



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

## 倍数性を活用したスパティフィラムの育種法の開発

メタデータ	言語: ja 出版者: 公開日: 2015-03-12 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小笠原, 利恵 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/49096">http://hdl.handle.net/20.500.12099/49096</a>

倍数性を活用したスパティフィラムの育種法の開発

2013年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物生産科学

(岐阜大学)

小笠原 利恵

## 目次

第1章 緒言	1
第2章 コルヒチン処理・茎頂培養併用法によるスパティフィラム ( <i>Spathiphyllum wallisii</i> Regel 'Merry') の四倍性個体の誘導	8
第3章 スパティフィラム'ニューメリー'の頂端分裂組織への in vitro コルヒチン処理による倍数体作出	26
第4章 スパティフィラム'フェアリーウィング' (4x) と'メリー' (2x) との交配による三倍体作出	36
第5章 総合考察	47
Summary	52
引用文献	54

## 第 1 章 緒言

花きは観賞植物であることから，他の作物と比較して新品種の育成が市場で常に求められており，多数の品種が登録されている．なかでも，1998年の植物の新品種保護のための国際条約（UPOV条約）に準拠した種苗法改正以降，育成者権の保護が徹底されたことから花きの品種登録数は急速に増加しており，全登録品種数の82%を花き類が占めている（水野，2011）．このような状況の下，花き産地は育種会社と連携して市場性の高い新品種の栽培を目指し，産地によっては自ら希少性の高いオリジナル品種を作出してブランド化を図る試みもみられる．このように，花き産業の活性化には育種が重要な役割を果たしている．

花きは切花，鉢物，苗物に大別される．このなかで，鉢物は室内観賞植物として位置づけられており，生活環境の変化に伴って新しい形質をもった品種が求められている．新たな形質としては，室内栽培で必要となる耐陰性や，栽培管理で重要となる耐乾性，さらにはインテリアとしての鑑賞価値など，求められる形質は多岐にわたる．

市場や産地，消費者から求められるこれらの形質を開発するためには交雑育種法を基本として，突然変異，遺伝子組み換え，倍数性育種法等，様々な育種法が活用されている．植物の倍数化は自然界で稀に起きる現象で進化の要因の一つでもあり，非還元性配偶子等によって得られた高次倍数体は耐寒性，耐暑性等，環境への適応性が拡大することから，栽培植物では多くの事例がある（西尾，1977）．倍数体は一般に形質の大型化，葉や花の濃色化など観賞価値が向上

するため、長い栽培の歴史の中で倍数体が園芸植物として選抜されてきた（イチゴ（ $8n$ ）、キク（ $4\sim 10n$ ）、ダリア（ $8n$ ）、バラ（ $4n$ ）等）（塚本，1969）。

人為的な倍数化方法は第二次世界大戦前に開発され、戦後に多くの植物で実用化が取り組まれている（ペチュニア（ $4n$ ）、ブドウ（ $4n$ ）、大根（ $4n$ ）等）（塚本，1969）。倍数体を用いた育種を倍数性育種といい、形質の大型化、環境への適応性の拡大、野生種との交配による新しい形質の導入、種間や属間交雑の可能性の拡大等が期待できる。

成長点等の細胞分裂が盛んな部位に、コルヒチンをはじめとする細胞分裂阻害剤を作用させると細胞分裂中期に紡錘糸の形成が阻害され、染色体が倍加する。倍数体を得られる確率は倍数化に使用する植物材料、細胞分裂阻害剤の種類、処理方法、処理時間によって変化し、最適な倍数化方法は種や品種によって異なる（西尾，1977）。

細胞分裂阻害剤にはコルヒチンの他に、オリザリン、アミプロフロスメチル、クロロプロファミン等が存在するが、コルヒチンは価格が安価で、水に溶けやすく扱いやすい為、主要な細胞分裂阻害剤として知られている。また、コルヒチンは痛風の治療薬で研究者だけでなく生産者でも購入し倍数化薬剤として利用できる。

倍数化処理方法には、細胞分裂阻害剤を溶かした溶液に種子や塊茎、植物の先端等を漬ける浸漬法、溶液をピペット等で成長点部分に滴下する滴下法、溶液をラノリンに加え軟膏を作成し塗布するラノリン法、溶液で寒天を作り成長点部分を覆う寒天法、溶液を成長点へ噴霧する噴霧法、溶液を組織培養培地に加え培養する培養法等がある。In vivoでの倍数化処理は特別な施設や技術を必要とせず、

生産者でも容易に倍数化を行うことができ、倍数化後の形態変化を早く観察できるといった利点があるが、得られた倍数体の固定と増殖に時間を要する。一方、*in vitro*での倍数化処理は、組織培養の施設や技術が必要で、倍数体の形態変化が順化後にしか観察できないものの、倍数体の固定、維持、大量増殖が比較的容易で、倍数体獲得効率も高い。

倍数性の判定は、組織分化層のL<sub>3</sub>層由来の根端分裂組織の染色体数やL<sub>2</sub>層由来の花粉母細胞の減数分裂時の染色体数の測定に基づいて行われてきた。しかし、染色体数の測定には多くの労力と時間を要するため、比較的簡便に測定できるL<sub>1</sub>層由来の気孔の大きさや数、孔辺細胞の葉緑体数やL<sub>2</sub>層由来の花粉の大きさ等が簡易的な倍数性判別指標として用いられている。現在では、より簡易で高速、正確な倍数性判定方法としてフローサイトメトリー（FCM）分析が主流となっている。

FCMとは高速で流れる液中に存在する粒子の特性を、光や蛍光色素を利用して1粒ずつ高感度に測定する方法である。二本鎖DNAのA-T結合に富んだ領域に特異的に結合するDAPIや、DNAの二重らせん構造に架橋的に結合するPI等の蛍光色素で核を染色しFCM分析を行う。分析結果は横軸を蛍光強度、縦軸を核数としたヒストグラムで表示され、DNA絶対量が判明している内部標準と核の蛍光強度を比較することでDNA相対量を測定できる。植物体のFCM分析はGalbraithら（1983）によってchopping法が紹介されて以来、倍数性の判定の他、植物の特性調査や交雑後の個体選別、粒子の選別・分取等、植物育種へ利用されている。

倍数体は前述のように多数の利点を持つが、細胞分裂速度と稔性

の低下が欠点として挙げられる．なかでも稔性の低下はその後の育種母本としての利用が困難となるため，実用品種として利用されている倍数性品種は稔性を回復した個体やこれらの欠点を上回る形質を有するものに限られている．一般に，倍数化によって形態が大型化するといわれているが，必ずしも大型化するわけではなく，個々の器官は二倍体に比べて大きくなるものの，植物体の大きさは高次倍数体になると小さくなる傾向にある．また，倍数化では形質の量的変異は起こるものの質的変異は起こらないため，新たな色素の発現や新規の形態変化などは生じない．

質的変異を伴う新規形質の付与を目的とした育種法として野生種の導入など，種間や属間などの遠縁交雑を行う必要があるが，種間や属間交雑で得られる交雑個体の多くは不稔となる．この不稔を回避する方法として複二倍体の作出が有効であり（西尾，1977），倍数化した交配親を用いることで稔性を持つ複二倍体の交雑個体を得ることができる．

スパティフィラム属（*Spathiphyllum*）はサトイモ科の多年生植物で，白い仏炎苞と濃緑色の照り葉のコントラストが美しく，5℃以上で越冬し耐陰性に富むことから室内で1年中楽しむことができる観葉植物として位置づけられており，ホルムアルデヒドなどの有害物質を吸着する能力も注目されている（Sonら，2000）．スパティフィラムの花芽分化は高温により抑制されるが，日長条件はほとんど影響を及ぼさず，GA<sub>3</sub>を処理すると草齢や植物体の大きさに関係なく花成が誘導されるため（Ogawaら，1993），周年出荷されており開花個体が一年中入手できる．

日本で主に栽培されている品種は日本で育種された‘メリー’，‘ニ

ューメリー’，‘ミニメリー’等や，海外で育種された‘ミニー’，‘ホワイトレディ’，‘センセーション’，‘マウナ・ロア’等がある．形態の特徴は‘ミニー’の葉身中央部に白い筋がある他は，サイズや花立ち，開花日数等の差しかなく，どの品種の花色も白で似たような形質をしており，新品种の育成が求められている．

スパティフィラムの野生種は主に熱帯アメリカに約 40 種が自生しており，その中の約 10 種が室内や，植物園で栽培されている（Walters ら，1996）．野生種には *S. cannifolium* (Dryander) Schott. (和名：オオササウチワ)，*S. floribundum* (Linden & Andre) N. E. Brown. (和名：オカメウチワ)，*S. cochlearispathum* (Liebmann) Engler. (和名：ニオイオオササウチワ)，*S. wallisii* Regel.等が存在する．観葉植物としてのスパティフィラムの育種は *S. wallisii* Regel や *S. floribundum* Schott を起源種として行われており（Walters ら，1996），本研究で使用した品種はすべて *S. wallisii* Regel から育成されている．両種は白い仏炎苞を持ち，栽培されている野生種の中では中～小型で観葉植物に適した形態をもっている．*S. cochlearispathum* (Liebmann) Engler. は，黄緑色の仏炎苞と，独特の香りを持つが，最も大きい種で容易に 1.2m に達する．国内の複数の植物園がこの種を所有しており，育種への利用が期待できる．

スパティフィラムと同じサトイモ科の代表的な観賞植物にはアンズリウム，カラー，アロカシア等がある．アンズリウムは赤，ピンク，緑，紫，カラーはピンク，オレンジ，黄，紫等の花色があり，スパティフィラムとの属間交雑による新しい花色の導入が期待できる．また，スパティフィラムと同じホウライショウ亜科には，葉に特徴的な切れ込みのある大型でツル性のモンステラが属している．モンステラの花は白く長さ 20cm ほどで熟した果実は食用になる．



アンズリウムとスパティフィラムの属間交雑はすでに試みられているが，未だ属間雑種は作出されていない．その理由として，Hennyら（2008）はサトイモ科内での交雑は散発的な花生成と交配の特異的条件のため困難とされていると述べており，Duquenneら（2007）は，サトイモ科内では，受精前隔離と受精後隔離，受精や受精卵の発達が抑制されるため属間交雑は不可能であると述べている．

サトイモ科植物のカラー（Cohen & Yao, 1996），アロカシア（Thaoら，2003，2004），サトイモ（宮崎ら，1985），タロイモ（Tambongら，1998），コンニャク（西山と渡部，1957）では倍数体作出の報告があり，コンニャク以外は *in vitro* による倍数化処理が行われている．このことから，サトイモ科の倍数化は *in vitro* では比較的容易であり，四倍体を作成することでスパティフィラム四倍体との属間交雑の可能性が拡大すると考える．しかし，これらの種はスパティフィラムとは異なる亜科に属するため，通常の属間交雑では雑種の獲得は困難であると予想され，倍数性育種と未熟胚培養などの操作を併用する必要がある．

スパティフィラムの倍数性育種の活用法として，Eeckhautら（2004）と Vanstechelmanら（2010）は未受精卵細胞からの倍数体の育成を試みている．未受精の卵細胞を倍数化することでヘテロ接合体であるスパティフィラムからホモ接合体個体を育成し，F1種子系の品種の作出と育種材料の開発を試みている．

このように，倍数性育種はスパティフィラムの新品種作出に有効であることから，本研究では効率的な倍数化技術の確立と四倍体の作出，四倍体と二倍体の交配による三倍体の作出を行い，倍数性を

活用したスパティフィラムの育種法を検討した。

## 第2章 コルヒチン処理・茎頂培養併用法によるスパティフィラム (*Spathiphyllum wallisii* Regel 'Merry') の四倍性個体の誘導

スパティフィラムの育種は *S. wallisii* Regel や *S. floribundum* Schott を起源種として行われているため (Walters ら, 1996), 品種間の変異の幅が小さく, 従来と異なる特性を持つ新たな品種の開発が望まれている. 新たな形質を持つ品種を育成する方法として, 今まで使用されていなかった野生種を導入した事例がペチュニア (Ui・Ishikawa, 2011), アジサイ (Kudo ら, 2008), プリムラ (Amano ら, 2006) など報告されており, スパティフィラムにおいても, 新たな育種親としての野生種の活用や近縁属との属間交雑による育種の促進が望まれている. しかし, 一般に野生種は二倍体であるため種間あるいは属間交雑における  $F_1$  は雑種不稔性が生じやすく, 3系交雑や戻し交雑などの  $F_1$  以降の育種まで視野に入れた品種育成においては複二倍体個体(四倍体)の育成が不可欠となる. また, 四倍体はそれ自体も植物体の大型化や花あるいは葉の濃色化などの優良な形質を発現する場合があります, さらに二倍体との交雑による三倍体の育成も可能となる.

スパティフィラムの倍数性育種は, *S. wallisii* 'Speedy' の蒴から誘導した不定胚への細胞分裂阻害剤処理による四倍体の作出がある (Eeckhaut ら, 2004; Vanstechelman ら, 2009) が, スパティフィラムにおける不定胚誘導の事例は Eeckhaut ら (2004) の報告以外にはみられず, 他の種もしくは品種に適用することは困難であると想定される.

そこで本研究では, 種間あるいは属間交雑における複二倍体作出

のための四倍体親の誘導を目的として，第 1 段階として *S. wallisii* ‘Merry’の塊茎のコルヒチン溶液浸漬処理による倍数化を行い，第 2 段階としてキメラ個体の茎頂培養による多芽体誘導と個体再生を行った．

## 材料および方法

### 1. コルヒチン浸漬処理濃度の検討（実験 1）

供試材料として *S. wallisii* ‘Merry’の選抜系統‘スーパーミニ’（以下‘SM’とする）の培養苗を順化，鉢上げし，草丈 5 cm 程度に生育した個体の展開葉，未展開葉および根を除去し，塊茎のみの状態に調整した．調整した塊茎を 0.1，1.0 および 10.0 mM のコルヒチン溶液（1%（v/v）ジメチルスルホキシド（DMSO）を含む）に 12 時間浸漬し，流水で 24 時間洗浄後，pH 調整済みピートモス培養土（BM-2，Berger）を充填した 72 穴セルトレイに植え付けて栽培した．各処理区それぞれ 144 個体を供試し，生存個体数を 4 週間後に調査した．

生存個体から展開した葉を用いて倍数性の判定を行った．倍数性の判定は PA 型フローサイトメーター（Partec）を用いて行い，植物用 High Resolution DNA Staining kit（Partec）の核単離溶液（溶液 A）および 4', 6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）染色液（溶液 B）を測定に用いた．プラスチックシャーレ上の葉組織に溶液 A を加えてカミソリで細かく切断し（chopping 法）（Galbraith ら，1983），溶液 B を溶液 A の 5 倍量加えて 30  $\mu$ m ナイロンメッシュを通して残渣を取り除き，フローサイトメトリーで倍数性を判定した．

## 2. コルヒチン処理濃度および処理時間の検討（実験2）

実験1と同様の‘M’の塊茎を0, 1.0, および10.0 mMのコルヒチン溶液（1%（v/v）DMSOを含む）に12, 24および48時間浸漬し，流水で24時間洗浄後，実験1と同様の方法で栽培および倍数性判定を行った．各処理区72個体を供試した．

## 3. キメラ個体の茎頂培養と四倍体の選抜（実験3）

実験1および実験2で得られた二倍性細胞と四倍性細胞のキメラ個体を草丈10 cm程度まで育苗し，新たに展開した2葉の閉鎖時の気孔の長さを気孔サイズとしてSUMP法（Suzuki's Universal Micro-printing Method）（Kawai, 1969）を用いて計測し，1葉当たり5個合計10個の気孔サイズを測定して平均値を個体の気孔サイズとした．

キメラ個体の展開葉，未展開葉および根を除去して中性洗剤で洗浄後，70%（v/v）エタノールに30秒浸漬し，次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度1%）で10分間表面殺菌した．クリーンベンチ内にて滅菌水で3回洗浄後，頂芽と上から第3位までの側芽を葉原基を含む約0.5 mmのサイズで摘出し，0.1  $\mu$ M  $\alpha$ -ナフタレン酢酸（NAA），10.0  $\mu$ M ベンジルアミノプリン（BAP）を添加したMurashige and Skoog（MS）培地（3%（w/v）Sucrose，0.2%（w/v）Gellan Gum，pH 5.8）に置床し，25℃，蛍光灯照明下3,000 lx，12時間日長で12週間培養した．茎頂分裂組織から形成された多芽体を5 mm×5 mmに分割し，同組成のMS培地に移植後，継代培養を6週間ごとに3回繰り返す．多芽体から再分化した2 cm程度の不定芽を切り離して成長調節物質無添加のMS培地に置床し，8週間培養して

発根を促した。発根した植物体を pH 調整済みピートモス培養土を充填したポットに鉢上げし，順化後，育苗した。育苗後に新たに展開した葉を採取し，再度フローサイトメトリーで倍数性の判定を行った。内部標準としてオオムギ (*Hordeum vulgare* L. ‘ASSE’,  $2n=2x=14$ , DNA 含量 10.9 pg) (Bennett・Leitch, 1995) を用いた。

四倍体と判定された個体に，少量のエタノールに溶解し 4.4 mM に調整した BAP を週 1 回 4 週間継続して葉面散布して子株の形成を促し，形成した子株を株分けして得られた 18 個体について気孔サイズ，葉幅／葉長比を調査し，二倍体と比較した。葉幅／葉長比は充分に展開した葉の葉身の長さと同幅を 1 植物体当たり 3 葉調査した。また，開花した個体については花器の形態を観察した。

### 結果および考察

実験 1 では，12 時間処理における 0.1，1.0 および 10.0 mM のコルヒチン濃度の影響を予備的に比較した結果，生存率は 0.1 mM 処理区が他の処理区に対して 84%とやや高い傾向を示した(第 2-1 表)。生育が認められた個体の倍数性判定においては完全な四倍体はみられなかったが，コルヒチン 10.0 mM 処理区において二倍性細胞と四倍性細胞のキメラ個体が 2 個体得られた。

実験 2 において，コルヒチン濃度を 0，1.0 および 10.0 mM，処理時間を 12，24 および 48 時間として再度コルヒチン処理を行った結果(第 2-2 表)，実験 1 に比べて総生存率が 25.9%と低く，コルヒチン 0 M 処理区での生存率も 33.8%と低かった。実験 1 と比べて生存率が下がったのは，実験 2 の材料調整時において除去した未展開葉の数が実験 1 の時と比べて多く，未展開葉切除時に塊茎に傷が付き

DMSOが塊茎内部に浸透したことによる可能性が推察された。コルヒチン濃度ごとに生存率をみると、0 M処理区と比較して1.0 mM処理区で低かったが、10.0 mM処理区では有意な差がみられなかったことから、コルヒチンによる生育阻害はないと考えられた。浸漬処理時間では48時間処理区で12.5%と低くなり、長時間の浸漬処理においてDMSOの浸透による阻害が認められた。生存が確認された個体の倍数性を判定した結果、完全な四倍体と判定された個体を見いだすことはできず、二倍性細胞と四倍性細胞のキメラ個体が10.0 mMの24時間処理区で1個体得られた（第2-1図）。

コルヒチン処理による染色体の倍加は細胞分裂中期における紡錘糸形成阻害によって生じる。従って、茎頂分裂組織では分裂期外のコルヒチンの影響を受けていない二倍性細胞と、分裂期で分裂阻害を受けた四倍性細胞が混在するキメラ状態となる。本研究において完全な四倍体はみられず、二倍性細胞と四倍性細胞のキメラ個体は3個体しか得られなかった理由として、スパティフィラムの成長速度が比較的遅くコルヒチンの作用が低かったことや、DMSOの影響などが関係していると考えられる。

二倍体とキメラ個体の気孔サイズを比較した結果、二倍体の平均値は $39.4\ \mu\text{m}$  ( $\sigma^2=2.71$ )であったのに対して、キメラ個体は実験1で得られた2個体が $50.9\ \mu\text{m}$  ( $\sigma^2=1.87$ )と $39.8\ \mu\text{m}$  ( $\sigma^2=0.88$ )で、実験2で得られた個体が $40.4\ \mu\text{m}$  ( $\sigma^2=1.62$ )であった。50.9  $\mu\text{m}$ を示したキメラ個体の気孔サイズは二倍体より有意に大きかったが、他の2個体のキメラ個体は有意差（Tukey法）が認められなかった。

植物は層状構造をした複数の起源層から成り、Schmidt (1924) の外衣 (tunica) - 内体 (corpus) 説では茎頂の構造から細胞の形成部

位を発生遺伝的に独立した3層の起源層に分け、垂層分裂するL1とL2（外衣）と並層分裂するL3（内体）に分類している（Satina・Blakeslee, 1941）。気孔はL1層由来であることから、3個のキメラ個体のうち50.9  $\mu\text{m}$ の気孔サイズを持つ個体はL1層に四倍性細胞が存在していたと考えられ、他の2個体のL1層は二倍性細胞であったと推測された。

二倍性細胞と四倍性細胞のキメラ個体は次第に四倍性細胞の割合が低くなり、最終的には二倍体に戻ることがある。すべての細胞が四倍性細胞からなる四倍体の育成には、生殖細胞を形成するL2層が四倍性細胞で構成されている個体相互の交雑実生が最も有効であるが、キメラ個体の茎頂培養を経由した不定芽形成によって四倍性細胞のみからなる完全な四倍体を育成できる可能性が想定された。そこで実験3において、得られた二倍性細胞と四倍性細胞のキメラ個体の茎頂培養を試み、茎頂分裂組織から多芽体を誘導し、再分化した植物体142個体を順化、鉢上げした。

鉢上げした個体の倍数性判定を行った結果、40.4  $\mu\text{m}$ の気孔サイズを持つキメラ個体の多芽体から再分化した植物体のうち1個体が四倍体であった（第2-2図）。不定芽の起源には単一細胞由来であったとの報告（Van Hartenら, 1981）と複数細胞由来であったとの報告（Sripichittら, 1988）がある。本研究で多芽体を経由して得られた完全な四倍体は、気孔サイズからL1層が二倍性細胞からなるキメラ個体由来であったことから、この個体はL2あるいはL3層の単一の四倍性細胞あるいは複数の四倍性細胞から分化したものと推定された。

本研究では、L1層が四倍性細胞からなるキメラ1個体と二倍性細



胞からなるキメラ 2 個体を茎頂培養したが，L1 層が二倍性細胞のキメラ個体のみから完全な四倍体を得ることができた．従って L1 層由来である気孔が二倍性細胞であっても四倍体の獲得が可能であることが明らかとなった．キメラ個体の茎頂培養による四倍体獲得率は 0.7% (1/142) と予想に反して著しく低かったが，これは二倍性細胞に比べて四倍性細胞の不定芽分化能力が低いことによる可能性が推定された．

本研究において，二倍性細胞と四倍性細胞のキメラ個体の茎頂培養によって四倍体が獲得できたことから，コルヒチンなどを用いた倍数化処理によって選抜された個体がキメラであっても，茎頂培養が可能な植物であれば多芽体やカルス由来の不定芽から四倍体を再度選抜することができ，比較的容易に倍数性キメラ状態を解消できる可能性が示唆された．

二倍性細胞と四倍性細胞のキメラ個体の茎頂分裂組織から誘導した多芽体から再分化した四倍体の気孔サイズは 52.6  $\mu\text{m}$ であり，二倍体の 42.4  $\mu\text{m}$ に対して有意に大きかった (第 2-3 図)．また葉幅／葉長は，四倍体では 0.55 であったのに対して二倍体では 0.36 であった．つまり，四倍体では葉幅が広くなり，二倍体の長楕円形葉身から四倍体では広卵形葉身に変化していた (第 2-4 図)．染色体倍加に伴う気孔の肥大や葉の卵形化は多くの植物において観察されており (Fukui・Yokota, 2007 ; Thaoら, 2003)，四倍体の簡易評価指標として用いることができるが，本研究においても同様の形態変化が認められた．四倍体の花の形態は，二倍体に比べて花茎が太くなり，仏炎苞は葉と同様に卵形化し厚みを帯びていた (第 2-5 図)．花茎の肥大化は花茎通道組織の充実に繋がり夏季の萎れの抑制効果を持ち，

仏炎苞の肉厚化は観賞期間の延長効果を示すなど、観葉植物としての観賞価値の向上に寄与するとともに、葉の卵形化は草姿のわい化にも貢献できる。一般に、四倍体は二倍体に比べて乾燥、低温、病害などの耐性が増加し、土壌に対する適応性が高まるとされる（西山，1936）。今後四倍体の栽培特性について調査するとともに、本研究で得られたスパティフィラムが育種素材として活用されることが期待される。

本研究で作出した四倍体は‘フェアリーウィング’（以下‘FW’とする）として品種登録し（品種登録出願番号 第 25037 号）、品種特性を第 2-3 表に示した。‘FW’の葉の長さ（葉身＋葉しょうの長さ＋葉しょうの上端から葉身までの長さ）が 17.7cm であったのに対して、‘ニューメリー’では 69.6cm と著しく長く、‘メリー’の 21.5cm より短かった。これに対して葉身の幅は‘FW’が 10.1cm であったのに対して、‘ニューメリー’では 8.7cm、‘メリー’では 4.3cm となった。葉幅／葉長を算出すると、‘FW’が 0.57、‘ニューメリー’が 0.12、‘メリー’が 0.20 となり、明らかに‘FW’は幅広の形態を示していた。

また、花柄の長さは明らかに‘FW’で短く、仏炎苞の幅／長さは‘FW’の 0.62 に対して‘ニューメリー’では 0.51、‘メリー’では 0.48 であったことから丸みを帯びていた。開花期は晩生であった。

以上のことから、本研究で育成した‘FW’はわい性で幅広の葉を保ち、やや短く丸みを帯びた仏炎苞を持つことが特徴で、開花は晩生であった。

第2-1表 スパティフィラム塊茎の倍数化に及ぼすコルヒチン処理の影響\*

コルヒチン濃 度 (mM)	供試個体数	生存個体数 (%)	倍数化検定個体数		
			二倍体	キメラ個体 **	四倍体
0.1	144	121 a ( 84.0 )	121	0	0
1	144	113 ab ( 78.5 )	113	0	0
10	144	102 b *** ( 70.8 )	100	2	0

\*: コルヒチン溶液 (1% DMSOを含む) に塊茎を12時間浸漬処理を行った

\*\* : 二倍体と四倍体細胞を含むキメラ個体

\*\*\*: 同一の英文字は  $p < 0.01$  で有意差を示す

第2-2表 倍数化に及ぼすスパティフィラム塊茎へのコルヒチン処理の影響

コルヒチン濃度 (mM)	処理時間 (h)	供試 個体数	生存個体数 (%)	倍数化検定個体数		
				二倍体	キメラ個体	四倍体
0	12	72	22 abc ** ( 30.6 )	22	0	0
0	24	72	35 a ( 48.6 )	35	0	0
0	48	72	16 bc ( 22.2 )	16	0	0
1	12	72	14 c ( 19.4 )	14	0	0
1	24	72	24 ab ( 33.3 )	24	0	0
1	48	72	5 c ( 6.9 )	5	0	0
10	12	72	27 ab ( 37.5 )	27	0	0
10	24	72	36 a ( 50.0 )	35	1	0
10	48	72	6 c ( 8.3 )	6	0	0
計		432	112 ( 25.9 )	111	1	0
0		216	73 a*** ( 33.8 )	73	0	0
1		216	43 b ( 19.9 )	43	0	0
10		216	69 a ( 31.9 )	68	1	0
	12	216	63 b ( 29.2 )	63	0	0
	24	216	95 a ( 44.0 )	94	1	0
	48	216	27 c ( 12.5 )	27	0	0

\*: 二倍体と四倍体細胞を含むキメラ個体

\*\* : 同一の英文字は  $p < 0.01$  で有意差を示す

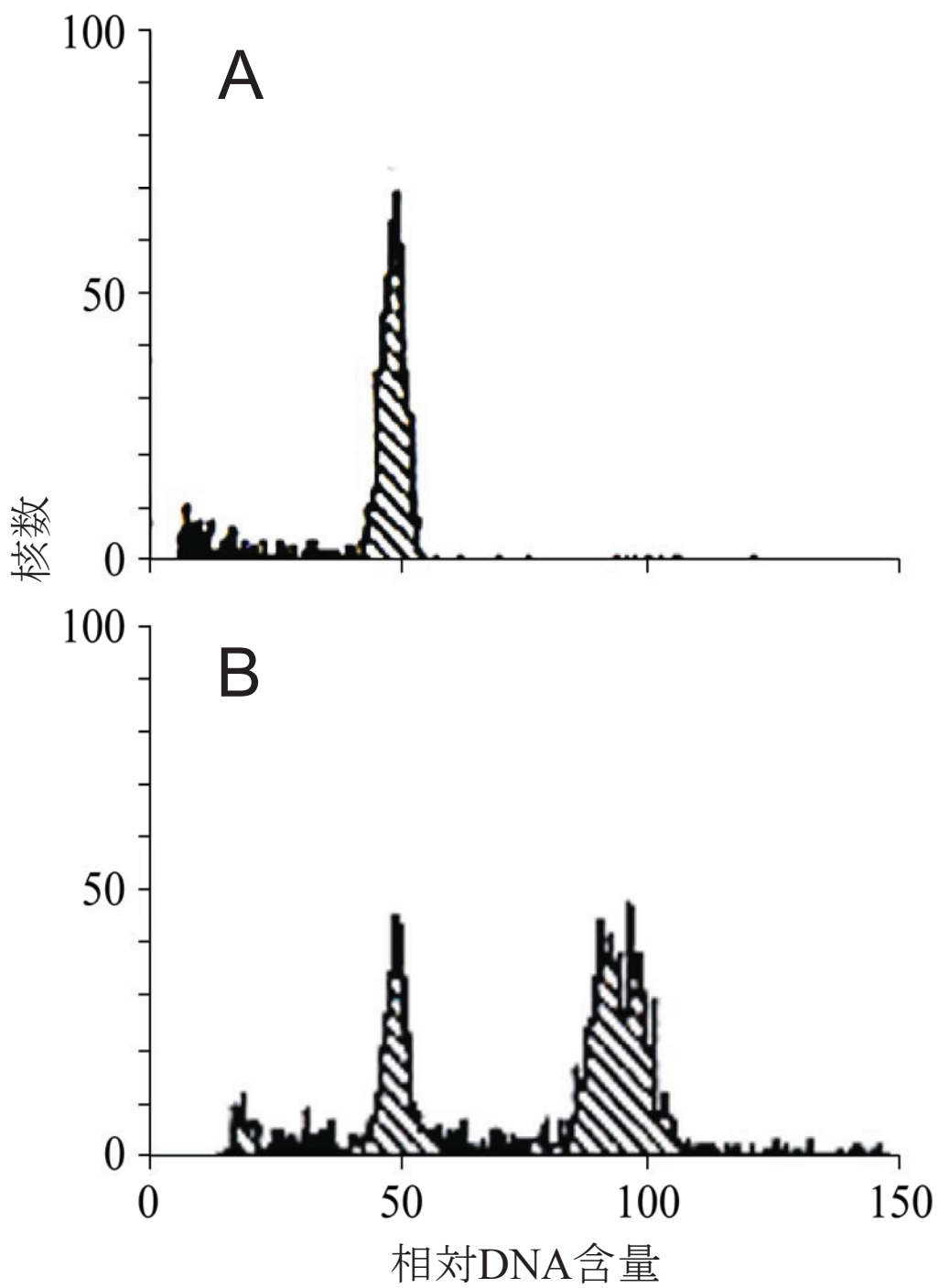
\*\*\*: 主要因効果は処理区の平均値として算出した

第2-3表 ‘フェアリーウィング’として品種登録した四倍体の特性表

形質番号	U P O V	記号	形質 (Characteristics)	定義	調査方法	階級	状態 (State)	登録品種 「フェアリーウィング」	ニューメリー	メリー
			(日本語)				(日本語)			
1	1 (*)	QNG	立茎数	株立ちの多少	観察	3 5 7	少 中 多	3:少(few)	7:多(many)	7:多(many)
2	2	QN	葉身の長さ	成葉の葉身基部から先端までの長さ	測定 cm	3 5 7	短 中 長	3:短(short) 10.1	5:中(medium) 22.8	3:短(short) 10.8
3	3 (*)	QN	葉身の幅	成葉の葉身の最大幅	測定 cm	3 5 7 9	狭 中 広 極広	5:中(medium) 10.1	5:中(medium) 8.7	3:狭(narrow) 4.3
4	4	QN	葉身の緑色の濃淡	成葉表面の緑色の濃淡	観察	3 5 7	淡 中 濃	5:中(medium)	5:中(medium)	5:中(medium)
5	5	QN	葉脈間のふくれの強弱	葉脈間のふくれの強弱	観察	3 5 7	弱 中 強	5:中(medium)	5:中(medium)	5:中(medium)
6	6 (*)	QN (+)	葉しょうの長さ	葉しょうの長さ	測定 cm	3 5 7	短 中 長	3:短(short) 6.7	7:長(long) 21.0	3:短(short) 9.2
7	7 (*)	QN (+)	葉しょうの上端から葉身までの長さ	葉しょうの上端から葉身までの長さ	測定 cm	3 5 7	短 中 長	3:短(short) 0.9	7:長(long) 9	3:短(short) 1.5
8	8	QL	葉身の色に対する葉柄上部の色	葉柄上部の色を葉身の色と比較しての濃淡	観察	1 2	同等 薄い	1:同等(similar)	1:同等(similar)	1:同等(similar)
9	9 (*)	QN	花柄の長さ	仏炎苞基部までの花柄の長さ	測定 cm	3 5 7	短 中 長	1:極短(very short) 7.8	3:短(short) 16.3	3:短(short) 11.1

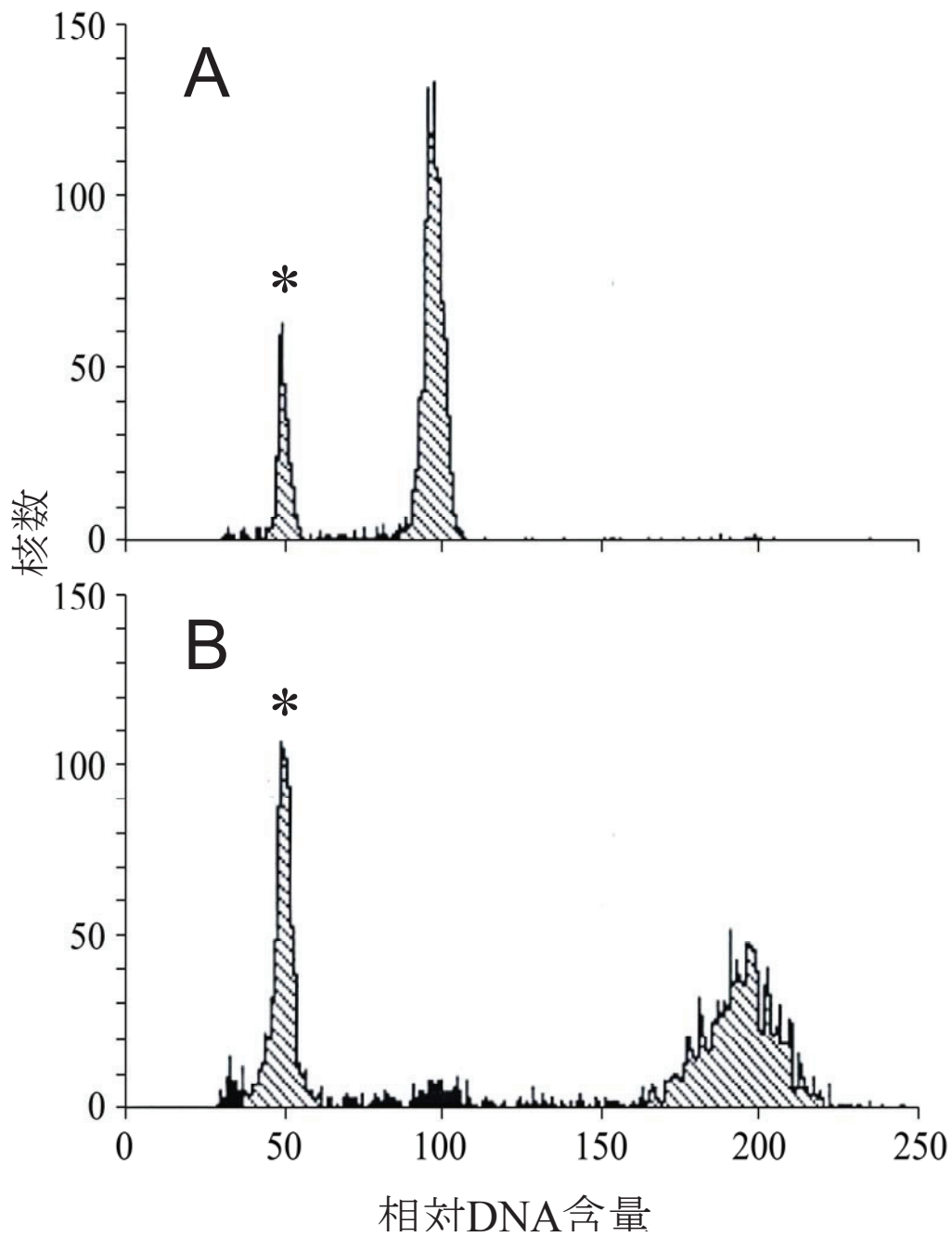
形質番号	U P O V	記 号	形質 (Characteristics)	定義	調査 方法	階 級	状態 (State)	登録品種 「フェアリーウイン グ」 (4x)	ニューメリー	メリー変種 (2x)
			(日本語)				(日本語)			
10	10	QN (+)	仏炎苞のゆ合部の長さ	仏炎苞と肉穂花序柄と ゆ合している部分の長 さ	測定 mm	3 5 7	短 中 長	3:短(short) 1.5	3:短(short) 2	3:短(short) 2
11	11 (* )	QN G (+)	仏炎苞の長さ	開花時の仏炎苞基部か ら先端までの長さ	測定 cm	3 5 7 9	短 中 長 極長	3:短(short) 8.1	5:中(medium) 13.1	3:短(short) 9.7
12	12 (* )	QN (+)	仏炎苞の幅	開花時の仏炎苞の最大 の幅	測定 cm	3 5 7 9	狭 中 広 極広	3:狭(narrow) 5	5:中(medium) 6.7	3:狭(narrow) 4.7
13	13	QN (+)	仏炎苞の深さ	開花時の仏炎苞のくぼ みの最大の深さ	測定 mm	3 5 7	浅 中 深	5:中(medium) 2.1	5:中(medium) 2.5	3:浅(shallow) 1
14	14 (* )	PQ (+)	仏炎苞の基部の形	開花時の仏炎苞の基部 の一般的な形	観察	1 2 3	切形 漸先形 非対称形	2:漸先形 (attenuate)	2:漸先形 (attenuate)	2:漸先形 (attenuate)
15	15	QN	仏炎苞の内側の先端か ら下部にかけての緑色 部の大きさ	開花時の仏炎苞の内側 (表面)において先端か ら下に広がっている緑 色部の面積の大きさ side	観察	1 3 5 7 9	無又は極小 小 中 大 極大	3:小(small)		
16	16	QN	仏炎苞の外側の先端か ら下部にかけての緑色 部の大きさ	開花時の仏炎苞の外側 (裏面)において先端か ら下に広がっている緑 色部の面積の大きさ side	観察	1 3 5 7 9	無又は極小 小 中 大 極大	3:小(small)		

形質 番号	U P O V	記 号	形質 (Characteristics)	定義	調査 方法	階 級	状態 (State)	登録品種 「フェアリーウイン グ」 (4x)	ニューメリー	メリー変種 (2x)
			(日本語)				(日本語)			
17	17	QN (+)	肉穂花序の花柄の長さ	肉穂花序花柄の長さ	測定 cm	3 5 7	短 中 長	5:中(medium) 0.7	5:中(medium) 0.3	5:中(medium) 0.7
18	18 (*)	QN (+)	肉穂花序の長さ	肉穂花序の基部から先 端までの長さ	測定 cm	3 5 7	短 中 長	3:短(short) 2.4	5:中(medium) 5.6	3:短(short) 3
19	19	QN (+)	肉穂花序の太さ	肉穂花序の中間部の直 径	測定 mm	3 5 7	細 中 太	5:中(medium) 1.1	5:中(medium) 1.4	5:中(medium) 1
20	20	QL (+)	花柄に対する肉穂花序 の屈曲	肉穂花序の花柄がゆ合 部に対してなす角度	観察	1 2	屈曲 直線	2:直線(in line)	1:屈曲(not in line)	1:屈曲(not in line)
21	21 (*)	QL (+)	子房の先端の形	開花時の個々の子房の 先端の形状	観察	1 2	尖 丸	2:丸(round)	1:尖(pointed)	1:尖(pointed)
22	22 (*)	QN	開花期	開花期の早晩	観察	3 5 7	早 中 晩	7:晩(late)	5:中(medium)	5:中(medium)



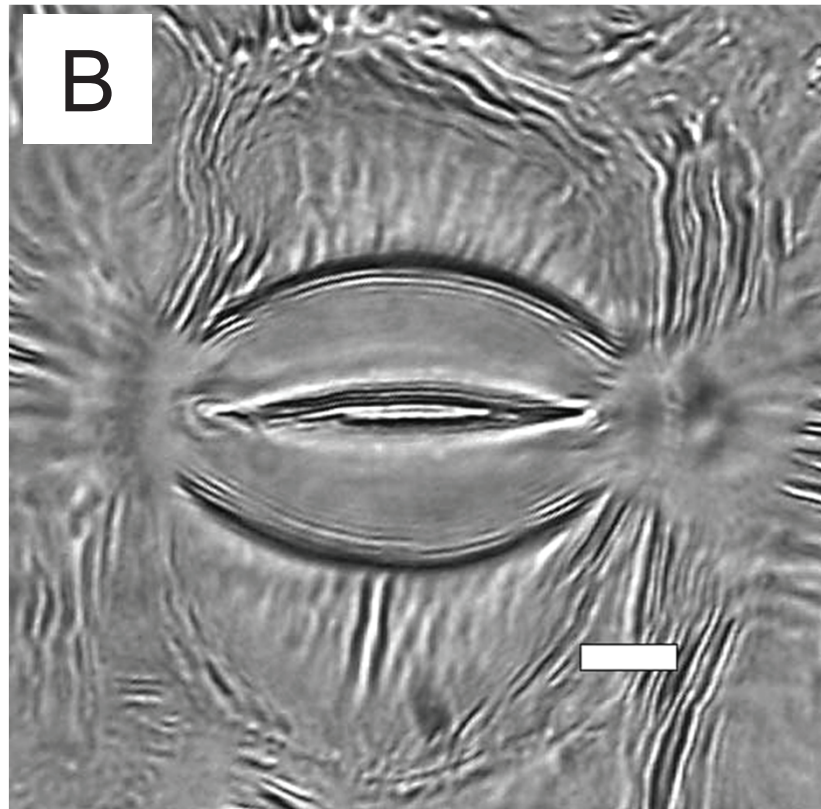
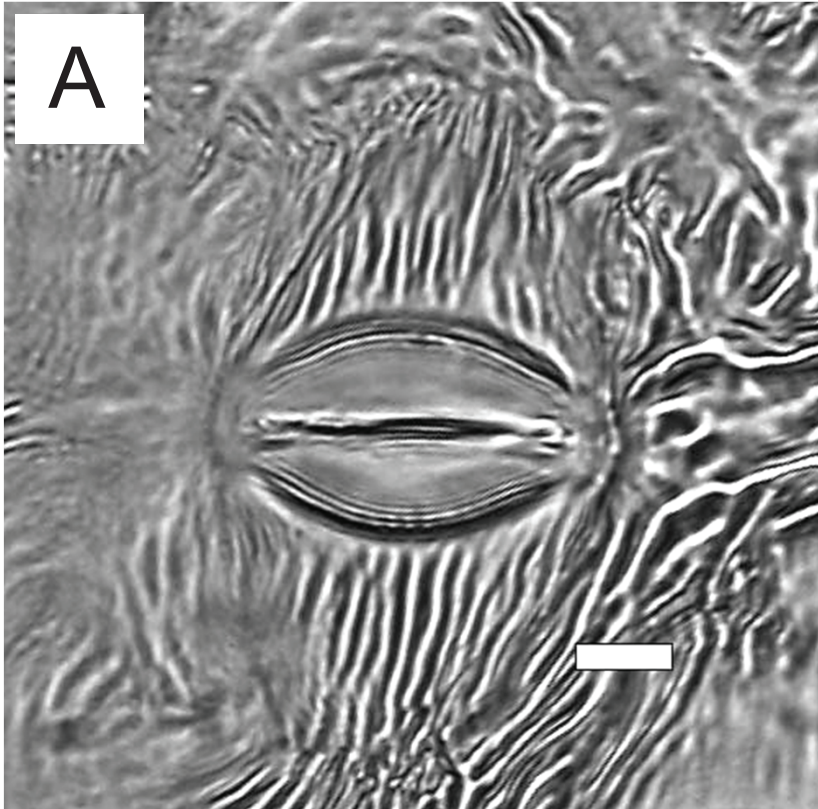
第2-1図 二倍体(A)および二倍体細胞と4倍体細胞を持つキメラ個体(B)のフローサイトメトリー



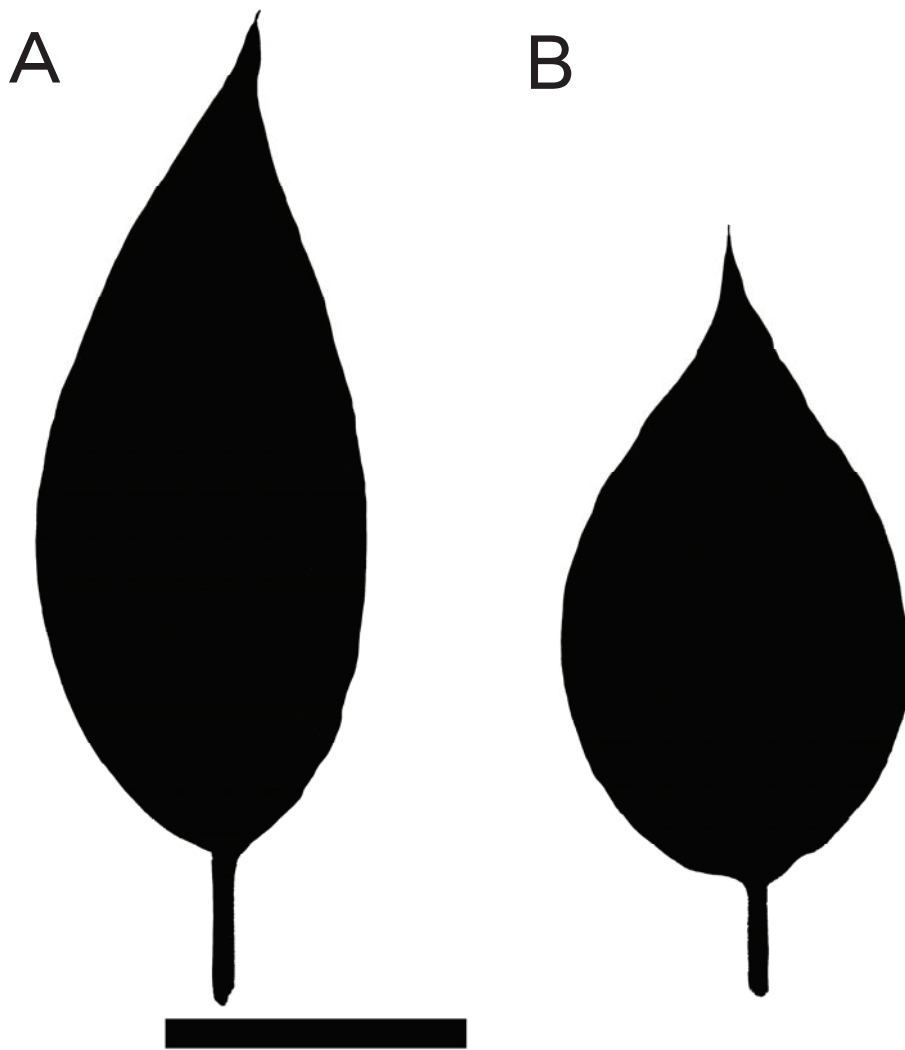


第2-2図 2倍体(A)と4倍体(B)のフローサイトメトリー

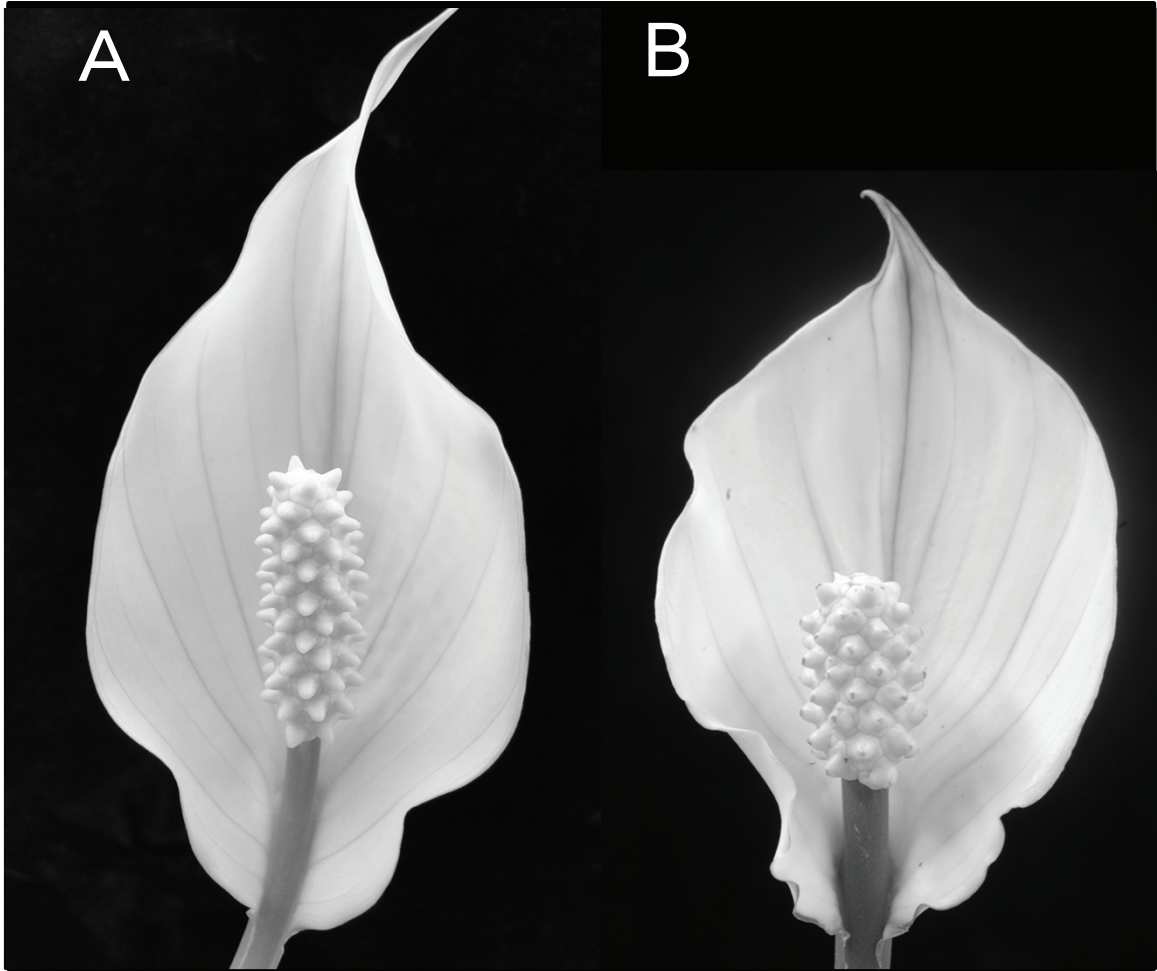
\* 内部標準:*H. vulgare* L. 'ASSE' ( $2n=2x=14$ , DNA amount 10.9 pg)



第2-3図 二倍体と四倍体の孔辺細胞  
bar: 10.0  $\mu\text{m}$



第2-4図 二倍体と四倍体の葉  
bar: 5 cm



第2-5図 二倍体と四倍体の花の形態

### 第 3 章 スパティフィラム‘ニューメリー’の頂端分裂組織への *in vitro* コルヒチン処理による倍数体作出

第 2 章において、S. ‘Merry’ (‘M’) の塊茎をコルヒチン溶液に浸漬処理して得られた  $2x+4x$  のキメラ個体から茎頂組織を摘出して培養し、誘導された多芽体から四倍体を獲得した。得られた四倍体は矮性で、葉や仏炎苞の肥厚化、花茎や肉穂花序の肥大が観察され、新品種‘フェアリーウィング’ (‘FW’) として種苗登録を行った (品種登録出願番号 第 25037 号)。しかし、‘FW’は葯が露出せず雄性不稔であり、その原因が倍数化に用いた二倍体親品種に起因することが明らかとなった。

そこで、種間交雑を目的とした稔性の高い新たな複二倍体を育成するために、花粉稔性の高い S. ‘New merry’(以下‘NM’とする) を用いた四倍体の育成を試みた。

前章での塊茎に対するコルヒチン浸漬処理では四倍体を得られず、得られた  $2x+4x$  キメラ個体の獲得率も 2% と著しく低かった。スパティフィラムの四倍体育成に関しては Eeckhaut ら (2004) や Vanstechelman ら (2009) の報告があるが、いずれも四倍体獲得率は数% と低く、四倍体獲得効率の高い処理方法の確立が望まれている。宮崎ら (1985) は、サトイモの培養茎頂のコルヒチン処理によって倍数体を獲得しており、その獲得率は 10% と高かった。

そこで、本研究では‘NM’を用い、倍数体獲得率の向上を目的として *in vitro* でのコルヒチン処理を検討した。

#### 材料および方法

岐阜大学応用生物科学部附属岐阜フィールド科学教育研究センター柳戸農場のガラス温室で栽培管理している‘NM’を用い、根、展開葉、未展開葉を除去した新芽を供試材料とした。実験は、殺菌処理前の未展開葉の除去数、摘出する頂端分裂組織の葉原基数、倍数化処理期間、処理方法を変えて実験 I ~ III の順に実施した。

実験 I. 供試材料の新芽を 2~3 枚の未展開葉を持つ約 5 cm に調整し, 中性洗剤で洗浄後, 有効塩素 1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (Tween20 を 1 滴/100 mL 含む) で 10 分間表面殺菌し, クリーンベンチ内にて滅菌水で 3 回洗浄した. 実体顕微鏡下で葉原基を 1~2 個持つ頂端分裂組織を摘出してコルヒチンを含む倍数化処理培地に置床し, 25℃, 日長 16 時間, 3000 lx で, 14 日間培養した. 倍数化処理培地は, オートクレーブで 121℃・15 分間滅菌した基本培地 (MS 培地, NAA 0.1  $\mu$ M, BAP 10  $\mu$ M, Sucrose 3%, Gelrite 0.2%, pH5.8) にコルヒチンとジメチルスルホキシド (DMSO) を無菌的に添加し, 直径 60 mm のプラスチックシャーレに 10 mL 分注して作成した. 処理区は, 基本培地のみの対照区, 基本培地に DMSO 5%のみを添加した DMSO 区, DMSO 5%を添加したコルヒチン 0.01, 0.05, 0.1%区とした. 処理個体数は対照区と DMSO 区が約 10 個体, コルヒチン 0.01, 0.05, 0.1%区が約 20 個体とした. 倍数化処理後, 基本培地を 10 mL 分注した管ビンに頂端分裂組織を移植し, 本葉が 3 枚以上展葉するまで培養した.

実験 II. 次亜塩素酸ナトリウム溶液での殺菌による植物体への障害を回避するために, 殺菌処理前の供試材料調整時に未展開葉を 4~5 枚残して調整し, さらに殺菌後に摘出した頂端分裂組織の葉原基数を 3~4 個とした. 実験 I と同様の倍数化処理培地を用い, 倍数化処理期間は 7 日間とした. 処理個体数は対照区と DMSO 区では約 30 個体, コルヒチン 0.01, 0.05, 0.1%区では約 60 個体とした. 倍数化処理後, 基本培地を 10 mL 分注した管ビンに頂端分裂組織を移植し, 本葉が 3 枚以上展葉するまで培養した.

実験 III. 殺菌処理前の供試材料の調整方法および摘出した頂端分裂組織の葉原基数は実験 II と同様とした. 摘出した頂端分裂組織は基本培地を 10 mL 分注した直径 60 mm のプラスチックシャーレで 1 カ月間初代培養した後, 実験 I と同様の倍数化処理培地に移植した. 倍数化処理期間は 14 日間とし, 倍数化処理後に基本培地を 10 mL 分注した管ビンに移植して, 本葉が 5 枚以上展葉する

まで培養した。処理個体数は対照区と DMSO 区では 15 個体，コルヒチン 0.01，0.05，0.1%区では約 30 個体とした。

倍数性の検定は Ploidy Analyser (Partec) を用いて行った。核単離溶液及び染色液(染色物質：4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI))として Plant High Resolution DNA Staining kit (Partec) を用い，クリーンベンチ内で採取した本葉を Chopping 法 (Galbraith ら,1983) を用いて検定した。

倍数化処理後の基本培地での培養過程において，多くの頂端分裂組織で複数のシュートの伸長が認められた。頂端分裂組織から複数のシュートが発生した場合には，すべてのシュートから葉を採取し，一括して Chopping 法で倍数性を検定し，4x のピークが確認できたものを倍数体と判定した。

倍数体と判定された培養個体はシュートごとに分割して継代培養し，シュート伸長後に再度倍数性を検定した。四倍体と判定されたシュートについては茎頂組織を切り取って基本培地に移植し，多芽体を誘導した。多芽体から得られたシュートは MS 培地 (Sucrose 3%，Gelrite 0.2%，pH5.8) を 40 mL 分注したマヨネーズビンに移植し発根を促した。発根後，pH 調整済みピートモス培養土 (BM-2, Berger) と赤玉土を 1:1 で混合した培養土を充填した 72 穴セルトレイに植え付けて順化し，2 カ月後に 6 cm ポットに移植し，再度倍数性を検定した。四倍体と確認された個体は 6 カ月後に 9 cm ポットに鉢上げして形質を調査した。

### 結果および考察

スパティフィラムの塊茎は地中にあるため雑菌汚染率は 20%程度と高かったが，各処理区間および実験 I ~ III の間に有意差は認められなかった。雑菌汚染が一定数みられたため，生存率 (%) は  $\text{生存個体数} / (\text{処理個体数} - \text{雑菌汚染個体数}) \times 100$  として算出し，第 1 表に示した。実験 I のコルヒチン 7 日間処理区では計 5 個体しか生存せず，生存率は 6.1%と低かった。同様に 14 日間処

理においても生存率は低く，対照区で 50.0%とやや高かったものの，全処理区の平均では 14.7%となり，実験 I での平均生存率は 3.5%と低かった．これに対して実験 II および III では平均生存率が 58.8%，82.3%と高く，実験 I に比べて有意に上昇した．

実験 I では雑菌汚染を避けるために新芽の調整時での未展開葉の除去数を多くし，さらに表面殺菌後の頂端分裂組織の摘出にあたって葉原基数を 1~2 個と少なくした．その結果，表面殺菌時での次亜塩素酸ナトリウムによる障害が発生し，さらにコルヒチン処理においても茎頂組織が小さかったために細胞分裂阻害が強く作用した結果，生存率が著しく低くなったと考えられる．これに対して実験 II および III では，表面殺菌前の新芽の調整時に除去する未展開葉数を少なくしたことで次亜塩素酸ナトリウムによる障害が回避でき，さらに摘出する頂端分裂組織を大きくしたことでコルヒチン処理による細胞分裂阻害作用が回避され，生存率が高くなったと考える．

コルヒチン処理後の生存個体数と得られた倍数体数について実験 I と実験 II で比較すると，実験 I のコルヒチン処理区では生存個体が 4 個体と少なく，そのいずれも二倍体であった．これに対して実験 II では生存個体が 117 個体と増加したものの倍数体は 3 個体しか得られず，倍数体の平均獲得率は 1.5%と著しく低かった．実験 II において，表面殺菌前の植物体調整方法を改変したことで次亜塩素酸ナトリウムによる障害が回避でき，さらに摘出した頂端分裂組織を大きくしたことで生存率が高まったものの，このことがコルヒチン処理による倍数体獲得率を高める効果をもたらさなかった．

実験 II と実験 III の倍数体獲得率を比較すると，いずれのコルヒチン処理濃度区においても実験 III の獲得率が高く，平均獲得率は実験 II の 1.5%に対して実験 III では 21.9%と有意に高かった．コルヒチンによる染色体倍加は細胞分裂中期の紡錘体形成を阻害することで行われ (Hays and Salmon, 1986)，細胞分裂が盛んな組織ほど



倍数体の獲得効率は高くなる。従って、実験Ⅱの頂端分裂組織の細胞分裂活性は実験Ⅲでのそれに比べて低かったものと考えられた。

宮崎ら（1985）は、サトイモにおいて初代培養した組織の細胞が第1回目の分裂を開始するのは置床して3日後と述べている。実験Ⅱでは頂端分裂組織を摘出して7日間のコルヒチン処理を行ったのに対して、実験Ⅲでは摘出後に基本培地で1カ月間の初代培養を行い、その後に14日間のコルヒチン処理を行った。従って、実験Ⅱでは初代培養直後の細胞分裂活性の低い時期にコルヒチン処理が行われたため、得られた倍数体数が少なかったものと考えられる。これに対して実験Ⅲでは、基本培地での1カ月間の初代培養期間中に活発な細胞分裂が開始されており、その後の処理でのコルヒチンの細胞分裂中期の紡錘体形成阻害作用が高まったと考える。培養組織に対するコルヒチン処理での継代培養効果はニンニクでも報告されており（柳野,1994）、葉原基を3~4個持った茎頂組織を3~5日間コルヒチン無添加のMS培地で培養後、コルヒチン添加培地に移植した処理では、茎頂組織摘出直後にコルヒチン処理した場合に比べて倍数体獲得率が高いことが明らかとなっている。

実験Ⅲでのコルヒチン処理濃度についてみると、有意ではなかったものの濃度が高くなるに従って倍数体獲得率が低下する傾向が認められた。従って、スパティフィラムの頂端分裂組織に対するコルヒチン処理濃度は0.01%区が適していたと考えられた。

前報（小笠原ら, 2012）での塊茎に対するコルヒチン浸漬処理での $2x+4x$ キメラ個体の獲得率が2%であったのに対して、実験Ⅲでの四倍体平均獲得率は21.9%と高く、処理区によっては31.3%に達した。従って、頂端分裂組織を摘出して1カ月間増殖培地で初代培養した後にコルヒチン0.01%を添加した培地で倍数化処理を行うことで効率的に四倍体を獲得することが可能であると考える。

得られた四倍体の植物体の葉の形質特性を第 2 図に示した。得られた四倍体は，起源となる頂端分裂組織が異なっても形態は同じであった。これは親の‘NM’が栄養繁殖性のクローン品種であることに起因しており，すべての四倍体は同一であると判断できた。葉の形態をみると，‘NM’の平均葉長が 15.0 cm，葉幅が 4.5 cm であったのに対して，四倍体の平均葉長は 17.4 cm，葉幅は 9.1 cm となり，明らかに幅広の形態を示し，その縦横比は 0.5 と大きかった（第 2 図）。この葉の縦横比は‘M’の四倍体である‘FW’とほぼ同じで，四倍体の葉が丸みを帯びる形態を示すことは多くの植物においても観察されている（Fukui・Yokota, 2007；Thao ら, 2003）。従って，草姿は‘FW’よりやや大きく，‘NM’と比較して幅広の葉が特徴であった（第 3 図）。仏炎苞の大きさは，四倍体では長さが 10.5 cm，幅が 5.0 cm であったのに対して‘M’ではそれぞれ 13.1 cm，6.7 cm であったことから，やや小さかった。

本研究において稔性を持つ四倍体が得られたことから，今後二倍体品種との交配によって三倍体の作出を目指すとともに，本方法を用いて野生種の四倍体を育成して種間交雑を行い，新たなスパティフィラム品種の育成を試みたい。

第3-1表 スパティフィラム‘New Merry’の頂端分裂組織への in vitro コルヒチン処理の影響

実験 I \*

処理期間	処理	供試個体数	雑菌汚染 個体数	生存個体数 (%) <sup>z</sup>	倍数化検定 個体数	倍数化個体数 (%) <sup>y</sup>
7日	対照区	10	0	3 ( 30.0 ) ab	0	0 ( 0 )
	DMSO 5%	10	2	1 ( 12.5 ) ab	0	0 ( 0 )
	コルヒチン 0.01	19	1	0 ( 0 ) b	0	0 ( 0 )
	(%) <sup>x</sup> 0.05	20	1	0 ( 0 ) b	0	0 ( 0 )
	0.1	23	2	1 ( 4.8 ) b	1	0 ( 0 )
14日	対照区	20	8	6 ( 50.0 ) a	0	0 ( 0 )
	DMSO 5%	20	8	1 ( 8.3 ) ab	0	0 ( 0 )
	コルヒチン 0.01	30	7	2 ( 8.7 ) ab	2	0 ( 0 )
	(%) <sup>x</sup> 0.05	25	9	1 ( 6.3 ) b	1	0 ( 0 )
	0.1	20	4	0 ( 0 ) b	0	0 ( 0 )

\* 表面殺菌前に2~3枚の未展開葉を残して調整し、1~2個の葉原基を持つ頂端分裂組織に対してin vitroでコルヒチン処理を行った

実験 II \*\*

処理期間	処理	供試個体数	雑菌汚染 個体数	生存個体数 (%) <sup>z</sup>	倍数化検定 個体数	倍数化個体数 (%) <sup>y</sup>
7日	対照区	40	11	22 ( 75.9 ) NS	0	0 ( 0 )
	DMSO 5%	40	12	18 ( 64.3 ) NS	0	0 ( 0 )
	コルヒチン 0.01	81	20	31 ( 50.8 ) NS	31	1 ( 1.6 ) NS
	(%) <sup>x</sup> 0.05	86	15	43 ( 60.6 ) NS	47	1 ( 1.4 ) NS
	0.1	91	24	43 ( 64.2 ) NS	43	1 ( 1.5 ) NS

\*\* 表面殺菌前に4~5枚の未展開葉を残して調整し、3~4個の葉原基を持つ頂端分裂組織に対してin vitroでコルヒチン処理を行った

実験 III \*\*\*

処理期間	処理	供試個体数	雑菌汚染 個体数	生存個体数 (%) <sup>z</sup>	倍数化検定 個体数	倍数化個体数 (%) <sup>y</sup>
14日	対照区	19	5	8 ( 57.1 ) NS	0	0 ( 0 )
	DMSO 5%	20	7	8 ( 61.5 ) NS	0	0 ( 0 )
	コルヒチン 0.01	44	12	29 ( 90.6 ) NS	26	10 ( 31.3 ) NS
	(%) <sup>x</sup> 0.05	44	14	23 ( 76.7 ) NS	22	6 ( 20.0 ) NS
	0.1	43	9	27 ( 79.4 ) NS	25	5 ( 14.7 ) NS

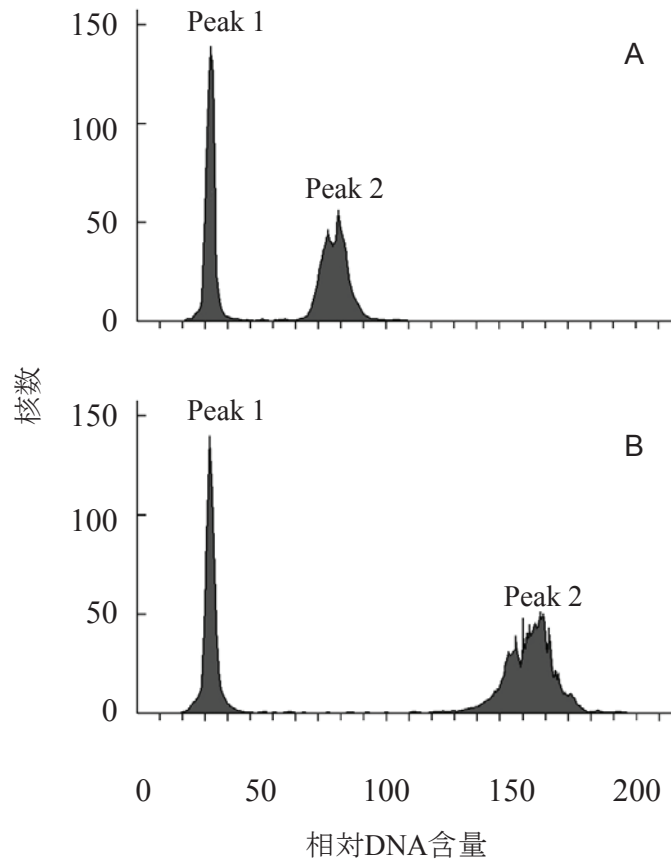
\*\*\* 実験 IIと同様に供試材料を調整して表面殺菌し、頂端分裂組織を摘出した。頂端分裂組織はNAA 0.1 μMとBAP 10 μMを含むMS培地で1カ月培養後にin vitroでコルヒチン処理を行った

z: 生存率は、生存個体数 / (供試個体数 - 雑菌汚染個体数) × 100として算出した

同一英文字はp<0.05で有意差を示す

y: 倍数化個体は2x+4xのキメラ個体と4x個体を含む

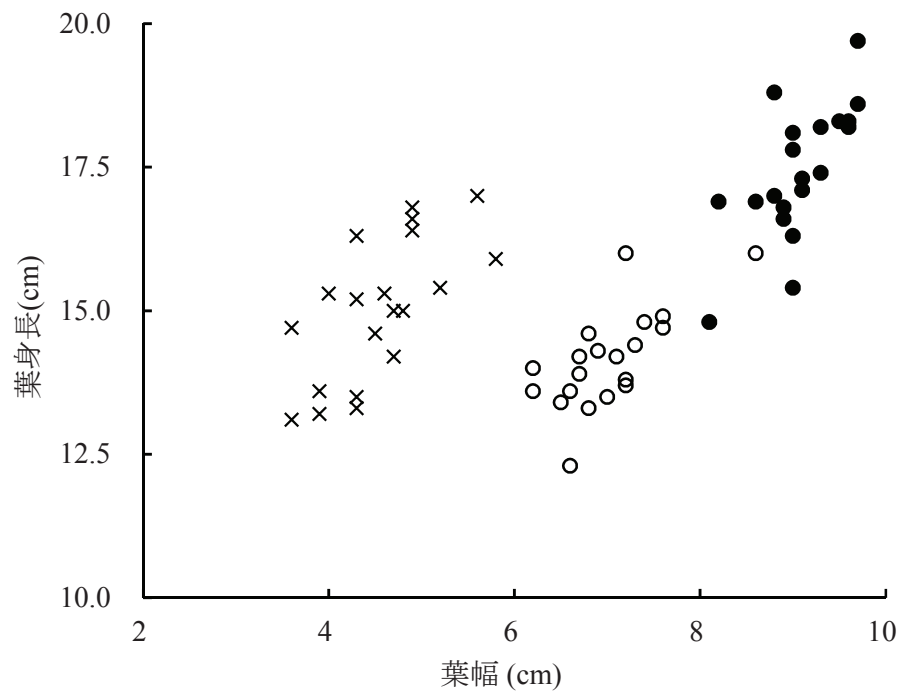
x: コルヒチン溶液はDMSO 5%を含む



第3-1図 二倍体(A)と四倍体(B)のフローサイトメトリー

Peak 1 : 内部標準としての*Sandersonia aurantiaca* Hook.f.

Peak 2 : 二倍体および四倍体



● Tetraploid ○ Fairy wing × Diploid ('New merry')

第3-2 四倍体, 二倍体および'FW'の葉形特性



二倍体  
(‘NM’)

四倍体

‘FW’

第3-3図 二倍体(‘NM’), 四倍体および‘FW’の植物体の形状

## 第 4 章 スパティフィラム ‘フェアリーウィング’ (4x) と ‘メリー’ (2x) との交配による三倍体作出

二倍体を倍数化した四倍体は形質が肥大化するが、三倍体はより大型化することが知られており、スパティフィラムの三倍体の事例として ‘センセーション’ がある (Eeckhautら, 2004)。本研究で用いた ‘メリー’ (‘M’) や ‘ニューメリー’ (‘NM’) の草丈が 40 cm 程度であるのに対して、 ‘センセーション’ は草丈 150cm となる超大型品種である。このように、第 2 章及び第 3 章で作出した四倍体とその親である二倍体との交配によって三倍体を作出することで、形態が大型化した個体の作出が期待できる。そこで、本研究にて作出した四倍体 ‘フェアリーウィング’ (‘FW’) を用いて三倍体の作出を試みた。

### 材料および方法

‘FW’ は、倍数化に用いた二倍体の親である ‘スーパーミニ’ (‘SW’) の性質を受け継ぎ、葯が露出せず雄性不稔の形質を示している。しかし、観察の過程で雌蕊の柱頭の展開が認められたため受精能力があるものと推定し、種子親として四倍体の ‘FW’ と、その育成親である二倍体の ‘SM’ を用い、花粉親として花粉稔性を持つことが確認できている二倍体の ‘Merry’ (‘M’) を用いた。‘SM’ は二倍体 ‘M’ の変異体であり、小型で葯が露出しない傾向があり雄性不稔であるのに対して ‘M’ は中型で稔性がある。

‘M’ の花粉は開花直後の花から予め採取して -30℃ で冷凍保存したものを使用した。本研究で使用した ‘FW’ は雄性不稔であり、

栽培施設内には種子親品種である‘FW’あるいは‘SM’以外の品種を栽培していないことから，除雄や肉穂花序の被覆は行わなかった．それぞれの品種の雌蕊が成熟して柱頭の展開が認められた雌蕊に晴天日を優先して二日に一度の頻度で絵筆にて花粉を塗布した．交配は肉穂花序のほぼすべての雌蕊の柱頭が展開して，その先端が黒く変色するまでの2～3週間継続して行った．

交配2～3ヶ月後に肉穂花序から果実を採取し（第4-1図），中性洗剤で洗浄後，70%エタノールに1分間浸漬し，有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液（Tween20を1滴/100 mL含む）で10分間表面殺菌し，クリーンベンチ内にて滅菌水で3回洗浄した．果実から種子を取り出し， $GA_3$ を $1.0 \times 10^{-7}$  M添加したMS培地（Sucrose 3%，Gelrite 0.2%，pH5.8）に置床し，暗所，25℃で2ヶ月間培養した．発芽が確認された個体から明所（25℃，3000lx，16時間日長）へ移動し，展葉後，FCMにて倍数性を確認した．

得られた三倍体は多芽体形成培地（MS培地，NAA  $1.0 \times 10^{-7}$  M，BAP  $1.0 \times 10^{-5}$  M，Sucrose 3%，Gelrite 0.2%，pH5.8）へ移植し多芽体を誘導した．多芽体から分離したシュートは発根培地（MS培地）へ移植し，順化，鉢上げをおこなった．

### 結果および考察

‘スーパーミニ’（2x）および‘フェアリーウィング’（4x）と‘メリー’（2x）との交雑

‘SM’（2x）×‘M’（2x）との交配では，‘SM’（2x）の22個体を用いて交配した結果（第4-1表），11個体については交配2～3ヶ月後に肉穂花序が枯死し，種子の採取に至らなかった．また，



このうち 2 個体については同時に被害を受けていた。これら 11 個体を除いた 11 個体全てで種子が得られた（第 4-2 図）。

Henny ら(2008)は、スパティフィラムを用いた交配において、交配 4~6 ヶ月後に完熟果実が得られ、種子が完熟すると果実が黄色化し軟化したと述べている。しかし、本研究で使用した‘SM’ (2x) では交配 2~3 ヶ月後には完熟種子が得られており、Henny ら(2008)の報告を考慮して採取時期を評価した結果、適正な採取時期を逃したために肉穂花序の枯死を招き、種子の採取ができなかったと考えられる。

交配を行った 22 個体のうち、緑色の段階で肉穂花序を採取できた 6 個体から 63 粒の種子が得られ、これらについて無菌播種を行い、残りの 5 個体の肉穂花序から得られた種子 203 粒については通常の播種を行った。無菌播種を行った 116 粒の種子では 21 粒で発芽が認められ、無菌播種における発芽率は 18.1%であった。これに対して通常播種した 203 粒の種子では無菌播種での発芽率を大きく超える 50%以上の割合で発芽が認められ、二倍体同士の交配で得られた完熟種子については無菌播種を行う必要がないと判断できた。

‘FW’ (4x) × ‘M’ (2x) では、‘FW’ (4x) の 15 個体を用いて交配を行った（第 4-2 表）。種子の採取を行った 8 月 2 日には 6 個体で肉穂花序が枯死していた（第 4-3 図）。枯死していた肉穂花序のうち 2 個体で種子の形成が確認できたため、種子を採取し実体顕微鏡下で種子の状態を観察した結果、そのすべての種子の内部は空洞となっており、受精後の未熟な状態で胚が発育不全を起こした種子であった。肉穂花序が黄褐色の 1 個体と緑色の 5 個体から計 66 粒

の種子が採取でき、それらについて無菌播種を行った。

黄褐色の4個体についてみると種子が得られたのは1個体のみであったことから、交配後に受精しなかった肉穂花序や受精しても形成した種子数が少ない肉穂花序は発育を停止して黄褐色に変色して枯死し、いわゆる生理落果と同じ現象が生じたと考えられた。このことは緑色の肉穂花序からは最大で21個の種子が得られ、平均種子数が13個であったことから明らかであった。また、緑色であった肉穂花序のうち最も種子数の少ないものは3個であったことから、受精後に肉穂花序が正常に発育を続けるためには少なくとも複数の種子の形成が必要であると考えられる。

#### 種子培養

‘SM’ (2x) × ‘M’ (2x)における種子培養後の発芽を第4-3表に、‘FW’ (4x) × ‘M’ (2x)における種子培養後の発芽を第4-4表に示した。

‘SM’ (2x) × ‘M’ (2x)で得られた63個の種子のうち10個が発芽し、発芽率は15.9%であった。無菌播種した種子のうち36個で雑菌汚染がみられ、雑菌汚染率は57.1%と高かった。雑菌汚染した種子の中には発芽したものもみられ、8個体の発育個体を得ることができた。また、未発芽であったものは19個体であった。

‘FW’ (4x) × ‘M’ (2x)の交配で得られた66個の種子のうち2個の種子(3.0%)が発芽し、フローサイトメトリーによる倍数性の検定の結果、三倍体であることが確認できた。未発芽のものは28個で、42.4%と高い割合であった。また、雑菌汚染したのもも36個と多く、その割合は54.5%であった。

雑菌汚染率は種子親として‘SM’ (2x)と‘FW’ (4x)のいずれを用いた場合でも 54%以上と高く、両者に有意な差は認められなかった。雑菌汚染率がいずれの種子親を用いた場合でも高かった理由として、種子から果肉を完全には取り除けず、果肉が種子に付着した状態で培養を行ったことが考えられる。特に、本研究では肉穂花序を表面殺菌した後に種子を取り出して培養したが、予め種子を採取した後に表面殺菌することで、雑菌汚染を回避できたかもしれない。

二倍体と四倍体の交配で得られる三倍体の種子では、その発育途中で胚乳組織の崩壊が生じることが知られている。第 4-3 図に示すように、‘SM’ (2x)×‘M’ (2x)で得られた種子を実体顕微鏡下で半切して観察した結果、正常に発育した胚が認められたのに対して、‘FW’ (4x)×‘M’ (2x)で得られた種子では胚乳が細胞質胚乳に発達しておらず、液状の遊離核胚乳の形態であったため半切できず、発育した胚を観察することができなかった。また、この‘FW’ (4x)×‘M’ (2x)で得られた種子を押しつぶして検鏡したが、子葉胚に発育した胚や細胞質胚乳を観察することができず、未熟な状態であった。したがって、‘FW’ (4x)×‘M’ (2x)の交配で得られた種子は胚乳組織の崩壊が生じ、胚乳が崩壊した空隙に雑菌が侵入していたため、雑菌汚染率が高くなったことも考えられる。しかし、この胚乳の崩壊は二倍体同士の交配では生じておらず、種子親として二倍体を用いた場合と四倍体を用いた場合で雑菌汚染率に有意な差が認められなかったことから、胚乳の崩壊に基づく雑菌汚染の発生は少なかったと考える。

以上のことから、雑菌汚染を抑えるためには果実の採取時期を早

め、未熟胚を摘出する胚救出や、種子を果実から取り出した後に種子の表面殺菌を行うなどの検討が必要と考える。

種子親として用いた‘SM’ (2x)と‘FW’ (4x)の発芽率を比較すると(第4-5表)、二倍体の‘SM’の発芽率は四倍体の‘FW’に比べて高かった。このことは、前述のような三倍体の‘FW’での受精胚の発育不全や胚乳極核の不適合に起因する胚乳の発育途中での崩壊が生じていた事が大きな原因として考えられる。また、‘FW’では四倍体化したことで胚珠の受精能力が低下している可能性も考えられる。このことは、第4-1および4-2表に示すように、個体ごとに得られた種子数が大きく異なり、二倍体の‘SM’では最大で51個の種子を得ることができたのに対して、四倍体の‘FW’では21個が最大種子数であったことから示すことができる。人工受精による受精率は花粉の稔性や交配日の天候等も影響するが、両者の受精作業はほぼ同時に行っていることを考慮すると、種子親の胚珠の受精能力に差があったと考える。

二倍体の種子は交配2~4か月後の緑色の果実から採取し、播種することで発芽個体を得られ、三倍体は交配2~3か月後の緑色の果実から種子を取り出し無菌播種することで低率ではあったが発芽個体を得られた。Hennyら(2008)は、供試した品種の記載がないものの、交配後の種子が完熟するまでに6か月を要すると述べている。したがって、スパティフィラムの種子の完熟までの期間には品種間があると推定でき、今後交配を行うにあたって交配後から完熟までの期間を確認して実施する必要がある。

本研究結果において、‘SM’と‘FW’を種子親とした交配で種子

が得られたことから，これらの品種はいずれも葯が露出せず雄性不稔であったものの，雌蕊は受精能力を持っており，種子親として用いる場合には交配に供することができることが明らかとなった．しかし，得られた肉穂花序あたりの種子数は明らかに‘SM’が‘FW’を上回っており，倍数化に伴って受精能力の低下が生じている可能性が考えられた．

第4-1表 SM (2x) × M (2x) の交配結果

交配個体 番号	交配 開始日	果実 採取日	結実の状態	種子数	培養個体 番号
1	4月24日	8月2日	枯れ	6	-
2	4月24日	8月2日	枯れ	4	-
3	4月24日	8月2日	枯れ、食害	-	-
4	4月24日	8月2日	枯れ	10	-
5	4月24日	8月2日	枯れ	7	-
6	4月24日	8月2日	緑色	12	1
7	4月28日	8月2日	枯れ	4	-
8	5月3日	8月2日	枯れ、食害	-	-
9	5月3日	8月2日	枯れ	6	-
10	5月3日	8月2日	緑色	6	2
11	5月4日	8月2日	枯れ	8	-
12	5月4日	8月2日	枯れ	1	-
13	5月7日	8月2日	枯れ	7	-
14	5月7日	8月7日	緑色	14	3
15	5月7日	8月7日	緑色	3	4
16	5月10日	8月7日	緑色	11	5
17	5月10日	8月7日	緑色	17	6
18	5月16日	9月13日	緑色	23	播種
19	5月16日	9月13日	緑色	44	播種
20	5月21日	9月13日	緑色	34	播種
21	5月28日	9月24日	緑色	51	播種
22	5月28日	9月24日	緑色	51	播種

第4-2表 FW (4x) × M (2x) の交配結果

交配 個体番号	交配 開始日	果実 採取日	結実の状態	種子数	培養個体 番号
1	4月28日	8月2日	枯れ	0	-
2	5月3日	8月2日	枯れ	0	-
3	5月7日	8月2日	枯れ	13	-
4	5月10日	8月2日	枯れ	0	-
5	5月10日	8月2日	枯れ	0	-
6	5月10日	8月2日	枯れ	9	-
7	5月11日	8月7日	緑色	13	1
8	5月11日	8月7日	緑色	21	2
9	5月16日	8月2日	黄褐色	1	3
10	5月16日	8月7日	緑色	3	4
11	5月21日	8月2日	黄褐色	0	-
12	5月21日	8月7日	緑色	8	5
13	5月28日	8月7日	緑色	20	6
14	5月30日	8月2日	黄褐色	0	-
15	5月30日	8月2日	黄褐色	0	-

第4-3表 'SM' (2x) × 'M' (2x) の種子培養

培養個体番号	1	2	3	4	5	6	計
未発芽	4	3	6	1	4	1	19 ( 30.2 )
雑菌汚染 (発芽)	5 ( 3 )	1 ( 0 )	7 ( 0 )	0 ( 0 )	5 ( 1 )	16 ( 4 )	34 ( 54.0 ) ( 8 )
発芽	3	2	1	2	2	0	10 ( 15.9 )
総種子数	12	6	14	3	11	17	63

第4-4表 'FW' (4x) × 'M' (2x) の種子培養

培養個体番号	1	2	3	4	5	6	計
未発芽	6	6	0	1	0	15	28 ( 42.4 )
雑菌汚染 (発芽)	6 ( 0 )	15 ( 0 )	1 ( 0 )	2 ( 0 )	8 ( 0 )	4 ( 0 )	36 ( 54.5 ) ( 0 )
発芽	1	0	0	0	0	1	2 ( 3.0 )
総種子数	13	21	1	3	8	20	66



第4-1図 'SM' (2x) × 'M' (2x) の果実



枯れ



食害



緑色

第4-2図 'SM' (2x) × 'M' (2x) の結実状態



枯れ



黄褐色



緑色

第4-3図 'FW' (4x) × 'M' (2x) の結実状態



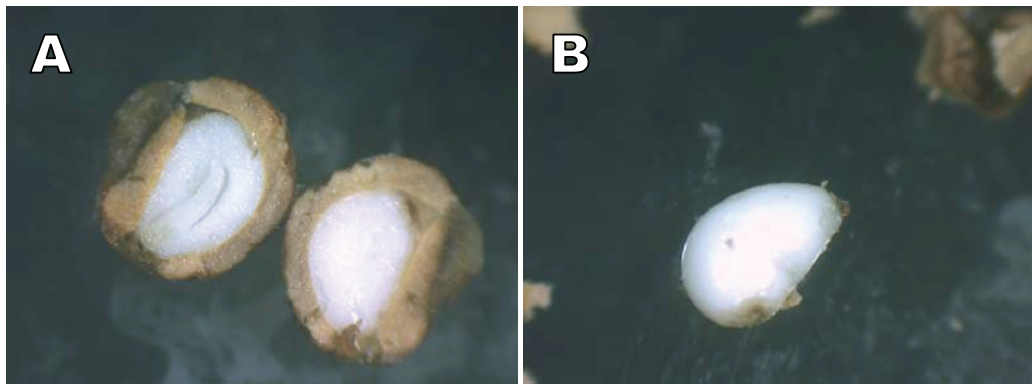


図4-4 'SM' (2x) × 'M' (2x) の種子 (A) と'FW' (4x) × 'M' (2x) の種子 (B) の胚の形状

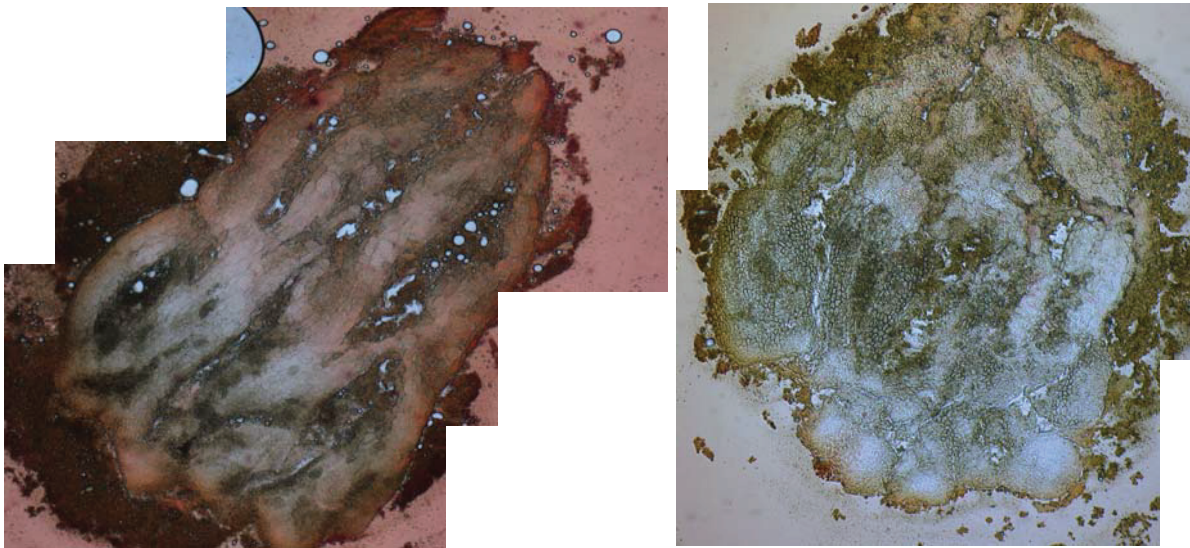


図4-5 'FW' (4x) × 'M' (2x) の種子の内部組織の形態

## 第 5 章 総合考察

倍数化処理の供試材料として、種子や伸長したシュート、球根（塊茎）、培養組織などが用いられており（西尾，1977）、処理の簡便性や効率性などの観点から供試材料や処理方法の選択が行われている。本研究で用いたスパティフィラムは、ヨーロッパの一部の生産会社では種子繁殖による鉢物生産が行われているが、日本国内では培養苗や株分けなどの栄養繁殖によって増殖したクローン個体が種苗として供給されており、種子の入手が困難である。そこで本研究では倍数化の材料として培養苗順化後の小塊茎と頂端分裂組織を選択し、塊茎のコルヒチン溶液への浸漬処理と、頂端分裂組織の *in vitro* でのコルヒチン添加培地による培養処理を行った。

コルヒチンによる染色体の倍数化は、細胞分裂中期の紡錘体形成を阻害するので、縦裂した染色体は両極に分かれることができず、そのまま四倍性の複旧核を形成することで生じる現象であることから（西尾，1977）、供試材料の成長活性（細胞分裂活性）が倍数化効率に大きく影響する。第 2 章の塊茎のコルヒチン溶液への浸漬処理で得られた倍数化個体は、供試した 864 個体のうち得られた倍数化個体は 3 個体と獲得率は著しく低く、得られた倍数化個体も  $2x+4x$  キメラ個体であった。

スパティフィラムの塊茎には多数の成長点が存在するが、塊茎の頂芽の成長点以外は頂芽優勢によって休眠状態にあり、細胞分裂の活性が高い成長点は頂芽のみである。第 2 章では、比較的成長活性の高い培養苗順化後の小塊茎を供試材料として用いたが、コルヒチンが作用する細胞分裂中期の細胞頻度が低かったものと考えられた。また、得られた倍数化個体が  $2x+4x$  キメラ個体であったことから、倍数化処理

によって成長点の一部の細胞の染色体が倍加したものの頂端分裂組織内には 2x の細胞と 4x の細胞が共存するキメラ状態となっていた。キメラ個体では、四倍体細胞に比べて二倍体細胞の細胞分裂速度が速いため、キメラ個体の生育の過程で倍加した細胞が失われることもある。したがってキメラ個体に対しては、キメラ個体同士の交雑による実生の獲得や挿し木、組織培養などの選抜を行わない限り、すべての細胞が倍加した完全な倍数体を得ることは理論上不可能である。第 2 章において、キメラ個体の頂端分裂組織を摘出して 4x 細胞からの不定芽形成による四倍体の固定を試みたが、幸運にも 1 個体の四倍体を得られ、その獲得率は 0.7% (1/142) と著しく低かった。したがって、塊茎のコルヒチン溶液への浸漬処理は細胞分裂速度が遅いスパティフィラムには適していなかった。

スパティフィラムでは組織培養技術は確立されているため、1 細胞からの植物体再生が可能であり、形成された不定芽からの多芽体の誘導も容易である。第 3 章で頂端分裂組織に対して *in vitro* でのコルヒチン処理を試みた結果、実験 III での四倍体平均獲得率は 21.9% と高く、処理区によっては 31.3% に達した。*In vitro* での頂端分裂組織に対するコルヒチン処理は得られた倍加細胞をその後の増殖培養で効率よく増殖することが可能であり、倍数化処理として効率がよい方法であると考えられる。本研究では *intact* な植物体の頂端分裂組織を使用したため雑菌汚染率が高くなったが、多芽体などの培養組織を用いることで回避できると予想される。

第 4 章の三倍体育成において、対照区の二倍体同士の交配によって多数の種子が得られ、発芽率は 50% 以上と高かったことから、スパティフィラムの倍数化の材料として種子の利用も可能であることが明らかとなった。しかし、スパティフィラム品種の多くはヘテロ接合体

であるため、種子の倍加で得られる倍数体の形質がばらつくことが懸念される。また、塊茎での処理と同様に完全な倍数体を得るためには、得られた個体同士の交雑での実生の獲得や頂端分裂組織の培養が必要であり、培養組織を用いた倍数化処理と比較して必ずしも効率は高くないと考えられる。しかし、培養組織の倍数化処理は培養技術と設備が必要であり、大学等の研究機関や種苗会社では可能であるが、生産者や個人育種家では容易に実施することができない。この観点においては、塊茎や種子を用いた倍数化処理は簡便性の観点で実用的な倍数化育種方法であるともいえる。

四倍体と二倍体との交雑によって多くの植物で三倍体が作出されている（Yao・Cohen, 1996；Morganら, 2004；Sharmaら, 1996）。しかし、四倍体と二倍体との受精後の胚乳組織の発育不全などが原因で受精胚の発育が抑制され、完熟種子を獲得できない場合がある。このことは本研究でも観察され、対照として行った二倍体同士の交雑では胚の発育がみられたのに対して、四倍体と二倍体との交雑では胚乳組織が細胞質胚乳に発達しておらず、実体顕微鏡下では胚を観察することができなかった。

一般に、受精不適合などが原因で胚の発育が停止し、実生個体を得られない場合に未熟胚培養や未熟胚珠培養が有効である（西尾, 1977）。本研究においても受粉2カ月後の種子を培養した結果、三倍体を獲得することができ、組織培養技術を用いることで三倍体の作出が可能であることが明らかとなった。しかし、果実の採取時期や雑菌汚染を防ぐ培養時期に課題が残っており、今後これらの点について検討する必要がある。

本研究で作出した四倍体は、二倍体と比較して気孔の肥大、葉や仏炎苞の卵形化および肥厚化、肉穂花序や花茎の肥大化、植物体の矮化

が観察された。Laere ら（2010）は、Eeckhaut ら（2004）と Vanstechelman ら（2009）が育成した *S. wallisii* Regel の数系統の二倍体と四倍体について、形態学的、解剖学的変化と、乾燥ストレスに対する改良の可能性の評価を行っており、四倍体では本研究で得られた四倍体と同様の形質変化に加えて、気孔密度の減少、乾燥重の減少、シュート・葉の生成数の低下、気孔抵抗や葉の水ポテンシャルの増加と関連するプロリン含有率の減少と、しおれ症状の遅延等の乾燥ストレスへの抵抗性の増大を認めている。これらの形態的变化は本研究で作成した四倍体と類似しており、本研究で作成した四倍体も乾燥ストレスへの抵抗性が増大していると考えられた。

高次倍数体は細胞分裂の低下による生育の遅延や、稔性の低下等の欠点をもたらすが、本研究で作出した四倍体においても生育遅延による培養苗の増殖速度の低下、栽培期間の延長等が生じている。しかし、室内のインテリアとして長期間観賞する観葉植物では生長速度が遅く外見の変化が少ないほうが望ましく、耐乾性、稔性低下による開花期間の延長と合わせて利点と考えることもでき、この観点では倍数性育種は観葉植物に適しているといえる。

倍数性育種は異種間や異属間の交雑を行うためには不可欠な手法である。スパティフィラム属の野生種は主に熱帯アメリカに約 40 種が自生しており、観葉植物としてのスパティフィラムは *S. wallisii* Regel や *S. floribundum* Schott を起源種として行われている（Walters ら、1996）。したがって、観賞植物としてのスパティフィラムは品種間の変異の幅が小さく、従来と異なる特性を持つ新たな品種の開発が望まれている。*S. wallisii* や *S. floribundum* 以外の野生種の中には黄緑色の仏炎苞を持つ種や独特の香りを持つ種の存在が知られており、本研究で開発したスパティフィラムの四倍体作出法を活用してこれらの

野生種との交雑を行うことが可能となる。

スパティフィラムと同じサトイモ科の代表的な観賞植物にはアンズリウムがある。アンズリウムとスパティフィラムの属間交雑はすでに試みられているが未だ属間雑種は作出されておらず，四倍体同士の属間交雑によって属間雑種が得られる可能性がある。アンズリウムはスパティフィラム同様に組織培養技術が確立されているため，交配材料の入手や倍数体の作出は容易である。属間交雑では受精胚の発育不全がみられるが，第4章で行った未熟種子の無菌播種技術を確立し，属間雑種の種子・胚救出等を行うことでアンズリウムとスパティフィラムの属間雑種を獲得できると考える。特にアンズリウムは仏炎苞がアントシアニンを含むことから，白色以外のスパティフィラム品種の育成が可能となる。

## Summary

*Spathiphyllum* is a perennial which mainly grows wild in the tropical America and has been cultivated as ornamental foliage plants which can be enjoyed indoors during one year. Although the genus *Spathiphyllum* has about 40 species, the cultivars were bred only from *S. wallisii* Regel and *S. floribundum* Schott. The cultivars, therefore, has narrow variation, and the development of cultivars with new characteristics has been desired. In order to develop cultivars with new characteristics, cross breeding with wild species and related genera is indispensable. As almost wild species and cultivars are diploid, hybrid plants by intergeneric or interspecies crossing may become hybrid sterility. The making tetraploid, amphidiploid, is indispensable in order to avoid hybrid sterility, and the crossing between tetraploids is able to make progenies by triple cross or back cross. The tetraploids often reveals high appreciative characteristics, such as enlargement and deep coloring of flowers and leaves, and breeding triploid is also expectable by crossing between tetraploid and diploid. So I tried making tetraploid by the whole tuber colchicine treatment in *S. wallisii* 'Merry'. The whole tubers, which expanded and unexpanded leaves were removed, were treated into 0, 0.1, 1.0 and 10.0 mM colchicine solutions solved by 1%(v/v) DMSO solution for 12, 24 or 48 h, respectively. The plantlets developed after colchicine treatment were checked through a flow cytometric procedure, and three chimeric plantlets, which had both diploid and tetraploid cells, were obtained by the 10.0 mM colchicine treatment. To obtain complete tetraploid plantlet, shoot apical meristems of three chimeras were cut out and cultured *in vitro*. The regenerated plantlets obtained through multiple buds were successfully acclimatized. Confirmation of ploidy level in the developed plantlets by flow cytometry was indicated that a complete tetraploid plantlet was obtained. Profitability of tetraploid was remarkably low and 0.7% (1/142), the whole tuber colchicine treatment was not suitable for making tetraploid of *Spathiphyllum* because of low cell division frequency. In comparison with diploid plantlets, the tetraploid plantlet showed some morphological differences; enlargement of guard cells, thickening of floral stem, spadix and spathe, ovateness in spathe and leaf, and increment of leaf width/leaf length ratio. The tetraploid was registered for new cultivar as 'Fairy wing'. 'Fairy wing' has obtained high evaluation in the market because of high appreciative characteristics for interior green plants; dwarf, deep green leaf and so on. But 'Fairy wing' has low advantage of mother plants for breeding because of male sterility. Since the male sterility of 'Fairy wing' was caused by diploid parent cultivar used for polyploidization, I tried making of new tetraploid, which replaces 'Fairy wing', for intergeneric or interspecies crossing. Miyazaki et al. (1985) has obtained polyploid by colchicine treatment to shoot apex in taro, and profitability of tetraploid was high, and 10%. So, in order to improve in profitability of tetraploid, I tried making of tetraploid by *in vitro* colchicine treatment to shoot apical meristem of *S. 'New merry'*, which had high pollen fertility. The suitable *in vitro* treatment of colchicine, by which polyploids were induced with high frequency, was investigated in *S. 'New merry'*; suitable number of

unexpanded leaves removed before sterilization, number of leaf primordia which cut-out apical meristem had, and days and methods of polyploidizing treatment. Processing for avoiding culture contamination; much unexpanded leaves removed before sterilization and small apical meristem cut out, brought about decline in survivals resulting from injury by sodium hypochlorite and colchicine. The processing of remaining four to five unexpanded leaves before sterilizing and cutting out apical meristems with three or four leaf primordia before treatment by colchicine in vitro raised in survivals by avoiding these injuries. High percentage of polyploids gained was brought in by treatment of culturing on MS solid medium containing of colchicine for fourteen days after primary culture of apical meristems on MS medium containing of NAA 0.1  $\mu\text{M}$  and BAP 10  $\mu\text{M}$  for one month, and percentage of polyploids gained reached to 31.3% in treatment of colchicine at 0.01%. The leaves of tetraploids induced showed broad form to the diploids, and spathe of tetraploids showed smaller than diploids. The tetraploid developed from *S. 'New merry'* was larger than 'FW' developed from *S. 'Merry'*, and this will be registered as new cultivar 'Angel wing'. Tetraploid is generally hypertrophy in comparison with diploid, and triploid enlarge. So triploid plants were cross-breed by crossing tetraploid 'Fairy wing' and diploid. Although 'Fairy wing' was male sterile, the development of pistil was normal as result of observation. So 'Fairy wing' were cross pollinated pollen of *S. 'Merry'* which has high pollen fertility. It is known that endosperm collapse during its development in seed of triploid crossed between diploid and tetraploid. The diploid seeds as control were taken from green fruit two to four months after crossing, and seedlings grew normally. On the other hand, the fruits crossed 'Fairy wing' and *S. 'Merry'* turned yellow two to three months after crossing caused by stopping development of embryo. The seeds were picked out from green fruit before yellowing, and were cultured in vitro. Two triploids were taken from seedlings.

In this thesis, two type of tetraploids and a triploid plantlets were obtained, and the suitable colchicine treatment to *Spathiphyllum* was decided. We would like to develop tetraploids of wild species of *Spathiphyllum* and species of *Araceae*, which had variation of flower color and good characteristics, and make new cultivars of *Spathiphyllum* by cross- breeding between species and genus.



## 引用文献

- Amano, J., J. Kato, M. Nakano and M. Mii. 2006. Production of inter-section hybrids between *Primula filchnerae* and *P. sinensis* through ovule culture. *Sci. Hortic.* 110: 223–227.
- Bennett, M. D. and I. J. Leitch. 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot.* 76: 113–176.
- Cohen, D. and J.-L. Yao. 1996. *In vitro* chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 47: 43-49.
- Duquenne, B., T. Eeckhaut, S. Werbrouck, J. V. Huylenbroeck. 2007. Effect of enzyme concentration on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 91: 165-173.
- Eeckhaut, T. G. R., S. P. O. Werbrouck, L. W. H. Leus, E. J. V. Bockstaele and P. C. Debergh. 2004. Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 78: 241–246.
- Fukui, H. and T. Yokota. 2007. Tetraploid induction by colchicine and oryzalin in *Rosa multiflora*. *Acta Hortic.* 751: 313–322.
- Galbraith, D. W., K. R. Harkins, J. M. Maddox, N. M. Ayres, D. P. Sharma and E. Firoozabady. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049–1051.
- Hays, T. S. and E. D. Salmon. 1986. The stabilization of microtubules in isolated spindles by tubulin-colchicine complex. *Cell Motility*

- and the Cytoskeleton 6: 282-290.
- Henny, R.J., J. Chen and T.A. Mellich. 2008. Tropical Foliage Plant Development: Breeding Techniques for Anthurium and Spathiphyllum. ENH1102 : 1-4, <http://edis.ifas.ufl.edu/ep366>.
- Kawai, K. 1969. Observation of the surface of the skin by SUMP method (Suzuki's universal micro-printing method). 1. Normal human skin surface. Hifuka kiyō. Acta Dermatologica 64: 257-289.
- Kudo, N., T. Matsui and T. Okada. 2008. A novel interspecific hybrid plant between *Hydrangea scandens* ssp. *chinensis* and *H. macrophylla* via ovule culture. Plant Biotech. 25: 529-533.
- Laere, K. V., S. C. Franca, H. Vansteenkiste, J. V. Huylenbroeck, K. Steppe, M.-R. V. Labeke. 2010. Influence of ploidy level on morphology, growth and drought susceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. Acta Physiol Plant. 33(4): 1149-1156
- 宮崎貞巳・田代洋丞・金澤幸三・松本弘幸. 1985. サトイモの培養茎頂のコルヒチン処理による倍数体の作出と倍数体の特性. 佐賀大農集. 59:37-45.
- 水野勝義. 2011. 東アジアにおける花卉園芸植物の育成者権保護の国際比較. 岐阜大学大学院連合農学研究科博士論文.
- Morgan, E. R., J. F. Seelye, B. L. Hofmann and J. E. Grant. 2004. Production of triploid *Sandersonia aurantiaca* plants. South African Journal of Botany. 70(2): 210-214.
- 西尾 剛. 1977. 植物育種学. 文永堂. 東京.
- 西山市三. 1936. 細胞遺伝学研究法. p. 258-259. 養賢堂. 東京.
- 西山市三・渡部忠広. 1957. 人為的倍数植物の研究 (第 19 報) コン

- ニャクの人為倍数体. Japanese Society of Breeding. 7(2): 69-72.
- 小笠原利恵・住吉 稔・川原勇太・加藤淳太郎・福井博一. 2009. スパティフィラム (*Spathiphyllum* 'New merry') のコルヒチン処理による4倍体個体の作出. 園芸学研究. 8別 2:273.
- Ogawa, Y., Shizuko Iwai and Tagako Azuma. 1993. Flower Induction of *Spathiphyllum patinii* by Gibberellin A<sub>3</sub> and Miniaturization of Flowering Plants. Bull. Fac. Bioresources, Mie Univ. 11: 191-197.
- Satina, S. and A. F. Blakeslee. 1941. Periclinal chimeras in *Datura stramonium* in relation to development of leaf and flower. Am. J. Bot. 28: 862-871.
- Schmidt, A. 1924. Histologische studien an phanerogamen vegetationspunkten. Botanisches Archiv. 8: 345-404.
- Sharma, D. R., R. Kaur and K. Kumar. 1996. Embryo rescue in plants - a review. Euphytica. 89: 325-337.
- Son, K., S. H. Lee, S. G. Seo and J. Song. 2000. Effects of foliage plants and potting soil on the absorption and adsorption of indoor air pollutants. J. Korean Soc. Hort. Sci. 41: 305-310.
- Sripichitt, P., E. Nawata and S. Shigenaga. 1988. Radiation-induced mutation by using in vitro adventitious bud technique in red pepper (*Capsicum annum* L. cv. Yatsufusa) -Analysis of the variant appeared in M1 generation. Japan. J. Breed. 38: 141-150.
- Tambong, J. T., V. T. Sapra and S. Garton. 1998. *In vitro* induction of tetraploid in colchicines-treated cocoyam plantlets. Euphytica. 104: 191-197.
- Thao, N. T. P., Y. Ozaki and H. Okubo. 2004. Colchicine- and

- Oryzalin-induced Tetraploids in Ornamental *Alocasia* × *amazonica*  
hort. Japan. Soc. Hort. Sci. 73(1): 63-65
- Thao, N. T. P., K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki and H. Okubo. 2003.  
Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine  
and oryzalin treatments. Plant Cell Tissue Organ Cult. 72: 19-25.
- 塚本洋太郎. 1969. 花卉総論. 養賢堂. 東京.
- Ui, A. and S. Ishikawa. 2011. *Petunia-Calibrachoa* plant named  
'sakpxc007'. United States Plant Patent US21853P220110405.
- Van Harten, A. M., H. Bouter and C. Broertjes. 1981. In vitro  
adventitious bud techniques for vegetative propagation and  
mutation breeding of potato (*Solanum tuberosum* L.). II.  
Significance for mutation breeding. Euphytica 30: 1-8.
- Vanstechelman, I., H. Vansteenkiste, T. Eeckhaut, J. Van Huylenbroeck  
and M.-C. Van Labeke. 2009. Morphological and anatomical  
characterisation of chemically induced polyploids in *Spathiphyllum*  
*wallisii*. Acta Hort. 836: 79-84.
- Walters S., A. Brady, C. Brickell, J. Cullen, P. Green, J. Lewis, V.  
Matthews, D. Webb, P. Yeo and J. Alexander. 1996. Araceae.  
p.75-112. In: J. Cullen, S. G. Knees and H. S. Cubey (eds.). The  
European garden flora vol. 1. Cambridge University Press.  
Cambridge, UK.
- Yao, J.-L. and D. Cohen. 1996. Production of triploid *Zantedeschia*  
hybrids using embryo rescue. New Zealand Journal of Crop and  
Horticultural Science. 24: 297-301.
- 柳野利哉. 1994. ニンニクのソマクローナル変異. 植物組織培養.

11: 74-75.