

不定芽分化能が抑制されたセイヨウワサビ毛状根の特性

真野佳博*・湯澤宏恵・渡辺 勝

東海大学開発工学部生物工学科

要 旨: セイヨウワサビ (*Armoracia rusticana*) の毛状根クローン AR182 株と AR450 株を用いて、植物ホルモン非存在下での根組織からの不定芽分化能について比較した。その結果、AR450 株からは多数の不定芽が分化し、植物体へと再生したが、AR182 株からは全く不定芽が分化しなかった。次いで、不定芽分化におよぼすオーキシシンとサイトカイニンの影響を比較した。ナフタレン酢酸 (NAA) とベンジルアデニン (BA) を、最終濃度 10^{-7} - 10^{-9} M となるように添加した LS 培地で培養したところ、AR450 株では、特に、LS (10^{-6} M NAA) 培地および LS (10^{-7} M NAA, 10^{-7} M BA) 培地で、置床部の根組織から顕著な不定芽の分化と伸長がみられた。一方、AR182 株では、オーキシシンやサイトカイニンを添加した LS 培地でも、不定芽の分化は全くみられなかった。AR182 株は不定芽分化能が極度に抑制された毛状根クローンであることがわかった。

キーワード: 植物ホルモン, セイヨウワサビ, 光シグナル, 不定芽形成, 毛状根。

Characterization of Horseradish Hairy-Root Clone Depressing Differentiation of Adventitious Shoots: Yoshihiro MANO, Hiroe YUZAWA and Masaru WATANABE (*Dept. of Biological Science and Technology, Tokai University*)

Abstract: Horseradish (*Armoracia rusticana*) hairy-root clones AR182 and AR450 were used to examine the capabilities for differentiation of adventitious shoots from root segments. When horseradish hairy roots were cultured in phytohormone-free LS medium in the light condition, adventitious shoots were formed in AR450 but not formed in AR182. To elucidate effects of phytohormones on differentiation of adventitious shoots in AR182, hairy roots were cultured in LS medium containing naphthaleneacetic acid (NAA) and benzyladenine (BA) in the light condition. A large number of adventitious shoots were formed in LS (10^{-6} M NAA) and LS (10^{-7} M NAA and 10^{-7} M BA) in AR450. But adventitious shoot was not formed in AR182 even in the presence of NAA and BA. These results showed that the adventitious shoot formation was strongly repressed in AR182.

Keywords: adventitious shoot formation, hairy root, horseradish, light signal, phytohormone.

1. 緒言

Ri (root-inducing) プラスミドを菌体内に有する *Agrobacterium rhizogenes* は、植物に感染すると T-DNA と称される一部の領域を植物染色体に挿入する (Zambryski et al., 1989; Moriguchi et al., 2001)。Ri T-DNA 上にはオーキシシン生合成酵素遺伝子 (*aux 1* と *aux 2*) や *rol* 遺伝子群などが存在しており (Taylor et al., 1985; Sheng and Citovsky, 1996; Otten and Helfer, 2001; Binns, 2002), それらが発現することによって、毛状根 (Hairy root) と呼ばれる形質転換組織が感染部位から生じる。毛状根を除菌しクローン化した植物細胞組織は、植物ホルモン非存在下での増殖が可能となり、それぞれの毛状根クローンは、個々に異なった表現型を示すことが報告されている (Mano et al., 1986; Mano et al., 1989; 真野, 1989)。

植物の染色体に T-DNA を挿入することによって変異株を単離できることが報告されて以来 (Marks and Feldmann, 1989; Koncz et al., 1989; Marton et al., 1994), 最近では単子葉植物でも変異株の作出にこの方法が用いられている (An et al., 2005)。

これまでに、セイヨウワサビ (*Armoracia rusticana*) の毛状根を用いて、光照射型不定芽分化について多くの研究がなされてきた (Noda et al., 1987; Uozumi et al., 1992; Saitou et al., 1992; Mano and Matsushashi, 1995; Saitou et al., 1999; Mano, 2001)。その結果、光受容体のフィトクロムが関与することが明らかになってきた (Saitou et al., 1999a; Saitou et al., 1999b; Saitou et al., 2000; Saitou et al., 2004)。

そこで本研究では、Ri T-DNA を挿入することによってセイヨウワサビから毛状根を多数誘

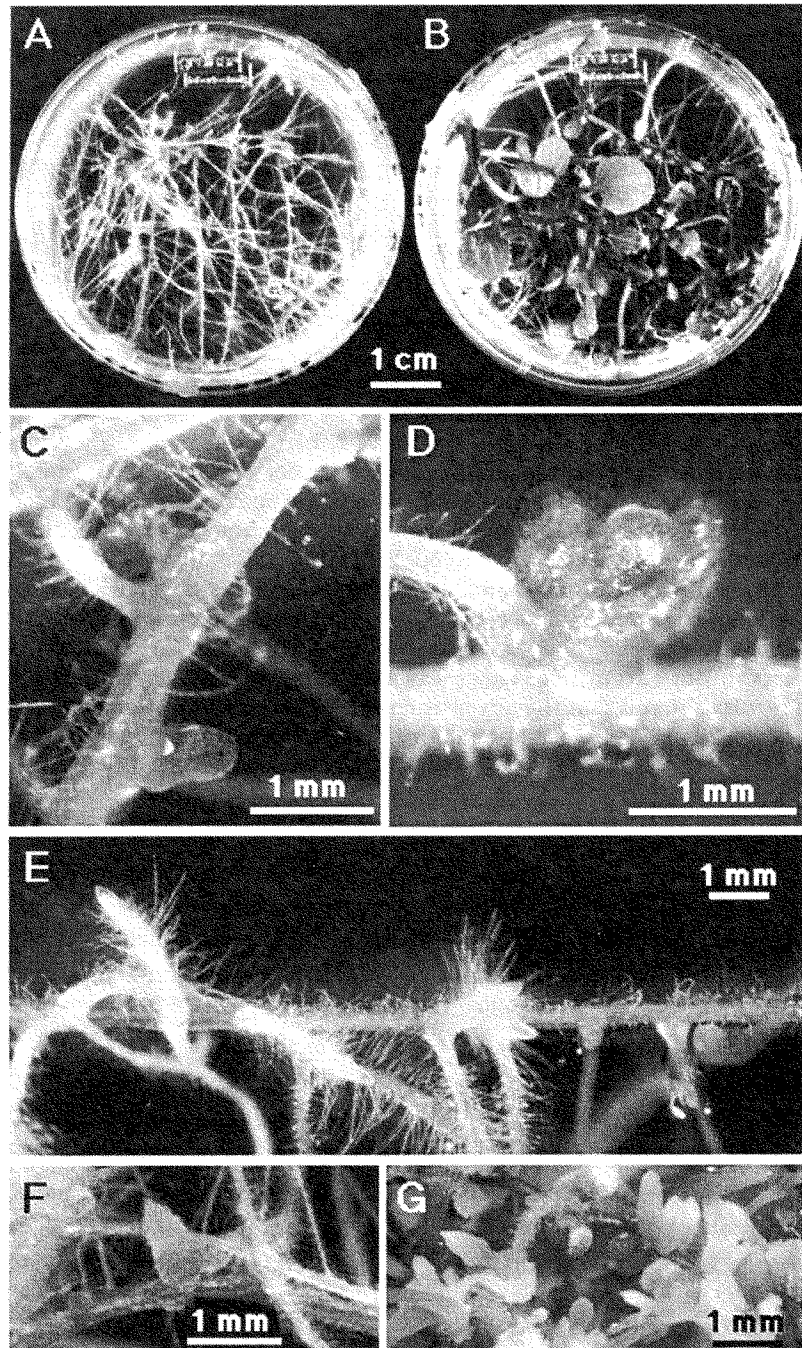
2005年7月21日受付 2005年9月8日受理
*連絡先 〒410-0321 沼津市西野317 東海大学開発工学部生物工学科
Fax: 055-968-1156 E-mail: y-mano@wing.ncc.u-tokai.ac.jp

発し，その中から不定芽分化能を欠損した変異株を単離することを試みた．約 1600 本の毛状根を選抜し，根からの不定芽分化能について検討した結果，不定芽分化能を欠損した変異株を単離した．本論文では，その変異株の表現形質について述べる．

2. 材料と方法

2.1 細菌および植物

セイヨウワサビ (*Armoracia rusticana*) の非形質転換植物 ARWT を無菌培養したものから葉切片を調製し，土壤細菌 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 株を接種して毛状根を誘発させたのち，毛状根クローンを多数樹立し



第1図. 毛状根 AR182 株と AR450 株からの不定芽分化誘導

AR182 株 と AR450 株の毛状根を LS 寒天培地に置床して暗所培養した．置床部の根を切除し，合計 20 日間暗所培養したのち明所培養した．AR182 株 (A, E, F, G) の根を明所で 15 日間 (E)，23 日間 (A, F)，60 日間 (G) 培養した．AR450 株 (B, C, D) の根を明所で 7 日間 (C)，12 日間 (D)，23 日間 (B) 培養した．

た (Mano and Matsushashi, 1995). その中から、生育の速いクローンである AR182 株および AR450 株を用いた。

2.2 培地

3% (W/V) ショ糖を含む Linsmaier & Skoog (LS) 培地 (Linsmaier and Skoog, 1965) を基本培地とした。LS 液体培地に寒天を 1% (W/V) とするように加えて LS 寒天培地を作成した。植物ホルモンは、オーキシンのナフタレン酢酸 (NAA) とサイトカイニンのベンジルアデニン (BA) を、最終濃度 10^{-7} - 10^{-5} M となるように添加した。

2.3 非形質転換植物および毛状根の継代培養

非形質転換植物を 60 ml の LS 液体培地で 25°C 明所で静置培養し、3-4 週間ごとに植え継いだ。植え継ぐ際は、大きく成長した葉柄と根の境界部に新たに生じた小さな植物体を、もとの植物から切り離して新しい培地に移植して培養した。

毛状根は 60 ml の LS 液体培地で 25°C 暗所、100 rpm で振とう培養し、1 週間ごとに植え継いだ。植え継ぐ際は、主根の先端を含むように 5-7 cm の長さに切り出し、培地中に 6 本加えて培養した。

2.4 非形質転換植物の根および

毛状根からの不定芽形成

静置培養した非形質転換植物の主根、および振とう培養した毛状根の主根を、液体培地の入ったシャーレに取り出し、主根の中央部に位置する側根の根端を含むように 0.5 - 1 cm の長さに切り出した。直径 6 cm のプラスチックシャーレ内に調製した LS 寒天培地上に 4 本の根を 1 cm 間隔で平行に置床した。 25°C 暗所で培養したのち、置床部の根を切除する場合は暗所内で緑色の発光ダイオードを安全光源として用い、置床部 (1 cm の長さ) の根をメスで切除した。その後、 25°C で 16 時間光照射条件 (16L/8D) の培養器 (白色蛍光灯, 2500 ルックス) で明所培養した。不定芽形成の評価は実体顕微鏡を用いて行なった。

3. 結果

3.1 毛状根 AR182 株と AR450 株からの不定芽分化誘導

液体培地で継代培養した AR182 株と AR450 株の根を 1 cm の長さに切り出し、植物ホルモン無添加の LS 寒天培地に置床し 25°C

暗所で 6 日間培養した。置床部 (1 cm の長さ) の根をメスで切除したのち、伸長部の根だけを暗所で 14 日間培養した。合計 20 日間暗所培養したのち、 25°C で 23 日間明所培養すると、AR450 株からは多数の不定芽が分化し、植物体へと再生したが (第 1 図 B), AR182 株からは全く不定芽が分化しなかった (第 1 図 A)。

AR450 株では、20 日間の暗所培養後、明所に移して 7 日間培養すると白色の根から緑色の不定芽が多数分化し (第 1 図 C), 12 日間不定芽の形態がはっきりと認められた (第 1 図 D)。

一方、AR182 株では、20 日間の暗所培養後、明所に移して 15 日間培養しても、主根が緑色に変化したが、不定芽の分化は認められなかった (第 1 図 E)。この時点で、新たに生じる根は白色であった。明所に移して 23 日間培養すると、緑化した主根から発生した側根がカルス化し、一見“芽”のような組織が出現したが (第 1 図 F), 不定芽には分化しなかった。明所に移して 60 日間培養しても、主根や側根が緑化し、特に側根が肥大してカルス化するだけで、不定芽分化はおこらなかった (第 1 図 G)。

なお、非形質転換植物の根を 1 cm の長さに切り出して同様に培養したが、根はほとんど伸長せず、不定芽の分化もみられなかった (未発表)。

3.2 毛状根 AR182 株と AR450 株からの不定芽分化におよぼす植物ホルモンの影響

液体培地で継代培養した非形質転換植物 ARWT の根、毛状根の AR182 株および AR450 株の根を 0.5 cm の長さに切り出し、植物ホルモンを添加した LS 寒天培地に置床し、 25°C で 7 日間暗所培養したのち 20 日間明所培養した (第 2 図)。

その結果、AR450 株では、植物ホルモン非存在下でも多数の不定芽分化がみられた (第 2 図)。また、LS (10^{-6} M NAA) 培地 (第 2 図 A), および LS (10^{-7} M NAA, 10^{-7} M BA) 培地 (第 2 図 B) では、明所培養 1 週間という早い時期に、置床部の根組織から不定芽の分化と伸長がみられた。

一方、AR182 株では、植物ホルモン非存在下のみならず、オーキシンのナフタレン酢酸を添加した LS 寒天培地でも、不定芽の分化は全くみられなかった (第 2 図)。AR450 株で顕著な不定芽分化と伸長がおこった条件、すなわち、LS (10^{-6} M NAA) 培地 (第 2 図 A), および LS (10^{-7} M NAA, 10^{-7} M BA) 培地 (第 2 図 B) で

も, AR182 株においては不定芽は全く形成されなかった。

AR182 株と AR450 株のオーキシシンに対するレスポンスを比較すると, 10^{-7} M NAA の低濃度条件で, AR182 株は AR450 株よりも根の分化が著しくおこり, 10^{-5} M NAA の高濃度条件にすると AR182 株は AR450 株よりも根の生育が抑制された (第2図)。

対照実験としての非形質転換植物 ARWT の根を用いた場合, 10^{-7} M - 10^{-6} M NAA および 10^{-7} M - 10^{-6} M BA が共存する培養条件では, 不定芽の分化がわずかながらみられたが (第2図, 第2図B), AR450 株で最も多数の不定芽が生じた LS (10^{-6} M NAA) 培地での不定芽分化は全くみられなかった (第2図A)。

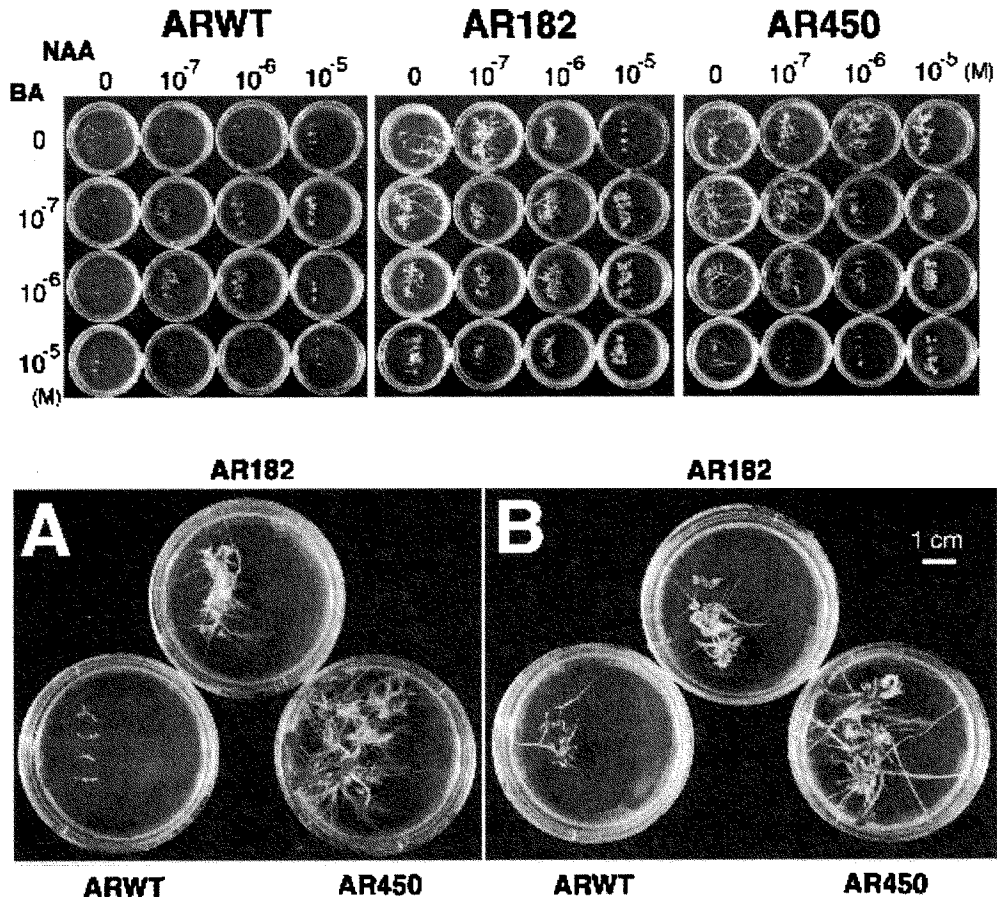
AR182 株と AR450 株のサイトカイニンに対するレスポンスを比較すると, AR450 株で細

胞増殖や分化が抑制される 10^{-5} M BA の高濃度条件でも, AR182 株はカサの生育がみられた (第2図)。

4. 考察

4.1 毛状根 AR182 株における不定芽分化能

多数のセイヨウワサビ毛状根を単離し, その中から生育の速い2つの株を選び, 不定芽分化能について検討した. AR450 株は光シグナルや植物ホルモンによって不定芽分化が誘導されるのに対し, AR182 株は全く不定芽を分化しなかった (第1図, 第2図). AR450 株に限らず, これまでに報告されているセイヨウワサビ毛状根では, 植物ホルモンの有無に関わらず, 不定芽の形成が比較的容易におこる (Noda et al., 1987; Uozumi et al., 1992; Saitou et al., 1992; Uozumi et al., 1994; Mano and Matsushashi, 1995;



第2図. 毛状根 AR182 株と AR450 株からの不定芽分化におよぼす植物ホルモンの影響

非形質転換植物 ARWT, 毛状根 AR182 株および AR450 株の根を 0.5 cm の長さに切り出し, 植物ホルモンを添加した LS 寒天培地に置床し, 7 日間暗所培養したのち 20 日間明所培養した。ただし, 置床部の根の切除は行なわなかった。LS 寒天培地を基本培地として用い, 植物ホルモンは NAA と BA を添加した。

AR450 株で顕著な不定芽分化と伸長がおこった条件のうち, LS (10^{-6} M NAA) 培地 (A), および LS (10^{-7} M NAA, 10^{-7} M BA) 培地 (B) の拡大写真を示した。

Saitou et al., 1999; Mano, 2001). また、植物細胞組織を培養する際、オーキシンやサイトカイニンの添加によって、多くの場合、不定芽分化を誘導できる。ARWT や AR450 株で不定芽分化がおこる植物ホルモン条件下でも、AR182 株は不定芽を形成しなかった(第2図)。

植物の染色体に組み込まれる Ri T-DNA 上には、オーキシン生合成酵素遺伝子 (*aux 1* と *aux 2*) や *rol* 遺伝子群がコードされているが (Taylor et al., 1985; Sheng and Citovsky, 1996; Otten and Helfer, 2001; Binns, 2002), サイトカイニン生合成酵素遺伝子は存在しない (Chilton et al., 1982; Taylor et al., 1985; Zambryski et al., 1989)。従って、過度の脱分化状態にはならず (Tepfer, 1984), 多くの場合、毛状根からの個体再生はクラウンゴールに比べて容易である。AR182 株は根の形態を維持し、外観も AR450 株と同じであるにも関わらず、不定芽分化能が極度に抑制された毛状根クローンであることがわかった。

4.2 毛状根 AR182 株の遺伝的変異

形質転換植物に組み込まれた T-DNA は、その長さやコピー数が異なることが示唆されており (真野, 1989), T-DNA 上の遺伝子の発現量は毛状根のクローンごとに大きく異なると思われる。AR182 株は AR450 株よりも、オーキシン生合成酵素遺伝子や根の形態維持に関わる *rol* 遺伝子群が高発現しているとするれば、根の形態を維持する形質が強く発現するために、結果として不定芽分化が強く抑制されるのかもしれない。ただし、AR182 株を6ヶ月程度培養すると、極めてまれに根からの不定芽分化がみられることがある。その不定芽を植物ホルモン非存在下で明所培養すると、容易に植物体へと再生する (Mano and Matsushashi, 1995)。これまでに、セイヨウワサビ毛状根から再生した植物について、正常な形態を示すもののほかに、wrinkled 型 や rooty 型など種々の形態を示すことが報告されている (Saitou et al., 1991)。しかし、AR182 株から再生した植物は、AR450 株から再生した植物と同様の正常な形態を示し、wrinkled 型 や rooty 型のような異常な形態ではない (Mano and Matsushashi, 1995)。従って、AR182 株は不定芽分化の誘導に関わる変異を有しており、一度、不定芽が分化すれば、あとの個体再生に関わる反応や植物体として形態を維持することに関しては正常であると考えられる。

AR182 株および AR450 株における Ri

T-DNA の存在状態、組み込まれた T-DNA 上の遺伝子の発現様式を解析することによって、AR182 株における不定芽分化の抑制に関わる T-DNA 上の遺伝子が明らかになるかもしれない。あるいは、AR182 株に挿入された植物染色体上の T-DNA を目印にして、その近傍の遺伝子を解析することにより、植物が本来持つ不定芽分化の誘導に関わる遺伝子が明らかになる可能性がある。このような遺伝子解析をするにあたって、毛状根クローン AR182 株および AR450 株は有用なツールであると考えられる。

5. 引用文献

- An, G., Lee, S., Kim, S. H., Kim, S. R. 2005. Molecular Genetics Using T-DNA in Rice. *Plant and Cell Physiology* 46: 14-22.
- Binns, A. 2002. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens*: 25 years and counting. *Trends Plant Sci.* 7: 231-233.
- Chilton, M. D., Tepfer, D. A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F., Tempe, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into genomes of the host plant root cells. *Nature* 295: 432-434.
- Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Koerber, H., Redei, G. P., Schell, J. 1989. High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8467-8471.
- Linsmaier, E. M., Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 18: 100-127.
- 真野佳博 1989. 毛状根クローン間のバリエーションとその応用. *植物組織培養*, 6: 1-9.
- Mano, Y. 2001. Transgenic Horseradish (*Armoracia rusticana*). In Bajaj Y. P. S. eds., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. pp. 26-38. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Mano, Y., Matsushashi, M. 1995. A novel life cycle arising from leaf segments in plants regenerated from horseradish hairy roots. *Plant Cell Rep.* 14: 370-374.
- Mano, Y., Nabeshima, S., Matsui, C., Ohkawa, H. 1986. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agric. Biol. Chem.* 50: 2715-2722.
- Mano, Y., Ohkawa, H., Yamada, Y. 1989. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Duboisia leichhardtii* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Science* 59: 191-201.
- Marks, M. D., Feldmann, K. A. 1989. Trichome Development in *Arabidopsis thaliana*. I. T-DNA Tagging of the GLABROUS1 Gene. *Plant Cell* 1: 1043-1050.

- Marton, L., Hrouda, M., Pecsvaradi, A., Czako, M. 1994. T-DNA-insert-independent mutations induced in transformed plant cells during *Agrobacterium* co-cultivation. *Transgenic Res.* 3: 317-325.
- Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N. S., Kataoka M, Tanaka N, Yoshida, K. 2001. The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. *J. Mol. Biol.* 307: 771-784.
- Noda, T., Tanaka, N., Mano, Y., Nabeshima, S., Ohkawa, H., Matsui, C. 1987. Regeneration of horseradish hairy roots incited by *Agrobacterium rhizogenes* infection. *Plant Cell Rep.* 6: 283-286.
- Otten, L., Helfer, A. 2001. Biological activity of the rolB-like 5' end of the A4-orf8 gene from the *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA. *Mol Plant Microbe Interact.* 14: 405-411.
- Saitou, T., Kamada, H., Harada, H. 1991. Isoperoxidase in hairy roots and regenerated plants of horseradish (*Armoracia lapathifolia*). *Plant Science* 75: 195-201.
- Saitou, T., Kamada, H., Harada, H. 1992. Light requirement for shoot regeneration in horseradish hairy roots. *Plant Physiol.* 99: 1336-1341.
- Saitou, T., Tokutomi, S., Harada, H., Kamada, H. 1999a. Overexpression of phytochrome A enhanced the light-induced formation of adventitious shoots on horseradish hairy roots. *Plant Cell Rep.* 18: 754-758.
- Saitou, T., Tokutomi, S., Harada, H., Kamada, H. 1999b. Quantitative correlation between the concentration of photoreactive phytochrome and light-induced formation of adventitious shoots in horse-radish hairy roots. *J. Exp. Bot.* 50: 1837-1844.
- Saitou, T., Hashidume, A., Kamada, H. 2000. Genes for phytochrome A in horseradish: isolation of cDNAs and analysis of expression during light-induced formation of adventitious shoots from hairy roots. *Plant Cell Rep.* 19: 1212-1218.
- Saitou, T., Hashidume, A., Tokutomi, S., Kamada, H. 2004. Reduction of phytochrome level and light-induced formation of adventitious shoots by introduction of antisense genes for phytochrome A in horseradish hairy roots. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 76: 46-51.
- Sheng, J., Citovsky, V. 1996. *Agrobacterium*-Plant Cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *Plant Cell* 8: 1699-1710.
- Taylor, B. H., White, F. F., Nester, E. W., Gordon, M. P. 1985. Transcription of *Agrobacterium rhizogenes* A4 T-DNA. *Mol. Gen. Genet.* 201: 546-553.
- Tepfer, D. A. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37: 959-967.
- Uozumi, N., Asano, Y., Kobayashi, T. 1994. Micropropagation of horseradish hairy root by means of adventitious shoot primordia. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 36: 183-190.
- Uozumi, N., Nakashimada, Y., Kato, Y., Kobayashi, T. 1992. Production of artificial seed from horseradish hairy root. *J. Ferment. Bioeng.* 74: 21-26.
- Zambryski, P., Tempe, J., Schell, J. 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* 56: 193-201.