

氏名・本籍	Most Tanziman Ara (バングラデシュ)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第52号
学位授与の日付	令和2年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	Studies on versatile methods to control the development of shoot and root apical meristems of bamboo and some model grass species through plant cell tissue and organ culture techniques (植物細胞組織培養技術を介したタケとモデルイネ科植物数種の頂端および根端分裂組織の汎用的な発達制御法に関する研究)
学位論文審査委員	主査 教授 荻田 信二郎 副査 教授 入船 浩平 教授 奥 尚 准教授 山本 幸弘

学位論文の要旨

In this study, I focused on the Plant cell tissue and organ culture (PCTOC) of bamboo and some practical model grass species since these plants are considered as important bio-resources. They are well-known for their great economic, social, cultural, and scientific values. They have jointed stem called 'culm' and each culm segment begins and ends with a solid joint called 'node'. As node portion contains 3 unique meristems such as intercalary meristem, shoot apical meristem (SAM), and root apical meristem (RAM), it is recognized as a meristem abundant area. This morphological uniqueness will be a great advantage for my research objectives. Here, I listed main objectives of my thesis research which will be presented as chapters. 1; to check effects of solid and liquid media on the growth of bamboo node cultures, 2; to establish a small scale liquid culture environment (SLCE) for controlling the development of SAM and RAM, 3; to select the best node portion from a shoot by using anatomy, fluorescent microscopy, histochemical observation, digital imaging analysis and also checking *in vitro* growth performance, and 4; to apply phenolic compounds for further promotion of SAM and RAM development in the SLCE system.

The basic protocol for setting a suitable culture environment, I used node portions from 11 different bamboo species belonging to 7 major bamboo genus (*Phyllostachys*, *Bambusa*, *Dendrocalamus*, *Chimonobambusa*, *Tetragonocalamus*, *Pleioblastus* and *Sasa*), and *in vitro* node culture stocks of two

major bamboo species, both *P. meyeri* McClure (Pm) and *B. multiplex* Raeush (Bm). In **Chapter I**, by using these node explants, I checked the effects of solid and liquid media on growth of bamboo shoots. I selected liquid MS medium as the base medium condition for my further experiments. In **Chapter 2**, I focused on using a 6-well microplate that contains 2 mL per well of a liquid medium, which provides a small-scale liquid culture environment (SLCE) for optimizing the culture protocol of the bamboo within a short period. Three types of node portions - the first node (the base node near a rhizome tissue), middle nodes (upper nodes near the 1st node), and the top meristem - were independently cultured in the SLCE to select the explant which showed the best growth performance. By culturing the first node in the SLCE system, I performed a quick survey for detection of *in vitro* SAM and RAM development and found that a combination of 10 μ M benzyl adenine and 3 μ M thiazuron was effective for *in vitro* SAM development, while 2,4-D promote *in vitro* RAM development. Another important finding in Chapter 2 is the autofluorescence property of the target tissue. Autofluorescence (primary fluorescence) is the fluorescence of naturally occurring substances, such as chlorophyll, collagen, and fluorite. Most plant and animal tissues show some autofluorescence when excited with ultraviolet light (e.g., light with a wavelength of approximately 365 nm). Currently, the concept of autofluorescence measurement and its application has been developed with the requirement for non-destructive detection of a target cells and tissues in the field of life sciences. I specified the color variation of explants as the relative fluorescent intensity by using an inverted fluorescent microscope under B- and U-excitation lights with RGB and HSB (hue, saturation, and brightness) digital imaging analysis with ImageJ software. Some staining techniques such as Wiesner reaction, safranin staining, DAPI staining were also applicable to identify histochemical characteristics of bamboo nodes. To my best knowledge, this is the first report that suggests a versatile node culture method in the SLCE to control morphological and histochemical responses of SAM and RAM in bamboo plants. In **Chapter 3**, I used this protocol to check the effects of two phenolic compounds, both phloroglucinol (PG) and coumarin (COU), on controlling the SAM and RAM development in Bm and Pm bamboo plants and other practical model grass species, i.e. rice, barley and *Brachypodium*. Finally, I combined two regulatory factors, both 500 μ M PG and 5 μ M COU, to control *in vitro* SAM and RAM development in bamboo. Briefly, once multiplied shoots were produced by the PG treatment and its rescue culture program, a bunch of shoots was transferred to the COU containing medium. Compared with the control condition, this new protocol showed a great capacity to multiply all plant species tested.

審査の結果の要旨

学位論文題目（和文）：植物細胞組織培養技術を介したタケとモデルイネ科植物数種の頂端および根端分裂組織の汎用的な発達制御法に関する研究（以下、本研究と略記）では、世界の主要なタケであるマダケ属およびバンブーサ属の節組織に存在する頂端および根端分裂組織の、無菌環境下における高度な発達制御法の確立、およびその成果のイネ科植物数種への応用に関する検討を行い、以下に記す新しい知見を明らかにした。

本研究は、General Introduction, Chapter I, Chapter II, Chapter III, および Conclusion and Perspectives で構成される。General Introduction では、本研究の背景と目的を述べた。Chapter I では、研究推進の鍵となる培養環境について、特に液体培養条件が節組織からのシュート伸長を有意に促進することを明らかにした。この知見に基づいて、Chapter II では、2 ml の液体培地を添加した 6 ウェルマイクロプレートを駆使する微小環境（a small-scale liquid culture environment（以下、SLCE））での培養・アッセイ方法を開発して、7 属 11 種の主要なタケ植物の節組織に SLCE 法が適応できること示した。また、節組織に存在する休眠中の頂端および根端分裂組織の活性化に及ぼす各種培地条件（培地成分および植物ホルモン）の影響を、SLCE 法によって短期間に評価できることを示した。この際、蛍光顕微鏡—デジタル画像解析を活用して培養過程で組織に生じる自家蛍光の変化を明らかにし、培養系効率化への指標として画像判断が有効であることを提唱した。Chapter III では、SLCE 法によってフェノール性化合物であるフロログシノールとクマリンが頂端および根端分裂組織の発達制御物質として働く新たな可能性を詳細に検討し、特にフロログシノール前処理を施し、次いで得られた多芽体をクマリン処理することでシュートの再分化効率や発根率を飛躍的に向上させることに成功した。このことは、植物ホルモン以外にも汎用的に対象植物の大量増殖を可能にできる新知見である。さらにこの培養条件は、3 種のイネ科植物（イネ、オオムギ、ミナトカモジグサ）においても当該発達制御に有効であることを明らかにした。Conclusion and Perspectives は、本研究の総合考察および総括である。

本論文で明らかにした SLCE 法の有効性および汎用性、またフェノール性化合物が頂端および根端分裂組織の発達制御物質として働く新たな可能性は、タケおよびイネ科植物の大量増殖のみならず、遺伝子組換えやゲノム編集を効率よく行うための新たな基盤技術として活用できることが期待され、植物細胞工学分野の研究発展に寄与するところが大きいと判断した。よって、本論文は博士（生命システム科学）の学位に値するものと認められる。