

シロイヌナズナの切断花茎におけるオーキシンの作用

山崎 達也 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 佐藤 忍 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

植物は様々なストレスにさらされており、それらのストレスの一つに傷害がある。茎は植物の重要な部位の一つであり、植物体の構造の維持や栄養の輸送、情報の伝達の役割をもっている。この茎に損傷が起こったとき、植物は7日間かけて損傷を修復する。この現象を組織癒合と呼ぶ。先行研究ではシロイヌナズナの切断花茎における組織癒合の過程が観察されている(Asahina *et al.*, 2011)。初めに切断後1~3日で髓の細胞が変形し始め、その後細胞分裂が促進され7日で切断部位の修復が完了する。また、組織癒合の早い段階では活性酸素(ROS)や植物ホルモンであるエチレンやジャスモン酸の合成が促進される。これらの物質が相互作用することによって癒合に関連している転写因子や遺伝子の発現が促進される。

加えて、Asahina *et al.*, 2011 と Pitaksaringkarn *et al.*, 2014 ではシロイヌナズナの頂芽切除個体やオーキシン極性輸送体 PIN1 の欠損変異体 *pin1-1 mutant* やオーキシン応答性転写因子の ARF6 と ARF8 の二重欠損変異体 *arf6/8 mutant* において組織癒合が起こらないことが観察され、組織癒合にオーキシンが関与していることが示唆された。しかしながら、組織癒合におけるオーキシンの作用の詳細は分かっていない。そこで本研究はシロイヌナズナの切断花茎におけるオーキシンの作用の解明を目的とした。

【材料】

モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた。

Wild type (WT)、*pin1-1 mutant* を直接人工土に播種、あるいは種子を低温処理した後に 1/2MS 培地に播種させてから人工土に植え替えて生育させた。

【方法】

①頂芽の切除

抽苔してから7~10日後に花茎の第一節間以上を、マイクロサージェリーナイフを用いて切除し、切断面に 10^{-3} M IAA あるいは D.W. を混合させたラノリンを塗布し、切除から12時間後に切り口から約3 cm 下の茎を直径の半分まで切断した。また、茎頂切除から半切断までの時間でタイムコースをとる際は、切断面には D.W. を混合させたラノリンのみを塗布し、切除後の時間を 0h、3h、6h、12h に変更して行った。

②頂芽切除個体 (+IAA+D.W.)、*pin1-1 mutant* の DAB 染色による切断部位の ROS 生産の観察

抽苔してから7~10日後に花茎の第一節間を直径の半分までマイクロサージェリーナイフを用いて切断した。切断から3時間後にサンプリングを行い、3,3'-ジアミノベンジジンを含む染色液でサンプルを染色し、脱色した後に染色の度合いを観察した。

【結果・考察】

1. 頂芽切除個体における ROS の生産

DAB 染色を行った結果、頂芽切除個体(+D.W.)の切断部位では非切除個体と比較して維管束における ROS の生産量が減少し、切断面に IAA を塗布した場合 ROS の生産は一部回復した。また、タイムコース実験では 0-6h においては非切除個体と同様な ROS の生産であることが観察され、6-12h では維管束での ROS の生産が減少した。これらのことから切断部位の維管束における ROS の生産にオーキシンが間接的に関わっていることが示唆された。

2. *pin1-1 mutant* における ROS の生産

DAB 染色を行った結果、*pin1-1 mutant* の切断部位における ROS の生産は WT と同様の結果となった。このことから、切断部位の維管束における ROS の生産に PIN1 によるオーキシンの極性輸送が直接的には関わっていないことが示唆された。

【今後の予定】

1. DAB 染色による *arf6/8 mutant* の切断部位の ROS 生産の観察2. 頂芽切除個体、*pin1-1 mutant*、*arf6/8 mutant* における傷害ホルモン生成遺伝子・癒合関連遺伝子の発現量の調査3. 頂芽切除個体、*pin1-1 mutant*、*arf6/8 mutant* における切断部位の形態学的観察

【参考文献】

- ・ M.Asahina, K.Azuma, W.Pitaksaringkarn, T.Yamazaki, N.Mitsuda, M.Ohme-Takagi, S.Yamaguchi, Y.Kamiya, K.Okada, T.Nishimura, T.Koshiba, T.Yokota, H.Kamada, and S.Satoh, Spatially selective hormonal control of RAP2.6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in *Arabidopsis*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108:16128-16132(2011)
- ・ W.Pitaksaringkarn, S.Ishiguro, M.Asahina, S.Satoh, ARF6 and ARF8 contribute to tissue reunion in incised *Arabidopsis* inflorescence stems, Plant Biotechnology 31:49-53(2014)