

トレンニア茎切片における傷害誘導不定芽分化に関する研究Ⅲ 高分子不定芽誘導物質

重田 千晶・谷本 静史
(遺伝子工学研究室)
平成9年9月4日 受理

Studies on the Wound-induced Adventitious Bud Induction in *Torenia* Stem Segments III High Molecular Weight Bud-inducing Substance

Chiaki SHIGETA and Shizufumi TANIMOTO
(Genetic Engineering Laboratory)
Received September 4, 1997

Summary

The role of the exudate from wounded stem in stimulating and/or inducing adventitious bud initiation in *Torenia* stem segments was examined. When the exudate was added to the medium, adventitious buds can be induced in the stem segments. The active component was heat-stable, and localized in the aqueous phase of the solvent. When the aqueous phase was fractionated by ion exchange chromatography, the active substance(s) were attached to the cation exchange resin indicating that the substance(s) were basic. Dialysis results showed that the active substance(s) had a molecular weights larger than 10,000. When the non-diffusate fraction was treated with proteinase K, DNase, or a mixture of pectinase, hemicellulase and cellulase, and re-dialyzed, the non-diffusate fraction was active. However, RNase treatment made the bud-inducing activity disappear. The result obtained by RNase treatment, suggest that the active substance in the exudate may be the high molecular weight RNA itself. On the other hand, however, RNA molecule is acidic and not attach to the cation exchange resin. Therefore, RNA or oligo ribonucleotide seemed to form complex by binding the basic high molecular weight substance such as protein. Furthermore, the part of RNA or oligo ribonucleotide has bud-inducing activity.

Key words: Adventitious bud, Oligo ribonucleotide, RNA, *Torenia fournieri*, Wounding.

緒 言

高等植物の器官切片からの不定芽分化において傷害は分化現象に対する“trigger”として作用している。この“trigger”の実体は傷害によって生成した何らかの物質によるものと思われる。

我々はこれまでにトレンニア (*Torenia fournieri*) の茎切片を材料として、不定芽分化につい

で検討してきた。その過程で、傷害がきわめて重要な作用をしていることを明らかにした。すなわち、比較的長い茎切片を材料とすると不定芽は切片両端の切り口周辺から分化するが、切片の中央部に傷害を与えると傷害部位周辺においても不定芽が分化してくる¹⁾。このような材料において、不定芽分化に関与する各種の物質、すなわちサイトカイニン、オーキシン、 NH_4^+ 、cyclic AMP、spermidine等の分布について調べた。その結果、遊離型の spermidine 含量が傷害部位周辺で高くなることが明らかとなったが、不定芽分化との密接な相関関係は認められなかった²⁾。植物に傷害を与えると各種のフェノール化合物を生成することが知られているので³⁾、それらの化合物を与えたところ、無傷の切片中央部からも不定芽が分化し、また傷害茎滲出液中にもフェノール化合物が存在することも明らかにした⁴⁾。しかしながら、滲出液中の含量と有効作用濃度がかなり異なるので、フェノール化合物が“trigger”であるとは断定できなかった⁴⁾。

以上の検討の結果は、傷害によって生成する不定芽分化の“trigger”物質が未知の物質である可能性を示唆するものである。そこで、その物質の単離・同定を試みることにした。前報⁴⁾の方法で細断した茎の滲出液を採取し、これを検定した。トレニアの茎切片からの不定芽分化は表皮細胞を起源として起こるために、1週間の培養後、表皮を剥ぎ取り不定芽の原基である meristematic zone (MZ) の数を測定することで、検定物の不定芽分化に対する効果を知ることができる⁵⁾。そこで、この実験系を検定系として用いることにした。

材料と方法

1. 検定方法

トレニア (*Torenia fournieri* Lind.) の種子をバーミキュライトに播種し、16時間明期/8時間暗期 ($100\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$)、温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ の培養庫で育て、播種後8週間後の植物体の上部茎節間を採取した。これを次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度 2%) で15分間滅菌し、滅菌水で洗浄した。この節間から長さ 5 mm の切片を採取して外植体とした。基本培地としては、Murashige と Skoog の無機塩類組成とビタミン⁶⁾に 3% ショ糖及び 0.3% ゲルライトを添加したもの (以降 MS 培地と称する) を用いた。実験によっては、benzyladenine (BA) $0.5\mu\text{M}$ を加えた。この培地に傷害茎滲出液の各画分を添加した。滲出液の濃度と活性の関係を検討する場合を除いて、1 ml の培地当り茎 1 mg 当量の滲出液あるいは画分を添加した。培養1週間後、茎切片を剥ぎ取り、酢酸カーミンで染色して MZ 数を測定した。1設定区当り 24個の茎切片を用い、実験は3回繰り返した。結果は3回の実験の平均値で示し、標準偏差を計算した。

2. 傷害茎滲出液の調製と熱安定性の確認

トレニアの播種後8週間後の植物体の上部茎節間を採取した。この節間を幅約 1 mm に細断して 1 g あたり 1 ml の滅菌水中に24時間浸漬した。その後、滲出液をミラクロスで濾過したものを傷害茎滲出液として検定に用いた。なお、対照として細断していない茎節間の両端をパラフィンで封じ、同様に浸漬したものを用いた。これらの滲出液はロータリーエバポレーター (36°C) を用いて濃縮した。

傷害茎滲出液の不定芽分化に対する活性は BA 添加及び無添加の培地を用いて検定した。1 ml の培地当り茎 0.1 から 100 mg 当量の滲出液をオートクレーブ滅菌した培地にフィルターで滅菌して添加した。

また、活性の熱安定性を確認するために、あらかじめオートクレーブ滅菌した培地にフィルター滅菌した滲出液を加えるか、あるいは培地に滲出液を添加後オートクレーブ滅菌した。

1 設定区当り24個の茎切片を用い、実験は3回繰り返した。結果は3回の実験の平均値で示し、標準偏差を計算した。

3. 不定芽分化誘導活性の分画

傷害茎滲出液に同量のクロロホルムを添加して分液ロートを用いて分配した。同様の分配を3回繰り返した。その水相をリン酸で酸性にした後、同量の酢酸エチルを加えて3回分配した。クロロホルム層及び酢酸エチル層はエバポレーターで濃縮・乾固後 MeOH で溶解した。クロロホルム層、酢酸エチル層及び最終的に得られた水層を BA0.5 μ M を含む MS 培地に添加して検定した。溶解に用いた MeOH による影響はなかった。結果は各画分を添加しなかった場合に形成された MZ 数を100%とした相対表示で示した。

傷害茎滲出液の溶媒分配によって得られた水層をさらにイオン交換樹脂カラムによって分画した。水相を0.1N の KOH で中性にした後に、まず陽イオン交換樹脂カラム (AG50-X4, H⁺ form, 1.5 \times 14cm, 25ml bed vol.) に吸着させた後に蒸留水100mlで洗浄した。これを2 N のアンモニウム水溶液50mlで溶出し、エバポレーターで濃縮・乾固してアンモニウムを除去した後少量の蒸留水に溶解した (AG50画分)。陽イオン交換樹脂を洗浄した蒸留水 (陽イオン交換樹脂に吸着しなかった画分) は、さらに陰イオン交換樹脂カラム (Dowex 1-X8, OH⁻ form, 1.5 \times 14cm, 25ml bed vol.) に吸着させた後に蒸留水100mlで洗浄した。これを2 N の重炭酸アンモニウム溶液50mlで溶出し、エバポレーターで濃縮・乾固して重炭酸アンモニウムを除去した後、少量の蒸留水に溶解した (Dowex 画分)。この洗浄液は両イオン交換樹脂に吸着しなかった画分であるが、濃縮して flow through (FT) 画分とした。これらの画分を BA0.5 μ M を含む MS 培地に添加して検定した。

AG50画分を分画分子量1万の透析膜により、蒸留水1 ℓ に対して4 $^{\circ}$ Cで24時間透析した。外液は2回交換し、エバポレーターで濃縮した。透析外液画分と透析内液画分をそれぞれ BA0.5 μ M を含む MS 培地に添加して検定した。

透析内液画分を以下の各種の分解酵素で処理した。proteinase K (Boehringer Mannheim, Germany), DNase I (Sigma, USA), あるいは RNase A (Sigma, USA) を10mM のリン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解し、それぞれ最終濃度が10 μ g/mlになるように透析内液画分に加えた。pectinase SE-150 (シキボウ, 大阪), hemicellulase (Sigma, USA) 及び cellulase RS (ヤクルト) を50mM の酢酸ナトリウム緩衝液に溶解し、最終濃度が各1 unit になるように透析内液画分に加えた。いずれの酵素処理も37 $^{\circ}$ Cで2時間行った。酵素処理終了後、分画分子量1万の透析膜により、蒸留水1 ℓ に対して4 $^{\circ}$ Cで24時間透析した。外液は2回交換し、エバポレーターで濃縮した。透析外液画分と透析内液画分をそれぞれ BA0.5 μ M を含む MS 培地に添加して検定した。結果は各画分を添加しなかった場合に形成された MZ 数を100%とした相対表示で示した。

結 果

1. 傷害茎滲出液の不定芽分化に及ぼす影響

まず、傷害茎滲出液を培地に添加し、不定芽分化に対する影響を調べた。その結果 (Fig. 1), BA を添加した培地では、不定芽の原基である MZ の数は添加した滲出液の濃度を上昇させ

ることによって増加し、この滲出液に不定芽分化の促進活性があることが判明した。この促進活性は、培地 1 ml 当り 1 mg 当量の滲出液の添加で認められ、100 mg 当量まで検討したが活性が低下することはなかった。さらに BA 無添加の培地においても MZ 数の著しい増加がみられ、滲出液中に不定芽分化誘導物質が存在することが示された。これらの場合にも誘導活性は、培地 1 ml 当り 1 mg 当量の滲出液の添加で認められた。傷害を与えていない茎の滲出液には全く促進及び誘導活性は存在しなかった。

上記の実験では、滲出液はフィルター滅菌して培地に添加した。この滲出液中の活性の熱安定性について検討するために、フィルター滅菌した場合とオートクレーブ滅菌した場合とで、活性に変化があるか否かについて検討した。Table 1 に示したように、この活性はオートクレーブ滅菌によって失われず、この活性物質が熱に安定であることが明らかとなった。

2. 不定芽分化誘導活性の分画

以上の結果から、傷害茎滲出液には不定芽分化誘導活性が存在することが明らかになったので、この活性物質を単離・同定するために、各種の分画を行うこととした。検定に際しては、滲出液中に誘導活性を有する物質以外に阻害活性を持つ物質も存在する可能性があるために、それらを明確に区分するため、BA を加えた培地に各画分を添加し、結果は各画分無添加の場合に形成された MZ 数を 100% とした相対表示で示すこととした。

最初に有機溶媒による分配を行った。滲出液にクロロホルムを添加して分配し、その水層を酸性にしてから酢酸エチルで分配した。クロロホルム層、酢酸エチル層、水層の三つの画分の活性をみると、活性は明らかに最終的に得られた水層に存在した (Fig. 2)。

次にこの水層をイオン交換樹脂によって分画した。水層を中性にした後に、まず陽イオン交換樹脂カラムに吸着させた後に蒸留水で洗浄した。これをアンモニウム水溶液で溶出し、濃縮・乾固してアンモニウムを除去した後少量の蒸留水に溶解し、AG50 画分とした。陽イオン交換樹

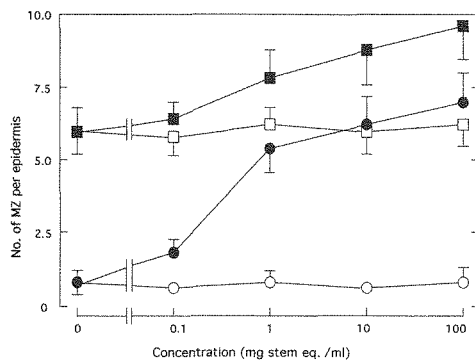


Fig. 1 Effects of exudate from wounded stem on adventitious bud initiation in *Torenia* stem segments.

The explants were cultured on the medium with (□, ■) or without (○, ●) 0.5 μM of BA and various concentrations of exudate from wounded (■, ●) or non-wounded stem (□, ○). After 1 week of culture, the epidermis was stripped off from the segments, and number of MZ was counted. More than 240 epidermis was counted at each treatment, and the experiments were repeated 3 times.

Table 1 Effect of sterilization method on adventitious bud-inducing activity of the exudate from wounded stem.

Exudate	No. of MZ per epidermis	
	+BA	-BA
No addition	5.6 ± 0.49	0.8 ± 0.24
Filter-sterilized ^a	6.8 ± 0.62	6.0 ± 0.62
Autoclaving ^b	8.0 ± 0.84	6.8 ± 0.26

The explants were cultured on the MS medium with or without 0.5 μM of BA. After 1 week of culture, the epidermis was stripped off from the segments, and number of MZ was counted. More than 240 epidermis was counted at each treatment, and the experiments were repeated 3 times.

^a The exudate was filter-sterilized and added to the medium.

^b The exudate was added to the medium before autoclaving.

The 1 mg stem equivalent of the exudate was applied to the 1 ml medium.

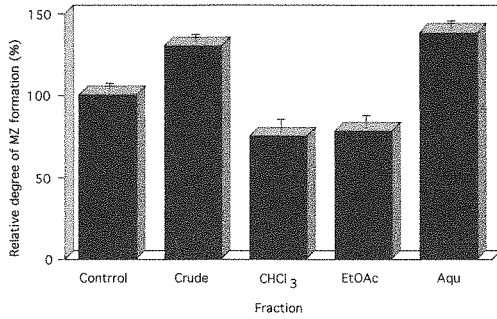


Fig. 2 Adventitious bud-inducing activities of fractions of the exudate separated by solvent participation.

The exudate was firstly fractionated by CHCl_3 , and then ethyl acetate (EtOAc). The adventitious bud-inducing activities of fractions such as CHCl_3 , EtOAc and final aqueous (Aqu) phases were examined. The 1 mg stem equivalent of the fraction was applied to the 1 ml medium with $0.5\mu\text{M}$ of BA. After 1 week of culture, the epidermis was stripped off from the segments, and number of MZ was counted. More than 240 epidermis was counted at each treatment, and the experiments were repeated 3 times. The results were expressed as relative degree of MZ formation against no exudate addition (control).

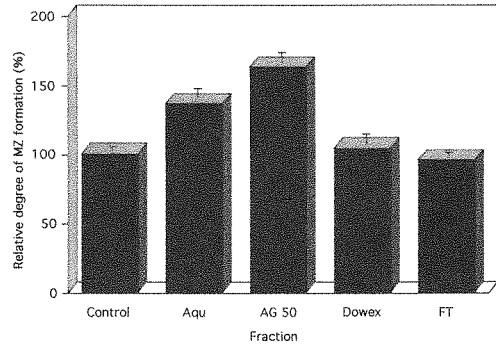


Fig. 3 Adventitious bud-inducing activities of fractions of the exudate separated by ion exchange chromatography.

The aqueous phase from solvent participation was further fractionated into three fractions by ion exchange chromatography (AG 50; eluted with NH_4OH from AG 50, Dowex; eluted with NH_4HCO_3 from Dowex, FT; flow through). The 1 mg stem equivalent of the fraction was applied to the 1 ml medium with $0.5\mu\text{M}$ of BA. After 1 week of culture, the epidermis was stripped off from the segments, and number of MZ was counted. More than 240 epidermis was counted at each treatment, and the experiments were repeated 3 times. The results were expressed as relative degree of MZ formation against no exudate addition (control).

脂を洗浄した蒸留水（陽イオン交換樹脂に吸着しなかった画分）は、さらに陰イオン交換樹脂カラムに吸着させた後に蒸留水で洗浄した。これを重碳酸アンモニウム溶液で溶出し、濃縮・乾固して重碳酸アンモニウムを除去した後少量の蒸留水に溶解し、Dowex 画分とした。この洗浄液は両イオン交換樹脂に吸着しなかった画分であるが、濃縮し、FT 画分とした。これら三つの画分の活性を調べた結果、活性は AG50画分に局在した (Fig. 3)。すなわち、活性物質は塩基性物質であることが示唆された。

次にこの AG50画分を分画分子量 1 万の透析膜を用いて透析し、透析内液画分と透析外液画分とに分画した。両画分の活性を調べた結果を Fig. 4 に示したが、活性は明らかに透析内液画分に存在し、この活性物質が分子量 1 万以上の高分子物質であることが判明した。

これまでの分画作業によって活性物質がどの程度精製されているのかを知るために、分画前の粗滲出液と透析において活性の存在した透析内液画分を用いて、活性—濃度相関について調べてみた。その結果を Fig. 5 に示したが、同じ数の MZ を誘導する濃度は透析内液ではほぼ 1/10 になっており、約 10 倍に精製されたものとみられる。

植物細胞に存在する高分子物質の代表的なものには、蛋白質、多糖類、DNA、RNA 等の核酸がある。本活性物質がそれらの高分子物質のいずれかである可能性が考えられたので、透析内液画分を、蛋白質に関しては proteinase K、多糖類については pectinase, hemicellulase 及び cellulase の混液、DNA については DNase、RNA については RNase で処理し、再度分画分子量 1 万の透析膜を用いて透析した。Fig. 6 にその結果を示したが、proteinase K, pectinase 等の混液あるいは DNase で処理した場合には活性は透析内液に残留したのに対して、RNase

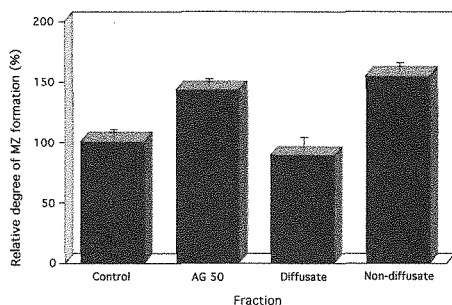


Fig. 4 Effect of dialysis on the adventitious bud-inducing activity of the exudate from wounded stem.

The AG 50 fraction was dialyzed (molecular weight cut off is 10,000) against distilled water, and adventitious bud-inducing activities of both diffusate and non-diffusate fractions were examined. The 1 mg stem equivalent of the fraction was applied to the 1 ml medium with $0.5\mu\text{M}$ of BA. After 1 week of culture, the epidermis was stripped off from the segments, and number of MZ was counted. More than 240 epidermis was counted at each treatment, and the experiments were repeated 3 times. The results were expressed as relative degree of MZ formation against no exudate addition (control).

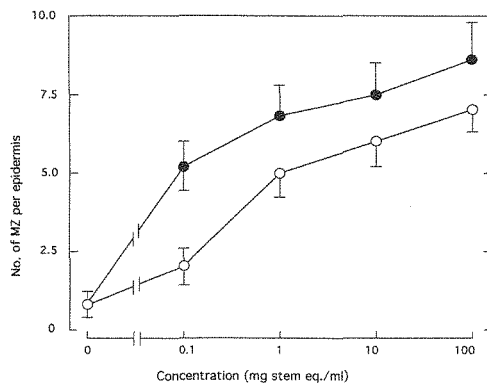


Fig. 5 Correlation between adventitious bud-inducing activity and concentration of the exudate from wounded stem.

Various concentrations of crude exudate (○) or non-diffusate fraction of dialysis (●) was added to the medium with $0.5\mu\text{M}$ of BA. After 1 week of culture, the epidermis was stripped off from the segments, and number of MZ was counted. More than 240 epidermis was counted at each treatment, and the experiments were repeated 3 times.

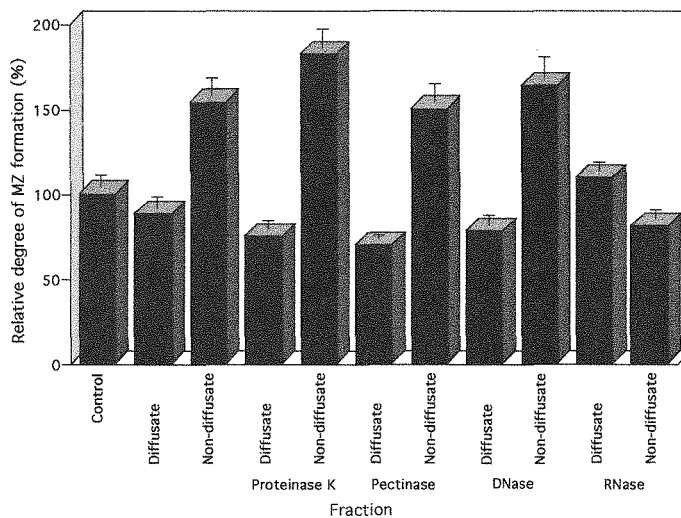


Fig. 6 Effect of enzyme treatment and subsequent dialysis on adventitious bud-inducing activity.

The non-diffusate fraction was treated with proteinase K, mixture of pectinase, hemicellulase and cellulase, DNase, or RNase, then re-dialyzed (molecular weight cut off is 10,000) against distilled water, and adventitious bud-inducing activities of each diffusate and non-diffusate fractions were examined. The 1 mg stem equivalent of the fraction was applied to the 1 ml medium with $0.5\mu\text{M}$ of BA. After 1 week of culture, the epidermis was stripped off from the segments, and number of MZ was counted. More than 240 epidermis was counted at each treatment, and the experiments were repeated 3 times. The results were expressed as relative degree of MZ formation against no exudate addition (control).

で処理した場合、透析内液の活性は完全に消失した。また透析外液については、わずかに活性が認められる程度に減少した。

考 察

すでに報告してきたように、トレンニアの茎切片からの不定芽分化は付加的に与えた傷害によって促進¹⁾あるいは誘導²⁾される。従って傷害は何らかの“trigger”物質を生成することで不定芽分化に作用しているものと思われる。さらに、傷害及び傷害誘導不定芽分化と既知の各種物質との間には明確な相関関係は存在しなかった²⁾。一方、低分子物質である各種のフェノール化合物にも不定芽分化誘導活性が存在し、また傷害茎滲出液中にもフェノール化合物が存在することも明らかにした⁴⁾。しかしながら、滲出液中の含量と有効作用濃度がかなり異なるので、フェノール化合物が“trigger”であるとは断定できなかった⁴⁾。

本報告で明らかにしたように、傷害茎滲出液には不定芽分化に対する誘導活性が存在した (Fig. 1)。この活性物質は熱に安定であり (Table 1)、有機溶媒による分配で水相に活性が局在することから、極性の高い物質であることが示された (Fig. 2)。イオン交換樹脂による分画の結果から、活性物質は塩基性物質であることが示唆され (Fig. 3)、さらに透析の結果からは分子量1万以上の高分子物質であること (Fig. 4) も明らかとなった。これらの分画・精製の結果不定芽誘導活性はほぼ10倍に向上した (Fig. 5)。今後さらに精製を進めてこの活性物質の実体を明らかにしていく予定である。

現在のところ、この活性物質は分子量1万以上の高分子物質であることが判明している (Fig. 4)。植物において生理活性を示す物質は植物ホルモンのように分子量300以下の低分子物質である。近年、cyclic AMP⁷⁾や spermidine⁸⁾等が植物においても生理活性を示すことが報告されている。しかしながらこれらの物質も低分子物質である。一方で、植物においても高分子物質が生理作用を示す例も少数ながら報告されている。例えばウキクサから抽出された花成誘導物質は、分子量2万以上の物質であり、proteinase K 処理によって低分子化する⁹⁾。その本体は polypeptide であるらしい¹⁰⁾。また海洋ラン藻由来の不定胚分化促進物質も報告されており、これは蛋白質あるいは糖蛋白質であるようだ^{11,12,13)}。さらに細胞培養の際に分裂を促進するいわゆる conditioning factor が最近単離・同定されたがこれも peptide であった¹⁴⁾。以上のように、植物において生理活性を示す高分子物質はいずれも蛋白質あるいは蛋白性物質である。

傷害茎滲出液中の不定芽誘導物質は、proteinase K, pectinase 等の多糖類分解酵素あるいは DNase で処理した場合に低分子化せず、RNase で処理した場合にはほとんど活性が消失した (Fig. 6)。この結果のみからは、この活性物質が RNA であり、さらに高分子量の RNA 本体が活性を有するという可能性が考えられる。しかしながら、RNA は酸性物質であり、陽イオン交換樹脂である AG50 に吸着する (Fig. 3) ことはない。従って、RNA あるいは oligo ribonucleotide が非常に強い塩基性の蛋白質のような高分子物質と複合体を形成していることが考えられる。さらにある程度分子量の大きい RNA あるいは oligo ribonucleotide の部分が、活性を有しているのではないかと考えられる。

植物において RNA が生理活性を持つという報告については以下のものがある。ダイズの根粒形成期に発現する遺伝子である *enod 40* に ORF が組めず^{15,16)}、この遺伝子は翻訳されずに RNA のままで機能するのではないかと¹⁷⁾とされてきた。しかし、昨年この *enod 40* から短い peptide が翻訳されこれが生理活性を持つという報告がだされ¹⁸⁾、この機能性 RNA 分子という魅力的な仮説も否定された。

一方で、動物においては ORF が組めず RNA レベルで分化・増殖を制御する遺伝子が単離され、*riboregulator* という名称が与えられている¹⁹⁾。我々が見出した傷害茎滲出液中の高分子物質もこの *riboregulator* に類似する物質である可能性がある。そこで、現在、最終的に精製された透析内液画分を用いて、RT-PCR を行い、この RNA 分子を DNA に置き換えて解析すべく検討を加えている。

摘 要

トレンニアの傷害茎滲出液中の不定芽分化に対する促進・誘導活性について調べた。滲出液を培地に添加すると、不定芽分化を誘導することができた。この活性は熱に安定であり、有機溶媒による分配で水相に活性が局在した。イオン交換樹脂による分画の結果から、活性物質は塩基性物質であることが示唆され、さらに透析の結果からは分子量 1 万以上の高分子物質であることが判明した。この透析内液を *proteinase K*, *pectinase* 等の多糖類分解酵素あるいは *DNase* で処理した場合に低分子化せず、*RNase* で処理した場合にはほとんど活性が消失した。この結果のみからは、この活性物質が RNA であり、さらに高分子量の RNA 本体が活性を有するという可能性が考えられる。しかしながら、RNA は酸性物質であり、陽イオン交換樹脂に吸着することはない。従って、RNA あるいは *oligo ribonucleotide* が非常に強い塩基性の蛋白質のような高分子物質と複合体を形成していることが考えられる。さらにある程度分子量の大きい RNA あるいは *oligo ribonucleotide* の部分が、活性を有しているのではないかと考えられる。従ってこの活性物質は RNA であり、さらに高分子量の RNA 本体が活性を有するという可能性が示唆された。

引用文献

1. Takeuchi, N., Tanimoto, S. and H. Harada (1985). Effects of wounding on adventitious bud formation in *Torenia* stem segments cultured in vitro. *J. Exp. Bot.* **36**, 841-847.
2. 重田千晶・谷本静史 (1997). トレンニア茎切片における傷害誘導不定芽分化に関する研究 I 不定芽分化制御物質の挙動. 佐賀大農彙 **82**, 53-63.
3. Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M. and P. Zambryski (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **318**, 624-629.
4. 下村尚生・重田千晶・谷本静史 (1997). トレンニア茎切片における傷害誘導不定芽分化に関する研究 II 低分子不定芽誘導物質. 佐賀大農彙 **82**, 65-71.
5. Tanimoto, S. and H. Harada (1982). Studies on the initial process of adventitious bud differentiation in *Torenia* stem segments cultured in vitro. I. Effects of cytokinin. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **177**, 222-228.
6. Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
7. Ishioka, N. and S. Tanimoto (1990). Involvement of cyclic AMP in adventitious bud initiation of *Torenia* stem segments. *Plant Cell Physiol.* **31**, 91-97.
8. Tanimoto, S., Matsubara, Y. and N. Ishioka (1994). Significance of spermidine in the initiation of adventitious buds in stem segments of *Torenia*. *Plant Cell Physiol.* **35**, 1071-1077.
9. Takeba, G., Nakajima, Y., Kozaki, A., Tanaka, O. and Z. Kasai (1990). A flower-inducing substance of high molecular weight from higher plants. *Plant Physiol.* **94**, 1677-1681.
10. Kozaki, A., Takeba, G. and O. Tanaka (1991). A polypeptide that induces flowering in *Lemna*

- paucicostata* at a very low concentration. *Plant Physiol.* **95**, 1288-1290.
11. Wake, H., Umetsu, H., Ozeki, Y., Shimomura, K. and T. Matsunaga (1991). Extracts of marine cyanobacteria stimulated somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Plant Cell Rep.* **9**, 655-658.
 12. Wake, H., Akasaka, A., Umetsu, H., Ozeki, Y., Shimomura, K. and T. Matsunaga (1992). Enhanced germination of artificial seeds by marine cyanobacterial extract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 684-688.
 13. Wake, H., Akasaka, A., Umetsu, H., Ozeki, Y., Shimomura, K. and T. Matsunaga (1992). Promotion of plantlet formation from somatic embryos of carrot treated with a high molecular weight extract from a marine cyanobacterium. *Plant Cell Rep.* **11**, 62-65.
 14. Matsubayashi, Y. and Y. Sakagami (1996). Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7623-7627.
 15. Kouchi, H. and S. Hata (1993). Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol. Gen. Genet.* **238**, 106-119.
 16. Yang, W.-C., Katinakis, P., Hendriks, P., Smolders, A., de Vries, F., Spee, J., van Kammen, A., Bisseling, T. and H. Franssen (1993). Characterization of *GmENOD40*, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. *Plant J.* **3**, 573-585.
 17. Crespi, M. D., Jurkevitch, E., Poirer, M., d'Aubenton-Carafa, Y., Petrovics, G., Kondorosi, E. and A. Kondorosi (1994). *enod40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J.* **13**, 5099-5112.
 18. van de Sande, K., Pawlowski, K., Czaja, I., Wieneke, U., Schell, J., Schmidt, J., Walden, R., Matvienko, M., Wellink, J., van Kammen, A., Franssen, H. and T. Bisseling (1996). Modification of phytohormone response by a peptide encoded by *ENOD40* of legumes and a nonlegume. *Science* **273**, 370-373.
 19. Rastinejad, F. and H. M. Blau (1993). Genetic complementation reveals a novel regulatory roles for 3' untranslated regions in growth and differentiation. *Cell* **72**, 903-917.