

野生稻 *Oryza officinalis* Wall ex Watt の
耐塩性機構の解明に関する研究

(Studies on Salt Tolerance Mechanism of
Oryza officinalis Wall ex Watt)

西澤 優

2017

目 次

第 1 章 緒論	1
第 2 章 乾物生産能力からみた <i>O. officinalis</i> の耐塩性	
2-1. はじめに	10
2-2. 材料および方法	11
2-3. 結果	15
2-4. 考察	25
2-5. 摘要	28
第 3 章 塩ストレス下条件下における <i>O. officinalis</i> の Na ⁺ および K ⁺ 吸収特性	
3-1. はじめに	30
3-2. 材料および方法	31
3-3. 結果	32
3-4. 考察	35
3-5. 摘要	44
第 4 章 塩ストレス下における <i>O. officinalis</i> の光合成能力	
4-1. はじめに	46
4-2. 材料および方法	48
4-3. 結果	49
4-4. 考察	59
4-5. 摘要	63

第 5 章	<i>O. officinalis</i> における光合成関連タンパク質の塩応答性	
5-1.	はじめに	65
5-2.	材料および方法	66
5-3.	結果	68
5-4.	考察	74
5-5.	摘要	79
第 6 章	総合考察	81
	要旨	97
	Summary	99
	謝辞	101
	引用文献	103

第 1 章 緒論

海水や低質水に含まれる塩化ナトリウムなどの塩類が土壌中に蓄積することや、台風や強風により塩類を含んだ水分が内陸に散布されることで、植物の生育が阻害されることを塩害という (前田 2012)。乾燥、半乾燥地域では、年間降雨量が少なく、低質の地下水を利用した灌漑農業が行われている。このような耕作地域では、塩類は雨水や冠水によって下層に浸透して行かないため、土壌中に塩類が蓄積しやすい。また、十分な排水施設もないまま過剰な灌漑農業を行うと、低質水の地下水位が上昇することになる。地下水は毛管現象によって、さらに地表面近くまで達し、水分の蒸発とともに土壌の塩分濃度が高まり塩類集積土壌が拡大していく。塩類集積土壌は、中国、オーストラリアおよびアメリカなど世界各地に分布しており、その総面積は、灌漑農地面積の約 30%にものぼることが報告されている (Chaves *et al.* 2009)。このような塩害地域は世界で 9000×10^6 ha あり、毎年 200 万 ha の農地が塩の影響を受けている (Flowers 2004)。

日本においても塩害の被害はあり、その多くは、海水の飛来や高波による海水の冠水によるものである (前田 2012)。なかでも、2011 年 3 月に東日本大震災があり、東北地方を中心に未曾有の被害をもたらしたことは記憶に新しい。地震発生に伴う津波は、東北地方沿岸部の農地に甚大な被害を及ぼした。特に被害を受けた、青森、岩手、宮城、福島、茨城、千葉の太平洋沿岸 6 県では、全耕地面積 900,900 ha に対し、その 2.6% に当たる 23,600 ha が津波による冠水等により作物栽培が困難となった (農林水産省 2011)。

国連によると、世界の人口は 2015 年で約 73 億人である。近年の急激な人口増加傾向から、2050 年には約 100 億人に達することが予想されている。この人口増加に伴い、食糧需要も増加することは必至である。急激な人口増加に対する食糧供給のためには、塩類集積土壌における食糧生産も今後ますます必要になると考えられる。加えて、東日本大震災の津波によって海水が冠水した農地では、作物を利用した除塩が効率的な除塩対策の一つとして挙げられている。塩類集積土壌で安定的に作物生産を行うためには、植物の塩ストレス条件下での耐塩性メカニズムを解明すること、および塩耐性作物を作出することが重要課題である。

一般に、塩類集積土壌において、作物生産は非常に困難である。作物は、土壌に高濃度の塩類が存在すると、塩ストレスを受ける。塩ストレスは、大きく分けて浸透圧ストレスと、イオンストレスに分類することができる (荒井ら 2011)。浸透圧ストレスは、根圏土壌の水ポテンシャルが低下し、根が吸水しにくい状態に陥ると引き起こされる。根での吸水阻害によって細胞内の水ポテンシャルが低下すると、細胞分裂の速度および分裂部位の大きさが減少する。これは水分ストレスによる茎葉部の生長速度減少の原因の一つとなっている。葉の水ポテンシャルが低下すると、気孔の閉鎖が起こり、光合成速度の低下を引き起こす (寺島 2001)。イオンストレスは、細胞内に過剰に Na イオン等を取り込まれることで、細胞内のイオンバランスの崩壊を引き起こし、窒素代謝やタンパク質代謝が阻害される (Munns and Tester 2008)。植物が塩ストレスに曝されると、まず浸透圧ストレスによるダメージを受け、長期間塩ストレスを受け続けると、浸透圧ストレスおよびイオンストレスによる複合的なダメージを受ける (Munns and Tester 2008)。

植物が塩ストレスに曝された場合の反応を Fig. 1-1 に示した (前田 2012). 塩ストレスを受けた物は, 浸透圧ストレスやイオンストレスによる影響を受ける. 植物体はそれらのストレスに対して, イオンバランスの維持, 適合溶質の合成, 細胞膜および細胞壁の構造維持, 塩腺による塩類の分泌, H^+ -ATPases の活性化および形態的变化等の抵抗反応を示す. 塩ストレスに抵抗した結果, 過剰の活性酸素が生成され, 2 次的ストレスとして酸化ストレスが生じる. 過剰に発生した活性酸素を消去するため, スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) などの活性酸素除去酵素が活性化する.

耐塩性を持つ植物 (塩性植物) の塩分に対する抵抗性の関係を Fig. 1-2 に示した (Larcher 2003). 作物の中には, 耐塩性の程度には種および品種によって差があり, それぞれ特有の耐塩性機構を持つ. 例えば, マングローブは, 特有の塩類腺を有しており, 体内に蓄積された塩類を能動的に体外へ排出し, 体内の塩濃度を一定に保っている. アッケシソウでは, 葉身を多肉化することにより, 体内の塩類貯蔵体積を一定に保っている. ヨシでは, Na^+ を地上部に蓄積しないように, 地上部まで吸収した Na^+ を根に再転流することで地上部の Na^+ 濃度を低くして塩ストレスに対する抵抗性を維持している (Matsushita and Matoh 1991).

イネ (*Oryza sativa* L.) は, トウモロコシや大豆とならび, 世界の主要な作物の一つであり, 特にアジア各国で多く食されている. 日本でもイネは古くから栽培されており, 主食として利用される, もしくは米菓子や酒などに加工して利用されている.

イネは塩類に対し感受性がある作物に分類され, 50mM 以上の NaCl 環境下では, 生長が阻害される (間藤 1991). イネを主食とするアジア

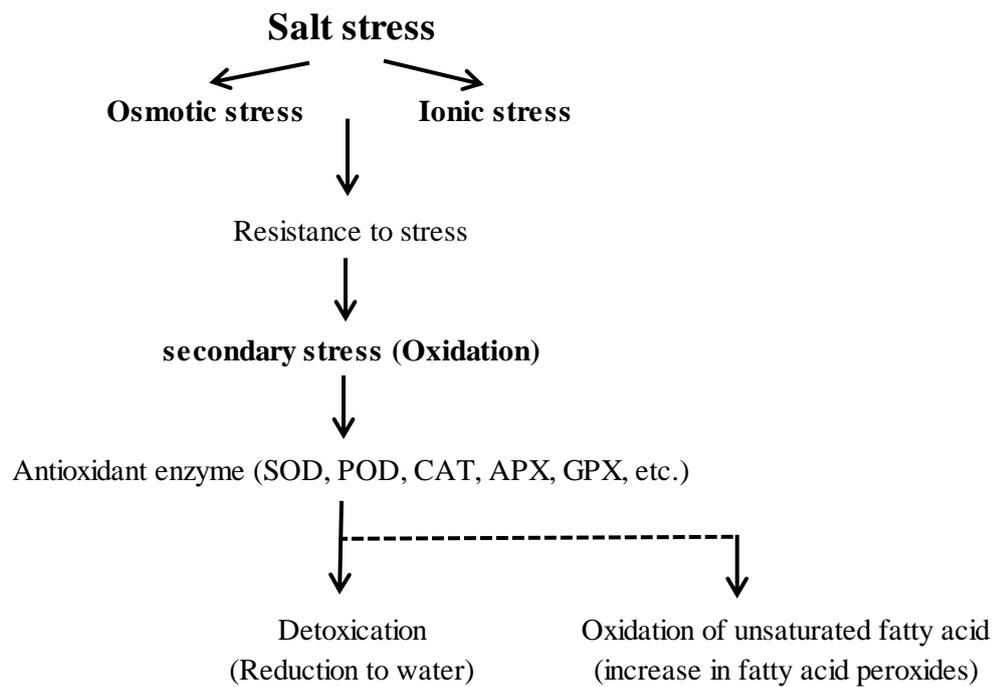


Fig. 1-1. Plant response to salt stress (Maeda 2012).

注) 原図を一部改変した.

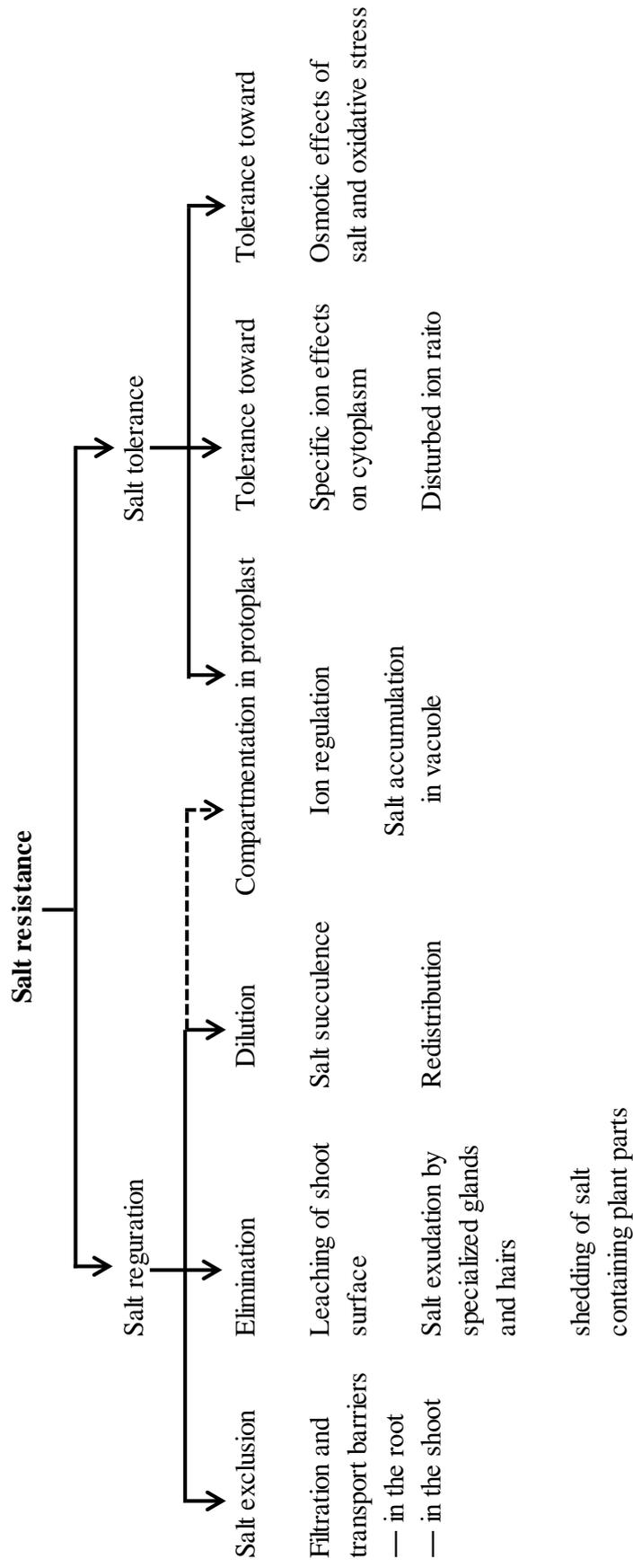


Fig. 1-2. Components of the resistance of halophytes to salt stress (Larcher 2003).

注) 原図を一部改変した.

地域（中国，インド，イラク，パキスタンなど）において，すでに塩類集積土壌の拡大が進行しており，イネ育成が困難な地域が増えてきている．今後の世界人口の増加，塩害地域における作物の収量低下や食糧供給率を考慮すると，イネの塩類に対する反応性を調査することにより，耐塩性イネ品種育成のための基礎的知見を得ることは急務な課題である．

イネの耐塩性に関する研究は世界各地で行われており，イネの耐塩性メカニズムについて様々なことが明らかにされてきた．NaCl ストレス下で栽培したイネは，葉組織内の Na^+ の増加によって乾物生産を低下させる (Akita and Cabsly 1990, 趙ら 1996)．葉組織内の Na^+/K^+ 比は，NaCl ストレスを受けることによって増加し，組織中のイオンバランスを崩す (Siringam *et al.* 2009)．また，葉組織内の Na^+ が増加すると，光合成の阻害，細胞質内の酵素活性の低下などを引き起こす (Niu *et al.* 1995)．葉身の水分含量と Na^+/K^+ の間には負の相関関係があり，塩ストレスを受けて Na^+/K^+ が高い状態の時，葉身水分含量は低下し，水ストレスを受ける (Arunroj *et al.* 2004)．水ストレスを受けたイネは，葉の伸長が抑制され，乾物生産が低下することが報告されている (Tanguilig *et al.* 1987)．塩ストレスを受けたイネは，葉身に Na^+ を蓄積し，光合成速度が低下することが報告されている (Yeo and Flowers 1983, Yeo *et al.* 1985)．また，塩ストレスを受け葉身の水分含量が低下したイネは，気孔の閉鎖に伴い気孔伝導度が低下することによって炭素固定速度が減少することが報告されている (Sese and Tobita 2000)．

先述した通り，イネは塩感受性の高い作物であるが，イネの塩に対する耐性には品種間差があることが報告されている (山内ら 1987, Akita

and Cabuslay 1990). 一般に耐塩性イネ品種では、地上部に Na^+ を転流しないよう根で吸収を抑制する機構を有することが報告されている (Tsuchiya *et al.* 1994, Basu *et al.* 2010). また、葉身、特に上位葉の Na^+ 濃度や Na^+/K^+ を増加させないような場合が多い (Akita and Cabuslay 1990). しかし、葉身 Na^+ 含量と乾物生産に相関がない品種や (趙ら 1996), 葉身 Na^+ 含量と光合成の維持能力においても品種間差があることから (楨原ら 2001), 耐塩性イネ作出における知見を得るには、さらに多くのイネの耐塩性機構について詳しく調べる必要がある.

イネ属 (*Oryza*) には、アジアを中心に多く栽培されている *Oryza sativa* L. と、アフリカで栽培されている *Oryza glaberrima* Steud. の 2 種の栽培イネが存在するが、その他にも約 20 種の野生稲が存在する. *Oryza* 属野生稲は熱帯アフリカ、アジア、アメリカ、オセアニアなど、世界中に広く分布しており、種によって形態は様々である. これまでに、*Oryza* 属野生稲の中には、耐乾性、病虫害耐性、耐塩性など農業上有用な形質をもつ種が存在することが報告されている (Kobayashi *et al.* 1993, Xiao *et al.* 1998, Nakamura *et al.* 2002). 野生稲は、栽培イネにこれらの有用な形質を導入するための遺伝資源として期待されている. 仲村らは、国際農林水産業研究センター (JIRCAS) 沖縄支所において、幼苗期における野生稲の耐塩性スクリーニング試験により選抜された *O. latifolia*, *O. officinalis*, *O. australiensis* および *O. eichingeri* 系統の中から *Oryza* 属野生稲 *O. latifolia* を用い、分けつ最盛期における耐塩性試験をした (Nakamura *et al.* 2002, 仲村ら 2005a). その結果、*O. latifolia* は、 12 dSm^{-1} NaCl の塩水処理でも乾物生産を低下させないことが明らかになった. その要因として、*O. latifolia* は塩ストレスによって葉身内に多量の Na^+ を

吸収、蓄積するにも関わらず、葉身の水分含量を維持できること、および光合成速度を維持できることが示唆された。また、耐塩性の高いチラコイド膜を有することも高い耐塩性を有する理由の一つであることも示唆された。一方で、その他の野生稲における耐塩性を詳しく評価した報告はほとんどない。

これまでに、ゲノムが異なる種間の交雑は難しいため、栽培イネへ有用な形質を導入するために使用されてきた野生稲は A ゲノムのものであった。野生稲 *O. officinalis* は、栽培イネとは異なる C ゲノムを有するが、戻し交雑の材料や、コルヒチン処理後の栽培種と交配し、複 2 倍体を得るなどの使用例が報告されている (Watanabe and Ono 1973, Jena and Khush 1990)。また、イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子を探索するための QTL 解析や、*O. officinalis* 由来の耐乾性に関する形質転換用の材料として使用されており (前田ら 2007, Liu *et al.* 2015)、栽培イネに有用な形質を導入するための育種素材としての価値が高まっている。一方、塩ストレスに対する *O. officinalis* の生長および生理反応については詳しく調査されていない。また、*O. officinalis* の耐塩性機構を明らかにすることは、耐塩性イネ作出のための一助となる。

以上のことを背景に、本研究では、*O. officinalis* の耐塩性機構を解明するために、塩処理後の生長および生理反応について調査し、耐塩性栽培イネ品種である Pokkali および Nonabokra、耐塩性を有する *O. latifolia* と比較検討した。まず、第 2 章では、塩ストレスを受けた *O. officinalis* の乾物重、水分含有率およびプロリン含量を測定し、*O. officinalis* の耐塩性について乾物生産の面から評価した。次に、第 3 章では、塩ストレス下の *O. officinalis* における Na^+ および K^+ の動態について調査し、*O.*

officinalis の耐塩性の高さについて、第 2 章の乾物生産の結果とあわせて評価した。第 4 章では、塩ストレスを受けた *O. officinalis* の光合成速度、気孔伝導度、葉内 CO₂ 濃度、クロロフィル含量および O₂ 放出速度を測定し、光合成能力の面から耐塩性を評価した。第 5 章では、塩ストレス下の *O. officinalis* における光合成器官の耐塩性について調査するため、葉身タンパク質の挙動を二次元電気泳動によって解析し、光合成に関わるタンパク質の挙動を調査した。以上の結果をもとに、第 6 章では、*O. officinalis* における塩ストレスに対しての生理的反応について統括し、*O. officinalis* の耐塩性機構について総合的に考察した。

第 2 章 乾物生産能力からみた *O. officinalis* の耐塩性

2-1. はじめに

乾燥および半乾燥地域では、降雨量よりも土壤水分の蒸発量が多いため、土壤の塩性化が起こりやすい。このような土壤では、 Na^+ 、 Ca^+ 、 Mg^{2+} 、 Cl^- および SO_4^{2-} などが多く含まれ、最も多い塩の種類はナトリウム塩である (高橋 1987)。

作物は、土壤に高濃度の塩類が存在すると、根による水分の吸収が滞り、植物体内は水分ストレス状態となる。水分ストレスは葉細胞の伸長抑制および気孔の閉鎖を引き起こし、蒸散速度および光合成速度の低下を招く。また、作物が多量に塩類を体内に吸収および蓄積すると、それがイオンストレスとなって細胞内のイオンバランスが崩れ、生育が阻害される (Munns and Tester 2008)。

一般に、イネは生育環境下に 50 mM の NaCl が存在すると、生育が急激に低下し (間藤 1991)、約 100 mM NaCl では枯死する品種もある (Akita and Cabuslay 1990)。一方、イネの塩に対する耐性には品種間差があり、耐塩性を有する品種は、約 100 mM NaCl でも高い乾物生産および相対生長率 (RGR) を維持する (Akita and Cabuslay 1990)。イネの塩に対する反応では、地上部に多量の Na^+ を蓄積することや、葉身細胞の伸長が抑制されることで、葉身光合成速度が低下し、乾物生産が低下することが報告されている (Yeo and Flowers 1985)。高い耐塩性を有するイネ品種では、地上部に Na^+ を転流しないよう根で吸収を抑制する機構を有することが報告されている (Tsuchiya *et al.* 1994, Basu *et al.* 2010)。一方で、

これまでの研究は、栽培イネの耐塩性機構についてのみ調べられており、野生稲のような未利用資源の耐塩性に関する報告は少ない。

野生稲の耐塩性についての調査は、野生稲 *O. latifolia* について乾物生産および光合成能力から耐塩性を評価した報告 (仲村ら 2005a) 以外ほとんどない。仲村ら (2005a) は、長期間の $12 \text{ dSm}^{-1} \text{ NaCl}$ の塩水処理した *O. latifolia* では、葉身に Na^+ を多量に蓄積するが、乾物生産および光合成能力が低下せず、高い耐塩性を有することを明らかにした。他の野生稲において、*O. officinalis*, *O. australiensis* および *O. eichingeri* 系統は、幼苗期にスクリーニング試験により耐塩性を有すると選抜されているが、その野生稲における耐塩性を詳しく評価した報告はほとんどない。

そこで本章では、栽培イネに有用な形質を導入する遺伝資源として使用例のある *O. officinalis* について、塩処理後の乾物重および葉身パラメータの変化について調査した。その結果を耐塩性栽培イネおよび耐塩性野生稲 *O. latifolia* と比較検討することで、*O. officinalis* における耐塩性の高さについて、乾物生産能力の面から評価した。

2-2. 材料および方法

1) 供試材料と栽培条件

材料には、琉球大学農学部保存系統である *Oryza officinalis* Wall ex Watt (IRGC Acc. No. 104672), *Oryza australiensis* Domin (IRGC Acc. No. 101144), *Oryza latifolia* Desv. (IRGC Acc. No. 100965 : 耐塩性野生稲), *Oryza rufipogon* Griff. (IRGC Acc. No. 105390 : 感受性野生稲) および *Oryza sativa* L. cv. Pokkali (耐塩性栽培イネ) の *Oryza* 属 5 種を用いた。種子は、籾殻を取り除き、 45°C 、3 日間の温度処理を行い休眠打破した。

その後、ベンレート水和剤 2000 倍希釈液に、30℃、24 時間浸漬させて種子消毒を行い、水洗後 30℃で 24 時間水に浸漬させた。栽培は、琉球大学農学部亜熱帯フィールド科学教育研究センターのビニールハウス内で行った。島尻マーヅ土壌を敷き詰めた育苗箱（長さ 55cm × 幅 45cm × 高さ 10cm）に、発芽処理を行った種子を 1cm 間隔で播種した。発芽後、4 葉期に達した（播種後 21 日）、生育の揃った苗を選び、吉田氏液（Yoshida ら 1976）を用い水耕栽培を行った。選抜した個体は、スポンジに挟み、あらかじめ穴を開けた発砲スチロールの穴に差し込み、吉田氏液を入れたプラスチックバット（長さ 73cm × 幅 42cm × 高さ 20cm）に浮かせて栽培した。水耕液の更新は 7 日毎に行い、pH が 5.0～5.5 になるように毎日 1N の塩酸および 1N の水酸化カリウムで調整した。

2) 生育形質および各器官における含水率の調査

塩処理下での生育調査および各器官の含水率を調査するための供試個体は、播種を 2010 年 6 月 26 日に行い、上記の条件で栽培したのを用いた。塩水処理は、10 葉期（播種後 60 日）に、NaCl 飽和水溶液を用い電気伝導度が 12 dSm^{-1} になるよう調整した。電気伝導度は、電気伝導度計（Twin Cord, 堀場製作所）を用いて測定した。NaCl 濃度の調整は、水耕液の更新時に行った。対照区および塩処理区でプラスチックバットを 3 枚ずつ使用し、プラスチックバット 1 枚につき各供試材料を 2 個体配置した。各実験は、1 反復につき各供試材料 2 個体を供試し 3 反復とした。塩水処理開始後 32 日目（播種後 92 日）に、供試材料の葉数を測定後、供試個体を根、葉鞘、葉身に分解し、各器官の生体重を測定した。その後 80℃で 72 時間通風乾燥し、乾物重を測定した。葉身については

直ちに葉面積計 (AAM-8型, 林電工) を用いて葉面積を測定した. また, 各器官の水分含有率は, 各器官の生体重から乾物重を差し引いた値を生体重で割った値とした.

3) プロリン含量の測定

測定には, 播種を 2011 年 5 月 11 日に行った供試個体を使用した. 供試材料は, *O. officinalis*, *O. latifolia*, *O. rufipogon* および *O. sativa* L. cv. Pokkali の *Oryza* 属 4 種を用いた. 栽培条件は前述に従った. 塩処理は, 10 葉期 (播種後 60 日) に, 水溶液に NaCl を添加し, 水溶液中の NaCl 濃度が 100 mM になるよう調節した. 播種後 81 日 (塩処理後 21 日) に主稈に隣接する分けつの第 I 葉 (最上位完全展開葉) および第 III 葉の 2 枚を測定に用いた. 採取した 2 葉は, 液体窒素で凍結させ測定するまで -20°C で保存した. 測定方法は Bates ら (1973) に従った. サンプル 0.5 g に対し 3% スルホサリチル酸溶液 10 ml を加え破碎し, 濾紙 (125 mm No.6, ADVANTEC) で濾過した. 濾液 2 ml に対し, 酸性ニンヒドリン溶液と氷酢酸をそれぞれ 2 ml ずつ添加し, 100°C で 1 時間反応させ, その後直ちに氷水中で反応を止めた. 冷却後, トルエン 4 ml を加え, 30 秒間攪拌した. 攪拌液 3 ml の 520 nm における吸光度を, 分光光度計 (Ubest-35 型 日本分光) によって測定した. 測定した吸光度を A^{520} , スルホサリチル酸の添加量を S ml, 供試したサンプルの重さを gFW として, 下記の式を用いてプロリン含量を算出した.

$$\text{Proline } (\mu\text{mol/gFW}) = \frac{A^{520}/0.0067}{gFW/S_{ml}/2}$$

4) 生長解析

供試材料は、*O. officinalis*, *O. latifolia*, *O. rufipogon* および *O. sativa* L. cv. Nonabokra の *Oryza* 属 4 種を用いた。播種は 2014 年 4 月 20 日に行い、上記の栽培方法に基づき供試材料を栽培した。塩処理は、10 葉期（播種後 60 日）に、水溶液に NaCl を添加し、水溶液中の NaCl 濃度が 100 mM になるよう調節した。NaCl 濃度の調整は水溶液更新時に行った。処理区は NaCl 処理をしていないものを対照区とし、100 mM の NaCl 処理を行ったものを塩処理区とした。各処理区の供試個体は 4 個体とした。塩処理開始後 0 日目および 20 日目に供試個体を根、葉鞘、葉身に解体し、各器官の生重を測定した。その後 80°C で 72 時間通風乾燥し、乾物重を測定した。葉面積は、葉面積計（AAM-8 型、林電工）を用い測定した。塩処理開始後 0 日目の処理日数を t_1 、乾物重を W_1 、葉面積を A_1 、塩処理開始後 20 日目の処理日数を t_2 、乾物重を W_2 、葉面積を A_2 として、相対生長率（RGR）、純同化率（NAR）、葉面積比（LAR）を以下の数式より算出し、生長解析を行った。

$$\begin{aligned} \text{RGR} &= \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1} \\ \text{NAR} &= \frac{W_2 - W_1}{t_2 - t_1} \times \frac{\ln A_2 - \ln A_1}{A_2 - A_1} \\ \text{LAR} &= \frac{A_2 - A_1}{\ln A_2 - \ln A_1} \times \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{W_2 - W_1} \end{aligned}$$

5) 相対葉身含水率（RWC）の測定

供試個体は、生長解析と同一の個体を用いた。測定葉は、主稈の最上位完全展開葉（第 I 葉）、第 III 葉および第 V 葉を用いた。葉身の飽和水分含量は、超純水に 4 時間浸漬した測定葉の重量とした。RWC は以下の数式より算出した。

$$RWC = \frac{\text{生重} - \text{乾物重}}{\text{飽和水分含量} - \text{乾物重}} \times 100$$

2-3. 結果

1) 乾物重および生長解析

Table 2-1 に、播種後 92 日の *Oryza* 属 5 種の地上部、葉身、葉鞘および根における乾物重を示した。対照区を 100%とした場合の塩処理区の相対値をみると、地上部乾物重では *O. latifolia* および *O. officinalis* でそれぞれ 69%および 64%であり、他種より有意に高かった。

葉身乾物重の相対値では、最も塩水処理の影響を受けなかったのは *O. latifolia* で、*O. australiensis* よりも有意に高かった。葉鞘乾物重の相対値では、*O. latifolia* および *O. officinalis* でそれぞれ 67%および 65%であり、Pokkali および *O. australiensis* より有意に高かった。根乾物重の相対値では、*O. rufipogon* で 70%であり、他種よりも高い値を示した。

Table 2-2 に、播種後 92 日の *Oryza* 属 5 種の葉数および葉面積を示した。対照区を 100%とした場合の塩処理区の相対値をみると、葉数では、*O. officinalis* で 89%であり、他種より高い値を示した。葉面積では、*O. latifolia* で 80%であり、他種よりも高い値を示した。

Table 2-3 に、播種後 80 日における *Oryza* 属 4 種の RGR, NAR および LAR を示した。対照区を 100%とした場合の塩処理区の相対値をみると、RGR では、*O. officinalis* で 72%であり、他種よりも高い値を示した。NAR では、*O. latifolia* で 83%であり、他種よりも高い値を示した。LAR では、Nonabokra で 91%であり、他種より高い値を示した。一方、*O. rufipogon* では、RGR, NAR および LAR は他種よりも低い値を示した。

Table 2-1. Effect of NaCl treatment on dry weight of root, leaf blade, leaf sheath and shoot of five *Oryza* species (92 days after seeding).

Species	Shoot (g / plant)		Leaf blade (g / plant)		Leaf sheath (g / plant)		Root (g / plant)	
	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl
<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	120.9 ± 2.2	62.6 ± 1.6 (52) b	35.5 ± 0.4	18.7 ± 0.3 (56) ab	87.3 ± 1.9	43.9 ± 1.4 (50) b	17.5 ± 0.5	7.4 ± 0.2 (42) b
<i>O. officinalis</i>	15.6 ± 0.4	10.0 ± 0.2 (64) a	6.2 ± 0.2	3.8 ± 0.1 (62) ab	9.4 ± 0.2	6.1 ± 0.1 (65) a	4.5 ± 0.1	3.0 ± 0.1 (66) a
<i>O. latifolia</i>	25.4 ± 0.1	17.5 ± 0.2 (69) a	9.8 ± 0.3	7.1 ± 0.1 (72) a	15.5 ± 0.2	10.4 ± 0.2 (67) a	6.5 ± 0.2	3.0 ± 0.1 (46) b
<i>O. australiensis</i>	24.7 ± 1.8	11.9 ± 0.5 (48) b	9.6 ± 0.5	4.2 ± 0.2 (43) b	15.2 ± 1.3	7.7 ± 0.3 (51) b	7.9 ± 0.2	2.5 ± 0.1 (32) c
<i>O. rufipogon</i>	38.5 ± 0.5	21.0 ± 1.0 (54) b	9.0 ± 0.4	4.7 ± 0.9 (52) ab	29.4 ± 0.6	16.3 ± 1.6 (55) ab	5.5 ± 0.2	3.9 ± 0.2 (70) a

Values are mean ± S.E. In parentheses values indicate the percentage to the control

n = 3. Means with the same letter within each column are not significantly different at the 5% level, as determined by Tukey's test.

Table 2-2. Effect of NaCl treatment on number of leaves and leaf area of five *Oryza* species (92 days after seeding).

Species	Number of leaves		Leaf area (cm ²)	
	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl
<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	120.7 ± 1.8	94.8 ± 2.2 (79) ab	6993 ± 53	4245 ± 121 (61) b
<i>O. officinalis</i>	31.2 ± 1.5	27.7 ± 0.7 (89) a	1614 ± 36	1185 ± 29 (73) a
<i>O. latifolia</i>	39.3 ± 0.6	28.0 ± 4.0 (72) b	2759 ± 72	2210 ± 55 (80) a
<i>O. australiensis</i>	44.7 ± 3.0	17.0 ± 0.3 (38) d	2502 ± 157	913 ± 17 (37) c
<i>O. rufipogon</i>	113.8 ± 1.2	67.7 ± 4.0 (59) c	2374 ± 138	864 ± 23 (37) c

Values are mean ± S.E. In parentheses values indicate the percentage to the control. n = 3. Means with the same letter within each column are not significantly different at the 5% level, as determined by Tukey's test.

Table 2-3. Effect of NaCl treatment on RGR, NAR and LAR of four *Oryza* species (80 days after seeding).

Species	RGR (g g ⁻¹ d ⁻¹)		NAR (m ² d ⁻¹)		LAR (g m ⁻² d ⁻¹)	
	Control	100 mM NaCl	Control	100 mM NaCl	Control	100 mM NaCl
<i>O. sativa</i> cv. Nonabokra	0.26 ± 0.004	0.17 ± 0.003 a (65)	25.6 ± 0.45	18.1 ± 0.29 a (71)	0.010 ± 0.0001	0.009 ± 0.0001 a (91)
<i>O. officinalis</i>	0.21 ± 0.004	0.15 ± 0.011 a (72)	16.8 ± 0.25	13.4 ± 1.20 a (80)	0.013 ± 0.0002	0.011 ± 0.0002 a (90)
<i>O. latifolia</i>	0.24 ± 0.005	0.16 ± 0.004 a (66)	17.6 ± 0.37	14.7 ± 0.64 a (83)	0.014 ± 0.0001	0.011 ± 0.0003 a (79)
<i>O. rufipogon</i>	0.18 ± 0.010	0.05 ± 0.020 b (31)	26.4 ± 1.07	12.6 ± 4.94 a (48)	0.007 ± 0.0002	0.003 ± 0.0011 b (50)

RGR: relative growth rate, NAR: net assimilation rate, LAR: leaf area ratio.

Values are mean ± S.E. In parentheses values indicate the percentage to the control.

n = 6, Means with the same letter within each column are not significantly different at the 5% level, as determined by Tukey's test.

Fig. 2-1 に RGR と NAR の関係, Fig. 2-2 に RGR と LAR の関係を示した. RGR と NAR の相関係数をみると, すべての種で 0.9 以上 ($P < 0.01$) であり, 高い正の相関がみられた. その中でも Nonabokra では $r = 0.99$ であり, 他種よりも高い値であった. RGR と LAR の相関係数をみると, *O. officinalis* 以外の種で 0.9 以上 ($P < 0.01$) であり, 高い正の相関があった. *O. officinalis* は $r = 0.67$ であり, 他種より低い値であった.

2) 葉身水分含有率

Fig. 2-3 に, 播種後 80 日における塩処理区の *Oryza* 属 4 種の葉位別 RWC を示した. *O. officinalis*, Nonabokra および *O. rufipogon* では第 I 葉 > 第 III 葉 > 第 V 葉の順であった. 一方, *O. latifolia* では第 III 葉 > 第 V 葉 > 第 I 葉の順であった. *O. officinalis* および *O. latifolia* のすべての葉位で, Nonabokra の第 I 葉よりも高い値を示した.

Table 2-4 に, 播種後 92 日における *Oryza* 属 5 種の各器官における水分含有率を示した. 塩水処理後の水分含有率は *O. officinalis* および *O. latifolia* はそれぞれ 70.2% および 75.4% であり, Pokkali と同程度であった. 一方, 塩水処理後の *O. rufipogon* は葉身水分含有率が 66.2% であり, 他種より有意に低かった.

3) プロリン含量

Table 2-5 に, 播種後 81 日における *Oryza* 属 4 種の葉位別プロリン含量を示した. すべての種で, 対照区より塩処理区で高い値を示した. *O. latifolia* の 100 mM 区は, 第 I 葉および第 III 葉で対照区および 50 mM 区より有意に高い値を示した.

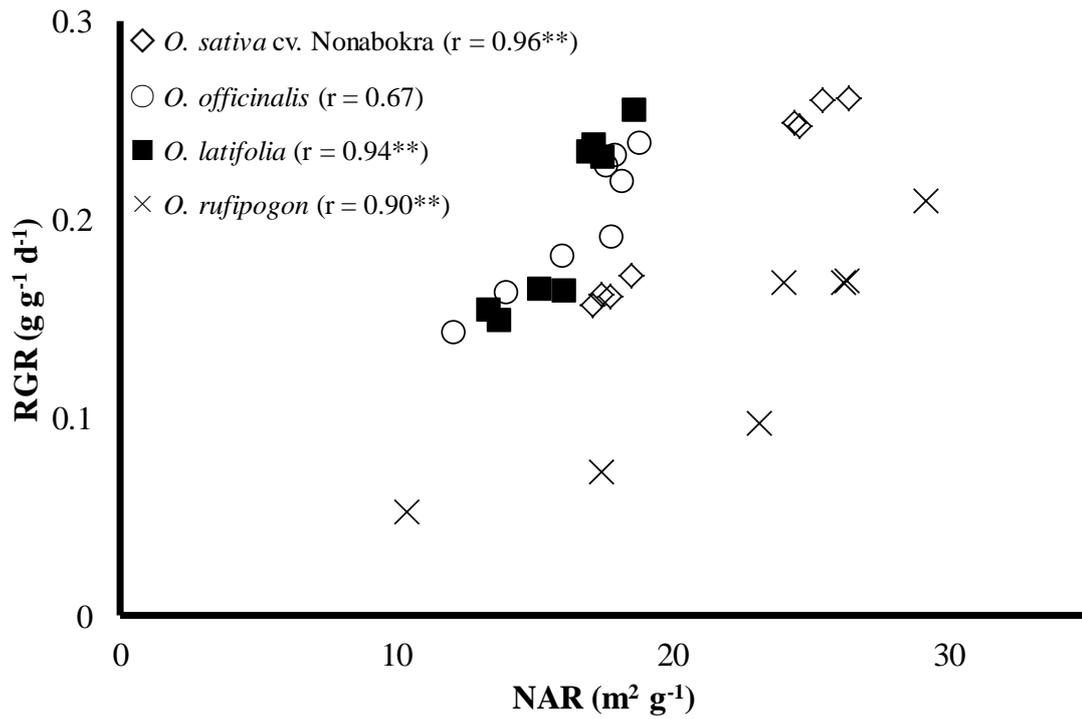


Fig. 2-1. Relationship between RGR and LAR of four *Oryza* species under NaCl treatment (80 days after seeding).
 n = 4, **: Indicates significance at 1% level.

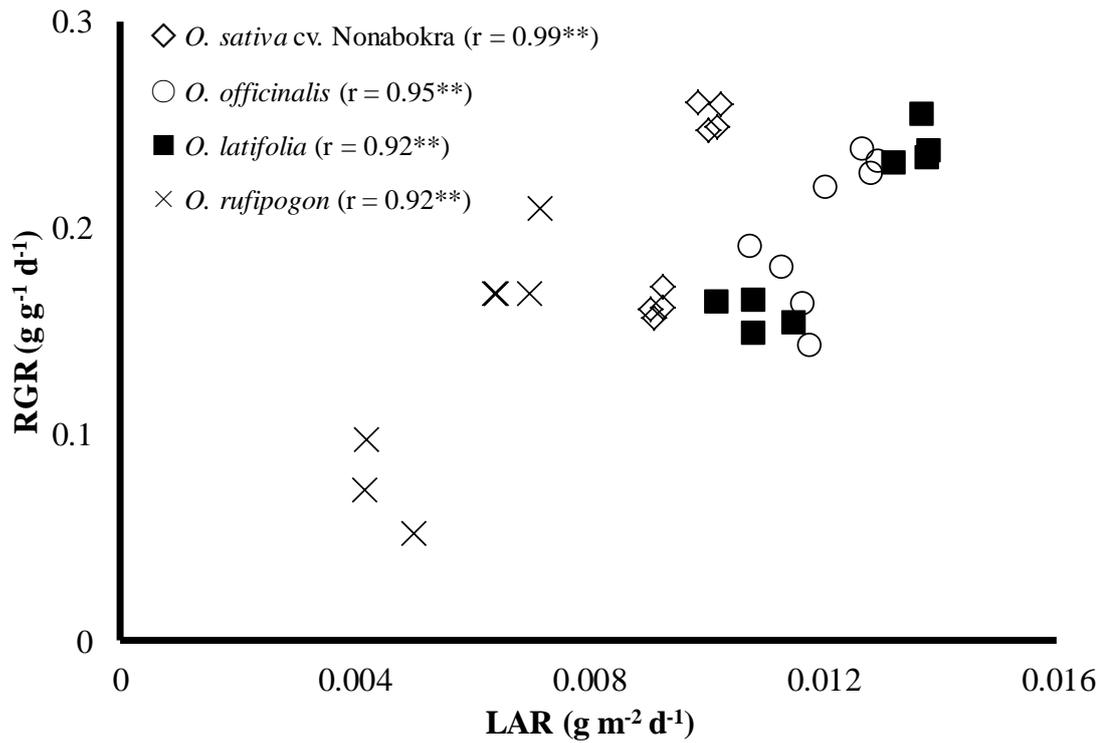


Fig. 2-2. Relationship between RGR and LAR of four *Oryza* species under NaCl treatment (80 days after seeding).
 n = 4, **: Indicates significance at 1% level.

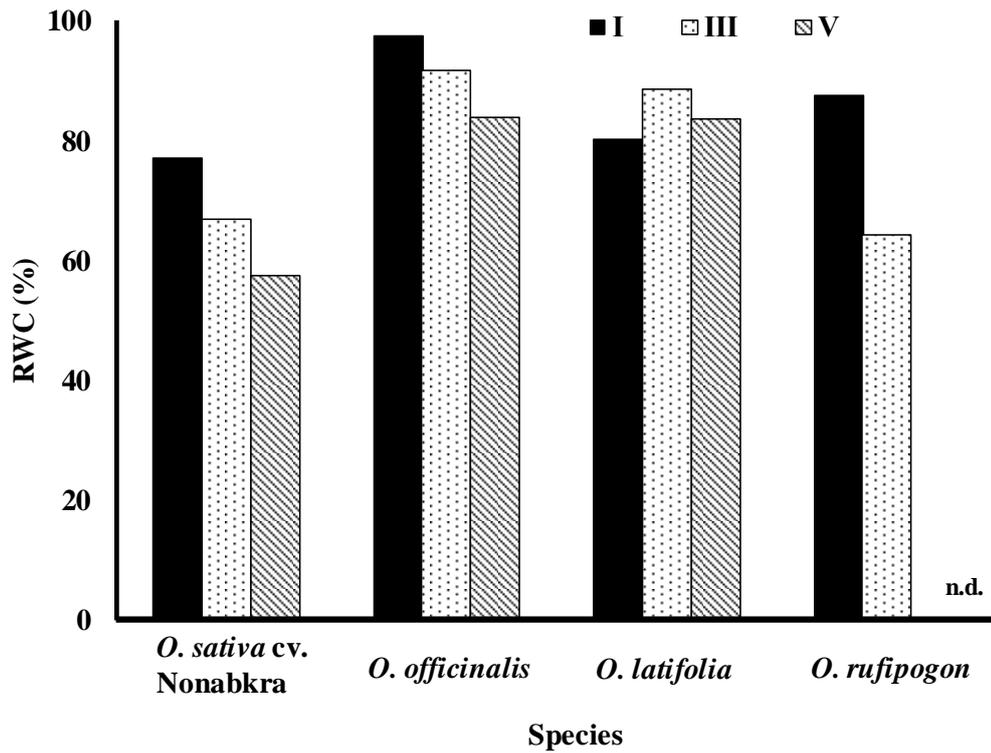


Fig. 2-3. Effect of NaCl treatment on RWC of leaf in different positions of four *Oryza* species (80 days after seeding).

I : The top leaf, III : The third leaf, V : The 5th leaf, n.d.: non deta.
 n = 4, Values indicate the percentage to the control.

Table 2-4. Effect of NaCl treatment on root water content, leaf blade water content and leaf sheath water content of five *Oryza* species (92 days after seeding).

Species	Leaf blade (%)		Leaf sheath (%)		Root (%)	
	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl
<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	73.2 ± 0.7	72.5 ± 0.3 ab	82.0 ± 0.6	84.0 ± 1.4 a	91.1 ± 0.4	93.2 ± 0.7 a
<i>O. officinalis</i>	68.3 ± 3.1	70.2 ± 0.7 b	77.5 ± 1.2	81.2 ± 0.5 ab	89.9 ± 0.4	91.5 ± 0.5 a
<i>O. latifolia</i>	74.4 ± 0.8	75.4 ± 0.8 a	79.5 ± 0.2	84.1 ± 0.4 a	91.3 ± 0.4	92.1 ± 0.4 a
<i>O. australiensis</i>	75.2 ± 0.9	73.0 ± 0.7 ab	83.7 ± 0.3	83.7 ± 0.8 a	91.5 ± 0.4	92.8 ± 0.3 a
<i>O. rufipogon</i>	69.0 ± 1.4	66.2 ± 1.1 c	78.4 ± 0.7	76.4 ± 2.3 b	93.2 ± 0.6	92.2 ± 0.2 a

Values are mean ± S.E. In parentheses values indicate the percentage to the control.

n = 3, Means with the same letter within each column are not significantly different at the 5% level, as determined by Tukey's test.

Table 2-5. Effect of NaCl treatment on proline content of leaf in different positions of four *Oryza* species (81 days after seeding).

Species	NaCl	Proline ($\mu\text{mol} / \text{gFW}$)			
		I		III	
<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	0 mM	66.4 \pm	7.7 b (100)	69.5 \pm	9.0 a (100)
	50 mM	188.3 \pm	17.9 a (283)	179.9 \pm	37.0 a (259)
	100 mM	226.8 \pm	45.4 a (341)	350.5 \pm	168.0 a (505)
<i>O. officinalis</i>	0 mM	73.2 \pm	6.5 a (100)	102.8 \pm	10.1 a (100)
	50 mM	125.7 \pm	27.7 a (172)	197.9 \pm	6.0 a (193)
	100 mM	75.8 \pm	15.2 a (104)	648.3 \pm	426.8 a (631)
<i>O. latifolia</i>	0 mM	46.6 \pm	4.7 b (100)	45.2 \pm	5.3 b (100)
	50 mM	59.0 \pm	3.5 b (126)	165.3 \pm	77.2 b (366)
	100 mM	963.4 \pm	269.3 a (2065)	1416.2 \pm	567.7 a (3136)
<i>O. rufipogon</i>	0 mM	63.4 \pm	6.5 a (100)	51.9 \pm	2.9 a (100)
	50 mM	115.8 \pm	9.3 a (183)	136.8 \pm	12.8 a (264)
	100 mM	169.6 \pm	67.6 a (268)	130.0 \pm	14.4 a (251)

I : The top leaf, III : The third leaf

Values are mean \pm S.E. In parentheses values indicate the percentage to the control. n = 4, Means with the same letter within each column are not significantly different at the 5% level, as determined by Fisher's Protected LSD test.

2-4. 考察

1) 乾物重および生長解析

播種後 92 日における乾物重の相対値では，*O. officinalis* および *O. latifolia* は，耐塩性品種である Pokkali と比較し，塩ストレスによる地上部乾物重の低下が少なかった (Table 2-1). これまでに，イネは土壤中に NaCl が 50 mM 以上存在すると生長が低下することが明らかにされている (間藤 1991, 趙ら 1995). 本研究では 12 dS m⁻¹ (約 100 mM) の塩処理を行っており，50 mM より強い塩ストレス下でも，*O. officinalis* および *O. latifolia* は栽培イネの Pokkali よりも乾物生産を低下させなかった. また，播種後 80 日における塩ストレス下の *O. officinalis* の RGR は，耐塩性品種の Nonabokra より低下程度は低かった (Table 2-3). このことから，*O. officinalis* は，栽培イネよりも NaCl に対する生長阻害が少ない，すなわち乾物生産面から評価すると，耐塩性が高いことが明らかになった.

塩ストレスを受けた植物は，茎葉組織に影響を受ける. 塩ストレス下のイネは，葉身の伸長が抑制され，生長が阻害される (Makihara *et al.* 1999). 塩処理後の葉身乾物重の相対値では，*O. officinalis* および *O. latifolia* は，耐塩性品種である Pokkali より低下程度は低かった (Table 2-1). 塩ストレス下の *O. officinalis* および *O. latifolia* における葉数および葉面積は，耐塩性品種である Pokkali より低下程度は低かった (Table 2-2). LAR では，*O. officinalis* は，耐塩性品種の Nonabokra と同等の相対値を示した (Table 2-3). このことから，*O. officinalis* は，塩ストレスによる葉身への影響が少ないことが明らかとなった. すなわち，塩ストレス下でも *O. officinalis* が乾物生産を高く維持できることは，光合成器

官である葉身へ塩ストレスへのダメージが少ないことが一つの要因であることが示唆された。

RGR は, NAR と LAR の積からなるため, 植物の生長速度への影響を, 葉面積あたりの同化産物を蓄積する能力 (NAR) によるものか, 個体あたりの葉量 (LAR) によるものかを解析することができる。本研究において, いずれの種も RGR と NAR の関係および RGR と LAR の関係では, 高い正の相関を示した (Fig. 2-1, Fig. 2-2)。すなわち, 供試材料の RGR の変化は, NAR および LAR のどちらの変化にも関わるようになった。塩ストレス下の *O. officinalis* を NAR および LAR の相対値をみると, LAR より NAR が低下した (Table 2-3)。また, RGR と NAR の相関係数が $r = 0.95$ であるのに対し, RGR と LAR の相関係数は $r = 0.67$ であった (Fig. 2-1, Fig. 2-2)。このことから, *O. officinalis* における RGR の変化は, LAR より NAR の変化によることが明らかとなった。従って, 塩ストレスによって *O. officinalis* の RGR が低下したことは, LAR の低下よりも NAR の低下によることが示唆された。一方で, 耐塩性品種である Nonabokra よりも RGR の低下程度が低かったことは, 塩ストレス下でも NAR をあまり低下させないことが一つの要因であることが示唆された。

2) 葉身水分含有率

イネは, 塩ストレスを受けると, 根による水分の吸収が滞り, 植物体内は水分ストレスを受ける (Munns and Tester 2008)。水分ストレスは, 植物の葉茎部に影響を及ぼす。葉の水ポテンシャルが低下すると, 葉緑体内の酵素活性が低下することや, 葉緑体自身の体積が減少し, 内部構

造の形態変化を引き起こす (寺島 2001). 播種後 92 日における *O. officinalis* および *O. latifolia* の葉身水分含有率は, 対照区に比べ塩処理区で高くなる傾向を示した (Table 2-4). 播種後 80 日における *O. officinalis* および *O. latifolia* の葉身 RWC は, Nonabokra で最も高い値を示した第 I 葉よりも, すべての葉位で高い値を示した (Fig. 2-3). このことは, *O. officinalis* および *O. latifolia* は塩ストレスを受けても, 水分ストレスによる生長の抑制を回避していることが示唆された. また, *O. officinalis* の葉位別 RWC では, 最上位展開葉で最も高い値を示した (Fig. 2-3). すなわち, 光合成が盛んに行われる最上位葉で水分を優先的に維持している可能性が考えられた. このことは, 塩ストレス下でも, *O. officinalis* が積極的に葉身の水分保持を行うことで, NAR を高く維持しているものと考えられた.

3) プロリン含量

アブラナ科の中には, 塩ストレスをうけると葉を厚くし, それに伴い葉内水分を保持する機構をもつ種がある (Vos *et al.* 2013). また, 細胞質内に適合溶質や液胞内にナトリウムを蓄積することによって葉内水分を保持する機構をもつ植物もある (Munns and Tester 2008). 耐塩性を有するイネは, 無処理の個体より塩処理下で適合溶質であるプロリンを体内に約 29 倍蓄積することが明らかになっており, 高いプロリンの合成能力が耐塩性獲得に重要であると報告されている (吉羽ら 1997).

Nakamura *et al.* (2002) は, 塩ストレスを受けた *O. latifolia* は, 葉内にプロリンを合成および蓄積し, 浸透圧調節を行うことで水分ストレスを回避している可能性を示唆した. 本研究では, 全ての種で, 塩ストレスに

よって葉身プロリン含量が増加することが明らかとなった (Table 2-5). 塩ストレス下での *O. officinalis* および *O. latifolia* の葉身水分含量は, 耐塩性栽培イネより高い値を示した (Table 2-4). このことは, 塩ストレスを受けた *O. officinalis* および *O. latifolia* における葉身の水分を保持するために, 葉身内でプロリンを合成および蓄積することが関わっている可能性が考えられた.

以上をまとめると, 野生稻 *O. officinalis* は, 塩ストレスを受けても, 耐塩性栽培イネより地上部乾物重および **RGR** の低下程度は低かった. このことから, *O. officinalis* は耐塩性栽培イネより高い耐塩性を有すること明らかとなった. *O. officinalis* が高い塩耐性を示した要因として, 塩ストレス下でも, 耐塩性栽培イネより光合成器官である葉身へのダメージが少ないことが示唆された. 加えて, *O. officinalis* は塩ストレス下でも葉身の水分保持力が高く, 水分保持には適合物質であるプロリンの細胞内蓄積が関わっている可能性があることが考えられた. 葉身の水分を塩ストレス下でも高く維持できたため, 光合成器官が水分ストレスを受けにくい状態であり, そのことが **NAR** の低下, すなわち光合成能力の低下を抑制している可能性があることが示唆された.

2-5. 摘要

本章では, *O. officinalis* の乾物生産および水分保持能力からみた耐塩性を評価するために, 塩ストレス下における各器官の乾物重および水分含有率, 葉数, 葉面積, 葉身のプロリン含量および生長解析法による **RGR**, **NAR** および **LAR** を測定した. その結果を耐塩性野生稻 *O. latifolia*, 耐

塩性栽培イネ *O. sativa* L. (Pokkali, Nonabokra) および塩感受性野生稻 *O. rufipogon* と比較した。得られた結果は以下の通りである。

- 1). 塩ストレスを受けた *O. officinalis* および *O. latifolia* は、耐塩性栽培イネ (Pokkali, Nonabokra) と比較し、地上部乾物重および RGR の低下程度は低かった (Table 2-1, Table 2-3)。このことから、*O. officinalis* は、耐塩性品種よりも乾物生産を維持し、*O. latifolia* と同等の高い耐塩性を有することが明らかとなった。
- 2). 塩ストレス下の *O. officinalis* における RGR の低下要因は、LAR より NAR が主な要因であることが示唆された (Fig. 2-1, Fig. 2-2)。
- 3). 塩ストレスを受けた *O. officinalis* において、葉数、葉面積および LAR の低下程度は耐塩性品種よりも低かった (Table 2-2, Table 2-3)。このことから、*O. officinalis* は、光合成器官である葉身へ塩ストレスの影響は少ないことが示唆された。
- 4). *O. officinalis* における各器官の水分含有率は、対照区より塩処理区で増加する傾向にあった (Table 2-4)。RWC は Nonabokra よりすべての葉位で高い値を示した (Fig. 2-3)。このことから、*O. officinalis* は塩ストレスを受けても、葉身の水分を維持しようとすることが示唆された。
- 5). *O. officinalis* の葉身プロリン含量は塩処理によって増加したことから (Table 2-5)、塩ストレス下での葉身水分保持にはプロリンの蓄積が関与していることが推察された。

第3章 塩ストレス条件下における *O. officinalis* の Na⁺および K⁺吸収特性

3-1. はじめに

前章では、*O. officinalis* の乾物生産面から耐塩性の評価を行った。その結果、塩ストレスを受けた *O. officinalis* は、地上部乾物重および RGR をあまり低下させず、耐塩性野生稻である *O. latifolia* と同等の高い耐塩性を有することが明らかとなった。高い耐塩性を有する要因として、光合成器官である葉身への塩ストレスの影響を少なくすることで、乾物生産を維持していることが示唆された。

一般に、植物体内に Na⁺が多量に存在すると、細胞外の水ポテンシャルが低下し、細胞質の脱水が誘発され、原形質分離が起こる。あわせて、細胞内への Na⁺流入が起こり、K⁺摂取が阻害されると、K⁺および Ca⁺などのイオン含量に影響を及ぼし、イオンバランスの崩壊や細胞内の酵素活性の阻害を引き起こす (吉田 2005)。イネでは、塩処理下で栽培した場合、葉組織内の Na⁺含量および Na⁺/K⁺が増加し、葉内の水分含量、イオンバランスおよび生長に影響を及ぼすことが報告されている (Niu *et al.* 1995, 趙ら 1996, Arunroj *et al.* 2004, Siringam *et al.* 2009)。

栽培イネでは耐塩性に品種間差があることはすでに明らかになっており、耐塩性を有する品種は、根において Na⁺を地上部へ移行させないよう選択的排除を行っている (Tsuchiya *et al.* 1994, Basu *et al.* 2010)。また地上部への Na⁺吸収には LAR が関与しており、RGR が大きい品種では地上部 Na⁺吸収量が少ないことが知られている (Akita and Cabuslay 1990)。一方、野生稻についての Na⁺の影響に関する報告は少ない。仲村

ら (2005a) は、塩ストレス下の *O. latifolia* は耐塩性品種より葉身に Na^+ を多く吸収・蓄積するが、乾物生産の低下は少ないことを明らかにし、*O. latifolia* の耐塩性機構は、塩類の排除より、塩類が体内に過剰に存在しても影響が少ないような、塩分に対する耐性が高いことを示唆している。*O. officinalis* も *O. latifolia* と同等の耐塩性を有することを前章で明らかにしたが、塩ストレス下の Na^+ の動態については未調査である。

そこで本章では、塩ストレスを受けた *O. officinalis* 体内の Na^+ および K^+ の動態を調査し、 Na^+ および K^+ が *O. officinalis* の生長へもたらす影響を評価した。

3-2. 材料および方法

1) 各器官における Na^+ および K^+ 含有率の測定

供試材料は、第 2 章において、播種を 2010 年 6 月 26 日に行った供試個体、すなわち地上部および各器官の乾物重および水分含有率を測定した個体を使用した。栽培条件および塩処理方法は第 2 章と同様である。塩水処理開始後 32 日目（播種後 92 日）に、供試個体を蒸留水で洗浄し、器官ごとに細かく切断し、 80°C で 72 時間以上通風乾燥した。乾燥した試料は粉砕機（ミルミキサー MR-280, 山善）を用い 1mm^2 以下となるまで細かく粉砕した。粉砕試料 0.25g に対し、1 規定の硝酸を 50ml 加え、 80°C で 24 時間静置した。その後抽出液を孔径 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターで濾過し、さらに濾過液を超純水で 10 倍に希釈したものを分析した。測定には、ICP-AES（ICP-9000, 島津）を用い、 Na^+ および K^+ を定量した。

2) 葉位別における Na^+ および K^+ 含有率の測定

供試材料は、第2章において、播種を2011年5月11日に行った供試個体、すなわち葉身のプロリン含量を測定した個体を使用した。栽培条件および塩処理方法は第2章に従った。測定葉は、主稈の最上位完全展開葉（第I葉）、第III葉および第V葉を用いた。葉身からのNa⁺およびK⁺抽出方法は前述と同様に行い、ICP-AES（ICP-9000, 島津）を用いてNa⁺およびK⁺含有率を測定した。

3-3. 結果

1) 各器官のNa⁺およびK⁺含有率

Table 3-1 に、播種後92日の *Oryza* 属5種の各部位におけるNa⁺含有率を示した。対照区を100%とした場合の塩処理区の相対値をみると、葉身では、*O. officinalis* で2787%であり、他種より有意に高かった。葉鞘の相対値は、*O. latifolia* で3020%であり、他種より有意に高かった。根の相対値は、Pokkali で423%であり、他種より有意に高かった。葉身におけるNa⁺含有率の相対値は、*O. officinalis* および *O. latifolia* で他の種よりも高かった。

Table 3-2 に、播種後92日の *Oryza* 属5種の各部位におけるK⁺含有率を示した。対照区を100%とした場合の塩処理区の相対値をみると、葉身では、*O. rufipogon* で90%であり、他種より有意に低かった。Pokkali, *O. officinalis*, *O. latifolia* および *O. australiansis* は、100%から150%程度であった。葉鞘の相対値は、*O. rufipogon* で71%と有意に最も低く、Pokkali で256%と有意に最も高い値を示した。*O. rufipogon* 以外の種の葉身では、対照区に比べ塩処理区でK⁺含有率が高かった。

Table 3-1. Effect of NaCl treatment on Na⁺ content in leaf blade, leaf sheath and root of five *Oryza* species (92 days after seeding).

Species	Leaf blade (% DW)		Leaf sheath (% DW)		Root (% DW)	
	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl
<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	0.44 ± 0.01	0.70 ± 0.01 (159) c	2.19 ± 0.01	3.49 ± 0.25 (159) c	1.54 ± 0.04	6.52 ± 0.07 (423) a
<i>O. officinalis</i>	0.13 ± 0.01	3.67 ± 0.63 (2787) a	0.88 ± 0.01	7.13 ± 0.14 (811) b	1.75 ± 0.04	5.59 ± 0.14 (320) bc
<i>O. latifolia</i>	0.26 ± 0.12	4.17 ± 0.31 (1574) b	0.36 ± 0.01	10.81 ± 0.61 (3020) a	2.17 ± 0.18	7.70 ± 0.03 (355) b
<i>O. australiensis</i>	1.16 ± 0.04	4.98 ± 0.43 (431) c	4.66 ± 0.12	12.55 ± 0.14 (269) c	1.89 ± 0.15	7.04 ± 0.52 (373) b
<i>O. rufipogon</i>	0.70 ± 0.04	4.80 ± 0.18 (683) bc	2.66 ± 0.21	11.33 ± 0.71 (426) c	1.99 ± 0.10	5.56 ± 0.21 (280) c

Values are mean ± S.E. In parentheses values indicate the percentage to the control.

n = 3, Means with the same letter within each column are not significantly different at the 5% level, as determined by Tukey's test.

Table 3-2. Effect of NaCl treatment on K⁺ content in leaf blade, leaf sheath and root of five *Oryza* species (92 days after seeding).

Species	Leaf blade (% DW)		Leaf sheath (% DW)		Root (% DW)	
	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl
<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	2.77 ± 0.14	4.20 ± 0.12 (152) a	2.63 ± 0.15	6.75 ± 0.08 (256) a	0.47 ± 0.02	0.90 ± 0.03 (193) b
<i>O. officinalis</i>	3.06 ± 0.02	4.06 ± 0.06 (133) a	3.89 ± 0.06	6.31 ± 0.09 (162) b	0.84 ± 0.01	1.57 ± 0.17 (187) b
<i>O. latifolia</i>	3.25 ± 0.03	4.35 ± 0.11 (134) a	3.78 ± 0.11	3.24 ± 0.38 (86) cd	0.90 ± 0.02	1.40 ± 0.03 (156) b
<i>O. australiensis</i>	3.27 ± 0.11	3.69 ± 0.27 (113) a	2.26 ± 0.06	2.42 ± 0.07 (107) c	0.48 ± 0.03	1.73 ± 0.28 (364) a
<i>O. rufipogon</i>	2.61 ± 0.12	2.34 ± 0.06 (90) b	3.03 ± 0.05	2.16 ± 0.02 (71) d	0.48 ± 0.03	0.61 ± 0.01 (126) b

Values are mean ± S.E. In parentheses values indicate the percentage to the control.

n = 3, Means with the same letter within each column are not significantly different at the 5% level, as determined by Tukey's test.

Table 3-3 に、播種後 92 日の *Oryza* 属 5 種の各部位における Na^+/K^+ を示した。塩処理によりすべての野生稲のどの部位においても、 Na^+/K^+ は対照区に対し高い値を示した。Pokkali では、塩処理区の根で最も高い値を示し、葉身では対照区と塩処理区で有意な差が認められなかった。

2) 葉位別の Na^+ および K^+ 含有率

Table 3-4 に、播種後 81 日目における *Oryza* 属 4 種の葉位別 Na^+ 含有率を示した。*O. officinalis*, *O. latifolia* および *O. rufipogon* におけるすべての葉位の 100 mM 区は、対照区に比べ有意に高い値を示した。100 mM 区での葉位別 Na^+ 含有率をみると、Pokkali では、第 V 葉、第 I 葉、第 III 葉の順に、*O. rufipogon* では、第 I 葉、第 V 葉、第 III 葉の順に、*O. officinalis* および *O. latifolia* では、第 V 葉、第 III 葉、第 I 葉の順に高い値を示した。

Table 3-5 に、播種後 81 日目における葉位別の K^+ 含有率を示した。Pokkali では、第 V 葉以外の塩処理区で、対照区に比べ高い値を示した。*O. latifolia* では塩処理区と対照区でほぼ同等の値を示した。*O. officinalis* および *O. rufipogon* では対照区より塩処理区が低い値を示した。

Table 3-6 に、播種後 81 日目における *Oryza* 属 4 種の葉位別の Na^+/K^+ 比を示した。 Na^+/K^+ 比は、Pokkali ではすべての葉位において対照区と塩処理区はほぼ同等の値を示した。一方、野生稲では塩処理区で上昇した。

3-4. 考察

1) 各器官の Na^+ および K^+ 含有率

Table 3-3. Effect of NaCl treatment on Na⁺/K⁺ ratio in leaf blade, leaf sheath and root of five *Oryza* species (92 days after seeding).

species	Leaf blade			Leaf sheath			Root		
	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	
	<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	0.16	0.17	0.83	0.52*	3.31	7.25*		
<i>O. officinalis</i>	0.04	0.90*	0.23	1.13*	2.08	3.55*			
<i>O. latifolia</i>	0.08	0.96*	0.09	3.33*	2.42	5.50*			
<i>O. australiensis</i>	0.35	1.35*	2.07	5.19*	3.97	4.07			
<i>O. rufipogon</i>	0.27	2.03*	0.88	5.24*	4.11	9.14*			

n = 3, *: Indicates significance at 5% level, as determined by T test.

Table 3-4. Effect of NaCl treatment on Na⁺ content of leaf in different positions of four *Oryza* species (81 days after seeding).

Species	NaCl	Na ⁺ content (% DW)				
		I	III	V		
<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	0 mM	0.158 ± 0.017 b (100)	0.122 ± 0.029 a (100)	0.272 ± 0.068 ab (100)		
	50 mM	0.223 ± 0.038 b (141)	0.079 ± 0.014 a (65)	0.252 ± 0.017 b (93)		
	100 mM	0.417 ± 0.048 a (264)	0.115 ± 0.021 a (94)	0.478 ± 0.093 a (175)		
<i>O. officinalis</i>	0 mM	0.171 ± 0.042 b (100)	0.055 ± 0.007 b (100)	0.170 ± 0.009 b (100)		
	50 mM	1.163 ± 0.623 a (679)	1.387 ± 0.432 a (2541)	1.543 ± 0.321 b (909)		
	100 mM	1.063 ± 0.028 a (622)	1.293 ± 0.210 a (2368)	5.172 ± 1.580 a (3047)		
<i>O. latifolia</i>	0 mM	0.133 ± 0.009 b (100)	0.175 ± 0.022 b (100)	0.154 ± 0.013 b (100)		
	50 mM	0.264 ± 0.089 b (199)	0.591 ± 0.068 b (338)	1.104 ± 0.437 b (716)		
	100 mM	0.859 ± 0.239 a (647)	2.204 ± 0.854 a (1261)	4.882 ± 0.872 a (3167)		
<i>O. rufipogon</i>	0 mM	0.117 ± 0.010 b (100)	0.144 ± 0.005 b (100)	0.136 ± 0.011 b (100)		
	50 mM	0.421 ± 0.112 b (359)	0.248 ± 0.089 ab (172)	0.267 ± 0.073 b (196)		
	100 mM	0.923 ± 0.218 a (787)	0.583 ± 0.184 a (405)	0.821 ± 0.205 a (604)		

I : The top leaf, III : The third leaf, V : The 5th leaf.

Values are mean ± S.E. In parentheses values indicate the percentage to the control.

n = 4, Means with the same letter within each column are not significantly different at the 5% level, as determined by Fisher's Protected LSD test.

Table 3-5. Effect of NaCl treatment on K⁺ content of leaf in different positions of four *Oryza* species (81 days after seeding).

Species	NaCl	K ⁺ content (% DW)				
		I	III	V		
<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	0 mM	3.340 ± 0.136 b (100)	3.014 ± 0.314 b (100)	5.814 ± 0.116 b (100)		
	50 mM	4.187 ± 0.319 a (125)	4.769 ± 0.240 a (158)	7.845 ± 0.438 a (135)		
	100 mM	4.112 ± 0.071 a (123)	5.208 ± 0.392 a (173)	5.739 ± 0.173 b (99)		
<i>O. officinalis</i>	0 mM	6.722 ± 0.394 a (100)	7.344 ± 0.212 a (100)	5.462 ± 0.162 a (100)		
	50 mM	5.123 ± 0.652 b (76)	5.661 ± 0.873 ab (77)	4.479 ± 0.709 a (82)		
	100 mM	4.967 ± 0.310 b (74)	5.369 ± 0.297 b (73)	4.434 ± 0.370 a (81)		
<i>O. latifolia</i>	0 mM	4.253 ± 0.280 b (100)	3.844 ± 0.149 a (100)	4.136 ± 0.163 a (100)		
	50 mM	3.977 ± 0.388 b (94)	4.133 ± 0.319 a (106)	4.321 ± 0.773 a (104)		
	100 mM	5.912 ± 0.363 a (139)	3.942 ± 0.115 a (101)	2.496 ± 0.220 b (60)		
<i>O. rufipogon</i>	0 mM	3.572 ± 0.212 a (100)	4.328 ± 0.397 a (100)	4.959 ± 0.324 a (100)		
	50 mM	3.019 ± 0.113 b (85)	3.764 ± 0.320 ab (87)	4.781 ± 0.359 a (96)		
	100 mM	2.949 ± 0.152 b (83)	3.277 ± 0.133 b (76)	4.539 ± 0.223 a (92)		

I : The top leaf, III : The third leaf, V : The 5th leaf.

Values are mean ± S.E. In parentheses values indicate the percentage to the control. n = 4, Means with the same letter within each column are not significantly different at the 5% level, as determined by Fisher's Protected LSD test.

Table 3-6. Effect of NaCl treatment on Na⁺/K⁺ ratio of leaf in different positions of four *Oryza* species (81 days after seeding).

Species	NaCl	I	III	V
<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	0 mM	0.05 b	0.04 a	0.05 b
	50 mM	0.06 b	0.02 b	0.03 b
	100 mM	0.10 a	0.02 ab	0.08 a
<i>O. officinalis</i>	0 mM	0.03 a	0.01 a	0.03 b
	50 mM	0.30 a	0.25 a	0.34 b
	100 mM	0.21 a	0.24 a	1.17 a
<i>O. latifolia</i>	0 mM	0.03 b	0.05 b	0.05 a
	50 mM	0.07 ab	0.14 ab	0.39 b
	100 mM	0.15 a	0.57 a	2.08 a
<i>O. rufipogon</i>	0 mM	0.03 b	0.03 a	0.03 b
	50 mM	0.14 b	0.07 ab	0.06 b
	100 mM	0.31 a	0.18 a	0.19 a

I : The top leaf, III : The third leaf, V : The 5th leaf.

n = 4, Means with the same letter within each column are not significantly different at the 5% level, as determined by Fisher's Protected LSD test.

イネは培地の Na^+ 濃度が高くなると、地上部の Na^+ 含量も高くなり、生長が阻害される (Yeo *et al.* 1985, 趙ら 1995). 本研究では、播種後 92 日における各部位の Na^+ 含有率は、どの供試材料も、対照区に比べ塩処理区において、葉身、葉鞘および根に Na^+ を多く蓄積した (Table 3-1). また塩ストレスを受けた野生稲は、耐塩性栽培イネの Pokkali に比べ、葉身に多くの Na^+ を吸収、蓄積することが明らかとなった (Table 3-1). 地上部への Na^+ 吸収には、根における Na^+ 選択能力と LAR が関係している (Akita and Cabuslay 1990). 一方で、*O. officinalis* および *O. latifolia* は、塩ストレスを受けても LAR は Pokkali より高く維持し、 Na^+ を多く吸収した. このことから、両種の根における Na^+ 選択能力は耐塩性栽培イネに比べ低いことが考えられた.

植物体内において、 Na^+ および Cl^- の過剰は原形質内のイオンバランスを乱し、酵素タンパク質と膜に特有の影響をもたらす. それが原因により窒素代謝やタンパク質代謝に影響を及ぼす (Larcher 2003). 塩に強い作物の耐塩性機構は、塩を体内に取り込まないようにする塩分制御と、塩類を取り込んだことによって起こるイオンの毒性と浸透圧の上昇に耐える塩分耐性の二つに分類される (Levitt 1992, Larcher 2003). 耐塩性を持つ作物は、プロリンなどの適合物質を合成し、細胞の浸透圧を調整することや、 Na^+ を液胞内や特殊な細胞 (ブラッダー細胞等) へ封じ込めることで、塩ストレスの影響を回避することが知られている (東江 2004). 耐塩性栽培イネの Pokkali は、地上部に Na^+ を転流させない塩分制御の耐塩性機構を有することが報告されており (Akita and Cabuslay 1990, Lee *et al.* 2003, Anil *et al.* 2005), 本実験結果でも Pokkali の Na^+ 含有率は、葉身 < 葉鞘 < 根の順を示し、これらの結果と一致した.

一方、仲村ら (2005a) は、*O. latifolia* の 10 葉齢期における耐塩性を評価した結果、同種は耐塩性栽培イネ品種よりも地上部への Na^+ 吸収量が多いにも関わらず、生存率は耐塩性栽培種よりも高く、栽培イネの耐塩性機構とは異なる機構を有していることを明らかにした。本研究においても、*O. officinalis* は光合成をする主要な器官である葉身に多くの Na^+ を吸収、蓄積するにも関わらず、耐塩性栽培イネ Pokkali よりも地上部における乾物生産の低下程度は低かった。このことから、*O. officinalis* においても *O. latifolia* と同様、塩分耐性の耐塩性機構を有することが明らかとなった。これまでの報告で、植物における Na^+ 害に対する応答として、1) 細胞質に侵入した Na^+ の細胞外への排出と、2) 液胞内への隔離が考えられており、それぞれに特異的なイオン輸送体が関係していることが知られている (魚住 2011)。*O. officinalis* および *O. latifolia* において、地上部に Na^+ を多量に吸収、蓄積するにも関わらず、乾物生産の低下が少なかったことは、細胞内の Na^+ を、細胞外へ排出する輸送体および液胞へ輸送する輸送体が関わっており、細胞内の Na^+ 害を回避している可能性があると考えられた。

趙ら (1996) は、塩水処理した水稻の各部位において、根では K^+ 濃度が低下し、葉身では増加することを明らかにした。Siringam *et al.* (2009) は、塩ストレスを受けたイネの K^+ の吸収量は、耐塩性品種では増加するが、感受性品種では変化しないことを明らかにした。本研究では Pokkali, *O. officinalis* および *O. latifolia* の葉身で、塩水処理後に Na^+ と同時に K^+ 含有率も高くなる結果となった (Table 3-2)。気孔の開閉は、 K^+ 濃度とも関係しており、孔辺細胞内に K^+ が多く蓄積されると気孔が開く (Humble and Raschke 1971)。 K^+ が欠乏すると、蒸散制御や水分吸収が抑制され、

水ストレスの影響を受けやすくなる (Tanguilig *et al.* 1987, Nandwal *et al.* 1998). 塩ストレス下で *O. officinalis* および *O. latifolia* における葉身水分含有率が低下しなかったことは、葉身 K^+ 含有率が増加したことと関係しているかもしれない。

Pokkali の葉鞘および葉身の Na^+/K^+ は、塩水処理による影響はみられなかった (Table 3-3). 一方, *O. officinalis* および *O. latifolia* の葉身では、対照区に対し塩処理区で Na^+/K^+ が増加した (Table 3-3). Sese and Tobita (2000) および Siringam *et al.* (2009) は、塩ストレスを受けたイネ葉身の Na^+/K^+ は増加することを示し、本研究はこれらと同様な結果であった。Matoh *et al.* (1986), 山内ら (1987) は、高濃度の NaCl 環境下でイネを栽培した際、生育を阻害する要因が、地上部の Na^+ 濃度と関係があることを示唆した。また、 Na^+ が植物体内へ過剰吸収されると、光合成の阻害、細胞質内の酵素活性の低下などを引き起こすことが知られている (Niu *et al.* 1995). このことから, *O. officinalis* および *O. latifolia* では、 Na^+ と同時に K^+ を吸収することにより、 Na^+ が及ぼす細胞質内への影響を軽減させている可能性があると考えられた。

2) 葉位別の Na^+ および K^+ 含有率

前述のとおり、塩ストレスによって *O. officinalis* および *O. latifolia* の地上部には、 Na^+ が多く蓄積することが明らかとなった。葉位別の Na^+ では、供試野生稲は播種後 81 日ではどの葉位でも対照区に比べ Na^+ 含有率は増加した (Table 3-4). 塩ストレスを受けたイネは、上位葉より下位葉 (老化葉) に Na を多く蓄積することがわかっており (Sharma 1986), *O. officinalis* および *O. latifolia* においても同様な結果を示した。一方、

Pokkali および *O. rufipogon* における葉位別の Na^+ 含有率は, Sharma (1986) とは異なり必ずしも最上位葉で Na^+ 含有率が最も低い値とはならなかった (Table 3-4). 近年, Na^+ を体内に取り込む輸送体 (AtHKT, OsHKT など) が同定され, 細胞内外の浸透圧調節のため積極的に細胞内に Na^+ を取り込む働きをしていることが示唆されている (魚住 2011). Pokkali および *O. rufipogon* において, Na^+ 蓄積様式が従来のイネとは異なる結果となったのは, 下位葉よりも上位葉で, Na^+ を体内に取り込む輸送体が多く発現および機能した可能性があると考えられる. 塩処理した Pokkali および *O. rufipogon* において, 葉位別の Na^+ 輸送に関わる輸送体の活性については今後の検討課題である.

葉位別の K^+ 含有率では, Pokkali は第V葉を除くすべての塩処理区で対照区よりも高かった (Table 3-5). これは, 個葉レベルでも Na^+ 害を回避するため K^+ を積極的に取り込んでいる可能性があることが考えられた. 一方, *O. officinalis* における個葉の K^+ 含有率では, 対照区より塩処理区が低い値となり (Table 3-5), 葉身全体を調査した場合と異なる結果となった. 孔辺細胞内に K^+ が多く蓄積すると, 気孔が開くことは報告されている (Humble and Raschke 1971). 塩ストレス下でも *O. officinalis* の葉身水分は保持されていたことはすでに明らかになっている (Table 2-4, Fig. 2-3). これは, 光合成の盛んな最上位展開葉へ K^+ を転流させずに, 気孔を閉鎖させ, 蒸散を抑え水分を保持していた可能性が考えられた. このことから, 主稈の個葉に対して K^+ を転流させるのではなく, 他所に転流させていることが推察された.

塩ストレス下の *O. officinalis* における主稈の個葉内では Na^+/K^+ は増加し, イオンバランスは崩れている状態であると考えられる. しかし, そ

れでも乾物生産力を低下させなかったことは、葉身細胞内の代謝器官が Na^+ 害に対して耐性がある、もしくは代謝器官が Na^+ 害を直接受けないように別場所へ隔離している可能性が考えられる。 *O. officinalis* における葉身の K^+ 輸送に関わる生理反応について、特に細胞膜および液胞膜上の K^+ 輸送に関わる輸送体の活性については今後精査する必要がある。

以上のことから、 *O. officinalis* は、塩ストレスによって地上部に Na^+ を多く吸収、蓄積することが明らかになった。一方で、耐塩性栽培イネより乾物生産は低下しなかったことから、生長に関して Na^+ 害に対する耐性が高いことが示唆された。また *O. officinalis* は、個葉レベルでも Na^+ を多く吸収、蓄積することが明らかとなった。このことは、光合成器官である葉身に Na^+ が多量に存在しても、乾物生産を維持できることを示唆した。葉位別における Na^+ 挙動は、下位葉から上位葉へ優先的に Na^+ を蓄積することが明らかとなった。一方、 K^+ については、葉身全体では塩処理区で多く蓄積することが明らかとなったが、個葉レベルでは逆に塩処理区で対照区より少ない値となった。その生理的意義の解明のために、本研究で調査していない主稈の葉（第Ⅱ，Ⅳ，Ⅵ葉など）や、主稈に隣接する分けつの葉における K^+ 含有率についても調査する必要がある。

3-5. 摘要

本章では、塩ストレスを受けた *O. officinalis* における各器官の Na^+ 、 K^+ 含有率および Na^+/K^+ 、葉位別の Na^+ 、 K^+ 含有率および Na^+/K^+ について調査し、*O. officinalis* 体内の Na^+ および K^+ の動態について検討した。得られた結果は以下のとおりである。

- 1). *O. officinalis* における各器官の Na^+ 含有率は塩処理によって増加し、特に葉身 Na^+ 含有率は対照区の約 28 倍であった (Table 3-1)。このことから、*O. officinalis* は *O. latifolia* と同様に葉身に Na^+ を多く蓄積しても乾物生産を維持することが明らかとなった。
- 2). *O. officinalis* における個葉の Na^+ は下位葉から順に蓄積していくことが明らかとなり、従来のイネの蓄積様式と同様であった (Table 3-4)。
- 3). *O. officinalis* における各器官の K^+ 含有率は塩処理によって増加した (Table 3-2)。一方で、葉位別 K^+ 含有率は対照区より塩処理区で低かった (Table 3-5)。このことから、主稈とは別の葉に K^+ を転流させていることが推察された。
- 4). *O. officinalis* の各器官および葉位別の Na^+/K^+ は塩処理によって対照区より増加し、Pokkali とは違う反応を示した (Table 3-3, 3-6)。このことから、*O. officinalis* は葉内のイオンバランスが崩れても、葉身の水分保持や Na^+ を他所へ輸送するなど Na^+ 害からの回避行為をしている可能性があると考えられた。

第4章 塩ストレス下における *O. officinalis* の光合成能力

4-1. はじめに

前章までに、*O. officinalis* の Na^+ および K^+ の動態及び乾物生産の面から耐塩性の評価を行った。*O. officinalis* は塩ストレスを受けると地上部、葉身に多量の Na^+ を蓄積することが明らかとなったが、それでも地上部乾物重および RGR は、耐塩性栽培イネより低下程度は少なかった。このことは、*O. officinalis* は Na^+ 害を受けにくい、塩分耐性の耐塩性機構を有することが示唆された。また、*O. officinalis* が高い耐塩性を有する要因の一つに、光合成器官である葉身へ塩ストレスの影響が少ないこと、葉身水分を保持することが考えられた。すなわち、*O. officinalis* は、塩ストレス下でも光合成を行いやすい状態にあると考えられる。

光合成は乾物生産と密接に関係し、光合成能力の低下は乾物生産の低下を引き起こす要因となる。光合成は、大きく2つの系に分けることができる。1つは、電子伝達系と、もう1つは炭酸固定系である。電子伝達系では、光エネルギーを受け取ったクロロフィルは励起され電子を放出する。その電子は電子伝達系へと渡される。また光エネルギーによって光化学系が活性化し、水を分解することで電荷分離を行い、それらの電子を伝達して NADPH を生産する。また、チラコイド内外の H^+ の濃度勾配により ATP が生産される。炭酸固定系は、電子伝達系で生産された ATP、NADPH を利用して、カルビン・ベンソン回路により気孔から取り込んだ二酸化炭素を固定し、光合成の最終産物としてブドウ糖が生産され、個体の生長に活用される。

これまでに、塩ストレスを受けたイネは、葉身に Na^+ を蓄積し、光合成速度（炭酸固定速度）が低下する報告はいくつかある（Yeo and

Flowers 1983, Yeo *et al.* 1985). 光合成速度の低下要因は、葉内 CO₂ 濃度と光合成速度の低下程度を比較することによって、気孔開度による葉内への CO₂ 供給の減少による場合 (気孔要因) と、葉肉組織における光合成活性の低下による場合 (非気孔要因) とにわけることができる (斉藤・石原 1987). 塩ストレスを受け葉身の水分含量が低下したイネは、気孔の閉鎖に伴い気孔伝導度が低下することによって炭酸固定速度が減少することが報告されている (Sese and Tobita 2000). 野生稲では、塩処理した *O. latifolia* における光合成速度を測定したところ、耐塩性品種より低下程度は少ないことが報告されている (仲村ら 2005a).

一方、葉肉内部の光合成能力に対する塩ストレスの影響を調べるためには、気孔の影響を除去した光合成の活性を測定する必要がある. Ishii *et al.* (1977) は、高濃度の HCO₃⁻ を使用し、気孔の開閉に関係なく強制的に CO₂ を葉内へ取り込ませることで、気孔の影響を取り除いた O₂ 放出速度を測定する方法を確立した. 仲村ら (2005b) では、塩処理した *O. latifolia* における葉位別の O₂ 放出速度を、液相型酸素電極を用いて測定したところ、上位葉の O₂ 放出速度は塩ストレスの影響を受けにくいことを示した. しかし、*O. officinalis* については、塩ストレス下での炭酸固定速度および O₂ 放出速度は未調査である.

本章では、塩ストレスを受けた *O. officinalis* が、葉身に Na⁺ を多く蓄積したにも関わらず、乾物生産を高く保ったことに着目し、個葉の光合成能力を調査した. まず、塩ストレス下での光合成速度を測定し、炭酸固定系への塩ストレスの影響を調べた. 次に液相型酸素電極を用いて O₂ 放出速度を測定し、電子伝達系への塩ストレスの影響を調べた.

4-2. 材料および方法

1) 個葉の光合成速度, 葉内 CO₂ 濃度および気孔伝導度

供試材料は, 第 2 章において, 播種を 2010 年 6 月 26 日に行った供試個体を使用した. 栽培条件および塩処理方法は第 2 章と同様である. 測定には, 播種後 63, 67, 74 および 81 日 (塩水処理 3, 7, 14 および 21 日目) に達した供試材料の主稈最上位完全展開葉を用いた. 供試個体は, 測定前日に, 栽培に使用しているものと同様の水耕液が入った実験室内のバットに移動した. 測定の前処理として, 光源のメタルハライドランプ (東芝) で測定葉に 30 分程度光を照射した. 測定葉の中央部分について, 携帯型光合成測定装置 (SPB-H4, ADC 社)を用いて, 光合成速度, 気孔伝導度, 葉内 CO₂ 濃度を測定した. 測定条件は, 導入空気量 450 ml min⁻¹, 光強度は約 1500 μmol m⁻² s⁻¹ の飽和光, 葉温 30 ± 2°Cであった.

2) 個葉の O₂ 放出速度

供試材料は, 第 2 章において, 播種を 2011 年 5 月 11 日に行った供試個体を使用した. 栽培条件および塩処理方法は第 2 章と同様である. O₂ 放出速度の測定には, 液相型酸素電極 (Clark-type, Hansatech) を用いた. 測定葉は, 主稈の最上位完全展開葉 (第I葉), 第III葉および第V葉を用いた. 播種後 81 日目 (NaCl 処理 21 日目) に, 測定葉の中央部位 1cm² を切除し, 超純水に一晩浸漬した. その後 0.5 mM 硫酸カルシウムを含む 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.2) 緩衝液中でさらに細断し, アスピレータ (Aspiret Q-1, TAITEC) により葉内の空気を 4~5 分脱気した. 同じ緩衝液を含むキュベット内に脱気した葉片を入れ, ハロゲンランプ (WLT-40 500W, TAKAGI) で 5 分間照射後, 30 mM NaHCO₃ を添加し, 反応を開

始させた。反応開始後、溶液中の O₂ 濃度を測定し、これを単位時間当たりに換算することにより O₂ 放出速度とした。測定時における反応容器の循環水の温度は 25°C、光強度は 55000 lux とした。

3) 個葉のクロロフィル含量

O₂ 放出速度の測定葉を収集し、クロロフィル含量の測定に用いた。クロロフィル含量の測定は、Porr ら (1989) の方法に従った。すなわち、O₂ 放出速度の測定後、直ちに測定葉を回収し、N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) 3 ml が入った試験管に移し、冷蔵庫に 24 時間静置した、その後、分光光度計 (Ubest-35 型, 日本分光) を用いて、663.8 nm と 646.8 nm の波長の吸光度を測定した。クロロフィル a + b 含量は、663.8 nm と 646.8 nm の測定値をそれぞれ A^{646.8}, A^{663.8} として以下の式より算出した。

$$\text{クロロフィル a + b} = 17.67 \times A^{646.8} + 7.12 \times A^{663.8}$$

4-3. 結果

1) 個葉の光合成速度、葉内 CO₂ 濃度および気孔伝導度

Fig. 4-1 に、*Oryza* 属 5 種の光合成速度の推移を示した。塩水処理開始後 21 日目の光合成速度は、Pokkali および *O. rufipogon* では対照区に対し、塩処理区でそれぞれ 85% および 74% まで低下した。しかし *O. latifolia*, *O. australiensis* および *O. officinalis* ではそれぞれ 91%, 89% および 93% までの低下となった。塩処理区の推移では、*O. latifolia*, *O. australiensis* および *O. officinalis* は、塩水処理開始後 3 日目と 21 日目の光合成速度の差が少なく、対照区と同様な傾向を示した。

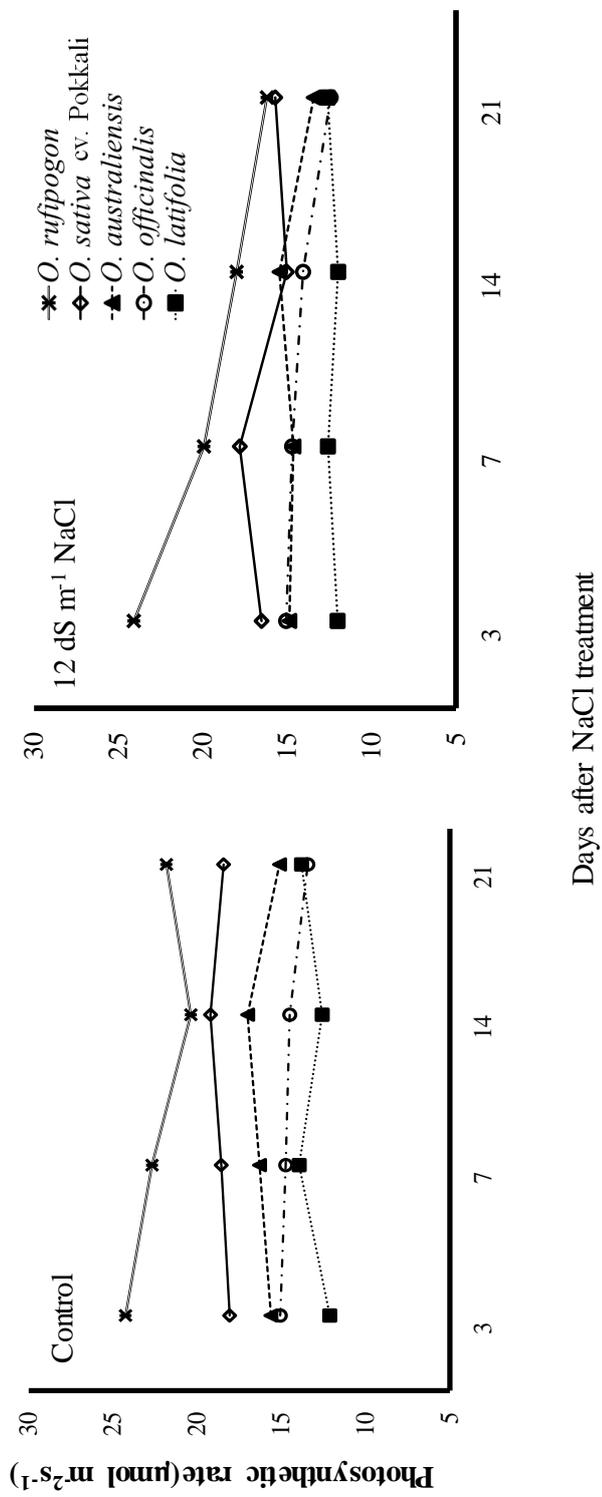


Fig. 4-1. Effect of NaCl treatment on Photosynthetic rate on five *Oryza* species (81 days after seeding).

Table 4-1 に、播種後 81 日の *Oryza* 属 5 種の光合成速度、葉内 CO₂ 濃度および気孔伝導度を示した。対照区を 100%とした場合の塩処理区の相対値をみると、光合成速度は、*O. officinalis*, *O. latifolia* および *O. australiensis* が 90%以上あり、*O. rufipogon* より *O. officinalis* および *O. latifolia* が有意に高かった。葉内 CO₂ 濃度の相対値は、*O. rufipogon* で 87%と最も高く、次いで Pokkali の 82%であった。一方、*O. australiensis* は 72%と最も低く、*O. rufipogon* および Pokkali より有意に低かった。気孔伝導度の相対値は、供試稲すべてが 50%を下回った。その中で *O. latifolia* が 46%であり、他種より有意に高かった。

Fig. 4-2 に、播種後 81 日における *Oryza* 属 5 種の光合成速度と気孔伝導度の関係を示した。*O. rufipogon*, Pokkali, *O. australiensis* および *O. officinalis* の相関係数は、それぞれ 0.99 ($p < 0.01$), 0.98 ($p < 0.01$), 0.69 ($p > 0.05$) および 0.64 ($p > 0.05$) であり、光合成速度と気孔伝導度の間に高い正の相関を示した。一方、*O. latifolia* の相関係数は 0.48 ($p > 0.05$) であり、中程度の正の相関であった。

2) 個葉の O₂ 放出速度およびクロロフィル含量

Table 4-2 に、播種後 81 日目における *Oryza* 属 4 種の葉位別面積当たりの O₂ 放出速度を示した。対照区を 100%とした場合の塩処理区の相対値をみると、*O. officinalis* および *O. latifolia* は、第I葉および第III葉のすべての塩処理区と第V葉の 50 mM 区で対照区よりも高い値を示した。*O. officinalis* の第I葉における 50 mM 区および 100 mM 区は、対照区より有意に高かった。一方、Pokkali および *O. rufipogon* は、第I葉および第V葉の全ての塩処理区で対照区よりも低い値を示した。塩ストレスを受けた

Table 4-1. Effect of NaCl treatment on Photosynthetic rate, intercellular CO₂ concentration and stomatal conductance of five *Oryza* species (81 days after seeding).

Species	Pn ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		Ci ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		gs ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	
	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl	Control	12 dS m ⁻¹ NaCl
<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	17.9 ± 0.1	14.9 ± 0.3 (84) bc	290.3 ± 0.3	236.7 ± 4.1 (82) a	365.7 ± 5.8	128.5 ± 3.9 (35) b
<i>O. officinalis</i>	13.4 ± 0.2	13.2 ± 0.1 (98) a	288.6 ± 2.3	225.2 ± 3.7 (78) ab	383.0 ± 8.0	122.7 ± 5.2 (32) b
<i>O. latifolia</i>	13.7 ± 0.1	12.9 ± 0.7 (94) ab	281.1 ± 2.5	227.4 ± 12.5 (81) ab	483.7 ± 5.4	220.2 ± 5.0 (46) a
<i>O. australiensis</i>	14.6 ± 0.1	13.1 ± 0.7 (90) abc	275.1 ± 2.3	197.8 ± 6.0 (72) b	361.0 ± 7.7	124.9 ± 6.5 (35) b
<i>O. rufipogon</i>	21.4 ± 0.5	16.2 ± 0.1 (76) c	273.5 ± 6.2	238.4 ± 5.6 (87) a	294.7 ± 8.1	88.8 ± 0.8 (30) b

Pn : Photosynthetic rate, Ci : intercellular CO₂ concentration, gs : stomatal conductance.

Values are mean ± S.E. In parentheses values indicate the percentage to the control.

n = 3, Means with the same letter within each column are not significantly different at the 5% level, as determined by Tukey's test.

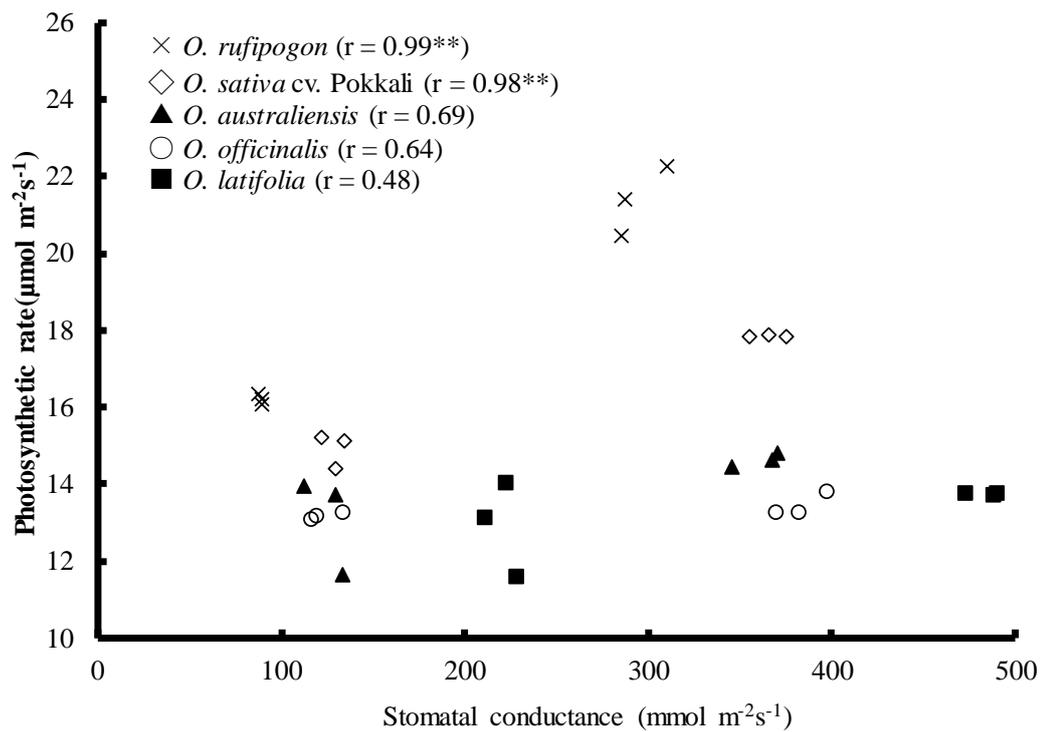


Fig. 4-2. Relationship between photosynthetic rate and stomatal conductance of five *Oryza* species under NaCl treatment (81days after seeding).
 n = 3, **: Indicates significance at 1% level.

Table 4-2. Effect of NaCl treatment on Photosynthetic O₂ evolution rate per leaf area of leaf in different positions of four *Oryza* species (81 days after seeding).

species	NaCl	O ₂ evolution (μmol / dm ² / hr)					
		I	III	V			
<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	0 mM	194.6 ± 15.3 a	(100)	118.1 ± 16.0 ab	(100)	58.3 ± 19.9 a	(100)
	50 mM	162.8 ± 21.3 a	(84)	97.3 ± 3.4 b	(82)	35.1 ± 20.7 a	(60)
	100 mM	162.5 ± 9.3 a	(84)	143.1 ± 17.8 a	(121)	46.9 ± 30.4 a	(81)
<i>O. officinalis</i>	0 mM	140.8 ± 10.7 b	(100)	129.8 ± 8.1 a	(100)	85.5 ± 25.8 a	(100)
	50 mM	189.1 ± 7.6 a	(134)	168.6 ± 25.6 a	(130)	120.6 ± 15.1 a	(141)
	100 mM	208.0 ± 19.1 a	(148)	172.7 ± 6.9 a	(133)	78.0 ± 50.8 a	(91)
<i>O. latifolia</i>	0 mM	151.1 ± 21.7 a	(100)	84.8 ± 22.1 a	(100)	43.1 ± 14.8 a	(100)
	50 mM	185.1 ± 16.5 a	(123)	105.0 ± 5.9 a	(124)	59.0 ± 21.5 a	(137)
	100 mM	173.1 ± 36.4 a	(116)	101.7 ± 24.0 a	(120)	21.2 ± 21.2 a	(49)
<i>O. rufipogon</i>	0 mM	179.5 ± 13.7 a	(100)	123.3 ± 30.8 a	(100)	125.5 ± 30.7 a	(100)
	50 mM	143.0 ± 5.4 b	(80)	146.0 ± 13.5 a	(118)	54.5 ± 29.1 a	(43)
	100 mM	130.0 ± 11.2 b	(72)	150.4 ± 24.8 a	(122)	51.5 ± 19.2 a	(41)

I : The top leaf, III : The third leaf, V : The 5th leaf.

Values are mean ± S.E. In parentheses values indicate the percentage to the control.

n = 4, Means with the same letter within each column are not significantly different at the 5% level, as determined by Fisher's Protected LSD test.

O. officinalis および *O. latifolia* は、上位葉で面積当たりの O_2 放出速度を増加させ、Pokkali および *O. rufipogon* とは異なる反応を示した。

Table 4-3 に、播種後 81 日目における *Oryza* 属 4 種の葉位別クロロフィル含量を示した。対照区を 100%とした場合の塩処理区の相対値をみると、*O. officinalis* における第III葉の 100 mM 区は対照区と比べ有意に高かった。また、第I葉および第III葉のすべての塩処理区は、対照区より高い値を示したが、有意差は認められなかった。一方、Pokkali の第I葉では、クロロフィル含量はすべての塩処理区で対照区よりも低くなる傾向を示した。*O. latifolia* および *O. rufipogon* の第I葉では、対照区に比べ 50 mM 区で高い値を示し、100 mM 区で低い値を示したが、有意差は認められなかった。Pokkali, *O. latifolia* および *O. rufipogon* の第III葉では、各塩処理で対照区より増加および減少したが、その変化割合は 10%以内であった。塩ストレスを受けた *O. officinalis* のクロロフィル含量は、上位葉で、対照区と比べ高くなる傾向を示した。

Table 4-4 に、播種後 81 日目における *Oryza* 属 4 種の葉位別クロロフィルあたりの O_2 放出速度を示した。対照区を 100%とした場合の塩処理区の相対値をみると、第I葉では、Pokkali はすべての塩処理区で対照区より低くなる傾向を示したのに対し、*O. officinalis* および *O. latifolia* のどの塩処理区でも高くなる傾向を示した。第III葉においても同様に、*O. officinalis* および *O. latifolia* では対照区に対して塩処理区で高くなる傾向を示した。

Fig. 4-3 に、*Oryza* 属 4 種における葉位別の O_2 放出速度と、第 3 章で測定した葉位別葉身 Na^+ 含有率の関係を示した。いずれの種においても、上位葉での O_2 放出速度と葉身 Na^+ 含有率の間には高い相関関係は認めら

Table 4-3. Effect of NaCl treatment on chlorophyll content of leaf in different positions of four *Oryza* species (81 days after seeding).

Species	NaCl	Chlorophyll content ($\mu\text{g} / \text{cm}^2$)				
		I	III	V		
<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	0 mM	28.2 \pm 2.1 a (100)	23.1 \pm 4.8 a (100)	9.2 \pm 3.4 a (100)		
	50 mM	24.2 \pm 2.2 a (86)	23.8 \pm 0.7 a (103)	7.0 \pm 4.1 a (76)		
	100 mM	24.4 \pm 3.5 a (87)	21.3 \pm 1.7 a (92)	6.9 \pm 4.0 a (75)		
<i>O. officinalis</i>	0 mM	35.8 \pm 3.7 a (100)	50.6 \pm 2.3 b (100)	37.9 \pm 4.9 a (100)		
	50 mM	41.7 \pm 4.5 a (116)	54.7 \pm 2.3 ab (108)	42.2 \pm 4.3 a (111)		
	100 mM	41.0 \pm 1.0 a (114)	63.4 \pm 4.6 a (125)	27.8 \pm 17.3 a (73)		
<i>O. latifolia</i>	0 mM	32.4 \pm 2.7 a (100)	29.8 \pm 2.7 a (100)	21.7 \pm 3.6 a (100)		
	50 mM	34.8 \pm 6.5 a (108)	29.5 \pm 1.8 a (99)	25.5 \pm 8.9 a (118)		
	100 mM	28.6 \pm 4.3 a (88)	30.2 \pm 4.8 a (101)	6.3 \pm 6.3 b (29)		
<i>O. rufipogon</i>	0 mM	36.0 \pm 2.7 a (100)	40.3 \pm 5.1 a (100)	35.6 \pm 3.1 a (100)		
	50 mM	37.3 \pm 3.3 a (104)	42.2 \pm 5.2 a (104)	34.1 \pm 12.1 a (96)		
	100 mM	25.3 \pm 2.0 b (70)	37.9 \pm 8.0 a (94)	20.0 \pm 7.8 a (56)		

I : The top leaf, III : The third leaf, V : The 5th leaf.

Values are mean \pm S.E. In parentheses values indicate the percentage to the control.

n = 4, Means with the same letter within each column are not significantly different at the 5% level, as determined by Fisher's Protected LSD test.

Table 4-4. Effect of NaCl treatment on Photosynthetic O₂ evolution rate per chlorophyll content of leaf in different positions of four *Oryza* species (81 days after seeding).

Species	NaCl	O ₂ evolution (µmol / mg chl / hr)				
		I	III	V		
<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	0 mM	70.3 ± 7.7 a (100)	54.5 ± 5.4 ab (100)	50.7 ± 19.4 a (100)		
	50 mM	67.6 ± 6.6 a (96)	41.0 ± 1.9 b (75)	25.1 ± 14.9 a (49)		
	100 mM	69.9 ± 8.6 a (99)	70.0 ± 13.6 a (128)	33.7 ± 21.4 a (66)		
<i>O. officinalis</i>	0 mM	40.3 ± 3.7 a (100)	25.7 ± 1.6 a (100)	21.5 ± 4.5 a (100)		
	50 mM	47.5 ± 6.5 a (118)	30.4 ± 3.5 a (118)	28.6 ± 2.2 a (133)		
	100 mM	50.6 ± 4.1 a (126)	27.7 ± 2.3 a (108)	13.7 ± 8.0 a (64)		
<i>O. latifolia</i>	0 mM	46.8 ± 5.3 a (100)	27.2 ± 4.5 a (100)	19.3 ± 6.3 a (100)		
	50 mM	57.1 ± 8.6 a (122)	36.4 ± 4.2 a (134)	17.2 ± 5.8 a (89)		
	100 mM	60.0 ± 5.6 a (128)	33.1 ± 4.3 a (121)	8.4 ± 8.4 a (43)		
<i>O. rufipogon</i>	0 mM	50.7 ± 5.3 a (100)	30.8 ± 6.5 a (100)	35.9 ± 9.0 a (100)		
	50 mM	39.3 ± 3.8 a (77)	35.1 ± 2.2 a (114)	11.7 ± 5.6 b (33)		
	100 mM	52.1 ± 5.3 a (103)	41.7 ± 5.2 a (135)	19.8 ± 6.9 ab (55)		

I : The top leaf, III : The third leaf, V : The 5th leaf.

Values are mean ± S.E. In parentheses values indicate the percentage to the control.

n = 4, Means with the same letter within each column are not significantly different at the 5% level, as determined by Fisher's Protected LSD test.

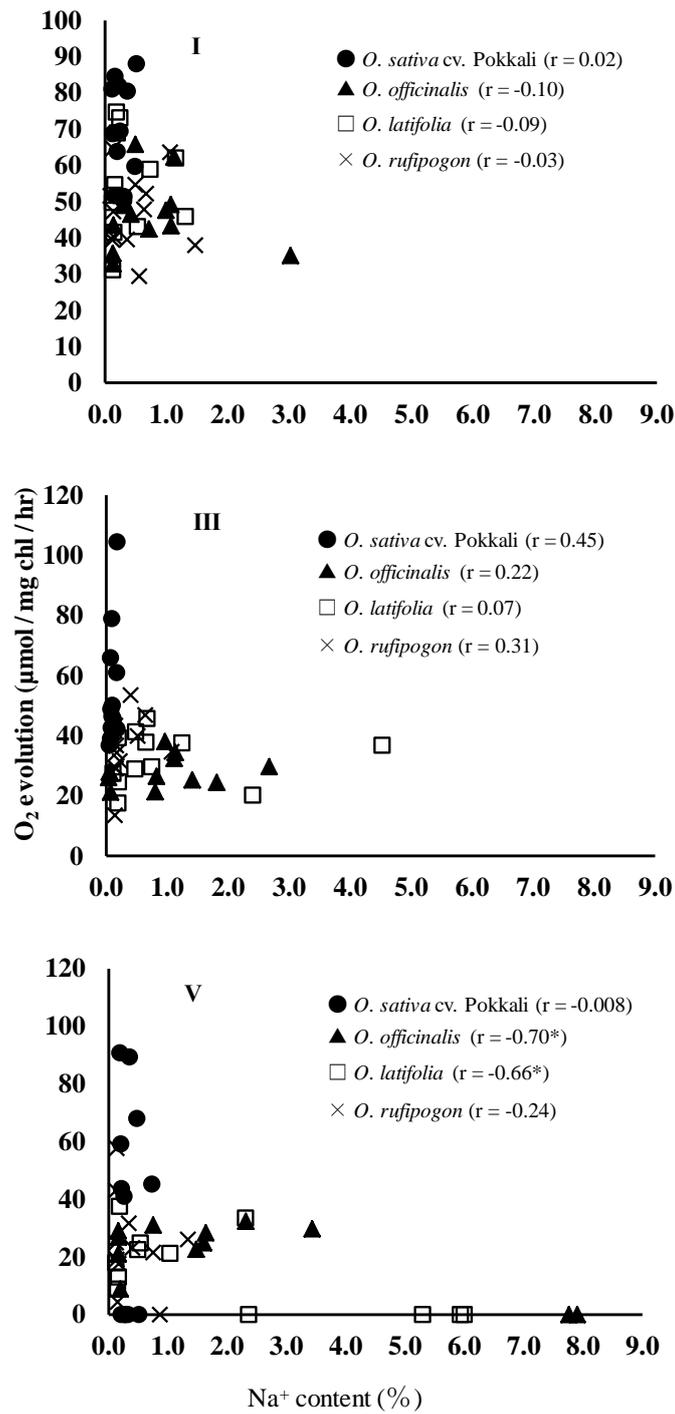


Fig. 4-3. Relationship between photosynthetic O₂ evolution rate per leaf area and Na⁺ content of four *Oryza* species under NaCl treatment (81 days after seeding).
 I : The top leaf, III : The third leaf, V : The 5th leaf.
 n = 3, * : Indicates significance at 5% level.

れなかった。一方、*O. officinalis* および *O. latifolia* の下位葉ではそれぞれ $r = -0.70$ ($P < 0.05$) および $r = -0.66$ ($P < 0.05$) であり、有意に高い負の相関がみられた。

4-4. 考察

1) 個葉の光合成速度，葉内 CO₂ 濃度および気孔伝導度

本研究では塩ストレスを受けた Pokkali および *O. rufipogon* は光合成速度が低下し (Fig. 4-1, Table 4-1), Yeo *et al.* (1985) の報告と同様の結果を示した。一方、*O. officinalis* および *O. latifolia* における光合成速度の低下程度は Pokkali より少なかった (Table 4-1)。また、*O. officinalis* および *O. latifolia* は、3 日目と 21 日目の光合成速度の差が少なく、対照区と塩処理区で同様な傾向を示した (Fig. 4-1)。このことから、*O. officinalis* は、Na⁺を葉身に多く蓄積するにも関わらず、塩ストレス下でも光合成をあまり低下させない機構をもつことが示唆された。Bohra and Doerffling (1993) は、塩水処理中のイネにカリウムを施肥すると、カリウムを施肥しないイネに比べ光合成活性が増加することを示した。*O. officinalis* の地上部葉身全体では、塩ストレスによって Na⁺と同時に K⁺の吸収を高めていた (Table 3-2)。一方で、K⁺は上位葉へあまり吸収されなかった (Table 3-5)。今後、*O. officinalis* における塩ストレス下において葉身に K⁺を蓄積することと、水分含有率および光合成速度を維持することの関係性を明らかにするために、個葉の蒸散速度や、葉身細胞内の水ポテンシャルを調査する必要がある。

播種後 81 日における気孔伝導度は、すべての種で対照区に対し塩処理区で 50% 以下となり、塩ストレスによって気孔開度の低下が起こるこ

とが明らかとなった (Table 4-1). 塩水処理 21 日目における Pokkali, *O. officinalis*, *O. latifolia* および *O. australiensis* の光合成速度は, それぞれ 16%, 2%, 6% および 10% 低下したのに対し, 葉内 CO₂ 濃度はそれぞれ 18%, 22%, 19% および 28% 低下した. 一方, *O. rufipogon* は光合成速度が 24% 低下したのに対し, 葉内 CO₂ 濃度は 13% 低下した (Table 4-1). これらの結果から, 光合成速度の低下要因は, *O. rufipogon* 以外の種では, 葉肉部分の光合成活性の低下よりも, 気孔の閉鎖によるところが大きいと考えられた. 一方, *O. rufipogon* では気孔の閉鎖に加え, 葉肉部分の光合成活性の低下によると考えられた.

光合成速度と気孔伝導度は密接に関係しており, 植物が水ストレスや塩ストレスを受けると, 気孔伝導度の低下に伴い光合成速度も低下する (Wrong *et al.* 1979, Brugnoli and Lauteri 1991). 本研究において, *O. rufipogon*, Pokkali, *O. australiensis* および *O. officinalis* では, 光合成速度と気孔伝導度の間に相関係数が 0.6 以上の高い正の相関が認められた (Fig. 4-2). Brugnoli and Lauteri (1991) は, 塩感受性のインゲンマメは, 塩ストレスによって気孔伝導度と光合成速度は低下するが, 葉内 CO₂ 濃度は一定となる実験結果を報告している. 本研究において *O. officinalis* は, 塩水処理後の葉内 CO₂ 濃度は供試イネの中で最も低かったことから, *O. officinalis* では塩ストレス環境下において炭酸固定能力が高いと考えられる. 一方で, *O. latifolia* は, 気孔伝導度と光合成速度の相関係数は 0.48 と供試イネの中で最も低かった (Fig. 4-2). *O. latifolia* は, 塩水処理後の気孔伝導度, 葉身水分含有率が供試稲の中で最も高かった. 気孔開度は孔辺細胞の膨圧によって変動する. 塩ストレスを受けた *O. latifolia* は, 葉身 K⁺ 含有率は対照区より高い値を示し, 個葉レベルでも対照区

と同等の値を示した。このことが葉身水分含有率を高く維持することおよび気孔開度を高くすることに関係していることが考えられるが、この機作については今後の検討課題である。

2) 個葉の O₂ 放出速度およびクロロフィル含量

塩ストレスを受けたイネは、O₂ 放出速度が低下する (Oh *et al.* 2003)。一方で、本研究では *O. officinalis* および *O. latifolia* の第I葉における面積あたりの O₂ 放出速度は、対照区に対し塩処理区で増加する傾向がみられた (Table 4-2)。これは、仲村ら (2005b) が行った *O. latifolia* の O₂ 放出速度測定と同様な結果となった。このことから、*O. officinalis* の上位葉における葉肉部分の光合成活性は、塩ストレスの影響を受けにくいと考えられた。

塩ストレスを受けた *O. officinalis* の上位葉におけるクロロフィル含量は、対照区に対し塩処理区で増加する傾向がみられ (Table 4-3), Misra *et al.* (1997) のイネを用いた実験と同様な結果となった。Aldesuquy (1992) は、塩処理後の小麦の止葉におけるクロロフィルやカロチノイドの増加は、葉緑体数が増加したことよるとしている。本実験において、塩ストレスを受けた *O. officinalis* の上位葉では、Aldesuquy (1992) の報告と同様に葉緑体数が増加したことでクロロフィル含量が増加している可能性があるかと推察された。今後は、塩ストレス下の *O. officinalis* における葉身クロロフィル含量と葉緑体数との関係性について調べる必要がある。

また、塩ストレスを受けた *O. officinalis* および *O. latifolia* の上位葉では、クロロフィルあたりの O₂ 放出速度が増加する傾向がみられた

(Table 4-3). Critchley (1982) は、塩性植物のマングローブへ高濃度の塩処理をしたところクロロフィルあたりの O_2 放出速度が増加するという結果を示し、これは光化学系IIの電子伝達に塩素が補助酵素として働いている可能性を示唆した。今後は、*O. officinalis* および *O. latifolia* においても、塩素に着目した O_2 放出の反応性について調べる必要がある。

葉位別のクロロフィルあたりの O_2 放出速度と、第3章で測定した葉身 Na^+ 含量の関係をみると、いずれの種も上位葉で高い相関は認められなかった (Fig. 4-3)。塩ストレスは浸透圧ストレスとイオンストレスに大別できるが、植物が長期間塩ストレスに曝されると、特にイオンストレスによる生長阻害の影響が大きくなる (Munns and Tester 2008)。イオンストレス下で、細胞内に Na^+ が蓄積することによってイオンバランスが崩壊する中で、Yeo and Flowers (1983) は、塩ストレスを受けたイネの葉身クロロフィル含量と Na^+ 含量の間には負の相関があることを明らかにした。本実験では、*O. officinalis* および *O. latifolia* において、Pokkali および *O. rufipogon* に比べ上位葉の Na^+ 含有率が高い値を示しているにもかかわらず O_2 放出速度を維持していた。 O_2 放出速度を測定するために、測定用を超純水中に一晩浸漬したことで、浸透圧ストレスが軽減された可能性があると考えられる。しかしながら、同じ条件で測定した Pokkali の第I葉では、対照区に対し塩処理区でクロロフィルあたりの O_2 放出速度が低下する傾向であったにも関わらず、*O. officinalis* および *O. latifolia* の第I葉では対照区に対し塩処理区で増加する傾向を示した (Table 4-4)。このことから、*O. officinalis* および *O. latifolia* において、長期の塩ストレスに曝されても、上位葉の光合成器官はイオンストレスを

受けにくい、もしくはイオンストレスの障害から回復しやすいことが示唆された。

一方、*O. officinalis* および *O. latifolia* では、下位葉で有意に高い負の相関が見られた (Fig. 4-3)。NaCl 処理による Na⁺ や Cl⁻ の過剰吸収は、葉の老化を促進させる (Lutts *et al.* 1996)。塩ストレスを受けた *O. officinalis* および *O. latifolia* では、下位葉へ Na⁺ を多く蓄積し、老化を促進させることで、上位葉における O₂ 放出速度への Na⁺ 害を軽減させている可能性があると考えられた。

以上のことから、*O. officinalis* は、塩ストレスを受けると、多量に Na⁺ を地上部に蓄積するにもかかわらず、乾物生産力は耐塩性栽培イネの Pokkali より低下させなかった。その要因として、塩ストレスを受けても、最上位展開葉の光合成速度は低下させないこと、および上位葉の O₂ 放出速度は増加させることで、高い乾物生産を維持していることが示唆された。塩ストレス下の *O. officinalis* における光合成の高さは、葉身の水分保持能力および葉肉部分の光合成活性が Na⁺ 害に高い耐性を持つことによると示唆された。一方、同等の高い耐塩性を有する *O. latifolia* とは光合成能力の塩反応性には違いが見られた。

4-5. 摘要

本章では、*O. officinalis* の光合成能力からみた耐塩性を評価するために、まず最上位展開葉における光合成速度、気孔伝導度および葉内 CO₂ 濃度を測定した。次に、葉肉内部の光合成活性の耐塩性を評価するため

に、個葉の O₂ 放出速度およびクロロフィル含量を測定した。得られた結果は以下の通りである。

- 1). 塩ストレスを受けた *O. officinalis* の光合成速度は、塩処理開始 3 日から 21 日の間であまり低下せず、低下程度は Pokkali より低かった (Fig. 4-1, Table 4-1). このことから、*O. officinalis* は、塩ストレスによって葉身に Na⁺を多く蓄積しても、光合成速度を維持できることが明らかとなった。
- 2). すべての供試個体は塩処理によって気孔伝導度を 50% 以下まで低下させたが、*O. officinalis* と *O. latifolia* では低下程度に差が見られた (Table 4-1). 光合成速度と気孔伝導度の関係においても、両種は相関係数に違いがみられた (Fig. 4-2).
- 3). 塩ストレスによる光合成速度の低下要因を気孔伝導度と葉内 CO₂ 濃度より解析すると、*O. rufipogon* 以外の種は気孔の閉鎖に起因することが示唆された。したがって、塩ストレス下の *O. officinalis* は、塩ストレスに対する葉肉内部の光合成活性は耐性があることが示唆された (Table 4-1, Fig. 4-2).
- 4). 塩ストレスを受けた *O. officinalis* における葉位別の O₂ 放出速度およびクロロフィル含量は、上位葉で増加する傾向にあった (Table 4-2, Table 4-3, Table 4-4).
- 5). 葉位別の O₂ 放出速度と Na⁺含有率の関係では、どの種も低い関係性だった (Fig. 4-3). このことから、*O. officinalis* では、葉身に Na⁺が多量に存在しても、光合成器官は Na⁺害の影響を受けにくく、むしろ O₂ 放出を盛んに行うことが明らかとなった。

第5章 *O. officinalis* における光合成関連タンパク質の塩応答性

5-1. はじめに

前章までに、*O. officinalis* の耐塩性について、乾物生産、水分保持力、イオンの動態および光合成能力の面から評価した。その結果、*O. officinalis* は、塩ストレスを受けると、地上部、特に葉身に Na^+ を多く蓄積することが明らかになった。一方で、葉身に対する形態的ダメージは少なく、乾物生産および RGR はさほど低下しなかった。このことから、*O. officinalis* の耐塩性機構は、従来の耐塩性栽培イネのような塩分排除ではなく、塩類に対する耐性が高いことが示唆された。耐塩性が高い要因として、プロリンを蓄積して葉身水分を維持できる、葉肉部分の光合成活性が Na^+ 害に対して耐性があり、光合成速度を維持できるなどが考えられた。

耐塩性野生稻である *O. latifolia* と *O. officinalis* を比較すると、両種も Na^+ 害に対して耐性を持つ耐塩性機構を有することが明らかとなった。また、塩ストレスを受けた両種は、上位葉で O_2 放出速度が増加傾向にあり、耐塩性栽培イネとは違う反応を示した。従来の栽培イネとは違う、*O. officinalis* の耐塩性機構を解明するためには、両種の光合成能力についてさらに調査が必要である。

O_2 放出は、クロロフィル分子が光量子を吸収し励起され、その励起エネルギーが光化学系の反応中心へ伝達されることによって起こる。光化学系の反応中心は励起エネルギーを受け取ると O_2 放出と共に電子を放出し、その電子が電子伝達系を経ることにより NADPH が生産され、また膜を介した水素イオンの濃度勾配を作ることによって ATP が生産さ

れる．電子伝達系には，光化学系I, II, シトクロム *b₆f*, プラストキノン, フェレドキシンなど多くのタンパク質が存在する．これまでに，塩ストレスによって光化学系I, IIに関わるタンパク質の発現が変動することを明らかにした報告はあるが (Sengupta and Majumder 2009), 野生稻についてはほとんど調査されていない．

二次元電気泳動は，一回の泳動で数百個のタンパク質を検出できるため，タンパク質の挙動を網羅的に解析するために最適な手法である (O'Farrell 1975) ．栽培イネの葉身タンパク質の塩応答性を，二次元電気泳動法によって解析した報告はいくつかある (Abbasi and Komatsu 2004, Kim *et al.* 2005) が，O₂放出に関するタンパク質の塩応答性について解析した報告は少ない．仲村ら (2004) は，*O. latifolia* のチラコイド膜タンパク質について二次元電気泳動によって解析したが，塩ストレス下における発現の違いは調べられていない．

本章では，前章までに明らかになった *O. officinalis* における光合成器官の塩耐性の高さについて，葉緑体に局在するタンパク質に着目し，光合成関連タンパク質の塩応答性について二次元電気泳動法を用い調査した．

5-2. 材料および方法

供試材料は，第2章における，2011年5月11日に播種したものを用いた．栽培条件および塩処理条件は第2章と同様である．測定葉は，播種後81日目の主稈に隣接する分けつの最上位完全展開葉を用いた．採取後直ちに液体窒素で凍結させ，測定まで-80°Cで保存した．タンパク質の抽出は，O'Farrell (1975) の方法を一部改変して行った．葉身 200 mg

を乳鉢および乳棒を用いて粉碎し、8 M 尿素、2% NP-40、2% Phamalyte (pH 3-10, GE Healthcare)、2-メルカプトエタノール、5% polyvinylpyrrolidone (PVP) を含むタンパク質溶解液を 1 ml 添加した。その後、4°C、15000 rpm で 5 分間遠心分離し、得られた上清み液をタンパク質抽出液とした。この抽出液のタンパク質含量は、Bradford 法 (Bradford 1976) により測定した。抽出したタンパク質は二次元電気泳動により分離した。一次元目の等電点電気泳動ゲル (7 cm IPG strips pH 3-10 NL, Bio-Rad) に、抽出したタンパク質 100 µl 添加し、16 時間膨潤させた。膨潤させたゲルを等電点電気泳動装置 (Protean IEF Cell system, Bio-Rad) にセットし、250 V 30 分、500-3000 V 4 時間、4000-10000 Vhr の条件で電気泳動を行った。泳動後、ゲルを平衡液I (6 M 尿素、2% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% glycerol, 2 mM tributylphosphine (TBP)), 平衡液II (6 M 尿素、2% SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% glycerol, 135 mM iodoacetamide) 中でそれぞれ 20 分間振盪させた。平衡化したゲルは、二次元目の SDS-PAGE ゲル (ミニプロテイン TGX ゲル, Bio-Rad) 上に 0.5%アガロース溶液を用いて固定した。ゲルを SDS-PAGE 用装置 (MiniProtean Tetra system, Bio-Rad) にセットし、電極緩衝液 (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS) を用いて 180 V 定電圧で電気泳動を行った。泳動したゲルは、CBB 溶液で染色した。各個体の測定葉 1 枚につき 1 つのゲルを使用し、これを 3 反復行った。スポットの検出および発現量の測定は、PDQuest (Bio-Rad) を用いて行った。各処理で検出されたスポットの発現量は、対照区を 100 とした場合の塩処理区の相対値を算出して比較を行った。タンパク質の相同

性検索は、ExPASy-TagIdent tool (0) を用いた。等電点および分子量の検索範囲は、等電点 ± 0.1 、分子量 $\pm 10\%$ の範囲で行った。

5-3. 結果

Fig. 5-1 に、*O. officinalis* における葉身タンパク質の二次元電気泳動の結果を示した。*O. officinalis* の対照区では 100 個、100 mM 区で 80 個のタンパク質が検出された。Fig. 5-2 に、*O. latifolia* における葉身タンパク質の二次元電気泳動の結果を示した。*O. latifolia* の対照区では 101 個、100 mM 区で 99 個のタンパク質が検出された。Fig. 5-3 に、*O. rufipogon* における葉身タンパク質の二次元電気泳動の結果を示した。*O. rufipogon* の対照区では 54 個、100 mM 区で 56 個のタンパク質が検出された。Fig. 5-4 に、Pokkali における葉身タンパク質の二次元電気泳動の結果を示した。Pokkali の対照区では 100 個、100 mM 区で 60 個のタンパク質が検出された。

それらのタンパク質を ExPASy-TagIdent tool により相同性検索をしたところ、約 120 種のタンパク質が推定された。その中で、葉緑体に局在するタンパク質と推定されたのは約 40 種であった。

Table 5-1 に、Fig. 5-1 から Fig. 5-4 のスポット解析から推定されたタンパク質のうち、NaCl 処理によって発現が変化した葉緑体に局在するタンパク質をまとめた。塩処理によって過剰発現したタンパク質は、*O. officinalis* で 53 個、*O. latifolia* で 21 個、*O. rufipogon* で 20 個、Pokkali で 24 個であった。その内、葉緑体に関わるタンパク質は、*O. officinalis* で 23 個、*O. latifolia* で 8 個、*O. rufipogon* で 5 個、Pokkali で 4 個であった。*O. officinalis* のスポット番号 2、*O. rufipogon* のスポット番号 19 番、

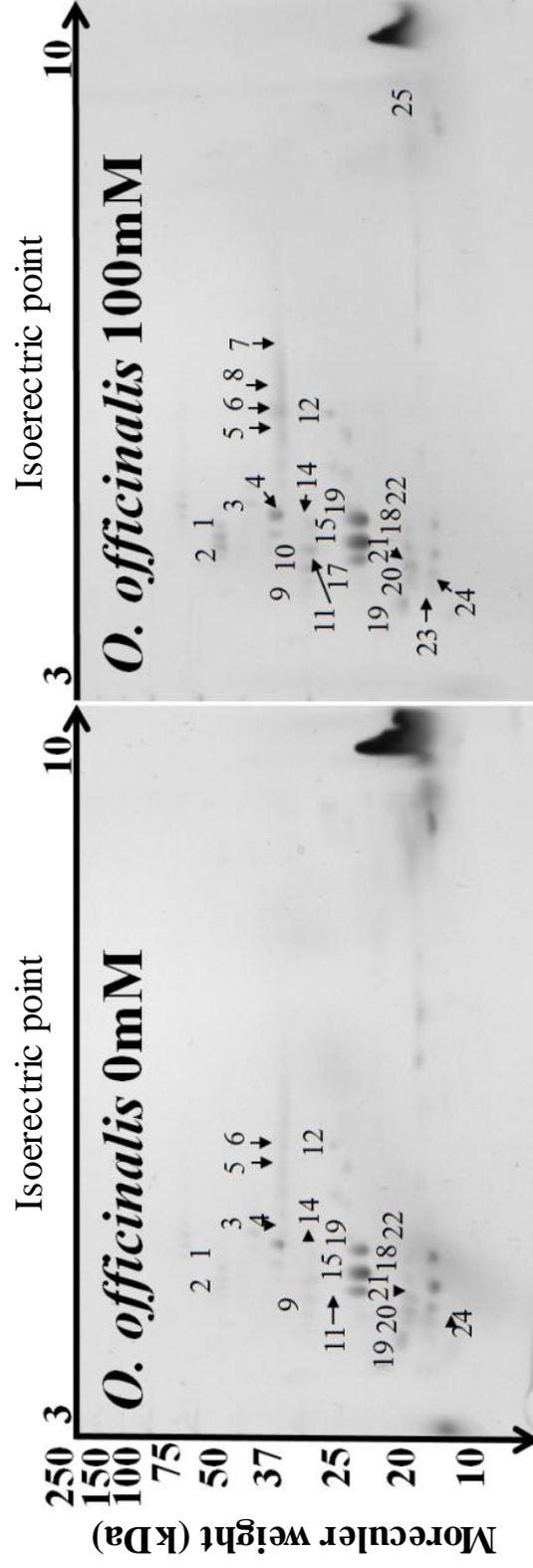


Fig. 5-1. Effect of NaCl treatment on two-dimensional electrophoresis in protein profiles of *O. officinalis* leaf blade (81 days after seeding). The numbers correspond to the numbers indicated in Table 5-1.

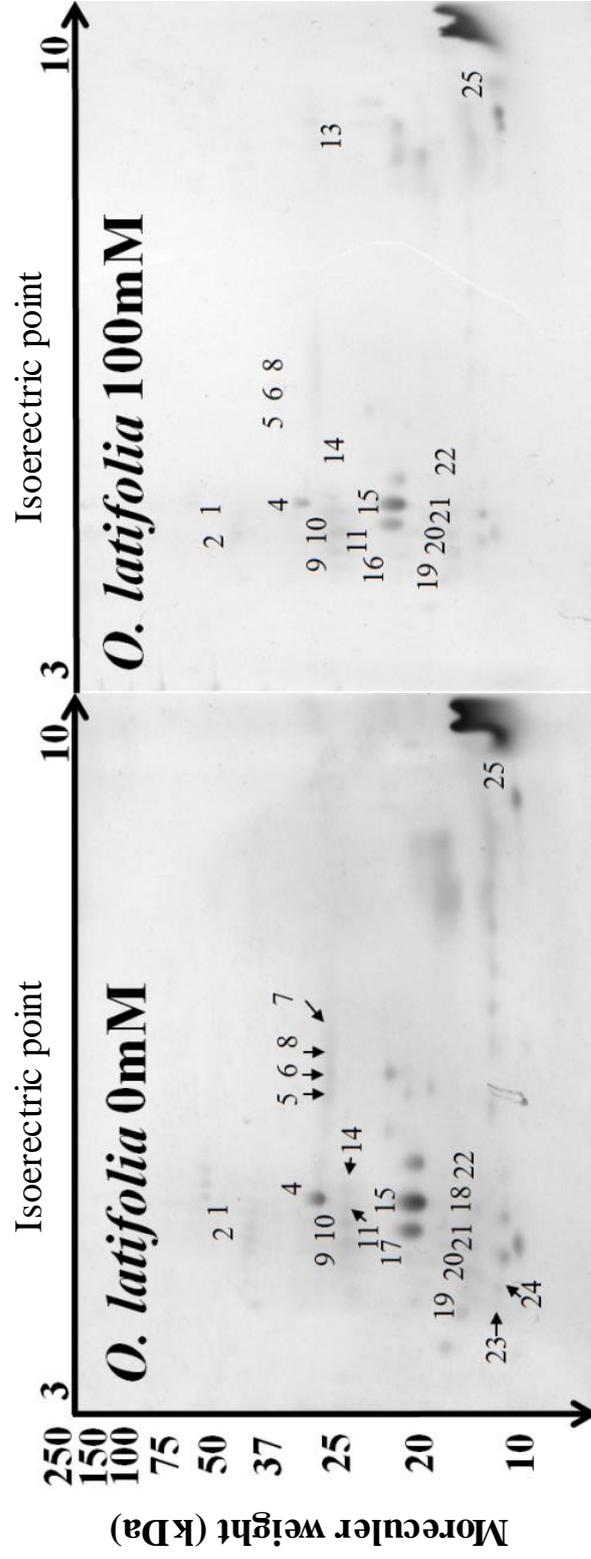


Fig. 5-2. Effect of NaCl treatment on two-dimensional electrophoresis in protein profiles of *O. latifolia* leaf blade (81days after seeding). The numbers correspond to the numbers indicated in Table 5-1.

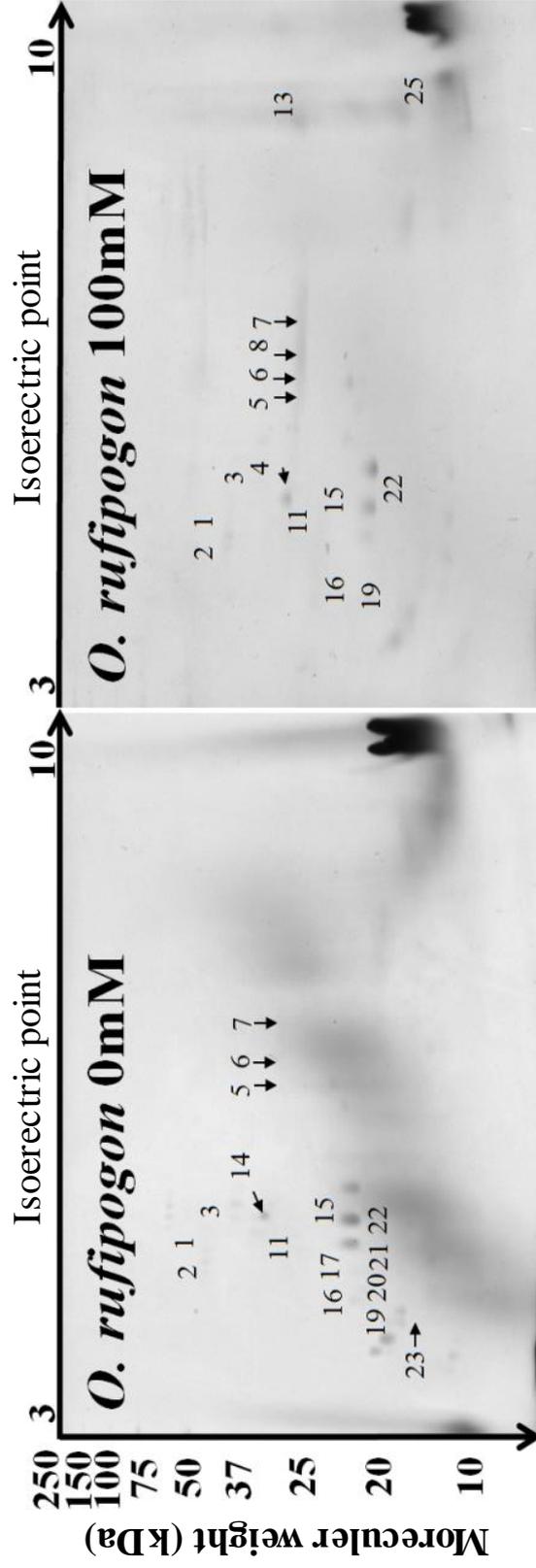


Fig. 5-3. Effect of NaCl treatment on two-dimensional electrophoresis in protein profiles of *O. rufipogon* leaf blade (81 days after seeding). The numbers correspond to the numbers indicated in Table 5-1.

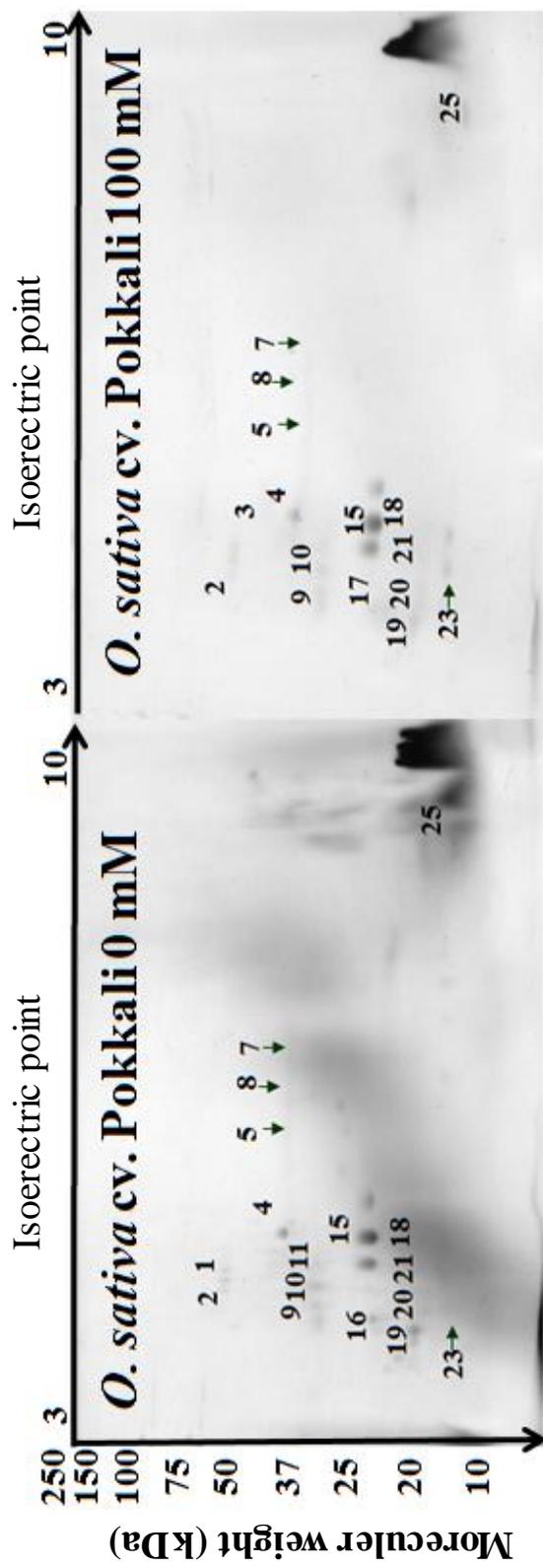


Fig. 5-4. Effect of NaCl treatment on two-dimensional electrophoresis in protein profiles of Pokkali leaf blade (81 days after seeding). The numbers correspond to the numbers indicated in Table 5-1.

Table 5-1. Protein related to chloroplast of four *Oryza* species by two-dimensional electrophoresis (81 days after seeding).

Spot No.	Moreculer weight (kDa)	Isoelectric point	Homologues Protein	Protein expression level in the 100 mM NaCl (%)			
				<i>O. sativa</i> cv. Pokkali	<i>O. officinalis</i>	<i>O. latifolia</i>	<i>O. rufipogon</i>
1	41.08	5.21	Glutamine synthetase, chloroplastic.	-	146.1	48.9	331.1
2	41.04	5.14	Delta-aminolevulinic acid dehydratase, chloroplastic.	60.1	1539.0*	87.9	267.7
3	35.88	5.41	Photosystem Q(B) protein.	○	101.2	-	18.2
4	31.05	5.33	Probable L-ascorbate peroxidase 5, chloroplastic.	62.7	124.8	58.1	69.0
5	29.13	6.03	Protochlorophyllide reductase B, chloroplastic.	7.8	109.9	148.9	336.8
6	28.94	6.09	Beta-carotene isomerase D27, chloroplastic.	-	111.8	148.7	377.1
7	28.72	6.24	Probable L-ascorbate peroxidase 7, chloroplastic.	46.5	○	-	347.8
8	28.59	6.14	Superoxide dismutase [Fe] 2, chloroplastic.	943.2	○	239.6	○
9	26.84	5.02	Chlorophyll a-b binding protein 1, chloroplastic.	67.7	107.9	161.7	-
10	26.38	5.14	Chlorophyll a-b binding protein 2, chloroplastic.	46.0	○	162.5	-
11	26.31	5.26	Copper chaperone for superoxide dismutase, chloroplastic.	-	254.3	129.5	15.8
12	23.74	6.17	Heme oxygenase 1, chloroplastic.	-	176.4	-	-
13	23.52	8.99	Peptide deformylase 1A, chloroplastic.	-	-	○	○
14	21.64	5.57	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit K, chloroplastic	-	439.4	39.0	-
15	20.50	5.30	Glutaredoxin-C9.	96.6	164.6	72.4	69.7
16	19.96	4.57	Photosystem I assembly protein ycf3.	-	-	○	16.2
17	19.05	4.92	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 6, chloroplastic	○	○	-	-
18	15.53	5.28	Peroxioredoxin-2E-1, chloroplastic.	12.6	109.3	-	-
19	15.01	4.57	Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic.	14.7	420.1	13.1	11.1*
20	14.89	4.99	Thioredoxin-like protein CTRX, chloroplastic.	32.7	162.4	10.4	-
21	14.50	5.15	ATP synthase epsilon chain, chloroplastic.	11.6*	250.9	20.5	-
22	13.43	5.40	Photosystem II reaction center PSB28 protein, chloroplastic.	-	329.1	23.4	0.3
23	11.25	4.84	Cytochrome b5.	67.2	○	-	-
24	11.01	4.94	Thioredoxin M5, chloroplastic.	-	208.9	-	-
25	10.48	9.16	Sec-independent protein translocase protein TATA, chloroplastic.	0.1	○	18.2	○

The proteins were estimated using the ExPASy-TgIdent tool (<http://web.expasy.org/tagident/>).

Values indicate the percentage to the control, "○" indicates that is expressed only in the 100 mM, "-" is expressed only in the control.

n = 3, *, Indicates significance at 5% level between control and 100 mM NaCl.

Pokkali のスポット番号 21 のタンパク質では、対照区と塩処理区の間
に有意差が認められた。

5-4. 考察

塩処理後の光合成活性の低下程度の違いは、葉身の光合成関連酵素や
光合成器官の耐塩性の高さが異なるためだと考えられる。一般に、細胞
質における光合成関連酵素類の耐塩性は低く、耐塩性の高い塩性植物に
おいても酵素の耐塩性は中生植物と同程度とされている (Flowers *et al.*
1977)。前章において、塩処理後の光合成速度の低下程度が *O. officinalis*
および *O. latifolia* で低かったことから、光合成器官が高い NaCl 耐性を
持つことが示唆された。両種の光合成器官の耐塩性についてタンパク質
面から評価するために、二次元電気泳動法を用いて検討した。

電気泳動で得られたゲルのスポット解析から、葉緑体に局在するタン
パク質が約 40 種推定された。その内、塩ストレスによって発現が増加
および誘発されたタンパク質は、*O. officinalis* で最も多く 20 個であった。
それ以外の種では 10 個以下であった。このことから、*O. officinalis* は、
葉緑体に局在するタンパク質の発現を高めることで、塩処理後の O₂ 放
出速度を維持した可能性があると考えられた。

O. officinalis において、クロロフィル合成代謝に関わる

Protochlorophyllide reductase B, Chlorophyll a-b binding protein,

Delta-aminolevulinic acid dehydratase と推定されたタンパク質の発現量は、
対照区に比べ、塩処理区でそれぞれ 1.1 倍、1.1 倍、15.4 倍であり、

Delta-aminolevulinic acid dehydratase と推定されたタンパク質の発現量は
対照区より有意に増加した (Table 5-1)。このことが、塩ストレスを受け

た *O. officinalis* の上位葉でクロロフィル含量が増加したと関係していると推察された。一方, Pokkali では, 検出されたすべてのクロロフィル合成経路に関わると推定されたタンパク質, *O. latifolia* では Delta-aminolevulinic acid dehydratase, *O. rufipogon* では Chlorophyll a-b binding protein と推定されたタンパク質が, それぞれ塩ストレスによって発現抑制がみられた (Table 5-1)。このことから, Pokkali, *O. latifolia* および *O. rufipogon* では, 塩ストレスによってクロロフィル合成経路の酵素活性が阻害される, もしくは酵素タンパク質が分解されたことによって, 上位葉におけるクロロフィル含量は, 対照区と同等もしくは低下すると推察された。

塩ストレスを受けたイネでは, O_2 放出速度が低下し, 光化学系IIの活性が低下することが報告されている (Tiwari *et al.* 1997)。本研究において, 塩ストレスを受けた *O. officinalis* は, 光化学系IIに関わる PhotosystemII reaction center PSB28 protein と推定されたタンパク質の発現量が対照区より 2.5 倍増加した (Table 5-1)。 *O. officinalis* は, 塩ストレスを受けることによって上位葉のクロロフィル含量および葉身面積当たりの O_2 放出速度が増加する傾向を示した (Table 4-2, Table 4-3)。また, クロロフィルを合成する代謝経路に関わるタンパク質と推定されたスポットの発現も高くなる傾向を示した (Table 5-1)。このことから, 塩ストレスを受けた *O. officinalis* における上位葉の葉身内では, クロロフィルおよび光化学系IIに関わるタンパク質を合成することで, 集光および水分解しやすい状態にし, クロロフィルあたりの O_2 放出速度を増加させている可能性があるとして推察された。一方, Pokkali では, 塩ストレスによって PhotosystemII reaction center PSB28 protein と推定されたタン

パク質の発現は対照区より有意に低下した。 *O. latifolia* も塩ストレスによって PhotosystemII reaction center PSB28 protein と推定されたタンパク質の発現は対照区より低下したが，その低下割合は Pokkali より *O. latifolia* の方が少なくなる傾向を示した。感受性品種である *O. rufipogon* では，光化学系IIに関わると推定されたタンパク質は塩処理区で発現しなかったが，光化学系Iに関わると推定されたタンパク質 (PhotosystemI reaction center subunit IV) は発現した。また，光化学系に関わるタンパク質として，ミトコンドリアの電子伝達系における複合体I とよく似た NAD (P) H 脱水素酵素がある。NAD (P) H 脱水素酵素は，NADPH を基質としプラストキノンを還元する。同様な酵素がシアノバクテリアから発見されており， HCO_3^- を濃縮する機能をもつことが報告されている (Zhang *et al.* 2005)。塩ストレスを受けた *O. latifolia* および *O. rufipogon* で発現が誘発されたタンパク質の中には，NAD (P) H 脱水素酵素 (NAD (P) H-quinone oxidoreductase subunit K) と推定されたタンパク質があった (Table 5-1)。このことは，塩ストレスを受けた *O. latifolia* 上位葉で，クロロフィルあたりの O_2 放出速度が増加する傾向を示したことと関係していると推察された。

葉緑体内の電子伝達系が活性化すると， O_2^- や H_2O_2 といった活性酸素種が生産され，酸化ストレスを引き起こすことが報告されている (Lee *et al.* 2001)。本研究の *O. officinalis* において，活性酸素除去に関わるスーパーオキシドジスムターゼおよびアスコルビン酸ペルオキシダーゼと推定されたタンパク質では，superoxide dismutase [Cu-Zn] および Probable L-ascorbate peroxidase 5 の発現量が対照区に比べ塩処理区でそれぞれ 1.1 倍および 1.2 倍増加した。また，superoxide dismutase [Fe] 2, Copper

chaperone for superoxide dismutase, Probable L-ascorbate peroxidase 7 および Peroxiredoxin-2E-1 と推定されたタンパク質は、塩処理区で発現が誘発された (Table 5-1). また、塩ストレスを受けた *O. officinalis* において、Asada (1999) が見出した water-water cycle の反応系内にあるグルタチオンリダクターゼの活性に関わる酵素である Glutaredoxin-C9 と推定されたタンパク質の発現量は、対照区に比べ 4.4 倍増加した (Table 5-1). 塩ストレスを受けた *O. officinalis* 上位葉ではクロロフィルあたりの O_2 放出速度が増加する傾向にあり (Table 4-4), 葉緑体内の電子伝達系が活性化している可能性があると考えられる. 電子伝達系の活性化によって生産された活性酸素を除去するために、スーパーオキシドジスムターゼやアスコルビン酸ペルオキシダーゼ, または water-water cycle に関わるタンパク質を増加させることで、塩ストレスの回避を行っていると考えられた. 一方、*O. latifolia* および Pokkali において、活性酸素除去に関わると推定されたタンパク質は、*O. officinalis* とは異なる発現パターンを示した (Table 5-1). *O. latifolia* は塩ストレスによって上位葉の O_2 放出速度が増加したことから、*O. officinalis* とは異なる方法で、活性酸素の除去を行なっている可能性があると考えられた. 今後は、塩ストレスを受けた *O. officinalis* および *O. latifolia* の上位葉において、活性酸素種である O_2^- や H_2O_2 含量の測定およびスーパーオキシドジスムターゼやアスコルビン酸ペルオキシダーゼの活性を測定することで、活性酸素除去反応系の塩反応性を解析する必要がある.

塩ストレスによって発現の変化がみられたタンパク質の中で、Glutamine synthetase および Thioredoxin M5 と推定されたタンパク質がある (Table 5-1). Glutamine synthetase の発現量は *O. officinalis* および *O.*

rufipogon でそれぞれ 1.5 倍および 3.3 倍増加した。Thioredoxin M5 は塩ストレス下の *O. officinalis* で発現が誘発された。Glutamine synthetase は、光呼吸に関わるタンパク質である。Hoshida *et al.* (2000) は、Glutamine synthetase を過剰発現させたイネを用いて、塩ストレスを受けたイネの光呼吸の反応を調べることで、Glutamine synthetase が光呼吸の反応系で重要な酵素であることを明らかにした。チオレドキシンは、光照射下でカルビン回路における、グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH)、フルクトースビスホスファターゼ (FBPase)、セドヘプツロースビスホスファターゼ (SBPase)、ホスホリブロキナーゼ (PRK) を還元し活性を高めることが報告されている (Buchanan *et al.* 2000)。本研究において、*O. officinalis* は、塩ストレス下での光合成速度の低下程度が低かった。このことは、塩ストレス下で Glutamine synthetase および Thioredoxin M5 が発現してきたことと関係している可能性があると考えられた。

最後に、Beta-carotene isomerase D27 と推定されたタンパク質をとりあげたい。このタンパク質は、塩ストレスを受けた *O. officinalis*, *O. latifolia* および *O. rufipogon* で、対照区よりそれぞれ 1.1 倍、1.5 倍、3.8 倍発現が増加した (Table 5-1)。一方 Pokkali では発現は見られなかった。

Beta-carotene isomerase D27 は、分枝を抑制するストリゴラクトンの生合成に関係していることが報告されている (Lin *et al.* 2009, Alder *et al.* 2012)。本実験では、耐塩性栽培イネの Pokkali では発現せず、感受性野生種の *O. rufipogon* で最も多く発現した。この結果は、塩ストレスを受けたイネの物質生産性との観点からみて興味深い。

以上のことから、*O. officinalis* は、塩ストレスによって発現が変化するタンパク質が存在し、その多くは葉緑体に局在するタンパク質と推定された。このことは、耐塩性野生稻 *O. officinalis* における上位葉の O_2 放出速度が増加したことと関係があると考えられた。また、活性酸素種の消散に関わると推定されたタンパク質の発現パターンには、*O. officinalis* と *O. latifolia* に種間差が認められた。このことから、*O. officinalis* および *O. latifolia* の光合成における耐塩性機構は異なることが考えられた。今後、塩ストレスを受けた *O. officinalis* および *O. latifolia* の上位葉で、 O_2 放出速度が増加した要因を明らかにするためには、今回検出されたスポットについて質量解析を行い、タンパク質を同定するとともに、water-water cycle, 光呼吸系および熱放散系に関わる酵素の活性についても検討する必要がある。

5-5. 摘要

本章では、*O. officinalis* の葉身に高濃度の Na^+ が存在しても光合成速度の低下程度は低く、 O_2 放出速度が増加した要因について、葉身タンパク質を二次元電気泳動法によって解析し、光合成関連タンパク質の塩反応性について調査した。得られた結果は以下の通りである。

- 1). 塩ストレスを受けた *O. officinalis* の葉身から、80 個のタンパク質スポットが得られ、そのうち 53 個が塩処理によって過剰発現した (Fig. 5-1). そのうち葉緑体に局在するタンパク質は 23 種あり、他種より多かった (Table 5-1).
- 2). 塩ストレスによって過剰発現したタンパク質の中には、クロロフィル合成に関わるタンパク質、光化学系に関わるタンパク質、活性酸

素除去系に関わるタンパク質，光呼吸および光合成速度に関わるタンパク質が推定された (Table 5-1).

- 3). 塩ストレスを受けた *O. officinalis* の上位葉における O_2 放出速度が増加した要因として，上述のタンパク質の過剰発現および誘発が関与していると推察された.

第 6 章 総合考察

世界の乾燥，半乾燥地域では，塩害集積土壌が毎年増加しており，そのほとんどが発展途上国である．これからの人口増加による食糧問題を考慮すると，塩類を多く含む土壌でも，安定的に食糧生産を行う必要がある．そのためには塩害地域でも生産できる耐塩性を持った作物を作出することが急務である．

一般に，作物は生育環境下に高濃度の塩類が存在すると，塩ストレスを受け生長が阻害される．塩ストレスは，細胞内の水ポテンシャルが低下することによって生長が阻害される浸透圧ストレスと，細胞内に蓄積した Na^+ などのイオンが代謝阻害を引き起こすイオンストレスに大別することができる．それに対し，作物の塩に対するメカニズムは，塩ストレスの回避機構と，塩ストレスの耐性機構がある (Fig. 1-2)．イネは，塩ストレスに対して感受性が高く，高濃度の塩類が存在する環境では，生育が阻害される (間藤 1991)．一方で，イネは品種間で耐塩性に差があることが報告されている (Akita and Cabuslay 1990)．その耐塩性機構は，地上部に Na^+ を蓄積させないよう根で Na^+ を排除する，いわゆる塩ストレスの回避機構であり，地上部への Na^+ 害を回避し，光合成速度を維持すると考えられている (山内ら 1987)．

これまでの報告は，主に栽培イネを供試したものがほとんどであった．近年では，未利用資源であるイネ属 (*Oryza*) に存在する約 20 種の野生稲が育種材料として注目されている (Kobayashi *et al.* 1993, Xiao *et al.* 1998, Nakamura *et al.* 2002)．野生稲の耐塩性については，仲村ら (2005a) が，*Oryza* 属野生稲 *O. latifolia* について調査した報告があるが，その他

の野生稲における耐塩性を詳しく評価した報告はほとんどない。仲村ら (2005a) の報告では、*O. latifolia* の耐塩性は栽培イネよりも高く、さらに従来の栽培イネとは違う耐塩性機構、すなわち塩類に対する抵抗性が高いといった耐塩性機構を有することを明らかにしている。栽培イネとは違った耐塩性機構についてさらに多くの知見を得ることができれば、耐塩性イネの作出に貢献できるだろう。

Oryza 属野生稲の *O. officinalis* は、国際農林水産業研究センター (JIRCAS) 沖縄支所にて、幼苗期における野生稲の耐塩性スクリーニング試験により選抜された種である。*O. officinalis* は、農業上有用な形質を持っていること、また未利用資源であることなどから、育種材料として注目されている。しかし、耐塩性の詳細については明らかにされていない。

以上のことを背景に、本研究では、野生稲 *O. officinalis* について、1) 塩ストレス下の乾物生産力および水分保持力、2) Na^+ および K^+ が生長に与える影響、3) 塩ストレス下の光合成能力、4) 塩ストレス下における光合成関連タンパク質の挙動を調査した。これらの結果から、本章では、耐塩性栽培イネおよび耐塩性野生稲と比較検討することで、*O. officinalis* の耐塩性機構について考察した。

1) 塩ストレス下の乾物生産力および水分保持力

これまでの研究で、イネでは生育環境下において、 NaCl が 50 mM 以上存在すると生長に影響を及ぼす (間藤 1991, 趙ら 1995)。野生稲では、*O. latifolia* が 12 dS m^{-1} (約 100 mM) NaCl 条件で耐塩性栽培イネ品種より乾物生産が落ちないことが明らかになっている (仲村ら 2005a)。本研

究では、100 mM 程度の NaCl 処理を行っており、50 mM より強い塩ストレス下でも、*O. officinalis* は、Pokkali と比較し、塩ストレスによる地上部乾物重の低下が少なかった (Table 2-1). また、*O. officinalis* の RGR は、Nonabokra より低下程度は低かった (Table 2-3). このことから、*O. officinalis* は、強い塩ストレス条件下でも耐塩性栽培イネより NaCl が及ぼす生長阻害が少ない、すなわち乾物生産面から評価すると、耐塩性が高いことが明らかになった。また *O. latifolia* と同等の高い耐塩性を有することが明らかになった。

O. officinalis の耐塩性について、RGR (相対生長率)、NAR (純同化率) および LAR (葉面積比) に分けて検討する。RGR は NAR と LAR の積からなる。塩ストレスを受けた *O. officinalis* において RGR が低下したことは、NAR の低下に起因することが示唆された (Fig. 2-1, Fig. 2-2)。しかし、NAR の低下程度は Nonabokra より低かった (Table 2-3)。このことから、*O. officinalis* における RGR の耐塩性の高さは、NAR を高く維持できることに因ると考えられた。一方で、*O. latifolia* における RGR の低下は、LAR の低下に起因することが示唆された (Fig. 2-1, Fig. 2-2, Table 2-3)。両種における RGR の低下要因には、違いがあることが示唆された。

O. officinalis における各器官の乾物重は、どの器官も対照区に対する塩水処理区の相対値が 60% 以上であり、Pokkali より高い値を示した (Table 2-2)。葉数および葉面積は、耐塩性栽培イネである Pokkali より塩水処理区の低下程度は低かった (Table 2-3)。LAR は Nonabokra と同等の相対値を示した (Table 2-4)。このことから、*O. officinalis* は塩ストレスを受けても、光合成器官である葉身へのダメージは少ないことが示唆された。

O. officinalis における各器官の水分含有率は、どの器官も対照区より塩水処理区で高くなる傾向を示し、*O. latifolia* と同様な結果となった (Table 2-4). RWC では、*O. officinalis* はどの葉位でも Nonabokra より高い値を示した (Fig. 2-3). 耐塩性を有する植物は、水分ストレスの回避のため、細胞内に適合物質を蓄積することが知られている (吉羽ら 1997). Nakamura *et al.* (2002) は、*O. latifolia* はプロリンを葉身内に合成、蓄積することで水分を保持していることを示唆した. 本研究においても、塩ストレス下の *O. latifolia* は葉身にプロリンを多く蓄積し、*O. officinalis* についても同様な結果となった (Table 2-5). このことから、*O. officinalis* は塩ストレス下でも葉身の水分保持能力が高く、その要因の一つとして、細胞内にプロリンを合成、蓄積していることが考えられた.

以上をまとめると、乾物生産面において、*O. officinalis* は、耐塩性栽培イネより高い耐塩性を有すること、および *O. latifolia* と同等の耐塩性を有することが明らかとなった. 塩ストレスを受けても *O. officinalis* が高い耐塩性を示した要因として、①水分を保持することで水分ストレスを回避していること、②葉身への形態的ダメージが少ないこと、③NAR を低下させないことが考えられた.

2) Na⁺および K⁺が生長に与える影響

イネは Na⁺を体内に多く吸収すると、細胞内のイオンバランスが崩れ、代謝活性が低下する (Yeo *et al.* 1985, 趙ら 1995). そのため、耐塩性を有する栽培イネでは、地上部へ Na⁺を吸収させないよう根で Na⁺を選択的に排除していると考えられている (山内ら 1987). 本研究では、*O. officinalis* は Pokkali より葉身に多くの Na⁺を吸収、蓄積することが明ら

かとなった (Table 3-1). このことから, *O. officinalis* は耐塩性栽培イネとは違い, 根による Na^+ 排除能力が低いことが考えられた. 一方で, 体内に Na^+ が多く存在しても, 乾物生産を維持できる, すなわち体内の塩分耐性が高いことが明らかとなった. 仲村ら (2005a) の報告および本研究の結果から, *O. officinalis* においても *O. latifolia* と同様, 塩分耐性の耐塩性機構を有することが明らかとなった.

O. officinalis における Na^+ の地上部へ蓄積により, K^+ の動態に影響を及ぼすことが考えられることから, 各器官の K^+ 含有率についても調査した. その結果, *O. officinalis* および *O. latifolia* の葉身では, 塩水処理後に Na^+ と同時に K^+ 含有率も高くなる結果となった (Table 3-2). 葉身の Na^+/K^+ では, 両種ともに対照区より高い値を示した (Table 3-3). 体内に Na^+ が多く蓄積することにより, 細胞内のイオンバランスが崩壊していることが考えられるが, 両種は乾物生産を低下させないことを考慮すると, K^+ の吸収が増加することは, 両種の耐塩性機構で特異的なものだと考えられる. 気孔の開閉と孔辺細胞内の K^+ 蓄積には関係性があることが報告されており (Humble and Raschke 1971), 両種が塩処理後でも葉身水分含有率を保持したことと関係があるかもしれない.

葉位別の Na^+ では *O. officinalis* および *O. latifolia* はどの葉位でも対照区に比べ Na^+ 含有率は増加した (Table 3-4). 塩ストレスを受けたイネは, 上位葉より下位葉 (老化葉) に Na を多く蓄積することがわかっており (Sharma 1986), *O. officinalis* および *O. latifolia* においても同様な結果を示した. このことは, 枯死する下位葉へ優先的に Na^+ を転流させることで, 光合成が活発に行われている上位葉へ Na^+ の影響を軽減させていることが考えられる. 一方, *O. officinalis* における葉位別 K^+ 含有率では,

対照区より塩処理区が低い値となり (Table 3-5), 主稈の個葉に対して K^+ を転流させるのではなく, 本研究で測定していない葉 (主稈の第 II, IV, VI 葉もしくは主稈に隣接する幹の葉) へ転流させていることが示唆された. 植物体内における Na^+ および K^+ の移動には, それぞれ特異的な輸送体が関わっている. Na^+ が体内に多く蓄積しているにもかかわらず, *O. officinalis* および *O. latifolia* は乾物生産を低下させなかったことは, Na^+ を細胞外へ転流させている, もしくは液胞内へ Na^+ を転流させている輸送体が塩ストレスによって活性化しているかもしれない. また上位葉へ Na^+ を転流させないように, 下位葉に Na^+ 輸送に関する輸送体が多く局在している, もしくは活性化している可能性があると考えられた.

以上をまとめると, *O. officinalis* は, 塩ストレスによって地上部に Na^+ を多く吸収, 蓄積することが明らかになった. 一方で, 耐塩性栽培イネより乾物生産は低下させなかったことから, *O. latifolia* と同様, 塩分耐性の耐塩性機構を有することが明らかとなった. 個葉レベルでも *O. officinalis* は Na^+ を多く吸収, 蓄積することが明らかとなった. その挙動は, 下位葉から上位葉へ優先的に Na^+ を蓄積することが明らかとなった. 一方, K^+ については, 葉身全体では塩処理区で多く蓄積することが明らかとなったが, 個葉レベルでは逆に塩処理区で対照区より少ない値となった. 葉身全体と個葉レベルの K^+ 含有率のギャップについては, 時間経過による K^+ の移動をリアルタイムで調査することや, 蛍光試薬などを用い K^+ の局在を視覚的に検出するなど, 精査が必要となるだろう.

3) 塩ストレス下の光合成能力

一般に、塩ストレスに曝されたイネは、光合成速度が低下すると報告されている (Yeo *et al.* 1985). 本研究では、*O. officinalis* における光合成速度の低下は、Pokkali より少なかった (Table 4-1). また、*O. officinalis* は、塩処理開始後 3 日目と 21 日目の光合成速度の差が少なく、対照区と塩処理区で同様な傾向を示した (Fig. 4-1). このことから、*O. officinalis* は Na^+ を葉身に多く蓄積するにも関わらず、塩ストレス下でも光合成速度を低下させない機構をもつことが示唆された.

塩ストレス下でも *O. officinalis* の光合成速度が維持されている要因について、気孔伝導度および葉内 CO_2 濃度の面から考察する. 塩処理後の気孔伝導度は、すべての種で対照区に対し塩処理区において 50% 以下となり、塩ストレスによって気孔開度の低下が起こることが明らかとなった (Table 4-1). *O. officinalis* の葉身全体としては K^+ 含有率が上昇したものの、上位葉では、塩ストレスによって K^+ はあまり蓄積しなかった (Table 3-5). これは上位葉に K^+ を転流させず、 K^+ 欠乏による気孔の閉鎖を引き起こし、水分保持をおこなっていると考えられる. 今後は、孔辺細胞膜に局在するカリウムチャネルの活性を測定し、細胞レベルでの K^+ 含有率を精査する必要がある.

光合成速度と気孔伝導度は密接に関係することがこれまでの研究で報告されており (Wrong *et al.* 1979, Brugnoli and Lauteri 1991), 塩ストレスを受けたイネは、気孔閉鎖によって炭素固定速度が減少することが明らかになっている (Sese and Tobita 2000). 本研究では、*O. officinalis* における気孔伝導度と光合成速度の関係は高い正の相関を示しており (Fig. 4-2), 塩ストレス下の *O. officinalis* における光合成速度の低下要因は、気孔伝導度の低下によるところが大きいことが示唆された. *O.*

officinalis における気孔伝導度の低下程度は塩処理区で 32%であり、Pokkali より低下したが、あわせて葉内 CO₂ 濃度も低下した。このことは、*O. officinalis* の光合成速度は、塩ストレスによって気孔の閉鎖が起こり低下するが、葉肉内部の光合成活性は、Na⁺が多く存在しても活性を高く維持していることが考えられた。

一方で、乾物生産面では *O. officinalis* と同様の耐塩性機構を持つ *O. latifolia* では、気孔伝導度は塩処理により低下したものの、他種より塩ストレスの影響は少なかった (Table 4-1)。また、気孔伝導度と光合成速度の関係では他種より低い相関関係であり、光合成面における *O. latifolia* の塩反応性は、*O. officinalis* とは異なることが明らかとなった。

葉肉内部の光合成活性を調査するため、気孔の影響を受けない液相型酸素電極を用い個葉の O₂ 放出活性を測定した。その結果、*O. officinalis* の上位葉では、クロロフィル含量、面積当たりの O₂ 放出速度およびクロロフィルあたりの O₂ 放出速度は、対照区より塩処理区で高い値を示した (Table 4-2, Table 4-3, Table 4-4)。さらに、葉位別の Na⁺含有率と O₂ 放出速度の関係では、上位葉での関係性は低かった (Fig. 4-3)。このことから、*O. officinalis* の上位葉では塩ストレス下でも O₂ 放出能力が高く、Na⁺濃度の影響を受けにくいことが示唆された。

以上をまとめると、*O. officinalis* は、塩ストレスを受けても、光合成速度の低下は少なく、そのことが塩ストレス下でも高い乾物生産能力を有することができると示唆された。*O. officinalis* の光合成能力における塩ストレスの影響は、気孔閉鎖による光合成速度低下であり、葉肉部分の光合成活性は、Na⁺害に高い耐性があることが示唆された。一方、*O. latifolia* の光合成については、*O. officinalis* とは異なる塩反応を示し、両

種の光合成能力における耐塩性機構は異なることが示唆された。また、 O_2 放出速度は両種とも塩ストレスによって増加する傾向であったことから、光合成器官の塩耐性は高いことが示唆された。

4) 塩ストレス下における光合成関連タンパク質の挙動

塩ストレス下の *O. officinalis* における耐塩性の高さの要因を調べるため、光合成関連タンパク質に着目し、塩処理前と塩処理後の発現の挙動について二次元電気泳動を用いて解析した。その結果、塩ストレスによって発現が増加および誘発された葉緑体に局在するタンパク質は 20 個以上であり、他種より多かった (Table 5-1)。このことから、*O. officinalis* は、葉緑体に局在するタンパク質の発現を高めることで、光合成活性を高く維持していた可能性があると考えられた。一方、*O. latifolia* は、塩ストレスによって発現が増加および誘発された葉緑体に局在するタンパク質は 7 個であった。これは、*O. officinalis* とは別の方法で光合成活性を高く維持している可能性が考えられた。

二次元電気泳動によって得られた結果から、①クロロフィルに関わるタンパク質、②光化学系に関するタンパク質、③活性酸素除去に関するタンパク質、④炭素固定に関わるタンパク質について *O. officinalis* の光合成活性の高さを考察した。

①クロロフィル合成に関わるタンパク質

塩ストレス下の *O. officinalis* では、3 種のクロロフィル合成代謝に関わるタンパク質の発現が増加した (Table 5-1)、一方で、Pokkali および *O. latifolia* では、塩ストレスによって発現抑制された種類のタンパク質があった (Table 5-1)。このことは、*O. officinalis* と *O. latifolia* では、ク

クロフィル合成代謝に関するタンパク質の塩応答性が異なり、両種における上位葉のクロフィル含量の変化に関与していることが示唆された。

②光化学系に関するタンパク質

塩ストレスを受けた *O. officinalis* は、光化学系ⅡおよびⅠに関わるタンパク質の発現量が対照区より増加および誘発した (Table 5-1)。これは、塩ストレス下の *O. officinalis* の上位葉で O_2 放出速度が高くなる傾向を示したことと関係していることが示唆された。*O. latifolia* は、塩ストレス下でも上位葉で O_2 放出速度が増加する傾向にあったが、光化学系Ⅱに関わるタンパク質の発現は抑制された (Table 5-1)。これは、今回検出されなかった光化学系に関わるタンパク質によって O_2 放出が制御されている可能性がある、もしくは、個々の光化学系に関わるタンパク質の能力が塩ストレスによって上昇した可能性があると考えられるが、今後光化学系に関わるタンパク質の活性を測定する必要がある。一方で *O. latifolia* で発現が誘発されたタンパク質の中には、NAD (P) H 脱水素酵素と推定されたタンパク質があった (Table 5-1)。このタンパク質が *O. latifolia* で発現が誘発され、*O. officinalis* では発現が誘導されなかったことは興味深い。

③活性酸素除去に関するタンパク質

塩ストレスに長期間曝されると、二次的ストレスとして、 O_2^- や H_2O_2 といった活性酸素種が生産され、酸化ストレスを引き起こす (Lee ら 2001)。本研究においても、約 3 週間の長期間塩処理を行っており、供試個体は酸化ストレスを受けている可能性があると考えられる。塩ストレス下の *O. officinalis* において、活性酸素除去に関わるタンパク質 7 種が、

塩ストレスによって発現が増加および誘発された (Table 5-1). 発現が増加および誘発された *O. officinalis* の活性酸素除去に関わるタンパク質の中には, water-water cycle に関するタンパク質が含まれていた. 塩ストレスを受けた *O. officinalis* 上位葉ではクロロフィルあたりの O₂ 放出速度が増加する傾向にあり (Table 4-4), また光化学系 II および I のタンパク質の発現が増加および誘発したことから, 葉緑体内の電子伝達系が活性化している可能性があると考えられる. *O. officinalis* は生産された活性酸素を除去するために, 電子伝達系に隣接する water-water cycle を積極的に活性化させることで, 酸化ストレスの回避を行っていると考えられた. 一方, *O. latifolia* および Pokkali において, 活性酸素除去に関わるタンパク質は, *O. officinalis* とは異なる発現パターンを示した (Table 5-1). *O. latifolia* では, *O. officinalis* と同様に上位葉で O₂ 放出速度が増加傾向にあることより, 活性酸素種による酸化ストレスを引き起こしている可能性があると考えられる. しかし, *O. officinalis* とは別の代謝経路により, 酸化ストレスを回避している可能性が考えられた.

④炭素固定に関わるタンパク質

塩ストレス下の *O. officinalis* において, 光呼吸に関わるタンパク質 2 種の発現が増加および誘発された (Table 5-1). 本研究において, *O. officinalis* は, 塩ストレス下での光合成速度の低下程度が低かった. このことは, 塩ストレス下で Glutamine synthetase および Thioredoxin M5 を多く発現させ, 光呼吸の代謝経路を活性化することにより, 電子伝達系で消費しきれない化学エネルギーを光呼吸によって消費している可能性があると考えられた.

以上をまとめ、*O. officinalis* および *O. latifolia* における塩ストレスによって発現が増加および誘発された光合成関連タンパク質を Fig. 6-1 および Fig. 6-2 に示した。本研究により、*O. officinalis* は、*O. latifolia* と同様の高い耐塩性を有することが明らかになったが、その耐塩性機構については、光合成能力面で種間差がみられた。その要因の一つとして、光合成関連タンパク質の挙動の差異が関係している可能性があると考えられた。今回の解析では、二次元電気泳動によって得られたスポットを相同性検索によって推定したのみであることから、アミノ酸および質量分析によりタンパク質を同定する必要がある。また、塩ストレスによって発現が変化したタンパク質については、タンパク質の活性、およびそのタンパク質をコードする遺伝子の発現についても今後測定する必要がある。

以上、野生稻 *O. officinalis* の耐塩性機構について、本研究で得られた結果を Table 6-1 表にまとめた。野生稻 *O. officinalis* の耐塩性の高さは、①体内へ Na^+ が多く蓄積しても葉身へのダメージが少ないこと、②葉身の水分保持能力が高いこと、③ K^+ の地上部への積極的吸収と個葉への選択的分配を行うこと、④ Na^+ の下位葉へ蓄積すること、⑤ NAR および光合成速度を維持すること、⑥ 光合成器官の塩耐性が高いこと、⑦ 電子伝達系および活性酸素除去系関連のタンパク質発現を増加および誘発させることなどによるものであった。これらの複合的な作用により、*O. officinalis* は塩ストレス条件下においても耐塩性栽培イネより高い物質生産能力を示したと考えられた。

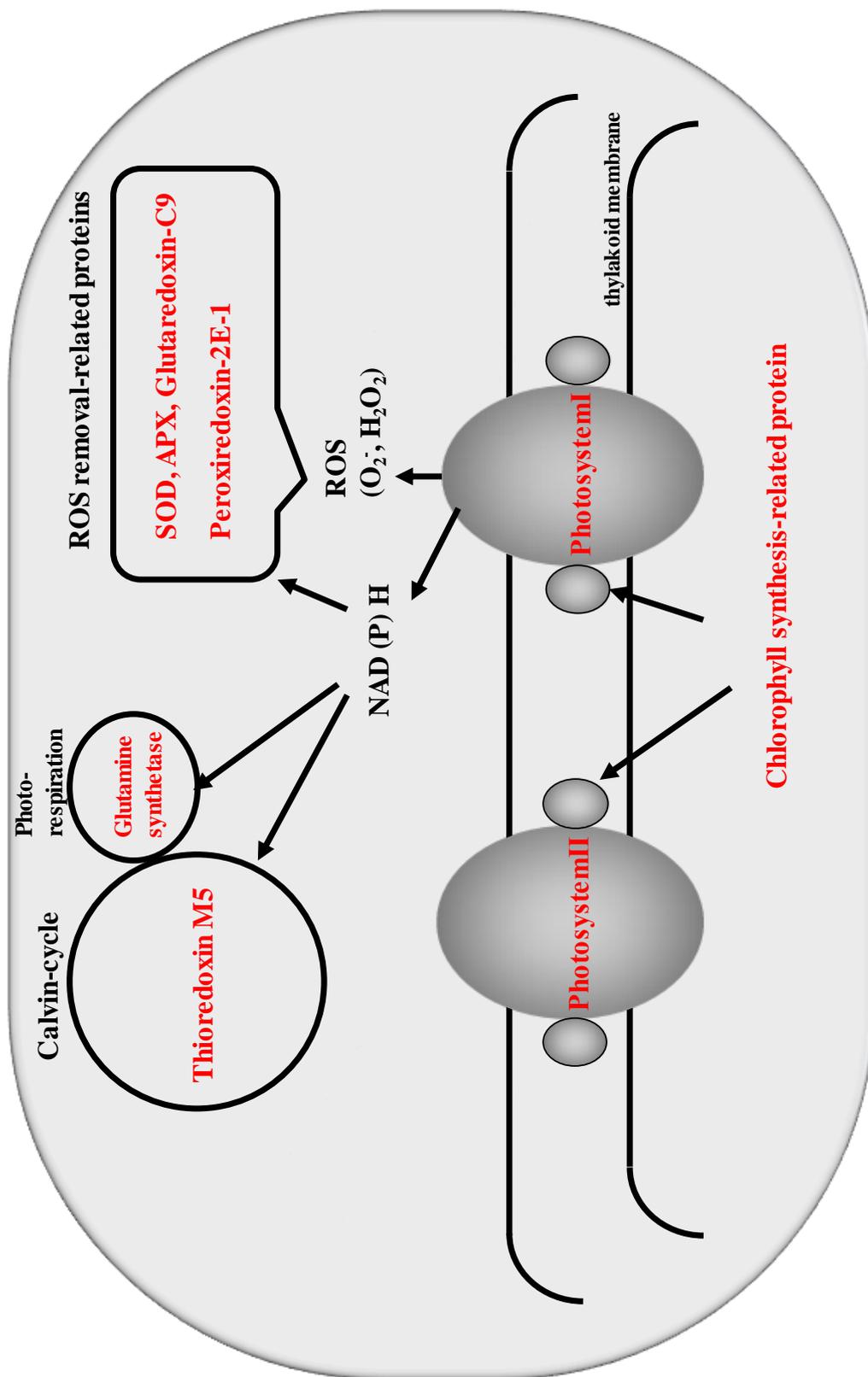


Fig. 6-1. Expression of *O. officinalis* chloroplast protein by salt stress. Induced and increased expression proteins were Red.

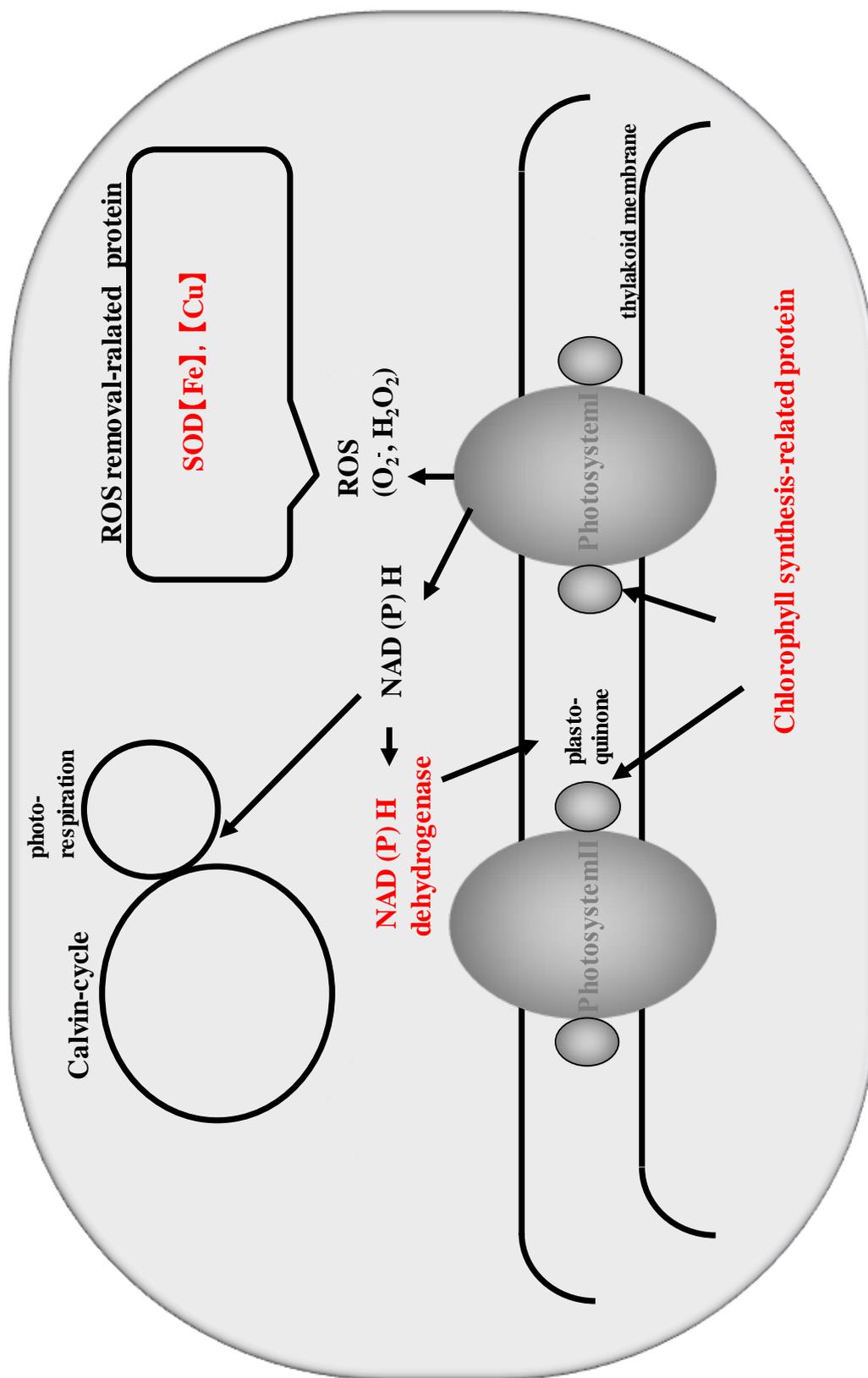


Fig. 6-2. Expression of *O. latifolia* chloroplast protein by salt stress. Induced and increased expression proteins were Red.

Table 6-1. Salt stress response of *O. officinalis*, *O. latifolia* and salt-tolerant cultivar.

	<i>O. officinalis</i>	<i>O. latifolia</i>	Salt-tolerant cultivar
Dry matter production	Shoot dry water production decrease a little Leaf number and leaf area decrease a little High RGR, NAR and LAR Decrease RGR is due to a decrease NAR	Shoot dry water production decrease a little Leaf area decrease a little High RGR, NAR and LAR Decrease RGR is due to a decrease LAR	Shoot dry water production decrease a little Reduction rate of leaf number is similar to <i>O. o</i> and <i>O. l</i> LAR is higher than <i>O. o</i> and <i>O. l</i> Decrease RGR is due to a decrease NAR
Water maintenance	Water content of each organ tends to increase Maintain leaf blade water content Accumulate proline in leaf blade RWC is high in upper leaves	Water content of each organ tends to increase Maintain leaf blade water content Accumulate proline in leaf blade RWC is 80% or more at each leaf position	Water content of leaf sheath and root tends to increase Maintain leaf blade water content Accumulate proline in leaf blade RWC of each leaf position is lower than that of <i>O. o</i> and <i>O. l</i>
Na ⁺	Accumulate a lot of sodium to the shoot Na ⁺ /K ⁺ ratio of each organ is increased Na ⁺ accumulation pattern is V > III > I Isolate the Na ⁺ to extracellular and the vacuole?	Accumulate a lot of sodium to the shoot Na ⁺ /K ⁺ ratio of each organ is increased Na ⁺ accumulation pattern is V > III > I Isolate the Na ⁺ to extracellular and the vacuole?	Accumulate a lot of sodium to the root Na ⁺ /K ⁺ ratio of the leaf blade is maintained Na ⁺ accumulation pattern is V > I > III Selectively eliminated in the roots so as not to raise to shoot
K ⁺	Accumulate a lot in each organ Lower than the control at all leaf positions K⁺ is related water content and stomatal aperture ?	Accumulate a lot in each organ Similar to the control at all leaf positions K⁺ is related water content and stomatal aperture ?	Accumulate a lot in each organ Higher than the control at all leaf positions Maintenance of ion balance in leaf cell

Photosynthetic rate	<p>Pn is maintained during salt stress</p> <p><i>g_s</i> decreased to 32%</p> <p>High positive correlation between Pn and <i>g_s</i></p> <p>Pn decrease is due to <i>g_s</i></p> <p>Photosynthetic activity in mesophyll is high</p>	<p>Pn is maintained during salt stress</p> <p><i>g_s</i> decreased to 46%</p> <p>Moderate positive correlation between Pn and <i>g_s</i></p> <p>Pn decrease is due to <i>g_s</i>?</p> <p>Photosynthetic activity in mesophyll is high</p>	<p>Pn is maintained during salt stress</p> <p><i>g_s</i> decreased to 35%</p> <p>High positive correlation between Pn and <i>g_s</i></p> <p>Pn decrease is due to <i>g_s</i></p> <p>Photosynthetic activity in mesophyll is high?</p>
	<p><i>O₂</i> evolution/cm² tend to increase in upper leaves</p> <p>Chl content tend to increase in upper leaves</p> <p><i>O₂</i> evolution/chl tend to increase in upper leaves</p> <p><i>O₂</i> evolution/chl and Na⁺ are not related in upper leaves</p> <p>Expression of chloroplast-related 23 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of chlorophyll synthesis-related 3 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of chlorophyll synthesis-related Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of ROS removal -related 7 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of photorespiration -related 2 variety Pro. is induced and increased</p>	<p><i>O₂</i> evolution/cm² tend to increase in upper leaves</p> <p>Chl content in the upper leaves is similar to control</p> <p><i>O₂</i> evolution/chl tend to increase in upper leaves</p> <p><i>O₂</i> evolution/chl and Na⁺ are not related in upper leaves</p> <p>Expression of chloroplast-related 8 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of chlorophyll synthesis-related 2 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of NAD (P) H dehydrogenase related Pro. is induced</p> <p>Expression of SOD -related 2 variety Pro. is increased</p> <p>photorespiration -related 2 variety Pro. is not expressed in salt treatment</p>	<p><i>O₂</i> evolution/cm² tend to decrease by salt treatment</p> <p>Chl content in the upper leaves is similar to control or is decreased</p> <p><i>O₂</i> evolution/chl tend in upper leaves is similar to control</p> <p><i>O₂</i> evolution/chl and Na⁺ are not related in upper leaves</p> <p>Expression of chloroplast-related 3 variety Pro. is induced and increased</p> <p>chlorophyll synthesis-related Pro. is not expressed in salt treatment</p> <p>Photosystem-related Pro. is not expressed in salt treatment</p> <p>Expression of SOD and POR-related 2 Pro. is induced and increased</p> <p>photorespiration -related 2 variety Pro. is not expressed in salt treatment</p>
<p><i>O₂</i> evolution</p>	<p><i>O₂</i> evolution/cm² tend to increase in upper leaves</p> <p>Chl content in the upper leaves is similar to control</p> <p><i>O₂</i> evolution/chl tend to increase in upper leaves</p> <p><i>O₂</i> evolution/chl and Na⁺ are not related in upper leaves</p> <p>Expression of chloroplast-related 23 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of chlorophyll synthesis-related 3 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of chlorophyll synthesis-related Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of ROS removal -related 7 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of photorespiration -related 2 variety Pro. is induced and increased</p>	<p><i>O₂</i> evolution/cm² tend to increase in upper leaves</p> <p>Chl content in the upper leaves is similar to control</p> <p><i>O₂</i> evolution/chl tend to increase in upper leaves</p> <p><i>O₂</i> evolution/chl and Na⁺ are not related in upper leaves</p> <p>Expression of chloroplast-related 8 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of chlorophyll synthesis-related 2 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of NAD (P) H dehydrogenase related Pro. is induced</p> <p>Expression of SOD -related 2 variety Pro. is increased</p> <p>photorespiration -related 2 variety Pro. is not expressed in salt treatment</p>	<p><i>O₂</i> evolution/cm² tend to decrease by salt treatment</p> <p>Chl content in the upper leaves is similar to control or is decreased</p> <p><i>O₂</i> evolution/chl tend in upper leaves is similar to control</p> <p><i>O₂</i> evolution/chl and Na⁺ are not related in upper leaves</p> <p>Expression of chloroplast-related 3 variety Pro. is induced and increased</p> <p>chlorophyll synthesis-related Pro. is not expressed in salt treatment</p> <p>Photosystem-related Pro. is not expressed in salt treatment</p> <p>Expression of SOD and POR-related 2 Pro. is induced and increased</p> <p>photorespiration -related 2 variety Pro. is not expressed in salt treatment</p>
Protein profile	<p>Expression of chloroplast-related 23 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of chlorophyll synthesis-related 3 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of chlorophyll synthesis-related Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of ROS removal -related 7 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of photorespiration -related 2 variety Pro. is induced and increased</p>	<p>Expression of chloroplast-related 8 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of chlorophyll synthesis-related 2 variety Pro. is induced and increased</p> <p>Expression of NAD (P) H dehydrogenase related Pro. is induced</p> <p>Expression of SOD -related 2 variety Pro. is increased</p> <p>photorespiration -related 2 variety Pro. is not expressed in salt treatment</p>	<p>Expression of chloroplast-related 3 variety Pro. is induced and increased</p> <p>chlorophyll synthesis-related Pro. is not expressed in salt treatment</p> <p>Photosystem-related Pro. is not expressed in salt treatment</p> <p>Expression of SOD and POR-related 2 Pro. is induced and increased</p> <p>photorespiration -related 2 variety Pro. is not expressed in salt treatment</p>

O. o : *O. officinalis*, *O. l* : *O. latifolia*, *RGR*: relative growth rate, *NAR*: net assimilation rate, *LAR*: leaf area ratio

I : The top leaf, *III* : The third leaf, *V* : The 5th leaf, *Pn* : Photosynthetic rate, *Cl* : intercellular CO₂ concentration, *g_s* : stomatal conductance.

Different response from salt tolerant cultivar and noteworthy points are bold.

要旨

野生稲 *Oryza officinalis* Wall ex Watt の耐塩性機構を明らかにすることを目的に、塩ストレス条件下における、1) 乾物生産，2) 水分含有率，3) イオン含量，4) 光合成速度，5) タンパク質の挙動を耐塩性野生稲 *O. latifolia*，耐塩性栽培イネ品種および塩感受性野生稲 *O. rufipogon* と比較検討した。得られた結果は以下のとおりである。

1) 塩ストレス下での *O. officinalis* における地上部乾物重・相対生長率 (RGR) の低下程度は耐塩性栽培イネよりも低かった。*O. officinalis* の葉数および葉面積への塩の影響は少なく，RGR の低下要因は NAR の低下に起因することが明らかとなった。

2) 塩ストレス下での *O. officinalis* における各器官の水分含有率は，対照区より増加する傾向を示した。各葉位の相対含水率 (RWC) は耐塩性品種 Nonabokra よりも高かった。また、塩処理により葉身にプロリンを蓄積すること明らかとなった。このことが、葉身の水分維持に関与していると示唆された。

3) *O. officinalis* における葉身 Na^+ 含有率は対照区の 28 倍高かった。また、 Na^+ を下位葉へ多く蓄積することが明らかとなった。本種の葉身 K^+ 含有率は，対照区に比べ高くなったが，主稈における個葉レベルでは，対照区より低くなることがわかった。

4) 塩ストレス下の *O. officinalis* における光合成速度は Pokkali より低下程度は低かった。光合成 (炭酸固定) 速度の低下要因は，葉肉部分の炭酸固定活性の低下より，気孔閉鎖に起因することが明らかとなった。個葉の O_2 放出を測定したところ，上位葉で増加する傾向を示した。クロ

ロフィル含量も上位葉で増加傾向を示したことから、*O. officinalis* の光合成活性は塩ストレス下でも高いことが示唆された。

5) 塩ストレス下の *O. officinalis* における葉身タンパク質の挙動を、二次元電気泳動を用いて解析した。塩処理で過剰発現したタンパク質は 53 個、そのうち葉緑体に関わるタンパク質は 23 個であり、他種より多かった。過剰発現したタンパク質の中には、クロロフィル合成、光化学系、活性酸素除去、光呼吸に関わるタンパク質が存在した。このことから、塩ストレス下の *O. officinalis* は、光合成関連タンパク質を過剰発現することで光合成活性を高く維持していると推察された。

以上より、*O. officinalis* の耐塩性の高さは、塩ストレス下により、体内へ Na^+ が多く蓄積しても、①葉身へのダメージが少ない、②葉身の水分保持能力が高い、③ K^+ の地上部への積極的吸収と個葉への選択的分配、④ Na^+ の下位葉への優先的蓄積、⑤NAR・光合成速度の維持、⑥光合成活性の高さ、⑦電子伝達系・活性酸素除去関連のタンパク質発現の増加・誘発が要因だと考えられた。

Summary

To evaluate the salt tolerance mechanism of the wild *Oryza officinalis* Wall ex Watt., I investigated dry matter weight, ion content, photosynthetic rate, O₂ evolution rate and proteins property of *O. officinalis*, and compared with the salt-sensitive wild species *O. rufipogon* Griff. and the salt-tolerant cultivar *O. sativa* L. (Pokkali and Nonabokra) and the salt-tolerant wild species *O. latifolia* Desv. under different NaCl-stressed condition.

Oryza officinalis subjected to salt stress accumulated more Na⁺ in the shoot than Pokkali. The shoot dry matter, relative growth rate (RGR), leaf number, leaf area and relative water content (RWC) of *O. officinalis* did not decrease as compared to those of salt-tolerant cultivar. In NAR and LAR of *O. officinalis*, NAR decreased more due to salt stress. The main factor of decreased RGR of *O. officinalis* was due to decreased NAR.

The Na⁺ and K⁺ content and Na⁺/K⁺ rate in leaf blade of *O. officinalis* increased due to salt stress. *O. officinalis* accumulated more Na⁺ in the lower leaves, on the other hand K⁺ content was lower in all leaf as compared those of control plant.

The photosynthetic rate of *O. officinalis* did not decrease with salt-stressed condition as compared that of Pokkali. The main factor of the decreased photosynthetic rate of *O. officinalis* was stomatal closure. Photosynthetic rate showed a positive correlation with stomatal conductance in *O. officinalis*, but a clear correlation was not found in *O. latifolia*. Chlorophyll (Chl) content and Chl-based O₂ evolution rate in the

upper leaves of *O. officinalis* subjected to salinity stress tended to be higher than those of the control plant. There was no correlation between the Chl based O₂ evolution rate and Na⁺ content in upper leaves of *O. officinalis*.

The leaf blade protein analyzed by two-dimensional electrophoresis showed 53 spots that were over-expressed by salinity stress in *O. officinalis* compared to that in the control, in which 23 spots were estimated to be localized in the chloroplast, and related to Chl synthesis, photosystem and water-water cycle.

These results indicated that the salt tolerance mechanism of *O. officinalis* were, ① Less damage to leaf blade, ② RWC is high, ③ Absorption to K⁺ shoot and selective distribution to leaves, ④ accumulated more Na⁺ in the lower leaves, ⑤ Maintain of NAR and photosynthetic rate, ⑥ High photosynthetic activity, ⑦ Expression of localization in the chloroplast-related proteins were induced and increased. Similar mechanisms were observed in *O. latifolia*. However, there were some differences between *O. officinalis* and *O. latifolia* in the response of photosynthetic rate and protein properties under salinity stressed condition.

謝辞

本研究を遂行するにあたり，琉球大学農学部 モハメド アムザド ホサイン准教授には，研究者としての心構えや姿勢，ならびに論文執筆について多くのご指導ご鞭撻を賜りました．心より感謝の意を表します．

本論文を取り纏めるにあたり，琉球大学農学部 玉城政信教授には，本研究とは違う分野の着眼点から，多くのご助言を賜りました．また学生生活の面でも，両親に代わり叱咤激励していただきました．深く感謝いたします．

佐賀大学農学部 鄭紹輝教授，鹿児島大学農学部 遠城道雄教授には，本論文をご校閲していただき，的確なご助言を賜りました．心から御礼申し上げます．

本研究におけるすべての実験および論文執筆に関して，琉球大学農学部 仲村一郎助教には，終始懇切丁寧なご指導を賜りました．また，仲村一郎助教のご助力により，学部時代から現在に至るまで幾多の困難を乗り越えることができました．ここに深く感謝の意を表します．

本研究において，光合成速度測定では，琉球大学農学部 赤嶺光准教授のご協力を賜りました． Na^+ および K^+ 含有率測定では，旧琉球大学機器分析支援センターの職員の皆様のご協力を賜りました．プロリン含量およびタンパク質抽出では，琉球大学農学部 伊村嘉美准教授のご協力を賜りました．琉球大学農学部附属亜熱帯フィールド科学教育センターの技術職員の皆さまには，栽培施設の提供，および各実験の測定についてご協力を賜りました．すべての実験において，ホサイン研究室，玉城

研究室，仲村研究室の皆様には，多大なるご尽力を賜りました．ここに
あわせて厚く御礼申し上げます．

最後に，長きにわたり，私の研究生活を支えてくれた最愛なる妻珠里
と，進学に対し暖かく見守り，辛抱強く支援してくれた家族にも深甚な
る感謝の意を表します．

引用文献

- Abbasi F.D. and Komatsu S. 2004. A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics* 4: 2072-2081.
- 東江栄 2004. アイスプラントを用いた土壌脱塩技術の可能性. 熱帯農業 48: 294-298.
- Akita, S. and Cabuslay, G.S. 1990. Physiological basis of differential response to salinity in rice cultivars. *Plant Soil* 123: 277-294.
- Alder A., Jamil M., Marzorati M., Bruno M., Vermathen M., Bigler P., Ghisla S., Bouwmester H., Beyer P. and Babili S.A. 2012. The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science* 335: 1348-1351.
- Aldesuquy H.S. 1992. Growth and pigment content of wheat as influenced by the combined effects of salinity and growth regulators. *Biologia Plantarum* 34: 275-283.
- Anil, V.S., Krishnamurthy, P., Kuruvilla, S., Sucharitha, K., Thomas, G. and Marhew, M.K. 2005. Regulation of the uptake and distribution of Na^+ in shoots of rice (*Oryza sativa*) variety Pokkali: role of Ca^{2+} in salt tolerance response. *Physiol. Plant.* 124: 451-464.
- 荒井 (三王) 裕見子・小林伸哉・吉永悟志・高井俊之・近藤始彦 2011. 水稻の塩害とその対策. 農及園 86: 737-742.
- Arunroj, D.S, Supapoj, N., Toojinda, T. and Vanavichit, A. 2004. Relative leaf water content as an efficient method for evaluating rice cultivars for tolerance to salt stress. *Science Asia* 30: 411-415.

- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.
- Basu, S., Roychoudhury, A., Saha, P.P. and Sengupta, D.N. 2010. Comparative analysis of some biochemical responses of three indica rice varieties during polyethylene glycol-mediated water stress exhibits distinct varietal differences. *Acta Physiol. Plant* 32: 551-563.
- Bates, L. S., R. P. Waldren and I. D. Teares 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39:205-207.
- Bohra, J.S. and Doerffling, K. 1993. Potassium nutrition of rice (*Oryza Sativa* L.) varieties under NaCl salinity. *Plant Soil* 152: 299-303.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brugnoli, E. and Lauteri, M. 1991. Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C₃ non-halophytes. *Plant Physiol.* 95: 628-635.
- Chaves, M. M., Flexas, J. and Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551-560.
- 趙東夏・佐々木治人・石井龍一 1995. 韓国産水稻品種の耐塩性に関する研究 I. 乾物生産と個葉光合成における耐塩性の機構. *日作紀* 64: 475-482.

- 趙東夏・伊藤亮一・石井龍一 1996. 韓国産水稻品種の耐塩性に関する研究 第2報 NaCl 処理がイネの葉身, 葉鞘, 根の Na および K イオン濃度に及ぼす影響. 日作紀 65: 1-7.
- Critchley C. 1982. Stimulation of photosynthetic electron transport in a salt-tolerant plant by high chloride concentrations. *Nature* 298: 483-485.
- Flowers T.J., Troke P.F. and Yeo A.R. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 89-121.
- Flowers, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307-319.
- Humble, G.D. and Raschke K. 1971. Stomatal opening quantitatively related to Potassium transport. *Plant Physiol.* 48: 447-453.
- Hoshida H., Tanaka Y., Hibino T., Hayashi Y., Tanaka A., Takabe T. and Takabe T. 2000. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Mol. Biol.* 43: 103-111.
- Ishii R., Yamagishi T. and Murata Y. 1977. On a method for measuring photosynthesis and respiration of leaf slices with an Oxygen electrode. *Jap. J. Crop Sci.* 46: 53-57.
- Jena, K.K. and Khush, G.S. 1990. Introgression of genes from *Oryza officinalis* Will ex Watt to cultivated rice, *O. sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* 80: 737-745.
- Kim D.W., Rakwal R., Agrawal G.K., Jung Y.h., Shibato J., Jwa N.S., Iwahashi Y., Iwahashi H., Kim D.H., Shim I.S. and Usui K. 2005. A hydroponic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf. *Electrophoresis* 26: 4521-4539.

- Kobayashi, N., Ikeda, R., Domingo I.T. and Vaughan D.A. 1993. Resistance to infection of rice Tungro viruses and vector resistance in wild species of rice (*Oryza* spp.). *Japan. J. Breed.* 43: 377–387.
- Larcher, W. 2003. *Physiological plant ecology*. Fourth edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 416-428.
- Lee D.H. Kim Y.S. and Lee C.B. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 158: 737-745.
- Lee, K.S., Choi, W.Y., Ko, J.C., Kim, T.S. and Gregorio, G.B. 2003. Salinity tolerance of japonica and indica rice (*Oryza sativa* L.) at the seedling stage. *Planta* 216: 1043-1046.
- Levitt, J. 1992. *Responses of plants to environmental stress*. Academic press, New York. p489-530.
- Lin H., Wang R., Qian Q., Yan M., Meng X., Fu Z., Yan C., Jiang B., Su Z., Li J. and Wang Y. 2009. DWAR27, An iron-containing protein required for the biosynthesis of strigolactones, regulates rice tiller bud outgrowth. *The Plant Cell* 21: 1512-1525.
- Liu R., Zhang H.H., Chen Z.X., Shahid M.Q., Fu X.L. and Liu X.D. 2015. Drought-tolerant rice germplasm developed from an *Oryza officinalis* transformation-competent artificial chromosome clone. *Genetics and Molecular Research* 14: 13667-13678.
- Lutts S., Kinet J.M. and Bouharmont J. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Ann. Bot.* 78: 389-398.

- 前田英郎・松下景・飯田修一・春原嘉弘・梶亮太・平林修介・小川紹文
2007. イネ C ゲノム野生種 *Oryza officinalis* 由来の縞葉枯病抵抗性に
関する QTL 解析. 近中四農研報 6: 29-38.
- 前田良之 2012. 植物の耐塩性機構と植物を利用した土壌塩類の除去.
日本海水学会誌 66: 92-98.
- Makihara, D., Tsuda, M., Morita, M., Hirai, Y. and Kuroda, T. 1999. Effect of
salinity on the growth and development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties.
Jpn. J. Trop. Agr. 43: 285-294.
- 榎原大悟・平井儀彦・津田誠・岡本憲治 2001. ナトリウムイオン集積に
対するイネ切断葉の光合成反応からみた耐塩性の評価. 日作紀 70:
78-83.
- Matoh, T., Kairusmee, P. and Takahashi, E. 1986. Salt-induced damage to rice
plants and alleviation effect of silicate. Soil Sci. Plant Nutr. 32: 295-304.
- 間藤徹 1991. 高等植物の耐塩性機構. 植物細胞工学 3: 268-272.
- 間藤徹 1997. 植物の耐塩性メカニズム. 植物の化学調節. 32: 198-206.
- Matsushita, N. and T. Matoh 1991. Characterization of Na⁺ exclusion
mechanisms of salt-tolerant reed plants in comparison with salt-sensitive
rice plants. Physiol. Plant. 83:170 - 176.
- Misra A.N., Sahu S.M., Misra M., Singh P., Meera I., Das N., Kar M. and
Sahu P. 1997. Sodium chloride induced changes in leaf growth, and
pigment and protein contents in two rice cultivars. Biologia Plantarum 39:
257-262.
- Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Ann. Rev.
Plant Biol. 59: 651-681.

- Nakamura, I., Murayama, S., Tobita, S., Bong, B.B., Yanagihara, S., Ishimine, Y. and Kawamitsu, Y. 2002. Effect of NaCl on the photosynthesis, water relations and free proline accumulation in the wild *Oryza* species. *Plant Prod. Sci.* 5: 305-310.
- 仲村一郎・東江栄・飛田哲・柳原誠司・野瀬昭博・村山盛一・本村恵二
2004. 野生稲 *O. latifolia* Desv.の葉緑体チラコイド膜の耐塩性. *日作紀* 73: 84-92.
- 仲村一郎・東江栄・村山盛一・飛田哲・柳原誠司・川満芳信・本村恵二
2005a. 生長・乾物生産からみた野生稲 *Oryza latifolia* Desv.の耐塩性. *熱帯農業* 49: 70-76.
- 仲村一郎・東江栄・村山盛一・飛田哲・柳原誠司・川満芳信・本村恵二
2005b. 塩ストレス下における個葉の光合成特性からみた野生稲 *O. latifolia* Desv.の耐塩性. *熱帯農業* 49: 77-83.
- Nandwal, A.S., Hooda, A. and Datta, D. 1998. Effect of substrate moisture and potassium on water relations and C, N and K distribution in *Vigna radiata*. *Biol. Plant.* 41: 149-153.
- Niu, X., Bressan, R.A., Hsegawa, P.M. and Pardo, J.M. 1995. Ion homeostasis in NaCl stress Environments. *Plant Physiol.* 109: 735-742.
- 農林水産省 2011. 津波により流失や冠水等の被害を受けた農地の推定面積. <http://www.maff.go.jp/j/press/nousin/sekkei/pdf/110329-02.pdf>.
2016年12月5日現在.
- O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.

- Oh M.J., Chun H.S. and Lee C.B. 2003. Differences in photosynthetic characterization of salt tolerance for two rice (*Oryza sativa*) cultivars. *Journal of Plant Biology* 46: 17-22.
- Porra R.J., Thompson W.A. and Kriedemann P.E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975: 384-394.
- 斉藤邦行・石原邦 1987. 水稻葉身の光合成速度におよぼす飽差の影響—光利用効率, CO₂利用効率に着目して—. *日作紀* 56: 163-170.
- Sharma S.K. 1986. Mechanism of tolerance in rice varieties differing in sodicity tolerance. *Plant and Soil* 93: 141-145.
- Sese, M.L.D. and Tobita, S. 2000. Effects of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance. *J. Plant Physiol.* 157: 54-58.
- Sengupta S. and Majumder A.L. 2009. Insight into the salt tolerance factors of a wild halophytic rice, *Porteresia coarctata*: a physiological and proteomic approach. *Planta* 229: 911-929.
- Siringam, K., Juntawong, N., Um, S.C. and Kirdmanee, C. 2009. Relationships between sodium ion accumulation and physiological characteristics in rice (*Oryza sativa* L. spp. *Indica*) seedling grown under iso-osmotic salinity stress. *Pak. J. Bot.* 41: 1837-1850.

- Tanguilig, V.C., Yambao, E.B., O'toole, J.C. and Datta, S.K.D. 1987. Water stress effects on leaf elongation, leaf water potential, transpiration, and nutrient uptake of rice, maize, and soybean. *Plant Soil* 103: 155-168.
- 高橋英一 1987. 生命にとって塩とは何か. 農文協. 143-161.
- 寺島一郎 2001. 朝倉植物生理学講座 5 環境応答 初版第1刷. 朝倉書店. 東京. 1-212.
- Tiwari B.S., Bose A. and Ghosh B. 1997. Photosynthesis in rice under a salt stress. *Photosynthetica* 34: 303-306.
- Tsuchiya, M., Miyake, M. and Naito, H. 1994. Physiological response to salinity in rice plant: III. A possible mechanism for Na⁺ exclusion in rice root under NaCl-stress condition. *Jpn. J. Crop Sci.* 63: 326-332.
- 魚住信之 2011. トランスポーター研究が土壌・肥料・植物栄養学にもたらすインパクト 5. 植物の Na 循環系と耐塩性. *土肥誌* 82: 65-69.
- Vos, A.C., Broekman, R., Guerra, C.C.D.A., Rijsselberghe, M.C. and Rozema, J. 2013. Developing and testing new halophyte crops: A case study of salt tolerance of two species of the brassicaceae, *Diplotaxis tenuifolia* and *Cochlearia officinalis*. *Environ. Exp. Bot.* 92: 154-164.
- Watanabe, Y. and Ono, S., 1973. Cytogenetic studies on the artificial polyploids in the genus *Oryza*. V. Sterile amphiploids, *sativa-officinalis* (AACC). *Japan. J. Breed.* 23: 67-70.
- Wrong, S.C., Cowan, I.R. and Farquhar, G.D. 1979. Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. *Nature* 282: 424-426.
- Xiao, J.H., Li, J.M., Grandillo, S., Ahn, S.N., Yuan, L.P., Tanksley, S.D. and McCouch, S.R. 1998. Identification of trait-improving quantitative trait

loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. *Genetics* 150: 899-909.

山内益夫・前田吉広・長井武雄 1987. 耐塩性の品種間差とナトリウムの吸収・移行特性との関係(1) イネ. *土肥誌* 58: 591-594.

Yeo, A.R. and Flowers, T.J. 1983. Varietal differences in the toxicity of sodium ions in rice leaves. *Physiol. Plant.* 59: 189-195.

Yeo, A.R., Caporn, S.J.M. and Flowers, T.J. 1985. The effect of salinity upon photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.): Gas exchange by individual leaves in relation to their salt content. *J. Exp. Bot.* 36: 1240-1248.

Yoshida, S., Forno, D.A., Cook, J.H. and Gomez, K.A. 1976. *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. International Rice Research Institute, Manila. 61-65.

吉田和哉 2005. 植物の Na^+/K^+ 輸送機構と耐塩性植物の分子育種. *化学と生物* 43: 719-726.

吉羽洋周・清末和宏・篠崎和子・篠崎一雄 1997. 植物におけるプロリン合成と水ストレス耐性. *蛋白質核酸酵素* 42: 842-855.

Zhang P., Battchikova N., Paakkarinen V., Katoh H., Iwai M., Ikeuchi M., Pakrasi H.B. Ogawa T. and Aro E.M. 2005. Isolation, subunit composition and interaction of the NDH-1 complexes from *Thermosynechococcus elongates* BP-1. *Biochem. J.* 390: 513-520.