

単為結実性トマト品種 ‘ルネッサンス’ の果実発達における内生植物ホルモン (ABA、CKs および IAA) の変化

坂井 優・太田祐樹・知野秀次・児島清秀*

(平成23年1月25日受付)

要 約

トマトの単為結実果の発達におけるアブシジン酸 (ABA)、サイトカイニン類 (iP、iPR、Z および ZR) およびインドール酢酸 (IAA) の変化を高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) を使用し分析した。果実は直径 3 cm、6 cm および赤く成熟した時期にサンプリングし、果皮と内部もしくは果皮、隔壁、ゼリー部および胎座に分けた。IAA、iPR および ZR の濃度は幼果 (3 cm の果実) で高かったが、ABA、Z および iPR は成熟期で高かった。全ての発達段階において、内部組織の IAA 濃度が果皮より高かった。特に、胎座の IAA 濃度は果実組織の中で最も高かった。IAA と同様に、胎座の ABA 濃度は果実の他の組織よりも高かった。サイトカイニン類において、Z 濃度は胎座で高かったが、iPR および ZR 濃度は果皮で高かった。iP 濃度は発達段階に応じて変化した。従って、単為結実性のトマトにおける幼果の細胞分裂は IAA によって促進されることが示唆された。さらに、これらの結果は IAA、ABA および Z の生合成部位は胎座、ならびに iPR および ZR の生合成部位は果皮であることを示唆する。

新大農研報, 63(2):109-114, 2011

キーワード: トマト, 単為結実性, 果実発達, 植物ホルモン, LC/MS

諸 言

トマトの施設栽培では、着果を安定させるためにセイヨウマルハナバチによる授粉 (池田・忠内, 1992; 小出・林, 1993) や合成ホルモン剤の散布 (Ho and Hewitt, 1986) が行われている。しかし、高温期や低温期の授粉処理は着果が不安定であり、セイヨウマルハナバチの使用期間が制約される。また、ホルモン処理は同じ姿勢での長時間作業による労働負担が大きく、空洞化による商品価値の低下が問題となっている。そのような背景をふまえ、一部の生産現場では単為結実性を有する品種の利用が進められている。例えば、強い単為結実性を持つキュウリ (斉藤, 1995) のように、単為結実性を有する品種が普及すれば、授粉処理や合成ホルモン剤処理が不要となり、生産性の高い栽培が可能となる (大川ら, 2006)。

この単為結実性には植物ホルモンが深く関わっていることが知られている (Fos ら, 2000, 2001)。トマトの単為結実に関与する遺伝子には *pat*、*pat-2*、および *pat-3/pat-4* があり、それらの遺伝子により子房内の内生ホルモンレベルが変化することで未授粉もしくは未受精でも果実の発達が促進される (Geotge ら, 1984)。例えば、*pat* 遺伝子を持つ系統の果実では、開花期のオーキシン様物質の内生レベルが通常の 3 倍、成長初期 (約 8 日間) のジベレリン様物質は 4 倍のレベルを示す一方、サイトカイニン様物質は通常の 1/20 のレベルで推移することが Mapelli ら (1978, 1981) によって報告されている。このように、開花から果実の初期ステージにおける遺伝子発現や内生植物ホルモンの研究は行われているが、その後の発達から成熟における植物ホルモンの消長は明確になっていない。また、一般的な果実における植物ホルモンの生合成は種子で行われているが、単為結実果は種子が存在しないため、それらの生合成部

位は特定されていない。植物の生理作用はいくつかのホルモンの相互作用によって調節されているため、同一の果実から複数のホルモンを同時に分析する必要がある。

植物ホルモンの分析法 (定量) は生物検定法、免疫検定法および機器分析法の 3 つに大別することができ、現在ではガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) や高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) を利用した機器分析法が望ましいとされている。GC-MS による植物ホルモンの分析事例は多く報告されているが、サンプルの前処理の工程が多く、迅速なホルモン分析が困難である。それに対して、LC-MS はサンプルの前処理が少なく、より効率的な分析が可能である。しかし、LC-MS による植物ホルモンの分析事例はほとんどなく、一種もしくは二種のホルモンを分析した報告があるのみで、同一のサンプルから数種類の植物ホルモンの分析に成功した研究はほとんどない。今後、LC-MS を活用した効率的な植物ホルモンの分析を行うには、複数の植物ホルモンの同時分析条件を明らかにし、実際に植物体のホルモンの定量事例を示す必要がある。

本研究は、単為結実性の植物の果実発達と植物ホルモンとの関係および生合成部位の特定を目的として、単為結実性トマト品種 ‘ルネッサンス’ の果実における様々な発達ステージ (細胞分裂期、細胞拡大期および成熟期) の植物ホルモン (ABA、CKs (iP、iPR、Z および ZR) および IAA) を LC-MS で定量した。

材料および方法

植物材料には遺伝的に強い単為結実性を示す系統のトマト品種 ‘ルネッサンス’ (サカタのタネ, 横浜) を使用し、新潟大学五十嵐圃場の無加温ハウスで栽培した。腋芽はすべて除去し、

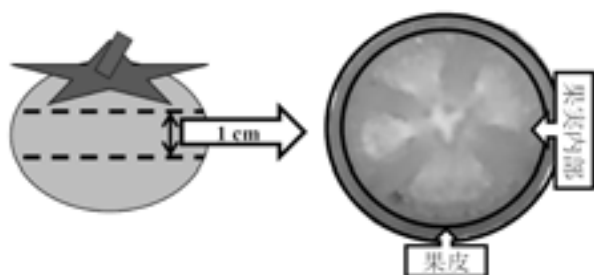


図 1. 細胞分裂期の果実のサンプリング方法

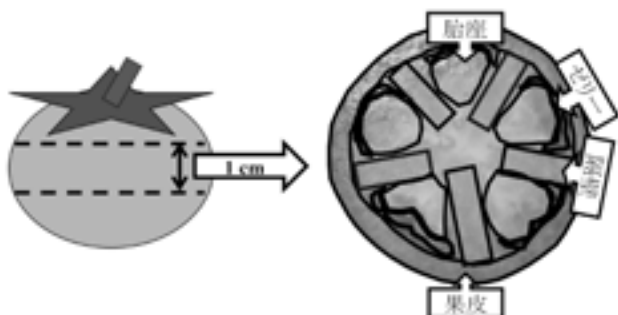


図 2. 細胞拡大期および成熟期の果実のサンプリング方法

主茎 1 本仕立てにした。果実の大きさを均一にするために、肥大させる果実を 1 花房当たり 3 果とした。果実を確実に単為結実させるために、葯（開花前 2～3 日）をピンセットで除去し、他からの授粉を防ぐために紙袋で花蕾を覆った。

直径が 3 cm に達した果実、直径 6 cm に達した果実、赤熟した果実をそれぞれ、細胞分裂期および細胞拡大期、成熟期の果実と定義し、発達ステージ毎に 3 果ずつ採取した。採取した果実の赤道面から 1 cm の範囲をディスク状に切り出し、3 cm の果実は図 1 のように果皮およびその他内部に、6 cm および赤熟した果実は図 2 のように果皮、隔壁、ゼリー部および胎座部に分けた。2 g の各部位のサンプルは液体窒素で凍結させ、ホルモンの抽出・精製まで -30°C の冷凍庫で保存した。

分析する植物ホルモンは、アブシシン酸類として活性があるアブシシン酸 (ABA)、オーキシン類として活性があるインドール-3-酢酸 (IAA) およびサイトカイニン類として活性があるトランス-ゼアチン (t-Z、以後 Z と示す) およびイソペンテニルアデニン (iP)、これらの前駆物質であるゼアチンリボシド (ZR) およびイソペンテニルアデノシン (iPR) とした。抽出および精製は Kojima (2003) の方法を改変して行った。冷凍保存したサンプルには 5 mL の 100% MeOH を加えた後、内部標準として $^2\text{H}_6$ -ABA、 $^{13}\text{C}_6$ -IAA、 $^2\text{H}_6$ -iP、 $^2\text{H}_6$ -iPR、 $^2\text{H}_5$ -Z および $^2\text{H}_5$ -ZR をそれぞれ 300 pmol ずつ加え、ホモジナイザーで磨砕し、磨砕液を 12 時間以上冷凍庫内で保存した。サンプルを遠心分離後、上澄みを回収し、0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過後、遠心濃縮器で MeOH を除去した。溶液に適量の蒸留水を加え、pH 3.0 に調整した。溶液を同量のヘキサンの 2 回分配し、ヘキサン層を除去した。その後、水層を酢酸エチルで 3 回分配し、酢酸エチル層を回収した。残った水層を pH 8.0 に再調整後、同量のブタノールで 2 回分配し、ブタノール層を回収した。得られた有機溶媒層を遠心濃縮し、各残渣を 100% MeOH で再溶解し、混合サンプルを作成した。

混合サンプルは LC-MS (LCMS2010EV; SHIMADZU) で分析した。イオン化法には、大気圧化学イオン化法 (APCI) を用いた。分析モードは選択イオンモニタリング法 (SIM 法) によって、表 1 に示されるように各植物ホルモンの正イオンおよび負イオンを表 2 の条件で分析した。検出器電圧は 1.5 kV、インターフェイス電圧は (+) 4.5 kV および (-) 3.0 kV、CDL 電圧は 0 kV、Q-array 電圧は DC 0V、RF 140 kV で固定した。また、HPLC の条件は表 3 に示した。各内生ホルモン濃度はプリカーサーイオンおよびプロダクトイオンのピークエリアを用いて算出した。

結 果

果実の各発達ステージにおける各部位の内生 IAA 濃度を図 3A に示した。各部位の内生 IAA 濃度は細胞分裂期から細胞拡大期にかけて低下した。内生 IAA 濃度はいずれの発達ステージにおいても果皮より内部 (特に胎座部) で高い傾向を示した。

内生 ABA 濃度を図 3B に示した。内生 ABA 濃度は細胞分裂期から細胞拡大期にかけて低下し、細胞拡大期から成熟期にかけて増加し、ピークに達した。IAA と同様に、内生 ABA 濃度はいずれの発達ステージにおいても果皮より内部 (特に胎座部) で高い傾向を示した。

内生 Z 濃度を図 3C に示した。内生 Z 濃度は果実の発達とともに増加し、成熟期においても高いレベルを維持していた。IAA および ABA と同様に、内生 Z 濃度もいずれのステージにおいても果皮より内部 (特に胎座部) で高い傾向を示した。

内生 ZR 濃度を図 3D に示した。果皮の内生 ZR 濃度は細胞分裂期で最も高く、果実の発達とともに低下した。部位別の濃度は全てのステージにおいて果皮が最も高かった。

内生 iP 濃度を図 3E に示した。果皮の内生 iP 濃度は果実の発達とともに増加し、成熟期でピークに達した。部位別の濃度は細胞分裂期および細胞拡大期では果実内部で高く、成熟期では果皮が高かった。

内生 iPR 濃度を図 3F に示した。果皮の内生 iPR 濃度は細胞分裂期で最も高く、果実の発達とともに低下した。部位別の濃度は内生 iP 濃度とは逆に、細胞分裂期および細胞拡大期で果皮が最も高く、成熟期では内部が高かった。

考 察

本試験において、内生 IAA 濃度は果実の肥大とともに低下した (図 3A)。このことは、単為結実果における、開花期に高い内生 IAA 濃度を示し、果実肥大中期にかけて低下した Mapelli ら (1978) の報告と一致する。この一致は、IAA が単為結実果の初期発達に最も重要な役割を果たしていることを示唆する。また、内生 IAA 濃度は果皮よりも内部 (特に胎座部) で高い傾向を示した。このことから、単為結果性のトマト果実における IAA の生合成部位は胎座部であることが推定された。

内生 ABA 濃度は細胞分裂期から細胞拡大期にかけて低下し、成熟期に再び増加した (図 3B)。この結果は、ABA は細胞拡大期よりも細胞分裂期や成熟期により重要な役割があることを示唆している。また生合成部位は、内生 ABA 濃度が果皮よりも内部 (特に胎座部) で最も高い値を示したことから、IAA と同様に胎座部であることが考えられる。しかしながら、本試験の結果は、有種子果の内生 ABA 濃度が種子および果皮の両方で授粉後 30～50 日後まで上昇することや、そのピーク

表1. 各植物ホルモンおよび各内部標準のLC/MSの正イオンおよび負イオン分析におけるイオン生成

分子	分子量	正イオン (m/z)		負イオン (m/z)	
		プリカーサーイオン	プロダクトイオン	プリカーサーイオン	プロダクトイオン
IAA	175.19	176.10	146.10 130.10	174.00	144.00
ABA	264.32	265.05	247.20 279.35*	263.15	n.d.
Z	219.25	220.15	n.d.	217.95	n.d.
ZR	351.36	352.75	220.15	n.d.	396.45* 217.95
iP	203.25	204.00	n.d.	202.00	n.d.
iPR	335.36	336.60	204.00	n.d.	380.50* 202.00
¹³ C ₆ -IAA	181.14	182.05	152.05 136.05	180.00	150.00
² H ₆ -ABA	270.36	271.10	253.10 285.35	269.15	n.d.
² H ₅ -Z	224.28	225.15	n.d.	222.95	n.d.
² H ₅ -ZR	356.40	357.70	225.15	n.d.	401.45*
² H ₆ -iP	209.29	210.00	n.d.	208.00	n.d.
² H ₆ -iPR	341.41	342.65	210.00	n.d.	386.50* 208.00

*付加イオン
n.d.: 非検出

表2. LC/MS分析のセグメント構成および分析したイオン

開始時間(分)	終了時間(分)	分析モード	植物ホルモン	
			標準物質	内部標準物質
5	31	正イオン	Z (220.15), ZR (352.75, 220.15)	² H ₅ -Z (225.15), ² H ₅ -ZR (357.70, 225.15)
		負イオン	Z (217.95), ZR (396.45, 217.95)	² H ₅ -Z (222.95), ² H ₅ -ZR (401.45, 222.95)
31	45	正イオン	IAA (176.10, 146.10, 130.10)	¹³ C ₆ -IAA (182.05, 152.05, 136.05)
			ABA (265.05, 247.20, 279.35)	² H ₆ -ABA (271.10, 253.10, 285.35)
			iP (204.00), iPR (336.60, 204.00)	² H ₆ -iP (210.00), ² H ₆ -iPR (342.65, 210.00)
		負イオン	IAA (174.00, 144.00), ABA (263.15)	¹³ C ₆ -IAA (180.00, 150.00), ² H ₆ -ABA (269.15)
			iP (202.00), iPR (380.50, 202.00)	² H ₆ -iP (208.00), ² H ₆ -iPR (386.50, 208.00)

表3. HPLCの条件

カラム	Cadenza CD-C18 (4.6 × 250 mm, Imtakt)
流速	0.3mL/分
移動相	A: 0.2% ギ酸添加メタノール B: 水 C: アセトニトリル
グラジエント	0~15分; 20: 75: 5
(A:B:C)	15~20分; 20: 75: 5~40: 55: 5 20~40分; 40: 55: 5 40~42分; 40: 55: 5~95: 5: 0 42~52分; 95: 5: 0 52~53分; 95: 5: 0~20: 75: 5 53~65分; 20: 75: 5

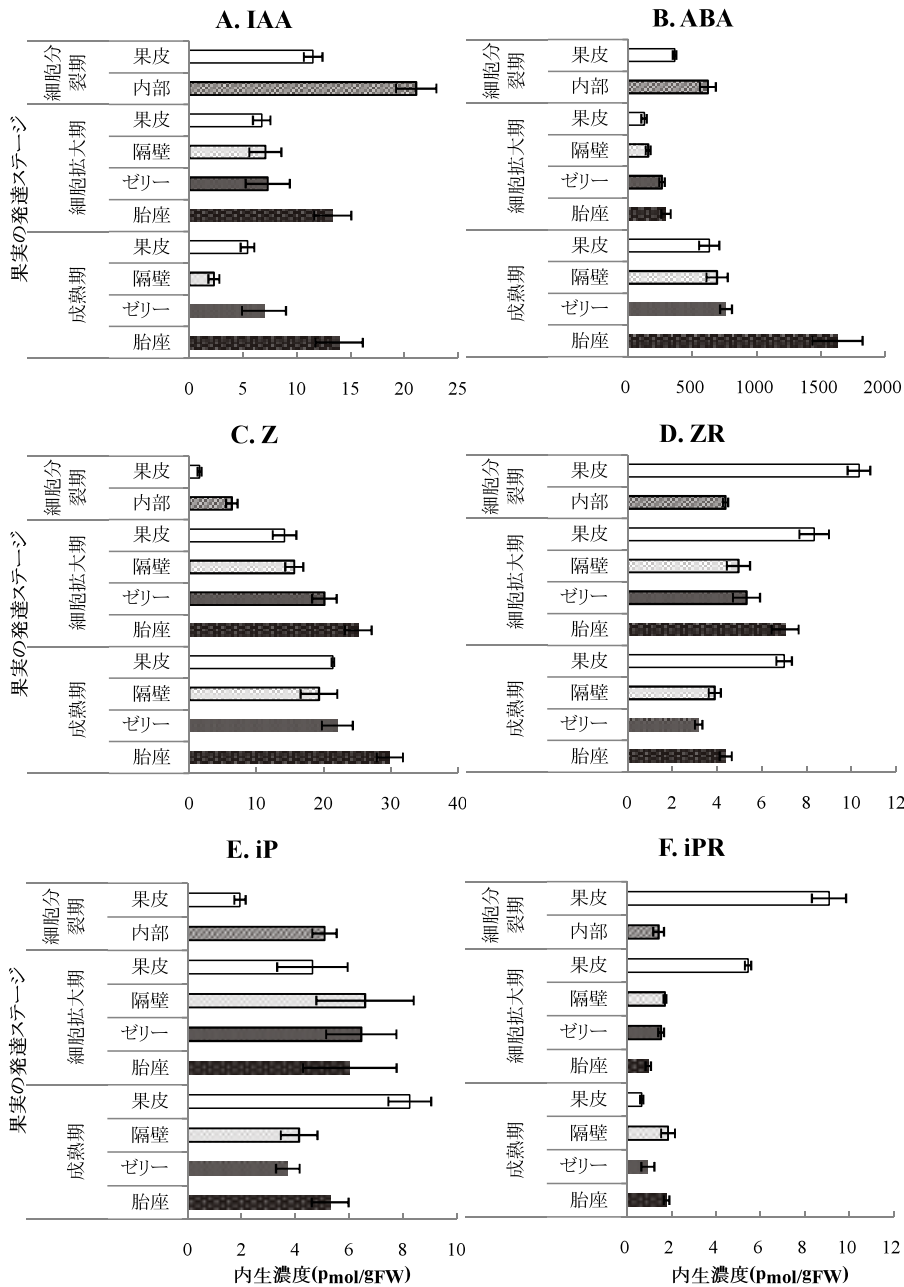


図 3. 各発達ステージにおける各内生植物ホルモン濃度 (A; IAA, B; ABA, C; Z, D; ZR, E; iP, F; iPR), n=3

が細胞拡大期と一致するという報告 (Sjut and Bangerth, 1982; Berry and Bewley, 1991) と異なる。従って、種子の成熟に関与しているとされている ABA は、単為結実果では他の役割 (例えば、同化物の集積や老化の促進、エチレンや IAA などの他のホルモンの生合成の促進もしくは阻害) があると考えられる。ただし、ABA は水ストレスなどの環境条件に反応して劇的に変化することから、本研究で使用した果実が環境条件によって変化した可能性は否定できない。しかし、各発達ステージで使用した果実 3 果において内生 ABA 濃度の極端な偏

りがないことから、環境条件の違いは少ないことが考えられる。本研究において、活性型である Z および iP の内生濃度を比較すると、内生 Z 濃度がいずれの発達ステージおよび各部位で常に iP 濃度よりも高いことから、単為結実果のサイトカインは Z が主要な役割を持つことが推定された。また、活性型である Z の内生濃度は果実が発達とともに増加し、iP もまた細胞分裂期から細胞拡大期にかけて増加した (図 3C・E)。この結果は、有種子果とは違い単為結実果は成熟期に内生サイトカインの低下が示されなかった Mapelli (1981) の報告と一

致する。したがって、単為結実果の発達におけるサイトカイニンは成熟期に最も関与し、細胞分裂期にはあまり重要な役割を示していないことが示唆された。

内生 Z 濃度が果実内部（特に胎座部）で高く（図 3C）、内生 ZR 濃度はいずれの発達ステージにおいても果皮で他の部位よりも高い傾向を示した（図 3D）。この結果から、ZR は果皮で生合成され、胎座部で ZR から Z に代謝されることが考えられる。また、内生 iPR 濃度（図 3F）は果皮で高い値を示したことから、ZR と同様に iPR は果皮で生合成されることが考えられる。部位別の内生 iP 濃度（図 3E）は果実の発達ステージで異なる傾向を示したことから、iPR から iP への代謝部位の特定はできなかった。

単為結果したトマト果実の発達中の複数の内生植物ホルモンの変化を調査することで、各発達ステージにおける植物ホルモンの役割や生合成部位を推定した。しかし、植物ホルモンは IAA のように細胞膜の外側から細胞に生理作用を及ぼす（Venis ら, 1990）ものや ABA のように受容体が細胞内に存在する（Anderson ら, 1994；Schwartz ら, 1994；Allan ら, 1994）ものがあるため、細胞外（アポプラスト）および細胞内（シンプラスト）を分けて分析する必要がある。さらに、各植物ホルモンの生合成をさらに詳しく解明するためには、IAA や ABA のように各種ホルモンの生理活性を示す化合物の他に、それらの前駆物質および代謝産物も同時に分析調査する必要がある。また、多くのホルモンは植物体内に結合型として活性型のホルモンよりも何十～何万倍も存在していることから、これらの分析も必要であると考えられる。また、果実の単為結実性には GA が深く関わっており、その生理作用からも果実の発達を深く理解するためには、GA の分析も必要である。

謝 辞

本研究を実地するにあたり、ご協力を頂いた新潟大学農学部園芸学研究室の皆様へ深く感謝申し上げます。

引用文献

- Allan, A., M. Fricker, J. Ward, M. Beale and A. Trewavas. 1994. Two transduction pathways mediate rapid effects of abscisic acid in commelina guard cells. *Plant Cell*, **6**:1319-1328.
- Anderson, B., J. Ward and J. Schroeder. 1994. Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in commelina guard cells. *Plant Physiol.*, **104**:1177-1183
- Berry, T. and J. D. Bewley. 1991. Seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) which develop in a fully hydrated environment in the fruit switch from a developmental to a germinative mode without a requirement for desiccation. *Planta*, **186**:27-34.
- Fos, M., F. Nuez and J. L. García-Martínez. 2000. The *pat-2* gene which induces natural parthenocarpy alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol.*, **122**:471-479.
- Fos, M., K. Proaño, F. Nuez and J. L. García-Martínez. 2001. Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by hormonal regulation of fruit development 79 the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Physiol Plant.*, **111**:545-550.
- George, W. L., J. W. Scott and W. E. Splittstoesser. 1984. Parthenocarpy in tomato. *Hort Rev.*, **6**:65-84
- 池田二三高・忠内雄次. 1992. わが国へのツチマルハナバチの導入経過と果菜類のポリネーターとしての実用性. *農及園.*, **67**: 1213-1216.
- Kojima, K., Y. Tamura, M. Nakano, D. Han and Y. Niimi. 2003. Distribution of indole-acetic acid, gibberellin and cytokinins in apoplast and symplast of parthenocarpic tomato fruits. *Plant Growth Regulation.*, **41**:99-104, 2003.
- 小出哲哉・林 悟朗. 1993. 果菜類におけるマルハナバチ (*Bombus terrestris*) の利用に関する研究 (第 1 報) マルハナバチの温室内における活動生態とミニトマトの着果及び果実品質に対する効果. *愛知農総試研報.*, **25**:165-170.
- Mapelli, S. 1981. Changes in cytokinin in the fruits of parthenocarpic and normal tomatoes. *Plant Sci Lett.*, **22**:227-233.
- Mapelli, S., C. Frova, G. Tort and G. Soressi. 1978. Relationship between set development and activities of growth regulators in tomato fruit. *Plant Cell Physiol.*, **19**:1281-1288.
- 大川浩司・菅原真治・矢部和則. 2006. 時季および花（花蕾）の処理が単為結果性トマト品種 ‘ルネッサンス’ の着果および果実特性に及ぼす影響. *園学研.*, **5**: 111-115 .
- 齋藤 隆. 1995. キュウリの単為結果に関与する生理生態的要因. *園学雑.*, **64** (別2) : 304.
- Schwartz, A., W. Wu, E. Tucker and S. Addmann. 1994. Inhibition of inward K⁺ channels and stomatal response by abscisic acid: An intracellular locus of phytohormones action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**:4019-4023.
- Sjut, V. and F. Bangerth. 1982. Induced parthenocarpy: a way of changing the levels of endogenous hormones in tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.): 1. extractable hormones. *Plant Growth Regul.*, **1**:243-251.
- Venis, M. A., E. W. Thomas, H. Barbier-Brygoo, G. Ephritikhine and J. Guern. 1990. Impairment auxin analogues have auxin activity. *Planta*, **182**: 232-235.

Change in Various Endogenous Phytohormones (ABA, CKs and IAA) in Parthenocarpic Tomato Cultivar 'Renescence' during Fruit Development

Yu SAKAI, Yuuki OHTA, Shuji CHINO, and Kiyohide KOJIMA

(Received January 25, 2011)

Summary

Changes in abscisic acid (ABA), cytokinins (isopentenyladenine (iP), Isopentenyladenosine (iPR), trans-zeatin (Z) and trans-zeatin riboside (ZR)) and indole-acetic acid (IAA) in fruit of parthenocarpic tomato cultivar 'Renescence' during fruit development were analyzed using a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Fruits were sampled at 3 and 6 cm in the diameter and the mature stage, divided into the pericarp and other parts or the pericarp, the partition, the jelly, and the placenta part. Concentrations of IAA, iPR, and ZR were high in the young fruit (3 cm-fruit) although ABA, Z and iPR were high in fruits at the mature stage. In all developmental stages, the IAA concentration of internal tissue was higher than that of pericarp. Especially, the IAA concentration of placenta tissue was highest in the fruit. As well as IAA, the ABA concentration of placenta tissue was higher than that of other tissue. In cytokinins, iPR and ZR concentrations were high in the pericarp, although the Z concentration was high in the placenta tissue. The concentration of iP has changed by the developmental stage. Therefore, it was suggested that the cell division of young fruits in parthenocarpic tomato is promoted by IAA. In addition, these findings suggest that the biosyntheses parts of IAA, ABA, and Z in parthenocarpic tomato fruit are the placenta, and ZR and iPR are the pericarp.

Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 63(2):109-114, 2011

Key words : development of fruit, LC-MS, parthenocarpy, phytohormones, tomato