

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 紅 梅

不定胚は植物の体細胞から生殖過程を経ずに、直接形成される胚状組織であり、増殖率が高く、培養工程の省力化・自動化が可能なことから、農業・園芸・林業などの分野の大量種苗生産方法の有力な候補として期待されている。しかし、変異率が高い、収穫した不定胚が不均一であるなどの理由から実用化された例がまだ少ない。不定胚経由での種苗生産を実用化するためには培養工学的な観点から解決すべき課題が山積している。本論文では、不定胚培養環境の諸要素のうち、せん断応力と溶存酸素濃度に着目し、効率的な不定胚培養方法を確立しようとするものである。すなわち、静置培養ではせん断応力による物理的ストレスが不定胚に加わらないこと、また、培地の溶存酸素濃度が不定胚の形成および発育に大きな影響を及ぼすことから、培養容器内酸素濃度を不定胚発育段階別に制御することにより、大量種苗生産の目的生産物である魚雷型胚生産量の高い高密度不定胚液体静置培養系を確立することを目的とした。

本論文は5章からなる。

1章では、研究の背景と目的について述べた。

2章では、高粘性液体培地を用いた不定胚液体静置培養の可能性を検討し、液体静置培養での培養容器内酸素分圧の制御による魚雷型胚形成率の向上を目的とした実験について述べた。低濃度寒天(0.5g/l)を含む高粘性液体培地とシャーレを用いた液体静置培養では、通常の三角フラスコを用いた液体振とう培養に比べ、魚雷型胚形成率の約1.8になり、液体静置培養の有効性が示された。次に、カルス懸濁液の入ったシャーレを酸素分圧20kPa、40kPa、60kPaの耐圧容器に設置し、14日間静置培養を行い、酸素分圧60kPaでは不定胚形成が阻害されること、酸素分圧20kPaと40kPaとの比較では、培養初期には酸素分圧の影響を受けないが、後期には40kPaで、発育が促進されることを明らかにした。この結果から、培養期間中期に酸素分圧を40kPaにし、その他の期間は20kPaにすれば、魚雷型胚形成が促進されるが予想され、そのことを実験的証明した(魚雷型胚形成率が酸素分圧を20kPaに一定にした培養の約1.3になった)。

3章では、液体静地培養での培養容器内酸素濃度、培地の溶存酸素濃度、不定胚の呼吸速度および不定胚の発育率の関係について調べた。心臓型胚と魚雷型胚をそれぞれ培養容器内酸素濃度20%、30%、40%下で3日間培養し、培地の溶存酸素濃度、心臓型胚および魚雷型胚の呼吸速度、心臓型胚から魚雷型胚への発育率、魚雷型胚から子葉期胚への発育

率を調べ、それらの関係を定量化した。

4章では、高密度液体静置培養での培養容器内酸素濃度の制御による魚雷型胚形成率の向上に関する実験について述べた。培養容器内酸素濃度を培養開始から11日後までは20%、培養開始12日目から14日後までは40%、培養開始15日目から20日後までは30%に制御した結果、魚雷型胚形成率が酸素濃度を制御しない高密度培養より約2倍に高くなった。また、魚雷型胚数は、通常の培養密度の場合の約2.6倍になった。

5章では、研究を総括し、今後の研究課題などにに関して論じた。

以上、本研究は、植物細胞培養での大きな問題であった、振とうあるいは攪拌によるせん断力の問題を高粘性培地を用いた静置培養という新たな発想で克服し、同時に、培養器内酸素濃度制御によって、魚雷型胚の生産を大幅に向上できることを示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文に値するものと認めた。