

氏 名(本籍) 小 山 博 之

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 498 号

学位授与年月日 平 成 6 年 3 月 10 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 難溶性低リン酸耐性ニンジン培養細胞の
生理的特性に関する研究

論文審査委員(主 査) 教 授 小 島 邦 彦
教 授 庄 子 貞 雄
教 授 伊 崎 和 夫

論文内容要旨

序論

酸性土壌におけるアルミニウム (Al) ストレスは、主として2つの側面を持つ。すなわち、直接的な毒性 (アルミニウムイオンストレス) と、難溶性のリン酸Alを生成することによる間接的なリン酸欠乏 (低リン酸ストレス) で、この両者により作物の生育は一般に極めて不良となる。特に東南アジアや中南米などの発展途上の諸国では、国土の大半がAlが問題となる土壌に分類される。こうした地域では多額の投資を必要とする土壌改良よりも、改良に比べて安価で収穫が期待できる「Alストレス耐性」植物の作出が、食糧の安定的な生産に大きく貢献すると考えられている。

このような背景から、近年培養細胞系でAlストレス選抜が盛んに試みられ、ConnerとMeredithは1985年に可溶性Alの選抜条件を確立し、Alイオン耐性 (IAT; Ionic-Al Tolerant) タバコ植物を作出した。しかし、Alストレスのもう一つの要因である低リン酸ストレスに対しては、その重要性にも関わらず、これまでに耐性系統を選抜した報告は見あたらず、効果的な選抜法の確立が強く望まれている。

一方、本研究で用いたニンジン選抜細胞は、酸性条件下におけるAlストレスを想定した培養条件、すなわち通常のリン酸を含む培地に大過剰のAlを添加した培地で繰り返し継代培養して選抜された。この培地では、可溶性Alは僅かに含まれるにすぎず、大部分のAlは、全てリン酸と難溶性Alを形成して可溶性リン酸は検出されない (Table 1)。従って、このAl沈澱生成系で選抜されたニンジン選抜細胞は常にリン酸Alをリン給源として選抜されたことになり、これまでに報告のない、リン酸Alを利用できる低リン酸耐性 (LPT; Low Phosphate Tolerant) 株であることが期待された。

そこで本研究では、先ず選抜細胞がリン酸Alを利用するタイプの低リン酸耐性株であることを明確に示し、そのリン酸Al可給態化機構を解明すると共に、野生型細胞と混在する選抜培地中での生育を想定して、選抜時に関与した低リン酸耐性細胞の生理的特性を明らかにすることを目的とした。更に、長期にわたる選抜過程において再分化能力を喪失していた低リン酸耐性細胞に対し、若い野生型細胞と細胞融合を行うことにより再分化植物の獲得を試み、低リン酸耐性植物作出の可能性を示唆した。

第1章 選抜細胞の低リン酸耐性特性とリン酸Alの可給態化機構

序論でも述べたように、本研究でニンジン培養細胞を選抜した培地 (Al:4 mM、P:2 mM、pH5.0) は、コロイド状のリン酸Alとして全てのリン酸が沈澱しているものの、若干の可溶性Alを含んでいる。そこで、この沈澱生成系にリン酸Alの生成に伴う低リン酸ストレスが存在することを明らかにするために、30 mMのMES (2-(N-morpholino)ethansulfonic acid) 存在下でpH3.5からpH6.0の範囲の同一組成の培地を調製し、可溶性Al・Pi量の変化、並びに細胞の生育を調べた (Figure 1)。その結果、選抜細胞は可溶性Alが減少するにつれ生育量が増加するものの、野生型細胞 (WT:wild type) は可溶性Alがほとんど検出されないpH 5以上の領域でも、可溶性リン酸区に対する相対生育量は20%以下であった。一方、可溶性Alに対する生育レスポンスをConnerらの選抜条件に準拠した培地 (pH4.0、Pi:0.1 mM) を用いて調べたところ、両細胞共に可溶性Al量の増加につれ生育は直線的に阻害され、選抜細胞はAlイオンに対して耐性とは認められなかった (Figure 2)。

以上の結果から、沈澱生成系には可溶性Al毒性以外のストレス、すなわち低リン酸ストレス (リン酸の難溶化によるリン酸欠乏ストレス) が存在することが明らかになった。同時に、選抜細胞はこれまでに報告されたことのない、難溶性リン酸Alを利用するタイプの低リン酸耐性 (LP-T) 細胞であると考えられた。このLP-T細胞の難溶性リン酸利用能力は、選抜系に含まれていたコロイド状のリン酸Al以外の難溶性リン酸給源でも認められ、市販の AlPO_4 試薬を洗浄し可溶性リン酸を完全に除いた粉末状の AlPO_4 で野生型細胞の4倍、コロイド状のリン酸鉄給源で野生型細胞の3倍の相対生育を示した (Table 2)。

次にLP-T株の難溶性リン酸Al可給態化機構として、Alストレスに対する植物の応答機構とされる有機酸放出を調べた。その結果、LP-T細胞は難溶性リン酸給源で多量のクエン酸を放出し (Table 3)、これとほぼ同濃度のクエン酸添加により野生型細胞も AlPO_4 給源で、可溶性リン酸給源とほぼ同様な生育を示した (Figure 3)。これらのことから、LP-T細胞はクエン酸放出によりリン酸Alを可給態化していると考えられた。そこでリン酸Al給源での細胞生育とクエン酸放出の関係を定量的に調べるため、LP-T細胞2系統と野生型細胞2系統を12日間培養し、生育量とクエン酸放出量を調べた。その結果、1) 細胞生育とクエン酸放出量の間には高い直

線相関が認められ (Figure 4)、更に2) クエン酸と可溶性Alの間には1:1の関係が認められた (Figure 5)。これらのことから、等量のクエン酸により可溶化されるリン酸量は、細胞によらず同一であると考えられ、リン酸Al給源での細胞生育は放出したクエン酸により可溶化されるリン酸の供給に依存していると考えられた。従って、リン酸Al給源ではクエン酸放出能力が高いほど、より多くのリン酸を可溶化し、良好に生育すると考えられる。実際、両細胞を用いてリン酸Alを含む培地におけるクエン酸放出速度を調べたところ、LP-T細胞のクエン酸放出速度は野生型細胞の8倍以上と見積もられた (Figure 6)。これより、LP-T細胞は高いクエン酸放出能力に依存して難溶性リン酸Alを可給態化していると結論した。

第2章 低リン酸耐性細胞の選抜過程の解析

LP-T細胞は、放出クエン酸により定量的にリン酸Alを可溶化し、生じたリン酸イオンを吸収して良好に生育する。この性質は極めて安定であり、ストレスを与えない条件で培養しても少なくとも25代の間保持された (Table 4)。このことから、単にリン酸Alに生理的に適応した細胞ではなく、クエン酸放出に関して何らかの変異を持つ細胞が選抜されたと考えられた。しかし、クエン酸放出によるリン酸Al可給態化モデルでは、野生型細胞と混在するLP-T細胞が選抜される過程を十分に説明するに至らない。すなわち、両細胞が混在する選抜過程では、LP-T細胞が高いクエン酸放出により多量のリン酸Alを可溶化しても、同一フラスコ内で生育する野生型細胞も遊離したリン酸イオンを利用できるため、LP-T細胞が特異的に増加する説明に対して、クエン酸放出モデルでは説明不十分である。従って、LP-T細胞が選抜されるためにはクエン酸放出以外に、集団中で優先的に増加するために有利な生理的特性を有すると考えられた。そこで、本章ではその可能性のある要因として1) 生育速度、2) リン酸利用効率、3) リン酸吸収速度の3つをとりあげ、これらについて、親細胞である野生型細胞 (LP-0細胞) と比較した。第1に、両細胞のリン酸吸収量並びにリン酸利用効率が同一であっても、LP-T細胞の生育速度が早い場合、細胞集団中でその増殖が選択的に増加すると考えられるため、生育速度を調べた。尚、生育速度は通常用いる指標である新鮮重のほか、選抜が懸濁細

胞を一定容積植え継ぐことにより行われることを考慮し、体積 (Settled Cell Volume) についても調べた (Figure 7)。その結果、両指標ともに、LP-T細胞と親細胞の間に有意な差は認められなかった。

第2に、リン酸利用効率をリン酸あたりの生育量を指標として調べた。あらかじめリン酸量を制限して前培養した細胞を、リン酸濃度の異なる培地で10日間培養し、生育量を測定した (Figure 8)。この条件では、低濃度のリン酸区ではリン酸が生育の制限要因となるが、両細胞とも1 mM以下の範囲でリン酸が制限要因となっていた。この範囲での両細胞のリン酸あたりの生育量には差がなく、1 μ moleあたり130mgの新鮮重増加が認められた。

第3に、LP-T細胞のリン酸吸収速度を調べた。まず、選抜過程のリン酸濃度が希薄であることから、20 μ Mのリン酸濃度での吸収速度を調べたところ、LP-T細胞のリン酸吸収速度は親株に比べ著しく早かった (Figure 9)。そこで、100 μ M以下での両細胞のリン酸吸収速度を測定したところ、両細胞ともリン酸濃度に対して飽和型の吸収を示し (Figure 10A)、逆数プロット (Figure 10B) より算出されるリン酸吸収の K_m 値はLP-T:13.6 μ M、LP-O:9.1 μ Mであり、 V_{max} 値はLP-T:88.8 \pm 1.5 $\text{nmole min}^{-1} \text{g}^{-1}$ 新鮮重、LP-O:28.2 \pm 5.3 $\text{nmole min}^{-1} \text{g}^{-1}$ 新鮮重であった。これらの値から、両者のリン酸吸収に関する V_{max}/K_m 値を算出したところ、LP-T細胞がLP-O細胞に比べて2.1倍高かった (Table 5)。従って、推定されるリン酸吸収速度は、いかなる濃度においてもLP-T細胞の方が大きくなり、LP-T細胞は野生型細胞と混在する選抜培地において、その放出クエン酸により可溶化されるリン酸を優先的に吸収し、細胞集団中で選択的に増殖したと考えられる。

第3章 細胞融合による低リン酸耐性ニンジン植物の作出

本研究で用いた低リン酸耐性ニンジン培養細胞は、リン酸Alをその放出するクエン酸により可給態化し、可溶性リン酸給源と同様に生育する。これまで個体レベルでの選抜でもこのような系統が選抜された報告はなく、低リン酸耐性細胞の耐性形質が再分化個体に発現されるかどうか興味もたれた。そこで、本章では低リン酸耐性細胞から再分化個体を作成した際、その耐性形質が再分化を通じて保持さ

れるか否かを調べることを目的とした。

前節で述べたように低リン酸耐性細胞は、難溶性リン酸Alを唯一のリン酸給源として選抜された。しかし、リン酸Al自体は毒性が低く野生型細胞も利用できるため、選抜には通常長期間を要した。こうした長期間にわたる継代培養過程で、その再分化能力を喪失していたので、LP-T細胞自体から直接再分化植物を獲得することはできなかった。そこで、再分化能力の旺盛な若い野生型細胞と細胞融合することにより再分化を試みた。

低リン酸耐性細胞は選別に適した薬剤抵抗性等のマーカー形質を持たないため、融合細胞を選別する際には、コロニーの形態が異なる野生型細胞を融合相手とし、更に、ヨードアセトアミド (IOA) 処理によりあらかじめ野生型 (WT) 細胞をLP-T細胞と融合しない限り分裂できないように不活性化した。この操作により、融合処理区では理論的に、LP-T細胞由来のコロニーと、LP-T細胞と野生型細胞が融合した細胞由来のコロニーが形成されることになる。実際に融合処理区では、LP-T細胞由来のFriableなコロニーと野生型細胞の形成するcompactなコロニーの中間的な形状のコロニーが多数形成された。このコロニーを2,4-Dを含まない再分化培地に移したところ、約20%のコロニーから再分化植物が形成された。

次に、再分化個体の一部から再びカルスを誘導し、リン酸Alの利用効率を生育量を指標として調べたところ、LP-T細胞由来の再分化植物から誘導したカルスでは、リン酸Al給源での相対生育量は概ね50%を越え、最大98%の相対生育量を示した (Figure 11)。この際、対照として行った親株 (LP-0) 細胞と野生型細胞を融合して得られた再分化植物由来のカルスでは、相対生育量が20-30%程度と明らかに低かった。このことから、細胞レベルで獲得された低リン酸耐性形質は、細胞融合・再分化・脱分化を通じて保持されることが確認された。また、このカルスは旺盛な再分化能力を有し、5系統のカルスから得られた幼植物を用いてリン酸Al利用効率を調べたところ、カルスレベルでのリン酸Al利用能力と個体レベルでのリン酸Al利用能力の間には高い相関が認められた (Figure 12)。

以上の結果から、LP-T細胞の低リン酸耐性形質は再分化を通じ、直接個体に導入できる形質であることが確認された。今後同様な手法を農業上有用な作物種に適用することが望まれる。

要 約

本研究ではこれまで困難であった、アルミニウムに起因する2つのストレス要因を実験的に明確に区別し、その1つの要因に関わるリン酸Alを利用するタイプの低リン酸耐性細胞を選抜し、以下の生理的特性を明らかにした。尚、これまで、同様な耐性系統を選抜したという報告は見当たらない。

- 1) リン酸Alを単独リン酸給源として選抜した低リン酸耐性 (LP-T) 細胞は、野生型細胞の約8倍のクエン酸放出能力を有し、定量的にリン酸Alを可給態化して正常に生育する。このクエン酸放出能力は、長期間の継代培養を通じて極めて安定な形質であった。
- 2) LP-T細胞は、そのリン酸吸収の V_{max} 値が親細胞の約3倍で、リン酸吸収速度が大きい。そのため選抜過程において、その放出クエン酸により可溶化したリン酸を優先的に吸収することにより選抜されたものと結論した。
- 3) LP-T細胞の低リン酸耐性形質は再分化・脱分化を通じて保持され、また細胞レベルの耐性と個体レベルの耐性に相関が認められた。このことは、細胞工学的手法のストレス選抜法による、難溶性低リン酸耐性植物作出の可能性を示唆するものである。

本研究に関連して発表した論文

- 1) Koyama H., Okawara R., Ojima K. and Yamaya T. (1988)
Re-evaluation of characteristics of a carrot cell line previously selected as aluminum-tolerant cells. *Physiol. Plant.* 74: 683-687.
- 2) Ojima K., Koyama H., Suzuki R. and Yamaya T. (1989)
Characterization of two tobacco cell lines selected to grow in the presence of either ionic Al or insoluble Al-phosphate. *Soil Sci. Plant Nutr.* 35: 545-551.
- 3) Koyama H., Ojima K. and Yamaya T. (1990) Utilization of anhydrous aluminum phosphate as a sole source of phosphorous by a selected carrot cell line. *Plant Cell Physiol.* 31: 173-177.
- 4) Arihara A., Kumagai R., Koyama H. and Ojima K. (1991)
Aluminum-tolerant carrot (*Daucus carota* L.) plants regenerated from selected cell cultures. *Soil Sci. Plant Nutr.* 37: 699-705.
- 5) Koyama H., Ojima K. and Yamaya T. (1992) Characteristics of aluminum-phosphate-adapted carrot cells: Uptake and utilization of the phosphate. *Plant Cell physiol.* 33: 171-176.
- 6) Koyama H., Ojima K., Yamaya T. and Sonoda Y. (1994)
Characteristics of carrot plants regenerated from two cell lines selected as either ionic-Al tolerant cells or Al-phosphate utilizing cells. *In Plant-soil interactions at low pH.* Ed. Date R. A., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. *in press*

Table 1. Concentration of the soluble Al and the soluble phosphate in the media used for Al-stress selection.

Additions	Concentration in medium (mM)		Selected Cell lines
	Soluble Al	Soluble Pi	
pH 4.0 AlCl ₃ 0.25 mM NaH ₂ PO ₄ 0.1 mM	0.25	0.10 (toxic Al toxicity)	IAT ^a
pH 5.0 AlCl ₃ 4 mM NaH ₂ PO ₄ 2 mM	0.12 (Al Induced Pi deficiency)	ND	LPT ^b

a: IAT (ionic Al tolerant)

ND: not detected

b: LPT (low phosphate tolerant)

The soluble ions were separated from the insoluble fractions by centrifugation at 20,000g for 15 min.

Table 2. Effects of hardly soluble phosphates on growth of carrot cell lines.

Cell lines	Relative growth (% of control)		
	NaH ₂ PO ₄	AlPO ₄	FePO ₄
LPT	100	101 ± 5	80 ± 5
WTa	100	22 ± 1	35 ± 2
WTb	100	24 ± 1	37 ± 2

All phosphate compounds were added at final concentration of 2 mM and the initial pH of the media was adjusted to 5.6. Both cells were cultured for 7 days. Actual value for the growth of the LPT, WTa, WTb was 2.24, 2.92 and 3.13 g fresh weight.

Table 3. Effect of various Pi compounds on the excretion of citrate after 7 days culture of carrot cells.

Cell Lines	Citrate release (mM : in medium)		
	NaH ₂ PO ₄	AlPO ₄	FePO ₄
LP-T	0.07 ± 0.01	0.86 ± 0.07	0.34 ± 0.01
WTa	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.09 ± 0.01
WTb	0.03 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.04 ± 0.01

The concentration of citrate was expressed as mM in medium which was measured after culturing cells for 7 days at initial pH 5.6.

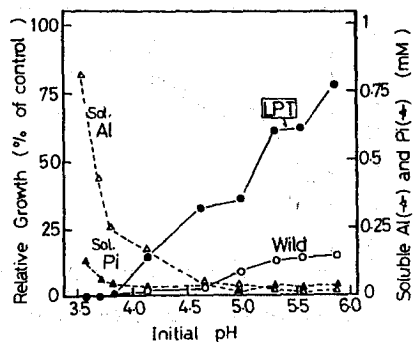


Figure 1. Relative growth of WT(O) and the LPT cells(●) in medium that contained 2 mM NaH₂PO₄, 4 mM AlCl₃ and 30 mM MES. The cells were grown for 7 days at different pH and the growth were compared relative to that of corresponding cell line at pH 5.6 in the presence of MES without addition of AlCl₃; WT, 2.42, ; LPT, 3.20 g fresh weight). Concentrations of soluble Al(Δ) and soluble phosphate(▲) were also determined prior to the culturing.

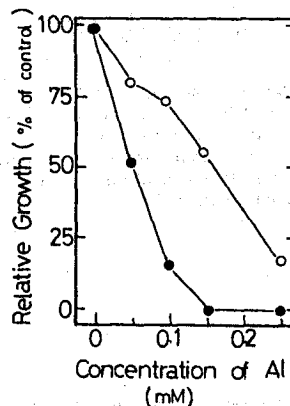


Figure 2. Effect of ionic Al on the growth of WT(O) and the LPT(●) cells. Growth of both cell types without AlCl₃ was indicated as 100% and relative values were plotted. The actual value for WT and LPT cells was 1.99 and 2.25 g fresh weight, respectively.

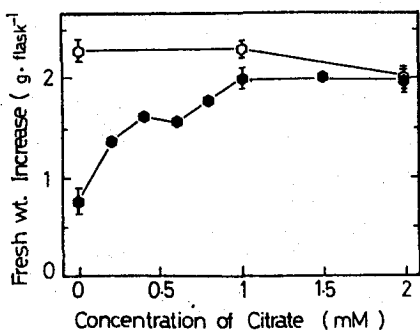


Figure 3. Effect of addition of citrate on the growth of WT cells in the presence of insoluble 2 mM AlPO₄ (●) as a sole source of phosphate. The cells were cultured for 7 days at the initial pH of 5.6. Growth with NaH₂PO₄ (○) was also indicated.

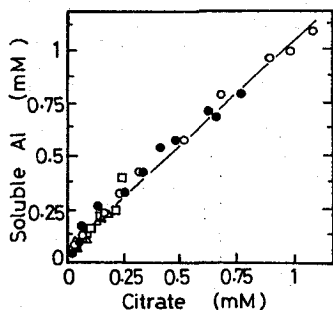


Figure 5. Relationship between soluble Al and citrate in the medium. Symbols are identical to those used in Figure 4. A linear regression equation was developed and the correlation coefficient was calculated: $y=0.06+1.01x$, $r=0.98$

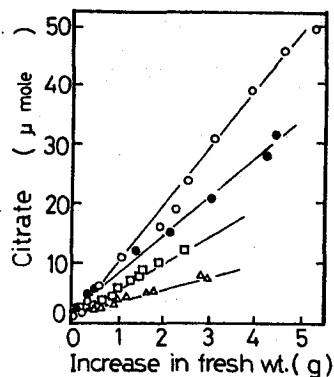


Figure 4. Relationship between the amount of citrate excretion and cell growth. LPTa (○), -b (●), WTa (△) and -b (□) cell lines were cultured with AlPO₄ as a sole phosphate source. The linear regression equations and the correlation coefficients were as follows;

LPTa $y=2.16+9.81x$, $r=0.95$
 LPTb $y=1.15+6.61x$, $r=0.98$
 WTa $y=1.29+2.25x$, $r=0.97$
 WTb $y=1.40+4.30x$, $r=0.97$

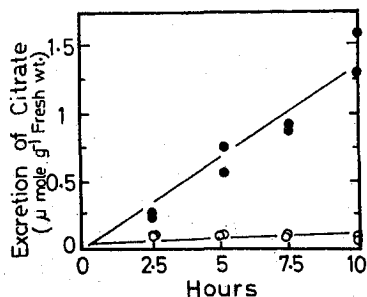


Figure 6. Determination of the rate of citrate excretion with LPT (●) and WT (○) cell lines. Both cell lines were precultured for 5 days in the medium that contained 0.5 mM NaH₂PO₄. The citrate excretion was measured by incubating cells in the medium that contained 2 mM NaH₂PO₄, 4 mM AlCl₃ and 30 mM MES at pH5.6.

Table 4. Stability of utilization of Al-phosphate in LP-T cells.

Subcultures (transfer)	Cell growth		Citrate excretion	
	NaH ₂ PO ₄ (g fresh wt. flask ⁻¹)	AlPO ₄	NaH ₂ PO ₄ (mM; in medium)	AlPO ₄
3	3.63 ± 0.12	3.62 ± 0.12	0.07	0.69
10	3.83 ± 0.15	3.78 ± 0.16	0.07	0.76
25	3.59 ± 0.10	3.52 ± 0.63	0.07	0.64

The LP-T cells were subcultured for the period as indicated in the basal R2 medium containing 2 mM NaH₂PO₄ in the absence of Al-phosphate. The cells were then transferred to medium containing either Na-phosphate or Al-phosphate as a sole source of phosphorus.

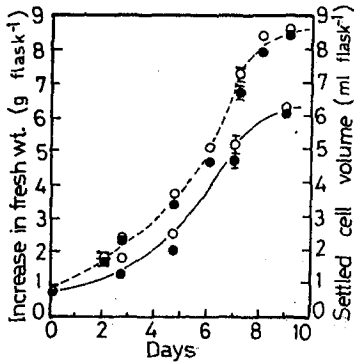


Figure 7. Increase in fresh weight (solid line) and in settled cell volume (dotted line) of LPT(●) and WT(O) cells in the presence of 2 mM NaH₂PO₄ over the course of 10 days in culture.

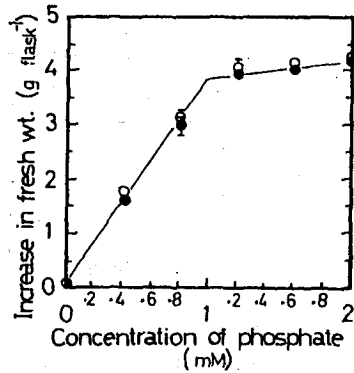


Figure 8. Effect of the concentration of external phosphate on the increase in the fresh weight of LPT(●) and WT(O) cells in cultures grown for 10 days.

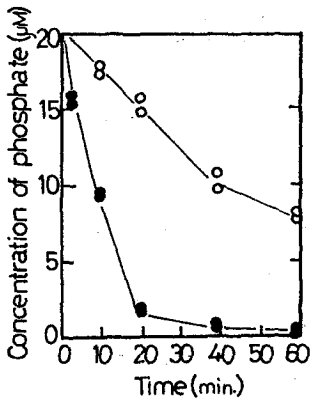


Figure 9. Time course of the uptake of ³²Pi by LPT(●) and WT(O) cells in the presence of 20 μM Pi. Cells(400mg fresh weight) were pre-incubated in 50 ml of Pi-free medium in the presence of 30 mM MES(pH 5.6) for 60 min and then radioactive Pi(0.25 μCi per μmol) was added. Five ml of cell suspension was harvested at appropriate times for measurement of ³²Pi remaining in the medium.

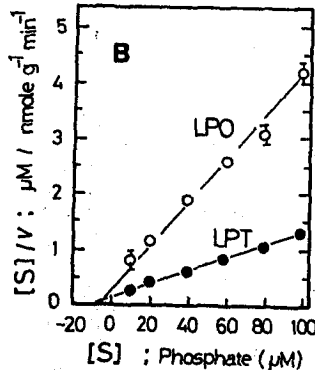
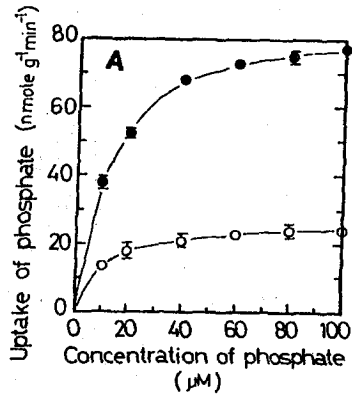


Figure 10. Rate of uptake of ³²Pi by LPT(●) and WT(O) cells as a function of increasing concentration of phosphate (A). Plots of [s]/v vs [s] were generated from the results in Figure 10A(B). Cells(288mg fresh weight) were incubated with various concentration of ³²Pi for 10 min. The amount of Pi incorporated was determined after digestion of the cells.

Table 5. Kinetic constants of the uptake of phosphate.

Cell lines	Km (μM)	Vmax n mole / min / g fresh wt.	Vmax / Km
LPT	13.6 \pm 1.4	88.8 \pm 1.5	6.52
LPO	9.1 \pm 1.3	28.2 \pm 5.3	3.10

Kinetic constants were calculated from the results of Fig. 10A. Means and SD were indicated.

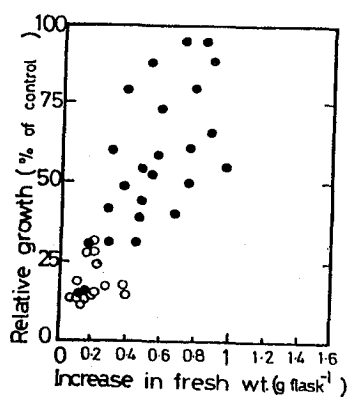


Figure 11. Relative growth of calli cultured with Al-phosphate as a sole phosphate source. Calli of LPT (●) and LPO (○) were induced from petiole of the regenerated plants of LPT and LPO.

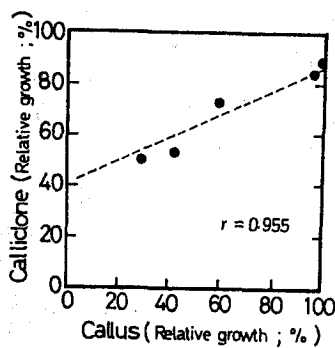


Figure 12. Relationship between the growth of calli and calliclones derived from somatic hybrid plants of LPT in $AlPO_4$ -medium.

論文審査の要旨

酸性土壌における、アルミニウム（A1）ストレスは、主に2つの側面を持つ。すなわちA1イオンの過剰障害と、難溶性のリン酸A1の生成により引き起こされる間接的なリン酸欠乏ストレスである。本研究では、これまで困難であった両ストレスの実験的な区別を明確に行い、その1つの要因に関わるリン酸AIを利用するタイプの低リン酸耐性細胞を選抜し、以下の生理的特性を明らかにした。尚、これまでに同様な耐性系統を選抜した報告は見当たらない。

まず、難溶性リン酸A1を単独リン酸給源として選抜した低リン酸耐性細胞が、リン酸A1と同様に、難溶性リン酸鉄を利用できることを示した。この、低リン酸耐性細胞における難溶性リン酸を可給態化する能力は、クエン酸放出能力に依存していた。すなわち、この細胞は野生型細胞に比べクエン酸放出速度が約8倍高く、難溶性リン酸からより多くのリン酸を定量的に可溶化し、正リン酸給源と同様に生育できると結論した。さらに、低リン酸耐性細胞のクエン酸放出能力は正リン酸給源で長期間継代培養しても安定に保持されたことから、この細胞は単に難溶性リン酸A1に生理的に適応した細胞でなく、クエン酸放出に関して変異を持つ細胞であることを示した。

次に、低リン酸耐性細胞が野生型の親細胞と共存する選抜過程で、特異的に増殖した現象に着目し、それに関わる生理的要因を明らかにした。まず、低リン酸耐性細胞と親細胞の生育速度並びにリン酸利用効率（リン酸当たりの生育量）を比較し、両者に差が認められないことを示した。しかし、この細胞はリン酸吸収の V_{max}/K_m 値が親細胞の2倍であり、同濃度の可溶性リン酸を含む条件では、常に親細胞よりリン酸吸収速度が大きいことを明らかにした。そのため、選抜過程において自らが放出クエン酸により可溶化したリン酸を優先的に吸収することにより、特異的に増殖したものと結論した。

さらに、農業への応用を考慮し、低リン酸耐性細胞の形質が個体レベルで発現するか否か検討した。まず、長期間の選抜過程で、再分化能力を喪失した低リン酸耐性細胞に対し、若い野生型細胞の持つ再分化能力を細胞融合により導入した。その融合細胞から得られた細分化個体を用いて、低リン酸耐性細胞の耐性形質が、脱分化・再分化を通じて保持されることを示し、細胞レベルの耐性と個体レベルの耐性に高い相関が認められることを明らかにした。これらのことから、細胞工学的手法であるストレス選抜により、実用的な難溶性低リン酸耐性植物を作出できる可能性を示唆した。

以上のように本研究は、難溶性低リン酸耐性ニンジン培養細胞の生理的特性を明らかにしたことは評価に値すると同時に、その耐性機構の解明のみならず、酸性土壌における作物生産にも寄与するところ極めて大きいと思われる。よって審査員一同は本論文が博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。