUS489615)
3	Akita Pref., Kosaka-machi	Oct. 14, 2016	7.00 (84)	0 \pm 0	0 \pm 0	K. Yonekura et al. 23946 (TUS489673)
4	Aomori Pref., Aomori-shi	Sep. 4, 2015	8.00 (96)	0 \pm 0	0 \pm 0	K. Yonekura 22862 (TUS494461)
5	Hokkaido Pref., Tsukigata-cho	Aug. 23, 2008	14.33 (172)	0 \pm 0	0 \pm 0	C. Takeda 9183 (SAPS55133)
6	Hokkaido Pref., Hamanaka-cho	Aug. 31, 2004	18.33 (220)	0 \pm 0	0 \pm 0	H. Takahashi et al. 31609 (SAPS65878)
7	Akita Pref., Oga-shi	Sep. 23, 2003	20.00 (240)	0 \pm 0	0 \pm 0	K. Yonekura et al. 10847 (TUS303604)
8	Hokkaido Pref., Hidaka-cho	Sep. 25, 2001	21.17 (254)	0 \pm 0	0 \pm 0	K. Oita et al. 01-6916 (SAPS65879)
9	Hokkaido Pref., Mukawa-cho*	Aug. 21, 2001	21.25 (255)	0.0 \pm 0.0*	0 \pm 0	K. Oita 01-8042 (SAPS65877)
10	Hokkaido Pref., Samani-cho	Aug. 3, 1996	26.17 (314)	0 \pm 0	0 \pm 0	H. Yamaji 2226 (TUS374976)
11	Hokkaido Pref., Samani-cho	Sep. 11, 1996	27.00 (324)	0 \pm 0	0 \pm 0	H. Yamaji 2230 (TUS374975)
12	Hokkaido Pref., Shirunai-cho	Aug. 18, 1996	27.00 (324)	0 \pm 0	0 \pm 0	H. Takahashi et al. 22381 (SAPS65876)
13	Hokkaido Pref., Tsubetsu-cho	Sep. 27, 1994	29.00 (348)	0 \pm 0	0 \pm 0	K. Yonekura & K. Terada 94891 (TUS261303)
14	Miyagi Pref., Iwanuma-shi	Oct. 16, 1990	33.00 (396)	0 \pm 0	0 \pm 0	T. Koga & T. Kurosawa s.n. (TUS328459)
15	Yamaguchi Pref., Iwakuni-shi	Sep. 23, 1982	41.00 (492)	0 \pm 0	0 \pm 0	A. Minami 33048 (TUS273442)
16	Miyagi Pref., Sendai-shi	Nov. 7, 1969	54.00 (648)	0 \pm 0	0 \pm 0	K. Sohma 1538 (TUS)
17	Tokyo Pref. Hachioji-shi	Nov. 3, 1961	62.00 (744)	0 \pm 0	0 \pm 0	H. Oba 1375 (TUS1375)

業を行った。

標本作成処理が施されていないコントロール試料として、スギナ22株、ゼンマイ3株、クサソテツ1株をそれぞれ2023年3月30日、5月13日、2022年11月11日に新潟県新潟市において採集し、各株から得た胞子を混合して試験に供した。収集した標本胞子とコントロール試料は、スギナは19（1937年～2023年；Table 1）、ゼンマイは23（1931年～2023年；Table 2）、クサソテツは17（1961年～2022年；Table 3）であった。これらの胞子試料は、実験に供するまで光や湿度、温度等の影響を排除するために密閉容器に入れてアルミホイルで遮光し、室温25°Cで保管した。

2-3. テトラゾリウム染色試験

シダ植物胞子の生存を簡易的に評価するために、テトラゾリウム染色試験（Cottrell 1947, 畑野 1952）を行い、ミトコンドリア活性を確認した。胞子に存在するミトコンドリアに活性がある場合、

好気呼吸の過程においてテトラゾリウム塩を還元して不溶性のホルマザン塩が生成される。テトラゾリウム塩に2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) を用いる場合は赤色のホルマザン塩 (triphenyl formazan salt) が生成され、胞子が赤色に呈色する。TTCによる染色方法はCatala et al. (2009) の試験方法を参考にを行い、pH8.0に調整した1% TTCを染色試験に用いた。

試験前処理として胞子を1.5mlチューブに入れ、蒸留水1.0mlに24時間浸けて給水させた。その後、蒸留水による洗浄を3度行い、0.1%次亜塩素酸ナトリウムNaClOを1.0ml加えて5分間胞子を漂白した。漂白後は遠心分離で胞子を沈殿させ上澄みを除去した。

胞子の漂白と洗浄を行った後、TTC溶液を1.0ml加えて、25°C暗条件下で48時間静置し染色を行った。染色終了後、蒸留水で3度洗浄し呈色を確認した。ゼンマイ、クサソテツは1試料につきランダムに抽出した200粒、スギナは100粒について確認し、

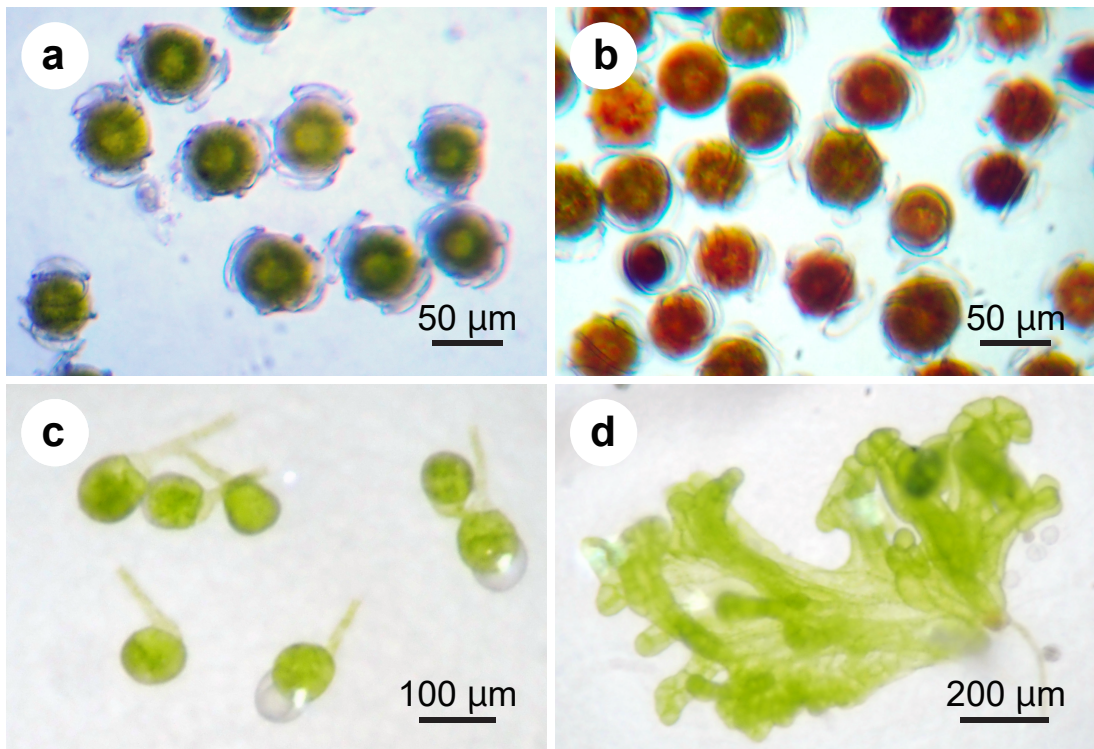


Figure 1. Spores and prothallium of *Equisetum arvense* L. (Equisetumaceae). a) Spores before staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). b) Living spores stained with TTC. c) Germinated spores. d) Prothallium growing after germination.

これを3反復行った。染色の評価は目視によって「明瞭に呈色」、「薄いもしくは一部呈色」、「呈色なし」の3段階に分け、明瞭に呈色されたもののみを生存している呈色胞子として扱い、呈色率を算出した (Figs. 1~3)。

2-4. 発芽試験

発芽試験は、*O. regalis*と*D. tyrrhena*の標本胞子の発芽に成功したMagrini et al. (2010) の試験方法や、スギナ (中谷ほか 1996, Lebkuecher 1997), ペニシダ*D. erythrosora* (松浦・林 2013), クサソテツ (Nekrasov et al. 2019) において過去に用いられた試験を参考に行った。

試験前処理として胞子を24時間蒸留水に浸け給水させた後、蒸留水で洗浄を3回行った。洗浄した胞子には、0.1%次亜塩素酸ナトリウムNaClOを1.0ml加え、5分間の滅菌処理を施し、再度洗浄を行った。

胞子の発芽培地 (1%寒天培地) は、スギナではKnop液 (Knop 1865), ゼンマイとクサソテツでは

Nekrasov et al. (2019) を参考に、1/2 Murashige and Skoog (MS) 培地 (pH5.8) を使用した。それぞれの培地は、オートクレーブによる高圧蒸気滅菌処理を行い、抗生物質であるナイスタチンを培地全体量に対して0.1w/w%添加した。1シャーレに対してスギナでは胞子を200粒、ゼンマイは300粒、クサソテツは500粒を実体顕微鏡下で播き出した。

発芽条件はスギナでは20℃, ゼンマイとクサソテツでは25℃, 光粒子密度33.52~62.58 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-2}$, 明暗12時間の日長周期で行った。数日おきに経過を観察し、40日後にシャーレ全体の胞子発芽率を求めた。上記発芽試験は恒温庫 (インキュベーターMIR-253, サンヨー) を用いて各試料につき6反復を行った。また、標本胞子からの発芽が確認された場合、同じ試料を用いて再試を行った。

3. 結果

スギナ18標本の胞子は、TTC染色試験において、

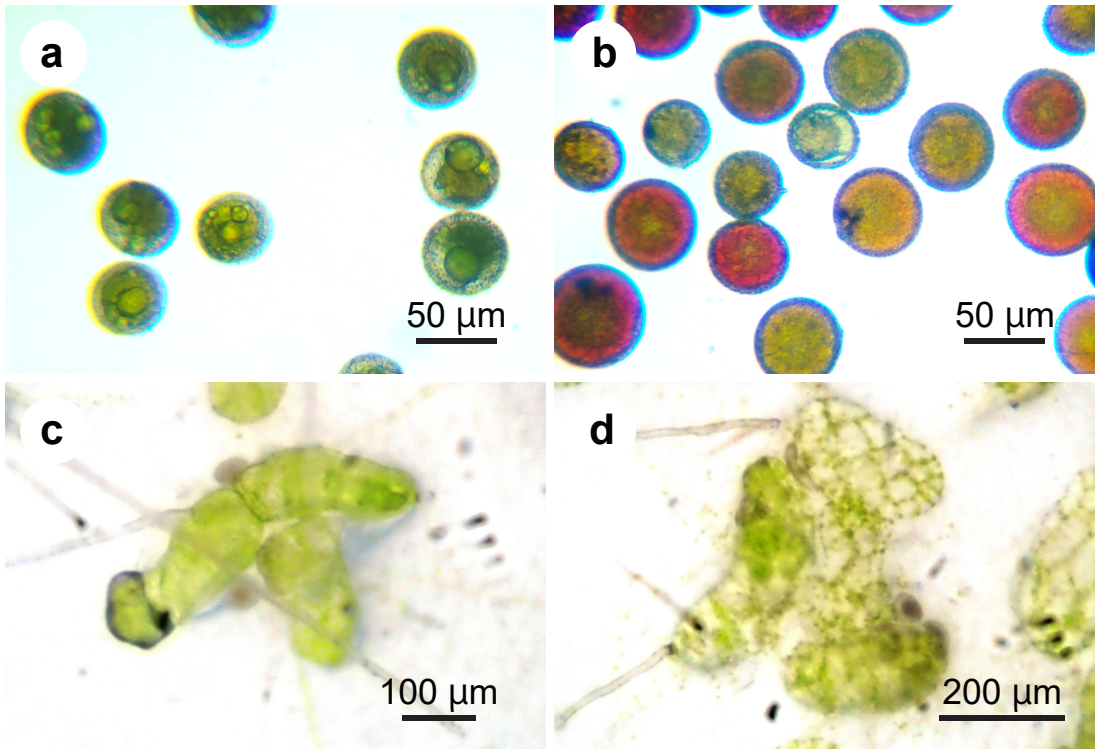


Figure 2. Spores and prothallium of *Osmunda japonica* Thunb. (Osmundaceae). a) Spores before staining with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). b) Living spores stained with TTC. c) Germinated spores. d) Prothallium growing after germination.

最も経過月数が短い5ヶ月を含む全試料で呈色は確認されず、生存率は0%であった。また、全試料において発芽は確認されなかった (Table 1)。コントロール試料の胞子の呈色率は $76.8 \pm 2.6\%$ 、発芽率は $92.0 \pm 4.3\%$ であった (Table 1)。

ゼンマイ22標本の胞子は、TTC染色試験において最も経過月数が短い3ヶ月を含む全試料で呈色は確認されず、生存率は0%であった。また、全試料において発芽は確認されなかった (Table 2)。コントロール試料の胞子の呈色率は $87.1 \pm 7.1\%$ 、発芽率は $67.8 \pm 5.1\%$ であった (Table 2)。

クサソテツ16標本の胞子は、TTC染色試験において呈色は確認されず、スギナ、ゼンマイと同様に生存率は0%であった (Table 3)。標本作成からの経過月数255ヶ月 (経過年数21年) の標本胞子 (K. Oita 01-8042, SAPS65877) において播種した合計3,094粒のうち1粒の発芽が確認された (Fig. 4, Table 3)。この標本胞子について、改めて発芽試験 (約500粒 \times 6 反復) を行ったが、合計3,002粒から

発芽は確認されなかった。コントロール試料の胞子の呈色率は $26.2 \pm 4.2\%$ 、発芽率は $55.8 \pm 3.4\%$ であった (Table 3)。

4. 考察

本研究において発芽が確認されたクサソテツの標本 [標本作成からの経過月数255ヶ月 (経過年数21年)] の胞子は、再試も含めると6,096粒を播種したうちの1粒のみであった。この胞子発芽が確認された発芽試験の播種は、2023年1月7日に当該の標本胞子試料のみを扱い試験を行った。また、試験に用いた器具はすべて洗浄に加え、高压蒸気滅菌 (121℃, 2気圧) 40分処理を施した器具を使用しているため、試験前後に他の試料の胞子が混入することは考えられない。また、試験中もシールしたシャーレを開封することは無かったため、他試料が混入の可能性は極めて低く、発芽した胞子は当該標本もしくは標本庫内の他の同種の標本由来のもので

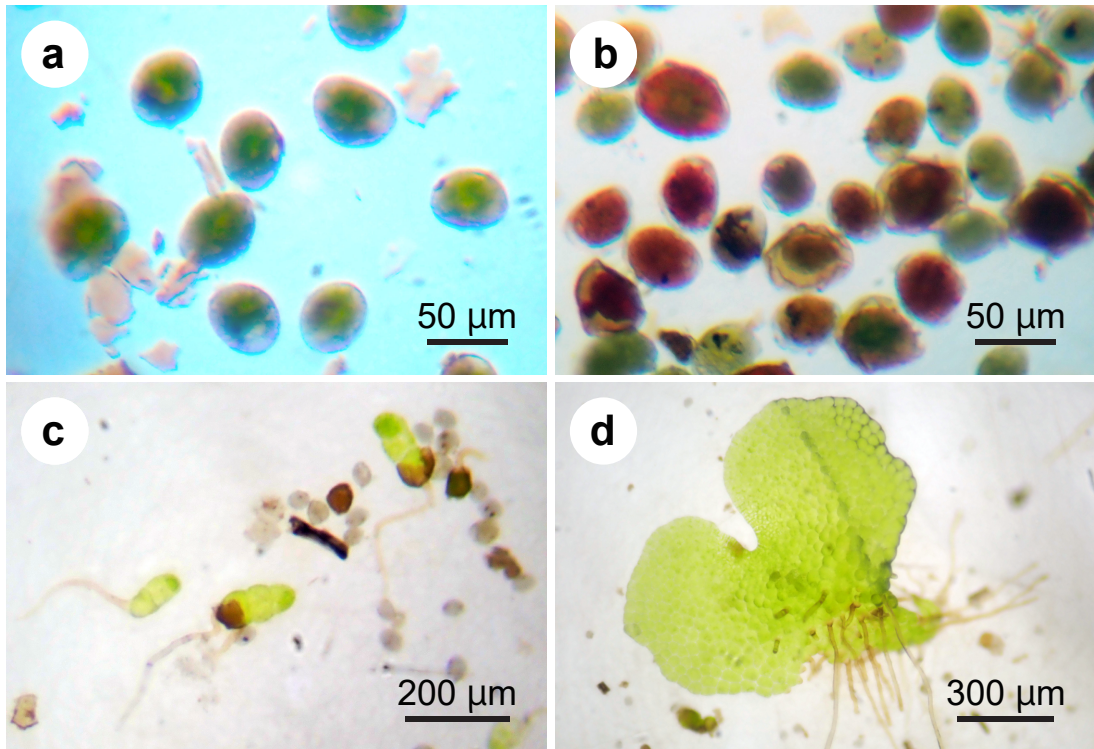


Figure 3. Spores and prothallium of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. (Onocleaceae). a) Spores before staining by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). b) Living spores stained by TTC. c) Germinated spores. d) Prothallium growing after germination.

あると考えられる。

緑色胞子を持つ種の胞子寿命は一般的に短いことが知られており (Lloyd and Klekowski 1970), その一因として非緑色胞子に比べて胞子の細胞膜が薄く乾燥に弱いためと考えられている (Hill and Wagner 1974, Ballesteros et al. 2017)。本研究で用いたスギナ, ゼンマイ, クサソテツではそれぞれ10~14日, 23~43日, 150日で胞子の発芽能力が失われることが報告されている (Okada 1929)。本研究においても前述のクサソテツの1点の標本を除いて, 3種とも標本胞子からは発芽も, TTC溶液による呈色反応を示す胞子も確認されなかった。本研究では胞子寿命が標本作製処理や保存処理の影響をどの程度受けているのかを明らかにすることは困難であったが, これらの結果は緑色胞子が急速に発芽能力を失うとする先行研究の結果と矛盾しないものであった。

緑色胞子か否かに加えて, 胞子葉や胞子嚢の形態学的な特徴と, 胞子の乾燥などの影響の受け難さ

も, その寿命に大きく関係していると考えられる。これまで長期間の保存を経て胞子発芽が確認されている *M. oligospora* (Johnson 1985) では, 胞子が硬い胞子嚢果に覆われている, 標本胞子からの発芽が確認されたクサソテツでは, 胞子嚢が反転した胞子葉に包まれている。本研究では標本胞子を採集するために胞子葉を軽く押し裂開させて胞子を採集した。胞子葉に胞子嚢が包まれた状態で標本処理を受け, そのまま保存されてきた胞子は, 外部環境の影響を受け難いのかもしれない。また, ゼンマイと同じく緑色胞子を持つ近縁種の *O. regalis* (Lloyd and Klekowski 1970) では10年以上経過した標本胞子から発芽が確認されており (Magrini et al. 2010), 採集された植物体, 標本作製時の処理, 保存環境など微妙な差が, 標本胞子の生存に影響を与える可能性が考えられる。

本研究では, 先行研究を参考に培地を含めた胞子の発芽条件を決定したが, 発芽培地には植物ホルモンを添加しなかった。シダ植物胞子の発芽試験にお

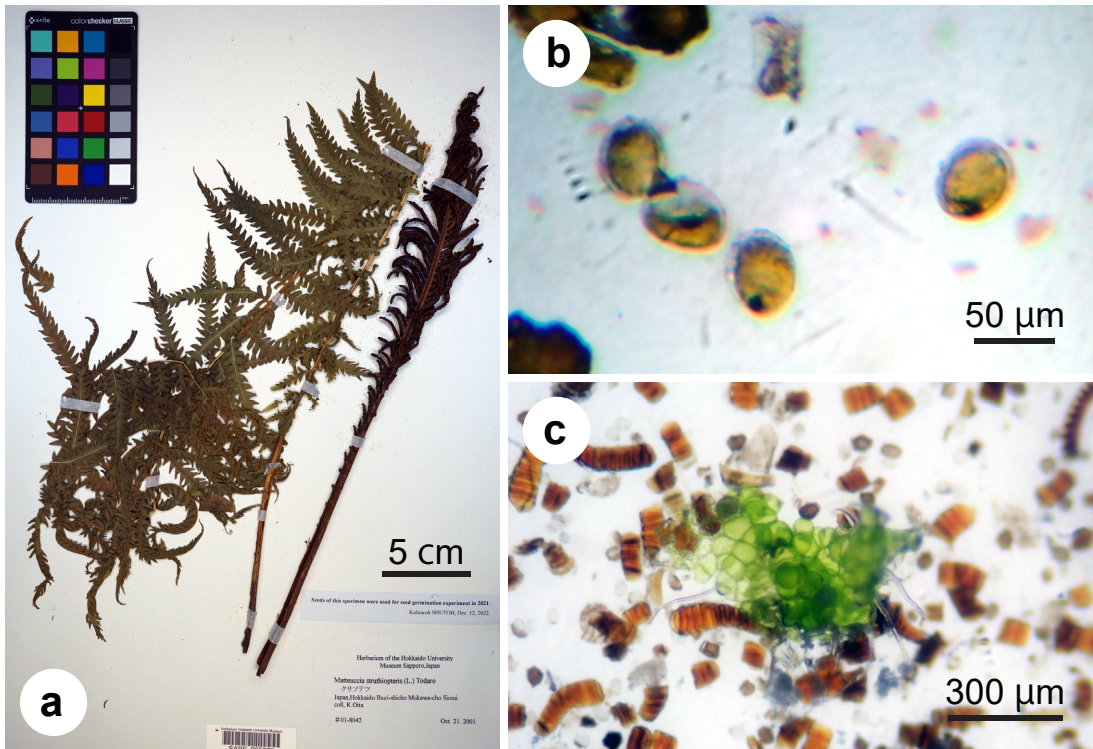


Figure 4. Herbarium specimen of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. (Onocleaceae) showed confirmed spore germination (K. Oita 01-8042, SAPS65877). a) Herbarium specimen. b) Spores not stained by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). c) Prothallium growing after germination.

いて、ジベレリンなどの植物ホルモンを発芽培地へ添加することによって孢子発芽が促進されることが知られている (Suo et al. 2015)。本研究では、用いた標本孢子の全てがTTC溶液でも呈色反応を示さなかったことから、このようなホルモン添加処理を培地に施しても標本孢子の発芽は得られなかった可能性が高いが、今後他種の標本孢子の発芽試験を行う際には植物ホルモンの使用を検討してもよいかもしれない。

博物館や植物標本庫に収蔵されているシダ植物の標本孢子を長期間発芽可能な状態で維持するためにはどのような処理を施せばよいだろうか。標本種子では、各地で取り組まれているシードバンクプロジェクト (例えば van Slageren 2003) と同様に低温保存することにより、長期的に発芽能力を保持できることが分かってきている (平澤ほか 2016, 志賀ほか 2017)。シダ植物では、孢子を適切な相対湿度に乾燥させるとともに、低温条件下において保存することが孢子の生存に有効であることが知られている (Ballesteros et al. 2017, 2019)。シダ植物孢子において、必ずしも冷凍保存が最適な保存方法ではないが (Ballesteros et al. 2019)、スギナでは -20℃ 条件下において1年以上生存した状態で保存できることが明らかにされている (Kato 1976)。急速に発芽能力を失う緑色孢子などの標本孢子の存在を考えると、希少種やその地域において重要なシダ植物の孢子は、予め取り分けて適切な保存処理を施し、さく葉標本とは別に至適な保存環境におくことを検討する必要があるだろう。

5. 謝辞

本研究において標本孢子を用いた試験を行うにあたり、大阪市立自然史博物館植物標本庫 (OSA) は横川昌史氏、北海道大学総合博物館 (SAPS) は首藤光太郎博士、国立科学博物館 (TNS) は海老原淳博士、東北大学大学院理学研究科生物学専攻植物分類学教室植物標本室 (TUS) は伊東拓朗博士に標本孢子を提供していただいた。新潟大学大学院自然科学研究科の李裕梨博士、内藤芳香氏、鈴井朋弘氏、田中美優氏、新潟大学教育学部の阿部仁美氏には野外調査や各種試験を手伝っていただいた。実験機器の使用法を含む研究全般について、新潟大学教育学部の佐藤雄二氏と加藤将博士には多くの助言をいただいた。これらの方々には厚くお礼申し上げます。本研究の一部は、文部科学省科学研究助成金

(研究課題20K20715, 21H00620) の助成を受けて実施された。

6. 引用文献

- Ballesteros D., L. M. Hill and C. Walters, 2017. Variation of desiccation tolerance and longevity in fern spores. *Journal of Plant Physiology* 211: 53-62.
- Ballesteros D., L. M. Hill, R. T. Lynch, H. W. Pritchard and C. Walters, 2019. Longevity of preserved germplasm: The temperature dependency of aging reactions in glassy matrices of dried fern spores. *Plant and Cell Physiology* 60 (2): 376-392.
- Bridson D. and L. Forman, 1998. *The Herbarium Handbook (Third Edition)*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Catala M., M. Esteban, L. J. Rodriguez-Gil and L. G. Quintanilla, 2009. Development of a naturally miniaturised testing method based on the mitochondrial activity of fern spores: A new higher plant bioassay. *Chemosphere* 77 (7): 983-988.
- Cottrell H. J., 1947. Tetrazolium salt as a seed germination indicator. *Nature* 159: 748.
- 海老原淳, 2016. 日本産シダ植物標準図鑑 1. 学研出版.
- 畑野健一, 1952. 種子発芽指示薬としてのテトラゾリウム塩. *日本林学会誌* 34 (2) : 37-41.
- Hill R. H. and W. H. Wagner, 1974. Seasonality and spore type of the pteridophytes of Michigan. *Michigan Botanist* 13: 40-44.
- 平澤優輝・港 翼・長谷川匡弘・志賀 隆, 2016. 標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. *分類* 16 (1) : 39-46.
- Johnson D. M., 1985. New records for longevity of *Marsilea* sporocarps. *American Fern Journal* 75 (1): 30-31.
- 兼子伸吾・首藤光太郎・黒沢高秀, 2013. 古い植物標本を用いた絶滅個体群の系統解析方法の開発: 磐梯朝日地域の「絶滅種」イワキアブラガヤの標本を用いた系統解析. *自然共生再生研究. 共生のシステム* 13 : 95-98.
- Kato Y., 1976. The effect of freezing and organic

- solvents on viability of chlorophyllous fern spores. *Cytologia* 41 (2): 387-393.
- Knop W., 1865. Quantitative Untersuchungen über den Ernährungsprozess der Pflanzen. Die Landwirtschaftlichen Versuchs-Stationen 7: 93-107.
- 倉田 悟・中池敏之, 1990. 日本のシダ植物図鑑. 東京大学出版会.
- Lebkuecher J. G., 1997. Desiccation-time limits of photosynthetic recovery in *Equisetum hyemale* (Equisetaceae) spores. *American Journal of Botany* 84 (6): 792-797.
- Lloyd R. M. and E. J. Klekowski, 1970. Spore germination and viability in Pteridophyta: evolutionary significance of chlorophyllous spores. *Biotropica* 2 (2): 129-137
- Magrini S., 2011. Herbaria as useful spore banks for integrated conservation strategies of pteridophytic diversity. *Plant Biosystems* 145 (3): 635-637.
- Magrini S., C. Olmati, S. Onofri and A. Scoppola, 2010. Recovery of viable germplasm from herbarium specimen of *Osmunda regalis* L. *American Fern Journal* 100 (3): 159-166.
- 松浦和枝・林 蘇娟, 2013. 無配生殖型ベニシダ (*Dryopteris erythrosora*) 胞子培養の適正培地の検討. 島根大学生物資源科学部研究報告 (18) : 17-21.
- Molnár V. A., J. Sonkoly, Á. Lovas-Kiss, R. Fekete, A. Takács, L. Somlyay and P. Török, 2015. Seed of the threatened annual legume, *Astragalus contortuplicatus*, can survive over 130 years of dry storage. *Preslia* 87: 319-328.
- Nakahama, N., Y. Hirasawa, T. Minato, M. Hasegawa, Y. Isagi and T. Shiga, 2015. Recovery of genetic diversity in threatened plants through use of germinated seeds from herbarium specimens. *Plant Ecology* 216 (12): 1635-1647.
- 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.
- Nekrasov E. V., L. A. Shelikhan and V. I. Svetashev, 2019. Fatty acid composition of gametophytes of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. (Onocleaceae, Polypodiophyta). *Botanica Pacifica* 8 (1): 63-66.
- Okada Y., 1929. Notes on the germination of the spores of some pteridophytes with special regard to their viability. Science report of the Tohoku University, Series 4, Biology 4: 127-182.
- Raghavan V., 1989. *Developmental Biology of Fern Gametophytes*. Cambridge University Press, New York.
- 志賀 隆・中濱直之・平澤優輝・長谷川匡弘, 2017. 博物館標本の種子は生きている！—発芽および利用可能性と標本作製・管理方法の検討. 生物の科学 遺伝 71 (5) : 460-465.
- Sundue M., A. Vasco and R. C. Moran, 2011. Cryptochlorophyllous spores in ferns: Nongreen spores that contain chlorophyll. *International Journal of Plant Sciences* 172 (9): 1110-1119.
- Suo J., S. Chen, Q. Zhao, L. Shi and S. Dai, 2015. Fern spore germination in response to environmental factors. *Frontiers in Biology* 10: 358-376.
- 鈴木まほろ, 2007. 博物館が所蔵する生物標本の生態学的利用事例. 日本生態学会誌 57 (1) : 129-132.
- Thiers B. M., 2022. The world's herbaria 2021: A summary report based on data from Index Herbariorum (https://sweetgum.nybg.org/science/wpcontent/uploads/2022/02/The_Worlds_Herbaria_Jan_2022.pdf, 2023年10月18日確認).
- 坪田博美・井上侑哉・中原-坪田美保・内田慎治・向井誠二, 2014. 標本同定のツールとしてのDNAバーコーディング: 植物標本の例. 広島大学総合博物館研究報告 (6) : 41-49.
- van Slageren 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.
- Wandeler P., E. A. B. Paquita and F. K. Lukas, 2007. Back to the future: Museum specimens in population genetics. *TRENDS in Ecology and Evolution* 22 (12): 634-642.
- 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 Journal 76 (3): 141-148.

Wolkis D., K. Jones, T. Flynn, M. DeMotta and N. Rønsted, 2022. Germination of seeds from

herbarium specimens as a last conservation resort for resurrecting extinct or critically endangered Hawaiian plants, Conservation Science and Practice 4 (1): e576.