

塩ストレス条件下のトマト成熟果実における維管束構築の変化

小坂 友紀 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 岩井 宏暁 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

植物は動物と異なり移動ができないため、多くの環境ストレスに適応しながら生活している。その中でも塩ストレスは、浸透圧ストレスとイオン毒性を引き起こすことで植物の生育や代謝に支障をきたす。トマト果実においては、果実サイズや数の減少、果実硬度の増加といった生育・代謝阻害がおこる。一方で、グルコースやフルクトース等の糖類や、プロリン、GABA等のアミノ酸の蓄積が起き、商品価値の高いトマト果実がつくられることも知られている。また、果実は水分を多く含む複雑な組織を有する器官であり、成熟に伴って軟化するという性質を持つ。

これまでに本研究室では、塩ストレス条件下のトマト成熟果実において、外果皮では硬度増加、中内果皮では硬度減少と内部組織の液状化が起り、組織ごとに異なった性質の細胞壁を再構成していることを明らかにした。一方で、中果皮の内部を通る維管束が、塩ストレス条件下で構造変化するのかわかりについてはほとんど分かっていなかった。しかし、X線CTスキャンを用いた解析から、塩ストレス条件下のRed ripe果実において維管束数が増加していることや、道管特有に存在するリグニンの合成酵素遺伝子PAL5が発現増加することが分かり、維管束構造の強化が示唆された。しかしこれまでの研究では、果実成熟ステージのうちMature greenとRed ripeの比較しか行われておらず、それらの間のステージであるBreakerやTurningの果実の維管束の状態については不明であった。そこで本研究では、果実成熟・軟化過程で、維管束の発達がどのように起こるのかを明らかにすることを目的に、より詳細に維管束の解析を行った。

【材料・方法】

1. トマトの水耕栽培・塩ストレス処理

トマト (*Solanum lycopersicum* cv. "Micro Tom") を Yin *et al.*, 2010 の方法を用いて、24°Cのインキュベーター内で水耕栽培した。水で濡らした濾紙に滅菌した種子を播種し、子葉が出た後ロックウールに植え替えた。塩ストレス処理は花が咲き始めた時点から開始し、NaCl濃度を徐々に上昇させることで馴化させ、最終的に150 mMになるように調整した。NaCl濃度の調節は電気伝導率測定器を用いて行った。

2. サンプルング

トマト果実の成熟ステージのうち、緑色のMature green、黄色のBreaker、オレンジ色のTurning、赤色のRed ripeの4ステージ別にサンプルングした。

3. マイクロ波を用いた解析

果径と果高を計測し、果径×果高で果実サイズを算出した。Cieslak *et al.*, 2016の方法を参考に、トマト果実を水中に入れ低電力のマイクロ波を照射し、果皮、子室組織、種子を除去し、維管束を取り出した。Mature green果実については、マイクロ波を

照射して外果皮を除去した後、50 mMのNa₂CO₃水溶液中に3日以上つけて水中に移し、中内果皮、子室組織、種子を除去した。

果実が最も太かったと思われる部分を縦に通過する維管束の数を数えた。1個体につき5回計測し、その平均値をその個体の維管束数とした。

4. 維管束関連遺伝子の発現解析

コントロール、塩ストレス条件のトマト果実について、果実組織のうち、中内果皮を用いて実験した。篩管分化のマスター制御因子であるAPLについて、RT-PCRにより発現解析を行った。

【結果・考察】

マイクロ波を用いた方法により、各条件、各成熟ステージのトマト果実10個体以上の維管束数を計測することができた。解析の結果、条件や成熟段階に関わらず果実サイズが上昇すると、維管束数も増加する傾向が見られた。維管束数/(果径×果高)で表される果実サイズあたりの維管束数について見てみると、コントロール条件では、Mature greenステージからTurningステージにかけて増加し、その後Red ripeステージで減少していた。塩ストレス条件では、成熟ステージごとの差はほぼ見られなかった。同じ成熟ステージ同士で比較すると、塩ストレス条件の果実では、コントロールと比較してMature greenステージにおいて約21%、Breakerステージにおいて約17%、Turningステージにおいて約8%、Red ripeステージにおいて約26%果実サイズあたりの維管束数が増加していた。

篩管分化のマスター制御因子であるAPLの発現解析では、コントロール、塩ストレスのどちらの条件でも、成熟とともに発現が減少していく傾向が見られた。また、各成熟ステージとも塩ストレス条件で発現が強くなっていた。このことから、塩ストレス条件では、篩管分化が促進されていることが示唆された。PAL5も発現増加していたことから、塩ストレス条件では維管束形成が促進されていると考えられる。

以上の結果から、塩ストレス条件下のトマト果実では、コントロール条件より維管束数が増加していると考えられる。維管束発達のタイミングについては、サイズあたりの維管束数がMature greenステージの時点で有意にコントロールより多いことから、果実成熟・軟化過程より前の果実形成過程において、すでに維管束が発達している可能性があると考えている。

【今後の展望】

今回のマイクロ波を用いた方法では、全ての維管束を取り出せていない可能性があるため、茎から色素を吸収させて果実断面を観察する方法や、凍結切片にしてリグニンの蛍光を観察する方法での解析を予定している。また、APL以外の維管束関連遺伝子についても発現解析を行い、さらに詳しく維管束構造を調査していく予定である。