

(論文内容の要旨)

組織培養による無病クローン苗の生産は高品質・高収量につながる。しかし、種苗の生産費が高額であることが普及を妨げる大きな要因の一つとなっている。種苗の生産費を押し上げる主な要因として、組織培養操作においてオートクレーブ・クリーンベンチなどの高額な装置の必要性と、組織培養で増殖した苗の器外への順化率や苗の均一性が悪いことも要因の一つとして挙げられる。そこで、オートクレーブを用いずに煮沸や薬剤を使用した培地滅菌法、クリーンベンチを用いず外植体を置床する方法、および露地圃場に直接移植しうるセル成型培養順化苗を作成する方法を開発した。得られた成果は以下のように要約される。

1. 細胞膜の透過性を増大させ、湿熱と併用効果があるショ糖ラウリン酸モノエステル（以下 SE）とナイシン A を培地 1L 当たりそれぞれ 0.5g、5mg 加えて煮沸し、次亜塩素酸カルシウムによる有効塩素（以下、塩素）1mg を 3 分以上の間隔をあけて 2 回加え、容器に分注することで培地を滅菌した。この方法で MS、Knop、大塚 A 号処方、およびこれらにジャガイモ破碎物もしくは酵母エキスとタンパク加水分解物を添加しさらに、微生物汚染源として耐熱芽胞菌を混入させた培地を滅菌できた。また、この方法で滅菌した培地で外植体を長期間培養した場合、損傷菌の復活による汚染もほとんど発生しなかった。

2. $800\sim1500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ の塩素および SE を含む溶液で容器内面、培地表面および外植体をぬらすことで置床時の微生物汚染率を低減できた。この時に生じる微生物汚染は、*Penicillium* 属と *Aspergillus* 属の糸状菌および *Bacillus* 属の細菌であった。これらの微生物に効果のあるベノミル、ポリヘキサメチレンピグアナイド、ペニシリン G、サルミンなどを外植体に置床前に浸透移行させることでさらに微生物汚染を低減させた。この方法と、前記のオートクレーブ培地滅菌法とを組み合わせ、ジャガイモもしくはカーネーション幼植物の 1 節切片を外植体とし、糸状菌は $100\text{cm}^2\cdot 30$ 秒当たり $0\sim69\text{CFU}$ で平均 12.7CFU 、細菌は $0\sim35\text{CFU}$ で平均 0.65CFU の落下菌密度の実験台で培養作業を行った。培地量 30mL とし、試験管に 1 つの外植体を置床後、100 本をまとめて蓋をした。その時の微生物汚染率は、置床～30 日後では 0.3%、30 日～90 日後では 0%、90 日～140 日後では 0.8%程度と少なかった。また、容器と蓋の隙間から再侵入した微生物による汚染もある程度低減することができた。30×60cm の開口部を持つ育苗バットや、32×38cm の低密度ポリエチレン袋を培養容器としても実用的な微生物汚染率で置床できた。それらの外植体の生体重はオートクレーブとクリーンベンチを使用したものと同程度が大きかった。

3. 培地に塩素を含む薬剤を添加して数日後に外植体を置床し、さらに数日後に塩素を無効化することで、通常の屋内で非加熱で液体培養を行う方法を開

発した。培養液 1L 当たり 50mg の塩素を添加後、容器の蓋を閉めて 2 日経過後に、あらかじめ殺菌剤液に浸漬した外植体を容器の蓋を開けて置床後、容器の蓋を再度閉め、1 日経過後に容器外側からチオ硫酸ナトリウムを添加することによって培地内の塩素を無効化して培養した。この方法により 45L の軟質ポリエチレン袋を培養容器とし、培養液量 8L でジャガイモとキクの試験管培養個体をそれぞれ 1 つを置床し、滅菌フィルタを通して通気培養したところ、微生物汚染率は 5%未満であった。キクでは外植体の成長はオートクレーブとクリーンベンチを用いたものと遜色なかった。ジャガイモでは、初期生育は劣ったが正常に成長した。

4. シートの上に根を張らせることによって根域を平面化し、移植時に新たな土壌に根を容易に密着させうるセル成型苗（セルシート苗）を開発した。セルシートと上記の非加熱液体培養を組み合わせ、セロファンを蓋にして通気しながら順化・培養したところ、露地圃場に直接定植可能な組織培養セル成型苗を作成することができた。この時、1 培養容器当たり、培養液量 8L、80 セルとし、1 セル当たり 1 外植体（カーネーションの培養植物の 1 節切片）を置床したにもかかわらず、微生物汚染は認められなかった。

氏 名

水田 洋一

(論文審査の結果の要旨)

組織培養における無病クローン苗は良品多收につながるが、その普及を妨げているのは主にその高い生産コストである。本研究では生産コストを低減するために、オートクレーブやクリーンベンチなど特別な装置を使用せずに簡易に組織培養を行う方法を開発した。成果として評価すべき点は以下のとおりである。

1. 食品添加物や農薬など安全かつ安価な薬剤と煮沸を併用するのみで、通常の屋内でほとんどオートクレーブやクリーンベンチを使用せず、作業場所や培地材料を選ばず培地作成や外植体の置床ができ、微生物汚染率が少なく、外植体の生育が良好である方法を開発した。その際、外植体置床後、長期間の培養で微生物の増殖が認められる原因の一部が、外植体の成長に伴う培地組成変化による損傷菌の復活であることを明らかとした。また、外植体の容器当たりの置床数や大きさ、部位、植物種などが異なっても同じ方法で、実用的な微生物汚染率で置床できた。耐熱性の低い低密度ポリエチレン袋や、開口部が大きく作業性のよい育苗箱なども培養容器とすることができた。また、液体培養において煮沸も必要とせず、培養できる簡便で安価な方法を開発した。これらのことにより、組織培養による大量増殖における装置費を無くしただけではなく、作業場所や容器種類などの自由度を大幅に向上させた。

2. 組織培養で育成された植物は土壌、特に露地圃場には極めて活着しにくい。これは組織培養植物の根が土耕植物の根と生理的な差異が大きいため、土壌に適応が難しいからであるとされていた。育苗時にシート上に根域形成させることによって根域を平面化し、根が土壌に容易に密着するようにした苗(セルシート育苗)は、組織培養で育成した場合でも、露地圃場へ高率で活着させることを示した。これは従来の定説をくつがえしたものであり、セルシート育苗と簡易組織培養とを組み合わせ、露地圃場に直接移植しうるセル成型化された順化培養苗の生産に成功した。

以上のように本論文は、組織培養によるクローン苗増殖とその順化苗の生産において、オートクレーブやクリーンスペース、ミスト室などの固定装置をほとんど無くし、かつ、その操作場所を選ばない方法を開発したものである。その知見は、組織培養による大量増殖と順化苗生産のコストを低減するだけでなく、機械化や流れ作業の導入を容易にしうることを示すなど、園芸生産並びに花卉園芸学に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 21 年 2 月 16 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。