

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 嶋 津 光 鑑

植物の不定胚の培養は、他の組織培養法と比較して増殖効率が飛躍的に高いこと、バイオリアクターなどの大型の培養装置を用いた液体培養に適していること、培養手順を機械化しやすいことなどから、大量種苗生産への応用が期待されている。液体培養において、溶存酸素濃度は最も重要な培養条件の1つである。しかし、今までに高溶存酸素濃度が不定胚培養に適しているという報告と、低溶存酸素濃度が適しているという矛盾する報告があり、溶存酸素濃度の不定胚培養への影響に関しては定説がなかった。そこで、本論文では、その影響を明らかにし、その結果を利用して不定胚培養の効率を高める省力的な培養方法を開発することを目的とした。

まず、矛盾する報告が存在することの原因が実験方法の不備にあることを指摘し、せん断応力など、他の要因の影響を受けずに溶存酸素濃度だけを制御できる実験方法として、通気ガスの酸素濃度制御による方法の有効性を示し、その装置を組み立てた。

通気ガスの濃度を4%、7%、20%、30%、40%に設定し、ニンジン不定胚培養実験を行った結果、次の点が明らかとなった。1. 総不定胚形成数の経時変化は、溶存酸素濃度の影響を受けなかった。2. 発育ステージの進行に伴い、各ステージの不定胚形成が抑制を受ける溶存酸素濃度は上昇した。通気ガス酸素濃度が4%の場合は魚雷型胚は形成されなかった。逆に、高溶存酸素濃度によって発育ステージ後期の魚雷型胚やその後の子葉期胚の形成が促進された。これらの現象は不定胚の大きさと不定胚内部での酸素の拡散の関係から説明できた。

以上の結果から、大量に魚雷型胚を生産するためには、低溶存酸素濃度によって、魚雷型胚より先の発育ステージ（子葉期胚）への進行を抑制することが有効であると考えられた。そこで、通気ガス酸素濃度7%と室内空気（酸素濃度21%）通気の比較実験を行った。その結果、室内空気通気の場合、魚雷型胚形成数のピークは58個 $\text{mL}^{-1}$ であったのに対し、7%酸素通気の場合、100個 $\text{mL}^{-1}$ であった。しかし、魚雷型胚の形成は室内空気通気の場合より遅延した。なお、7%酸素通気で形成された魚雷型胚は幼根部の伸長が抑制されていたが、植物体への再生率は80%で、室内空気通気の場合の87%と大きくは変わらなかった。

そこで、全培養期間を通して同一酸素濃度のガスを通気するのではなく、不定胚の発育状態に対応した溶存酸素濃度制御方法を考案し、DDOC (Developmental-stage dependent Dissolved Oxygen Control) と名付けた。不定胚の発育状態をモニタリングするため、不定胚の画像を1日ごとに撮影するとともに、培養液pHの経時変化を測定した。培養期間を3つのフェーズに分け、それぞれで異なる酸素濃度のガスを通気した。第1フェーズでは、室内空気を通気した。培養8日目に魚雷型胚が観察され

たので、魚雷型胚から子葉期胚への進行を抑制するために、通気ガスの酸素濃度を6%とし、第2フェーズへ移行した。第2フェーズに移行して数日が経過しても子葉期胚は観察されなかった。魚雷型胚形成率が一定になった培養19日目に、魚雷型胚の形成を促進するために通気ガス酸素濃度を10%にした。その結果、DDOCでは、魚雷型胚形成数は対照実験として行った室内空気通気の場合の2倍、6%酸素通気の場合の1.4倍であり、魚雷型胚の率も高かった。植物体再生率はDDOCで70%であり、室内空気通気の71%、6%酸素通気の75%と大差なかった。このように、DDOCの有効性が確認された。また、pHは第1フェーズから第2フェーズのころに低下し、その後上昇した。この結果から、モニタリングの方法として簡易なpH測定が有効であることが示された。

以上のように、本論文は不定胚形成に及ぼす培養液溶存酸素濃度の影響を、新たな実験方法を開発することにより、体系的に検討するとともに、大量種苗生産に不定胚形成を応用することを念頭に、魚雷型胚の形成を促進する培養液溶存酸素濃度制御法を開発したものであり、学術上、応用上貢献するところが大きい。よって、審査員一同は本論文が博士（農学）の学位論文に値するものと認めた。