

アブラナ科植物 *Rorippa aquatica* にみられる 葉断面からの栄養繁殖条件の検討

平成 28 年 4 月 19 日受付

天 野 瑠 美^{*1}
中 山 北 斗^{*2}
木 村 成 介^{*1}

要 旨

アブラナ科植物の *Rorippa aquatica* は、栄養繁殖能が高く、自然条件下において、ちぎれた葉の断面から新しい個体（栄養分体）を再生することで無性的に繁殖していることが知られている。栄養分体を再生する一連の過程には植物ホルモンによる処理は必要なく、水分状況が適切であれば、葉断面に複数の栄養分体を再生する。一般に、植物細胞の脱分化および再分化による植物体の再生は *R. aquatica* 以外の植物においても観察される現象だが、多くの場合は植物ホルモンによる処理が必要である。そのため、この *R. aquatica* の栄養繁殖のメカニズムを明らかにすることで、植物の再生機構に新たな知見を提供できると考えた。本研究では、*R. aquatica* の栄養繁殖のメカニズムを解明するにあたり、より効率的に再生を維持できる条件の検討を行なった。その結果、水道水を含ませた紙の上で栄養繁殖をさせる条件が、発生学的解析および分子生物学的解析に適していることが明らかになった。これにより、*R. aquatica* の栄養繁殖のメカニズムの解析を効率的に行なうことが可能になると期待される。

キーワード：植物，アブラナ科，栄養繁殖，再生，培養

1. はじめに

自然界に存在する植物には、受粉を通して有性生殖を行なう種の他に、無性生殖を行なう種が存在する。さらに、無性生殖の中でも、根や葉、そして茎といった栄養器官から、新しい根や葉、栄養分体と呼ばれる新しい個体が再生するものを栄養繁殖という。このような栄養繁殖の性質は、挿し木や葉挿しのように、園芸の面で古くから応用されてきた（図 1）。

一般に、植物は再生能力が高く、組織片を、植物ホルモンのサイトカイニンやオーキシンによって処理することで、分化していた細胞が脱分化し、カルスと呼ばれる細胞塊を形成した後新しい個体を再生（再分化）させることができる¹。例えば、処理するサイトカイニンの量に対してオーキシン

^{*1} 京都産業大学総合生命科学部

^{*2} Department of Plant Science, University of California, Davis

の量が多い場合は根を再生し、オーキシンの量に対してサイトカイニンの量が多い場合はシュートを再生する (図 1)。このような植物ホルモンによる処理を介した植物体の再生メカニズムについては、モデル植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた研究が盛んに進められている。

植物ホルモンを含むカルス誘導培地でシロイヌナズナの組織片を培養すると、側根形成時と同様に維管束の内鞘の細胞が分裂し、カルスが形成される²。さらに近年の解析の結果から、このカルスでは静止中心の幹細胞において特異的に発現する *SCARECROW* (*SCR*) に代表されるような、側根形成時にはたらく遺伝子の発現が認められることが明らかになっている²。このことから、カルスは未分化な細胞塊ではなく、側根のアイデンティティを持つことが明らかになっている²。

また、シロイヌナズナの胚軸を切断して培養すると、その傷を塞ぐためのカルスを形成する³。このカルスは「傷害応答性カルス」と呼ばれ、AP2/ERF ファミリーの転写因子 *WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION1* (*WIND1*) が高発現していることが報告されており、植物の再生を制御する因子の1つとして注目されている。

一方で、栄養繁殖は植物ホルモンによる処理を必要としない。栄養繁殖を行なう植物の1つであるコダカラベンケイソウ (*Kalanchoe daigremontiana*) は、葉縁の鋸歯から、不定胚発生によって栄養分体を再生することで繁殖する⁴。不定胚とは、植物の組織や器官から形成される胚であり、有性生殖によって発生した胚とは区別される。コダカラベンケイソウの再生メカニズムについては、胚発生に重要な役割を果たす *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*) に焦点を定めた変異体の作出をはじめとした *KdLEC1* の機能解析が進められている。

加えて、発生学的な解析から、ペペロミア属 (*Peperomia*) やマンネングサ属 (*Sedum*) の植物は、葉挿しによって栄養分体を再生することが明らかになっている⁵。マングローブ樹種の1つであるヒルギ科のメヒルギ (*Kandelia candel*) は、胚軸の断面からシュートや根を再生することが知られている⁶。

このように、栄養繁殖についてはいくつかの植物種について散発的に解析が行なわれてきた。しかしながら、既存のモデル植物ではその性質が見られないために遺伝子レベルでの解析が難しいことが多く、栄養繁殖の分子的なメカニズムはほとんど明らかになっていない。

北米の湖畔に生育する半水生でアブラナ科の *Rorippa aquatica* は、葉の断面から栄養分体を再生することで栄養繁殖を行なうという特徴を持っている⁷。*R. aquatica* は、水分状況さえ適切であれば、葉の基部側の断面からのみ複数の栄養分体を再生し、先端部側の断面からは再生しない (図 2)。また、シロイヌナズナと同じアブラナ科に属し、比較的近縁でありながらこのような性質を示す *R. aquatica* は、栄養繁殖のメカニズムを遺伝子レベルで解明する上で、モデルとなり得る材料であるといえる。加えて近年、属内および近縁属での分子系統解析も行なわれており、*R. aquatica* によって栄養繁殖のメカニズムが明らかになれば、植物における発生学および進化学の分野に新たな知見を提供できるだけでなく、育種分野への応用も期待できる。

そこで、本研究では、*R. aquatica* の栄養繁殖のメカニズムを遺伝子レベルで明らかにする基盤作りとして、効率的に再生を維持できる条件の検討を行なった。

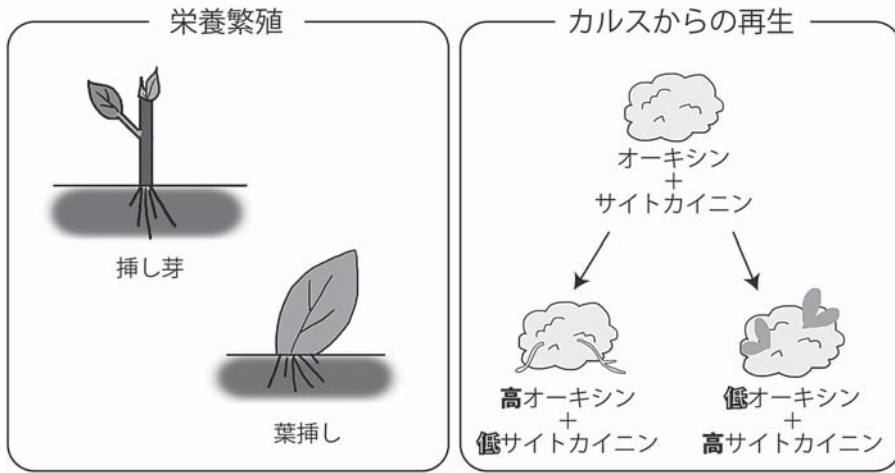


図1 一般的にみられる植物の再生様式

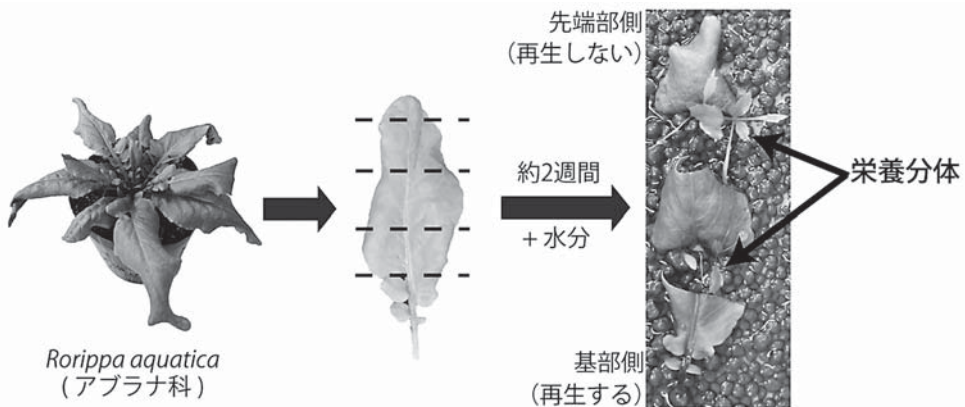


図2 *Rorippa aquatica* の栄養繁殖

R. aquatica の葉片を水分のある環境に2週間ほど静置すると、基部側の断面からのみ栄養分体を再生する。

2. 材料と方法

2.1 植物材料

プラスチック製のバット上に、培養土「水草とシュリンプの土 (charm)」を敷いて水道水を含ませ、3～4枚の葉片に切り分けた *R. aquatica* の葉を置いて栄養繁殖させた。この際、乾燥を防ぐためにバットの上からラップをかかけた。栄養繁殖は22°Cの24時間明条件下で20日間行なった。再生した栄養分体は培養土（パーミキュライト：赤玉土：メトロミックス＝3：1：1）が入った栽培ポットに鉢上げし、30°Cの24時間明条件下で40日以上栽培した。2～3日に1度、0.5 ml/Lのハイポネックス溶液（窒素：リン酸：カリウム＝6：10：5）を与えた。

2.2 栄養繁殖

栽培ポットへの鉢上げ後 40 日以上経過した複数の個体から、生育の良い葉を無作為に切り取り、それらを葉 1 枚につき 3～4 枚の葉片に切り出して、水道水を含ませた培養土「水草とシュリンブの土 (charm)」を敷いたプラスチック製のバット上、および、水道水を含ませたコンフォートサービスタオル (クラシエ) を 2 枚敷いたプラスチック製のバット上で、それぞれ栄養繁殖させた。栄養繁殖は 22°C の明条件下で 20 日間行なった。

3. 結果

R. aquatica は、水分量が適切であれば培養土だけでなく紙 (コンフォートペーパータオル) においても栄養分体を再生することができることは、筆者らによってあらかじめ確認されていた。そこで、今後、*R. aquatica* の栄養繁殖のメカニズムを明らかにする上でサンプルを再生させる際に、培養土あるいは紙のどちらで再生させるのがより適切であるかを検討した。

培養土の上で再生させた場合、栄養分体の葉は葉身部分が大きく展開し、葉柄も太かった。根は長く太く再生した (図 3A, C)。また、表面に白い粉状にカビのような汚れが付着した土が多数見られた。この汚れは水面上にも浮かんでおり、バットを動かすと、水と共に移動した。

紙の上で再生させた場合は、栄養分体の葉が、葉身部分、葉柄部分共に細かった。根は短く、収縮していた (図 3B, D)。紙には白い粉状のカビのような汚れは確認されなかったが、葉片や栄養分体のない部分に少量の緑色の藻類が発生していた。

なお、鉢上げすると、培養土上で再生させた栄養分体および紙上で再生させた栄養分体のどちらも正常に生育することができたが、後者の方が少し生育が遅かった。

4. 考察

培養土上で再生させた際は栄養分体の葉が大きく、根が長かったのに対し、紙上で再生させた際は葉が細く、根が短かったことから、栄養分体をより精力的に再生させることのできる条件は培養土であるといえる。一方で、培養土や水面にカビのような汚れが見られたことから、再生した環境は清浄ではないと考えられる。これは、今後、各種顕微鏡によって再生部分を詳細に観察する際や、再生部分での遺伝子の発現解析を行なう際の妨げになる可能性がある。これに対して、紙上で再生させた栄養分体は、培養土上で再生させた場合と比べて葉や根が弱々しかったものの、カビは生えず、葉片や栄養分体におよそ影響しない部分に藻類が発生するに留まったことから、こちらの方がより清浄な環境で再生させることができると考えられる。また、鉢揚げ後の生育は培養土上で再生させた栄養分体よりも紙上で生育させた栄養分体の方が生育が遅かったことについては、鉢上げ時点の栄養分体の葉や根の大きさの違いが原因である可能性が大きい。併せて、培養土と紙における、再生した栄養分体の大きさやカビの発生の違いは、培養土に含まれる栄養分が原因であると考えられる。

以上のことから、より発達した栄養分体を得ることで *R. aquatica* の個体数を増やしたい場合には

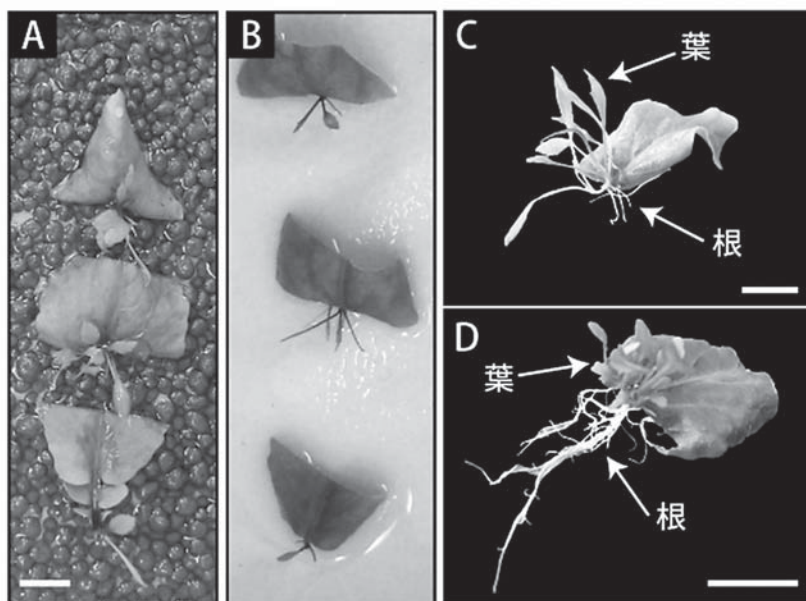


図3 栄養繁殖の条件の検討

(A) 水道水と培養土での栄養繁殖。(B) 水道水と紙での栄養繁殖。(C) 水道水と培養土で再生した栄養分体。(D) 水道水と紙で再生した栄養分体。スケールバーはそれぞれ1cmを示す。なお、(A) および (B) は同じ縮尺である。

培養土上での再生が適しており、再生途中にある葉片や再生した栄養分体を、発生学的解析および分子生物学的解析に用いたい場合には紙上での再生が適しているといえる。

5. 今後の展望

今回の結果から、*R. aquatica* の再生メカニズムの解明を進める際の適切な再生条件を決定することができた。今後は、この再生条件をもとに各種顕微鏡による再生部位（葉断面）の経時的な観察を行なうことで、栄養分体が再生する厳密な部位や再生する時期を特定する。さらに、シロイヌナズナのカルス形成やコダカラベンケイソウの葉縁部分からの栄養繁殖をはじめとする近年報告されてきた研究をもとに、植物の再生に関与する遺伝子の発現解析を *R. aquatica* の葉断面において行なうことで、遺伝子の発現が変動し始める時期を特定する予定である。その後、上記の発生学的解析、分子生物学的解析をもとに、再生過程において重要な現象が起こると考えられる時期を決定し、その当該時期においてRNA-seqを行なう。これにより、遺伝子の発現を網羅的に解析することで、*R. aquatica* の栄養繁殖のメカニズムに重要な役割を果たす遺伝子群や遺伝子ネットワークを同定することができると考えている。

今後の研究による *R. aquatica* の栄養繁殖のメカニズムの解明は、植物の育種や発生学的な研究に発展的な知見を提供することができるだろう。

謝辞

本研究は、京都産業大学第3次総合研究支援制度新規研究課題挑戦支援プログラム「種子植物の栄養繁殖機構の解明と植物再生工学の展開」(課題番号 E1501)の研究の一部として実施された。また、研究の一部は、平成27年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「植物における生態進化発生学研究拠点の形成—統合オミックス解析による展開—」(課題番号 S1511023)、および、平成24年度科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金(若手研究(B))「葉の形態の表現型可塑性の分子基盤の解明:環境に応じて葉形を変化させる植物の研究(課題番号 24770047)」)の支援を受けて実施した。

参考文献

1. Skoog F and Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 54: 118-130.
2. Sugimoto K, Jiao Y, and Meyerowitz EM (2010) *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev. Cell* 18: 463-471.
3. Iwase A, Ishii H, Aoyagi H, Ohme-Takagi M, and Tanaka H (2005) Comparative analyses of the gene expression profiles of *Arabidopsis* intact plant and cultured cells. *Biotechnol. Lett.* 27: 1097-103.
4. Garcês HM, Champagne CE, Townsley BT, Park S, Malhó R, Pedroso MC, Harada JJ, and Sinha NR (2007) Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoë*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 15578-15583.
5. Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, and Geneve RT (2010) HARTMAN AND KESTER'S PLANT PROPAGATION: PRINCIPLES AND PRACTICES. *Prentice Hall*: 290-292.
6. Ogita S, Edward C, and Sasamoto H (2004) Histological analysis in shoot organogenesis from hypocotyl explants of *Kandelia candel* (Rhizophoraceae). *J. Plant Res.* 117: 458-464.
7. La Rue CD (1943) Regeneration in *Radicula aquatica*. *Michigan Academician* 28: 51-61.

Vegetative propagation from leaf fragments in *Rorippa aquatica*

Rumi AMANO
Hokuto NAKAYAMA
Seisuke KIMURA

Abstract

Rorippa aquatica (Brassicaceae) has a high vegetative propagation capacity. This plant can produce plantlets from leaf fragments that have been stripped off their stems without any external application of plant hormones. The molecular mechanism underlying plant vegetative propagation still remains unclear. In this study, we investigated the most suitable reproduction conditions in order to improve our understanding of the vegetative propagation mechanism in *R. aquatica*. The results suggest that paper with water is the most suitable condition for developmental and molecular analyses. This study should help further studies on the mechanism underlying vegetative propagation in *Rorippa aquatica*.

Keywords : plant, Brassicaceae, vegetative propagation, regeneration, cultivation

