

## 塩ストレス下における個葉の光合成特性からみた野生種 *O. latifolia* Desv. の耐塩性

仲村一郎<sup>1</sup>・東江 栄<sup>2</sup>・村山盛一<sup>1</sup>・飛田 哲<sup>3</sup>・柳原誠司<sup>4</sup>・川満芳信<sup>1</sup>・本村恵二<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 琉球大学 〒903-0213 沖縄県西原町千原1番地

<sup>2</sup> 佐賀大学農学部生物生産学科 〒840-8502 佐賀県佐賀市本庄町1番地

<sup>3</sup> 国際農林水産業研究センター 〒305-8686 茨城県つくば市大わし1-1

<sup>4</sup> 国際稲研究所 *International Rice Research Institute (IRRI) DAPO Box 7777, Metro Manila, Philippines*

**要約** イネの野生種 *O. latifolia* の乾物生産が NaCl 存在下でも高く維持された要因を明らかにするため、NaCl 処理した個葉の光合成速度、拡散伝導度、葉内 CO<sub>2</sub> 濃度 (Ci)、及び CO<sub>2</sub> 固定効率を測定し、野生種と栽培種と比較した。その結果、NaCl 処理で光合成速度が低下したのは、栽培種では気孔閉鎖による葉内への CO<sub>2</sub> 供給速度の減少と Rubisco 活性の低下が、また野生種では、気孔の閉鎖が主要因であることが示唆された。液相型酸素電極を用いて気孔閉鎖の影響を除いた光合成速度を測定したところ、*O. latifolia* では塩ストレス下においても光合成速度が維持されること、またこの効果は下位葉で顕著であることが明らかとなった。また同様にストレスのない条件下で栽培した葉身の液相中の光合成速度を、液相中の反応液の NaCl 濃度を種々かえて測定し、光合成能力に及ぼす塩の影響を調べた。その結果、*O. latifolia* では、高 NaCl 反応液中でも光合成速度が維持されることが明らかとなった。以上の結果から、*O. latifolia* は葉身の光合成関連酵素あるいは、チラコイド膜の NaCl 耐性が高いと考えられた。

キーワード 気孔伝導度、光合成速度、葉内 CO<sub>2</sub> 濃度

**Salt tolerance of *Oryza latifolia* Desv. in relation to photosynthesis under salinity conditions** Ichiro NAKAMURA<sup>1</sup>, Sakae AGARIE<sup>2</sup>, Seiichi MURAYAMA<sup>1</sup>, Satoshi TOBITA<sup>3</sup>, Seiji YANAGIHARA<sup>4</sup>, Yoshinobu KAWAMITSU<sup>1</sup> and Keiji MOTOMURA<sup>1</sup> <sup>1</sup>*Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan* <sup>2</sup>*Faculty of Agriculture, Saga University, 1 Honjyou, Saga 840-8502, Japan* <sup>3</sup>*Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), 1-1 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, Japan* <sup>4</sup>*International Rice Research Institute (IRRI) DAPO Box 7777, Metro Manila, Philippines*

**Abstract** To elucidate the factors responsible for salt tolerance in *Oryza latifolia* Desv., we measured the photosynthetic rate, stomatal conductance, intercellular CO<sub>2</sub> concentration (Ci) and CO<sub>2</sub> fixation efficiency in the salt-stressed leaves, compared with those of the salt susceptible wild rice species *O. rufipogon* Griff., salt-tolerant *O. sativa* cultivar SR26B, and susceptible *O. sativa* cultivar IR28. In the cultivated species, the photosynthetic rate decreased with the application of NaCl due to the decrease in the CO<sub>2</sub> supply rate associated with the stomatal closure and lowering of the Rubisco activity, whereas in the wild rice species, the closure of the stomata was the main factor responsible for the decrease in the photosynthetic rate. Photosynthetic rate without the effects of stomatal closure that was measured with a liquid phase type oxygen electrode was maintained in *O. latifolia* under the stress conditions, and the superiority was remarkable in terms of leaf senescence. Using this method, the photosynthetic rate of leaves grown under normal conditions was also measured in the reaction buffer containing NaCl at different levels. In *O. latifolia*, the photosynthetic rate was maintained in the buffer solution containing 655mM NaCl, suggesting that the photosynthetic enzymes and thylakoid membrane of this species display specific characteristics of enhanced resistance to NaCl.

**Key words:** Intercellular CO<sub>2</sub> concentration, Photosynthetic rate, Stomatal conductance

### 緒言

我々はこれまでに、生長、及び乾物生産に対する NaCl の影響について検討し、*Oryza* 属近縁野生種の *O. latifolia* は耐塩性栽培種 SR26B よりも耐塩性が高いことを明らかにした。同時に測定した NaCl 存在下での個葉光合成は *O. latifolia* で高く、本種では塩ストレス下において光合成速度が維持されることが明らかとなった。

イネの耐塩性を光合成の面から調べた例は少なく、特に野生種についてはほとんどみられない。一般に作物の光合成速度は、塩ストレス条件下で低下するが (Kaiser *et al.*, 1981; Seeman and Critchley, 1985)、それは、1) 気孔の閉鎖 (Nagy and Galiba, 1995; Lakshimi *et al.*, 1996)、2) 葉肉における CO<sub>2</sub> 固定系の活性の低下 (趙ら, 1995; Delifine *et al.*, 1998; Downton, 1977)、及び 3) イオンバランスの攪乱 (Khan *et al.*, 1997) 等が考えられている。

葉内の CO<sub>2</sub> 濃度 (Ci) は、ストレス条件下における光合成速度の低下の指標としてよく用いられる

(斉藤・石原, 1987; 平沢ら, 1989).  $C_i$  は気孔を介した  $CO_2$  の供給と光合成による固定とのバランスで決まる. したがって, ある条件下における  $C_i$  と光合成速度の低下度を比較することで, 光合成速度の低下要因を  $CO_2$  の供給速度 (気孔開度), 及び葉肉部分の活性とに分けて捉えることができる. また,  $C_i$  は光合成の基質濃度とみなされるので,  $C_i$  の変化に伴う光合成速度の変化をプロットした  $C_i$ -光合成曲線 ( $A/C_i$  カーブ) の初期勾配は,  $CO_2$  固定酵素であるリブロース 1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ (Rubisco) の活性を (Faquhar and Sharkey, 1982), さらにその最大値は, リブロース 1,5-ビスリン酸 (RuBP) の再生能力を表すと考えられている (Faquhar and Sharkey, 1982).

$CO_2$  の葉内への拡散には, 葉面境界層抵抗, 気孔抵抗, 葉肉細胞抵抗, といった抵抗が存在するが, その中で最も強く  $CO_2$  の拡散を抑制するのは気孔抵抗である. 葉肉部の  $CO_2$  固定能に及ぼす塩ストレスの影響を調べる際に気孔の影響の無い光合成速度を測定する必要がある. 液相型酸素電極法は, この目的に最も適した手法である. 本法では, 葉身を細断し, 高濃度の基質 ( $HCO_3^-$ ) の条件下で酸素放出速度を測定するため, 葉片内外の基質の濃度勾配を大きく保ち, 葉組織内への  $CO_2$  拡散抵抗を低く抑えることができる. したがって, 得られた値は, 気孔の開閉に影響されない葉肉部の  $CO_2$  固定能を示していると考えられる.

本研究では, まず通気式同化箱法で光合成速度, 及び気孔コンダクタンスを測定し, 塩ストレス下での光合成速度の低下要因を検討した. また葉肉部の光合活性を比較するため, 液相型酸素電極法を用いて気孔の影響をなくした光合成能力を調べ, *O. latifolia* の乾物生産が塩ストレス下でも低下しない要因を検討した.

### 材料および方法

#### 供試材料および栽培条件

材料には, JIRCAS 沖縄支所において NaCl ( $12 \text{ dSm}^{-1}$ ; 約  $113 \text{ mM}$ ) 存在下の生存率を指標に選抜された野生種 *O. latifolia* Desv. (IRGC Acc. No. 100965) を用いた. 本研究では他に, 感受性野生種 *O. rufipogon* Griff. (IRGC Acc. No. 105390), また比較品種として栽培稲感受性品種 *O. sativa* L. cv. IR28, 及び耐塩性品種 *O. sativa* L. cv. SR26B を用いた. 野生稲は種子の籾殻を取り除き  $45^\circ\text{C}$  で3日間おき, 休眠を打破した. 予措として種子消毒 (ベンレート T

水和剤 2000 倍希釈液に 24 時間浸漬) と催芽 ( $32^\circ\text{C}$ , 24 時間水に浸漬) を行った. 葉齢が 3 ~ 4 葉期に達した幼苗を木村氏 B 液 ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $48.2 \text{ mg/l}$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$   $15.9 \text{ mg/l}$ ,  $\text{MgSO}_4$   $65.9 \text{ mg/l}$ ,  $\text{KNO}_3$   $18.5 \text{ mg/l}$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$   $59.9 \text{ mg/l}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $24.8 \text{ mg/l}$ , Fe-citrate ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )  $2 \sim 5 \text{ mg/l}$ ) を含む  $48 \times 80 \times 20 \text{ cm}$  のプラスチックバットに移植し水耕栽培した. 植物体は軽石を敷き詰めて穴を開けたプラスチック製のザルに固定した. バットに 8 つの穴を開けた発砲スチロールを浮かせ, その穴に植物体が入ったザルを設置した. 水耕液の更新は 7 日毎に行い, pH は pH 計 (HM-10P, 東亜電波工業株式会社) を用いて,  $5.0 \sim 5.5$  になるよう毎夕調整した.

NaCl 処理は, 通気式同化箱を用いた光合成測定用の個体については, 播種後 48 日目に飽和 NaCl を水耕液に電気伝導度が  $6 \text{ dSm}^{-1}$ ,  $12 \text{ dSm}^{-1}$  となるように添加した. 対照区の電気伝導度は,  $0.9 \text{ dSm}^{-1}$  であった. 電気伝導度は, 電気伝導度計 (CM-14P, 東亜電波工業株式会社) で測定した. また, 葉別別の光合成測定に用いた個体については, 播種後 48 日目に  $40$ ,  $80$ , 及び  $120 \text{ mM}$  NaCl となるように水耕液に NaCl 処理した. 水耕液を更新する際に調整した. その間は特に新たに NaCl を添加しなかった. また, 水温は特に制御しなかった. 各処理区の供試個体数は 2 個体で 3 反復とした.

#### 通気式同化箱法による光合成速度の測定

測定には, NaCl 処理前に展開した主群着生の完全展開葉 (第 10 または第 11 葉) 及びそれに隣接する分けつの最上位完全展開葉を用い, 処理後 7 日目及び 14 日目は随時展開が完了した葉を供試した. 測定は Kawamitsu *et al.* (1999) の方法に準じた. 測定を開始する前に約 1 時間, 陽光ランプ (D-400, 東芝) の光を  $1000 \sim 1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  の強さで照射した. 同化箱内への空気導入流量, 光強度, 葉温, 葉面飽差, および  $CO_2$  濃度等の環境条件を制御できる通気式同化箱を用い, 光合成速度, 蒸散, 気孔伝導度, 葉内  $CO_2$  を測定した. 同化箱への導入空気量と露天温度の調節には, それぞれマスフローコントローラー (STEC 社, SEC-4400), クールニクス (YAMATO-KOMATSU, CTE82W) を用いた. 同化箱の入口と出口の  $CO_2$  濃度, 相対湿度は, それぞれ赤外線ガス分析計 (Li-COR 社, Li-6251), 相対湿度センサー (Vaisala 社, HMP-112Y) で測定した. 測定条件は, 導入空気量  $8.5 \text{ L min}^{-1}$ , 光強度は  $1550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  の飽和光, 葉温  $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , 葉面飽差  $1.8 \sim 2.0 \text{ kPa}$  お

よび CO<sub>2</sub> 濃度は、360 ppm であった。また、光合成一葉内 CO<sub>2</sub> 曲線作成時の外気 CO<sub>2</sub> 濃度は、0～1100 μL<sup>3</sup>まで 10 段階とした。

Ci は、以下の式から算出した。

$$C_i = C_a - P (r_{a(CO_2)} + r_{s(CO_2)})$$

ここで、P は光合成速度、C<sub>a</sub> は外気 CO<sub>2</sub> 濃度、r<sub>a(CO<sub>2</sub>)</sub> は葉面境界層抵抗、および r<sub>s(CO<sub>2</sub>)</sub> は気孔抵抗である。

#### 液相型酸素電極による野生稲の光合成速度の測定

測定は、液相型酸素電極 (Clark-thpe, Rank Brothers, England) を用い Ishii *et al.* (1977) の方法で行った。水耕液に NaCl を終濃度で 40, 80, 及び 120 mM になるように加えて 14 日間根から NaCl を吸収させた個体の第 I 葉 (最上位完全展開葉), 第 III 葉, 第 V 葉の中央部位 1 cm<sup>2</sup> を中肋を除いて切除し, 0.5 mM 硫酸カルシウムを含む 50 mM HEPES-NaOH (pH7.2) 緩衝液中で 2 mm × 2 mm にさらに細断した。その後, 1～2 分脱気した後, 同じ緩衝液を含む測定用キュベットに葉片を入れた。5～9 分光を照射した後, 30 mM NaHCO<sub>3</sub> を添加し, 反応を開始させた。反応液の温度は 25℃, 光強度は 1200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> とした。

葉片の光合成能に及ぼす NaCl の直接的な影響を調べるために、酸素電極法による分析に供試した個体のうち、NaCl 処理していないものについては、測定用キュベット内の NaCl 濃度を種々変えて酸素放出速度を測定した。測定には、主程最上位完全展開葉 (第 9 葉または第 10 葉) を用いた。測定する葉を上述のように採取し、同様の緩衝液中で 2 mm × 2 mm に細断し、1～2 分脱気した。その後、測定葉キュベット内の反応液の NaCl 濃度を終濃度で 100, 300, および 655 mM に設定し酸素放出速度を測定した。約 10 分間光を照射した後、30 mM NaHCO<sub>3</sub> を添加し、反応を開始させた。反応液の温度は 25℃, 光強度は 1200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> であった。測定後、葉片を集めて -80℃ に保存し、クロロフィル含量の測定に用いた。クロロフィルの測定は Porr *et al.* (1989) の方法に従った。

#### Na<sup>+</sup> 含量の測定

通気式同化箱法で光合成速度を測定した直後、測定部位を切除し、表面を水道水、及び蒸留水で洗浄した後、80℃ で 72 時間乾燥させた。乾燥したサンプルを粉碎し、粉碎試料 0.25g に 0.1% 硝酸を 50ml 加え、80℃ に 24 時間おいた。抽出液を孔径 0.45 μm の

メンブレンフィルターで濾過し、濾液中のイオン含量をイオンクロマトグラフィー (DX-AQ, DIONEX 社) で測定した。陽イオンの分析には、ガードカラム (IonPac, CG12), 分離カラム (IonPac, CS12) を用い、溶離液には 20 mM メタンスルホン酸を使用した。硝酸と溶離液の調整は、18M Ω 以上の超純水 (Milli-RX, 日本ミリポア社製) を用いた。

#### 結果および考察

葉内 CO<sub>2</sub> 濃度 (C<sub>i</sub>) は、気孔を介した CO<sub>2</sub> の供給と光合成による CO<sub>2</sub> 固定とのバランスで決まる。ストレス条件下における C<sub>i</sub> の変化に着目することで、光合成速度の低下要因を気孔の閉鎖によるものと葉肉部分の活性の低下によるものとに分けて解析することができる (齊藤・石原, 1987; 平沢ら, 1989)。つまり C<sub>i</sub> の低下度が光合成速度のそれよりも大きい場合は、葉肉部の CO<sub>2</sub> 固定能よりも CO<sub>2</sub> 供給量が低下したことを意味し、逆に光合成速度の低下度が C<sub>i</sub> のそれよりも大きい場合は、気孔を介した CO<sub>2</sub> の供給量より葉肉部の CO<sub>2</sub> 固定能が大きく低下したことを意味すると考えられている。

Table 1 に NaCl 処理後 7 日目および 14 日目の個葉の光合成速度を示した。処理後 7 日目には *O. rufipogon* のみに NaCl の影響がみられ対照区に比べ 11% 低下した。処理後 14 日目には *O. latifolia* の光合成速度は維持されたのに対し、それ以外のイネでは約 10～20% 低下した。気孔コンダクタンスも同様に低下していたことから (Table 2), NaCl 処理に伴う光合成速度の低下要因としてまず気孔の閉鎖が考えられた。しかし葉内の CO<sub>2</sub> 濃度 (C<sub>i</sub>) (Table 3) と光合成速度の低下度を比較すると、光合成速度を低下させる要因が種間および品種間で異なることが示唆された。たとえば 12 dSm<sup>3</sup> NaCl 区では栽培品種の IR28 と SR26B の光合成速度はそれぞれ 10% と 18% 低下したのに対して、C<sub>i</sub> の低下度はそれぞれ 8%, 12% であった。一方、野生稲 *O. rufipogon* では光合成速度は 14% 低下したのに対し C<sub>i</sub> は 23% 低下しており、C<sub>i</sub> の方が大きく低下した。したがって、光合成速度が低下した主因は、野生稲 *O. rufipogon* では気孔の閉鎖、栽培品種では気孔の閉鎖と葉肉部の CO<sub>2</sub> 固定能の低下と考えられる。

次に C<sub>i</sub>-光合成曲線 (A/Ci カーブ) について検討する。葉肉細胞間隙の CO<sub>2</sub> の拡散伝導度は大きく、細胞内外の CO<sub>2</sub> 濃度差はほとんど無いことから (Sharkey *et al.*, 1982), C<sub>i</sub> は光合成系の基質濃度と

Table 1 Effect of NaCl on the photosynthetic rate of the leaves of *Oryza* species grown at different NaCl levels

Variety and species	NaCl (dS m <sup>-1</sup> )	Before treatment		7 DAT		14 DAT	
		( $\mu$ mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) (%)	100* <sup>2</sup>	( $\mu$ mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) (%)	100	( $\mu$ mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) (%)	100
IR28	0	31.0 $\pm$ 1.4*	100* <sup>2</sup>	27.4 $\pm$ 0.7	100	22.5 $\pm$ 3.5	100
	6	31.9 $\pm$ 2.8	103	29.1 $\pm$ 1.4	106	24.0 $\pm$ 1.1	107
	12	33.6 $\pm$ 1.3	109	27.1 $\pm$ 1.2	99	20.3 $\pm$ 3.6	90
SR26B	0	31.8 $\pm$ 1.9	100	24.1 $\pm$ 0.6	100	25.8 $\pm$ 0.7	100
	6	31.1 $\pm$ 1.6	98	27.7 $\pm$ 0.5	115	24.8 $\pm$ 0.7	96
	12	32.4 $\pm$ 0.2	102	25.0 $\pm$ 0.4	104	21.2 $\pm$ 1.9	82
	0	29.5 $\pm$ 0.9	100	26.1 $\pm$ 0.4	100	20.8 $\pm$ 1.6	100
<i>O. rufipogon</i>	6	28.6 $\pm$ 2.1	97	26.0 $\pm$ 0.9	100	21.3 $\pm$ 1.3	102
	12	30.9 $\pm$ 0.3	105	23.3 $\pm$ 0.3	89	17.9 $\pm$ 0.8	86
<i>O. latifolia</i>	0	24.2 $\pm$ 0.5	100	19.9 $\pm$ 2.0	100	19.1 $\pm$ 1.4	100
	6	25.7 $\pm$ 0.6	106	19.7 $\pm$ 0.9	99	20.0 $\pm$ 0.3	115
	12	25.4 $\pm$ 0.6	105	20.0 $\pm$ 0.7	101	19.0 $\pm$ 1.3	100

\* Values are means  $\pm$  S.E.\*<sup>2</sup> Values indicate the percentage to the control.

DAT: days after treatment.

Table 2 Effect of NaCl on the stomatal conductance in the leaves of *Oryza* species grown at different NaCl levels

Variety and species	NaCl (dS m <sup>-1</sup> )	Before treatment		7 DAT		14 DAT	
		(mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) (%)	100* <sup>2</sup>	(mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) (%)	100	(mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) (%)	100
IR28	0	707.9 $\pm$ 32.7*	100* <sup>2</sup>	489.3 $\pm$ 21.7	100	527.3 $\pm$ 28.5	100
	6	745.7 $\pm$ 41.7	105	485.2 $\pm$ 15.9	69	528.3 $\pm$ 6.5	100
	12	720.5 $\pm$ 54.4	102	404.7 $\pm$ 26.8	57	364.6 $\pm$ 4.4	69
SR26B	0	549.5 $\pm$ 11.6	100	404.7 $\pm$ 27.0	100	395.3 $\pm$ 4.0	100
	6	608.0 $\pm$ 54.5	111	338.5 $\pm$ 10.6	62	357.8 $\pm$ 32.9	91
	12	593.9 $\pm$ 14.5	108	251.7 $\pm$ 10.2	46	252.5 $\pm$ 9.4	64
	0	494.9 $\pm$ 36.0	100	424.7 $\pm$ 7.5	100	332.6 $\pm$ 52.9	100
<i>O. rufipogon</i>	6	483.2 $\pm$ 28.9	98	312.4 $\pm$ 18.0	63	244.0 $\pm$ 29.8	73
	12	496.2 $\pm$ 37.8	100	236.1 $\pm$ 14.5	48	172.5 $\pm$ 9.1	52
<i>O. latifolia</i>	0	425.7 $\pm$ 18.0	100	395.6 $\pm$ 52.3	100	369.4 $\pm$ 35.7	100
	6	537.9 $\pm$ 33.4	126	283.6 $\pm$ 24.2	67	407.4 $\pm$ 22.3	110
	12	551.3 $\pm$ 18.4	130	224.6 $\pm$ 7.2	53	218.1 $\pm$ 13.5	59

\* Values are means  $\pm$  S.E.\*<sup>2</sup> Values indicate the percentage to the control.

DAT: days after treatment.

仮定することができる。したがって、A/Ci カーブの初期勾配は CO<sub>2</sub> 固定効率をあらわし、光合成の暗反応における CO<sub>2</sub> 固定能力、すなわちリブロース二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) の活性を表していると考えられる (Sharkey *et al.*, 1982; 齊藤・石原, 1987)。また、A/Ci カーブの飽和点は、リブロース 1,5-ビスリン酸 (RuBP) の再生能力の指標となる (Faquhar and Sharkey, 1982)。初期勾配 (CO<sub>2</sub> 固定効率) は NaCl 処理によって低下

したが、影響のあらわれ方は種間で異なっていた (Fig. 1)。そこで、NaCl 処理前と処理後の A/Ci カーブの初期勾配の一致性の検定をおこなったところ、IR28 と SR26B の処理前後の傾きには、それぞれ 1% と 5% レベルで有意差が認められた。このことから、IR28 と SR26B では、NaCl 処理により Rubisco 活性が低下していることが示唆された。一方、野生種の *O. rufipogon* と *O. latifolia* では、*O. latifolia* の NaCl 処理前後の初期勾配が若干低下するものの、

Table 3 Effect of NaCl on the intercellular CO<sub>2</sub> concentration (Ci) of the leaves of *Oryza* species grown at different NaCl levels

Variety and species	NaCl (dS m <sup>-1</sup> )	Before treatment (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) (%)		7 DAT (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) (%)		14 DAT (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) (%)	
IR28	0	283.2 ± 4.3*	100* <sup>2</sup>	262.1 ± 6.2	100	297.3 ± 12.4	100
	6	281.0 ± 5.4	99	255.5 ± 4.5	97	285.3 ± 4.6	95
	12	282.2 ± 2.2	100	244.7 ± 3.0	93	275.3 ± 15.0	92
SR26B	0	259.3 ± 4.7	100	254.8 ± 3.9	100	258.3 ± 2.7	100
	6	266.0 ± 4.4	103	220.4 ± 5.3	86	245.3 ± 7.7	95
	12	267.7 ± 1.9	103	191.8 ± 7.3	75	228.2 ± 3.4	88
<i>O. rufipogon</i>	0	259.6 ± 4.8	100	254.5 ± 3.2	100	265.6 ± 8.8	100
	6	256.2 ± 11.6	99	221.8 ± 2.4	87	220.7 ± 10.8	83
	12	258.0 ± 8.7	100	244.7 ± 9.3	96	204.1 ± 3.9	77
<i>O. latifolia</i>	0	262.3 ± 3.2	100	269.4 ± 2.4	100	282.3 ± 2.1	100
	6	271.8 ± 3.4	104	239.7 ± 5.1	89	268.9 ± 4.6	95
	12	283.2 ± 1.4	108	208.3 ± 3.2	77	223.8 ± 9.9	79

\* Values are means ± S.E.

\*<sup>2</sup> Values indicate the percentage to the control.

DAT: days after treatment.

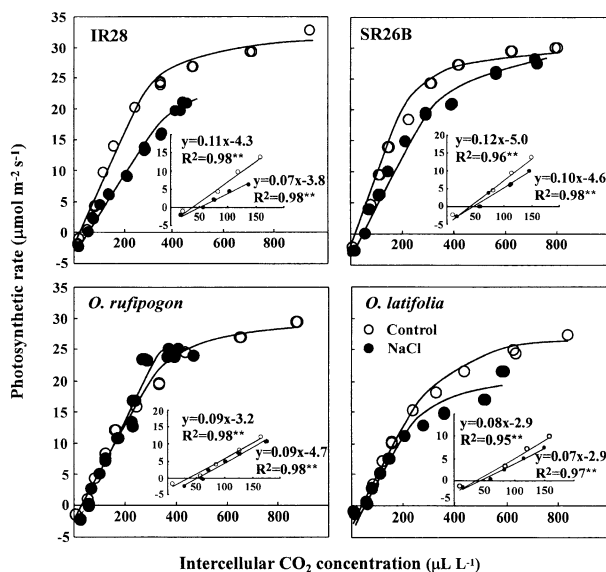


Fig. 1 Photosynthetic rate as a function of intercellular CO<sub>2</sub> concentration in NaCl - (closed circles) and non-stressed (open circles) leaves.

Note: Data obtained at low values of CO<sub>2</sub> concentration are expanded in the inset for clarity.

\*\* : Significant at 1% level.

両者の傾きに有意差は無く、栽培種に比べて CO<sub>2</sub> 固定効率に対する NaCl の影響は小さかった。以上のことから、野生稲 *O. rufipogon*、及び *O. latifolia* の Rubisco 活性は NaCl 処理の影響はほとんどうけないと考えられる。

A/Ci カーブの光合成速度の最大値を NaCl 処理前

後で比較すると、その差は IR28, *O. latifolia*, *O. rufipogon*, 及び SR26B の順で大きく、それぞれ 11.6, 5.7, 4.3, 及び 2.5 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 低下していた。これは、IR28 では RuBP の再生過程に NaCl の影響が強く現われたことを意味している。

インゲンでは、NaCl 処理によって RuBP のプール

サイズと Rubisco 活性両方が低下し、光合成速度が低下するという報告がある (Seemann and Sharkey, 1986). 本研究では、A/Ci カーブの初期勾配から推察した Rubisco 活性は、NaCl 処理にともなって、IR28 > SR26B > *O. latifolia* > *O. rufipogon* の順に大きく低下した。また NaCl 処理にともなう RuBP の再生能力は、IR28 > *O. latifolia* > *O. rufipogon* > SR26B の順で大きく低下し、いずれも感受性栽培品種 IR28 において NaCl の影響が最も大きくあらわれた。

細胞内の過剰な Na<sup>+</sup> はイオンバランスの攪乱や各種酵素反応の障害を引き起こす。イネの耐塩性の高い栽培品種は根で塩を排除する機構を有し、葉身への塩の蓄積を回避している (Tsuchiya *et al.*, 1994). 野生稲の塩排除能力は低く、例えば 12 dSm<sup>-1</sup> NaCl で7日間栽培した場合、SR26B と比較して *O. rufipogon* で 19 倍、*O. latifolia* で 10 倍多く塩を蓄積した (Nakamura *et al.*, 2002). Na<sup>+</sup> 含量の増加に伴い光合成速度は低下したが、Na<sup>+</sup> に対する光合成の反応には種間差がみられ、たとえば SR26B は葉身に乾物 1g あたり 9 ~ 23 μmol Na<sup>+</sup> を蓄積したが、そのときの光合成速度は 28 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> から 19 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> に低下した。一方、*O. latifolia* では、最高で SR26B の約 10 倍に相当する Na<sup>+</sup> を葉身に蓄積したが、光合成速度は Na<sup>+</sup> 含量に関係なく 22 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 付近で横ばいとなった。*O. latifolia* 以外のイネでは光合成速度と Na<sup>+</sup> 含量との間に高い負の相関関係が認められたが、*O. latifolia* では両者の間に相関関係はみられず、*O. latifolia* は葉身に Na<sup>+</sup> を多量に蓄積しても光合成能力を維持すること考えられた。

イネの塩ストレスによる光合成速度の低下は、1) 水ポテンシャルの低下による気孔の閉鎖、2) 炭酸固

定過程に関わる酵素の失活、及び 3) 葉内の炭酸ガス拡散抵抗の増大等に大別できる (Delifine *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 2001; Maegawa *et al.*, 1987). NaCl 存在下で光合成速度を高く維持できた *O. latifolia* はこれらの要因を低く抑える機構を有していると考えられる。これを一般的な耐塩性機構にてらして考えると、本種は、1) 葉内の浸透圧が増加しても気孔開度を保つこと、2) 細胞内に流入してきた Na<sup>+</sup> を液胞へ封じ込める能力が高いこと、3) 適合溶質を生成する浸透調節能が高いこと、あるいは 4) 光合成の場である葉緑体および細胞質の酵素群の塩分耐性が高いこと等が考えられる。

気孔の影響の無い葉肉部の光合成活性を比較するために、液相型酸素電極法を用いて、根から 14 日間 NaCl を吸収させた野生稲 *O. rufipogon* と *O. latifolia* の光合成能力を比較した (Table 4). *O. rufipogon* の光合成速度は、葉位に関係なくいずれの葉身でも処理 NaCl 濃度が増加するにつれて低下した。NaCl 処理の影響は、葉位が下位になるにつれて増加した。一方、*O. latifolia* では第 V 葉にのみ NaCl の影響がみられた。この結果は、*O. latifolia* の葉肉部の活性が NaCl 存在下で高く維持されていることを示している。また、この結果は長期間 NaCl 存在下におかれた葉身で得られたものであるため、*O. latifolia* の浸透調節能の高さを示している可能性も考えられる。そこで、浸透調節の影響を排除するために、ストレスを与えてない個体から葉身を採取し、反応液に NaCl を添加して光合成速度を測定した (Table 5). 高 NaCl (655 mM) を含む反応液で *O. rufipogon* の光合成速度は無処理の約 30% まで低下したのに対し、*O. latifolia* では 60% まで低下した。この葉片

Table 4 Photosynthetic O<sub>2</sub> evolution rate in the top, third and fifth leaves of wild *Oryza* species at 14 days after NaCl treatment

Species	NaCl (mM)	O <sub>2</sub> evolution (μmolO <sub>2</sub> dm <sup>-2</sup> hr <sup>-1</sup> )					
		Top leaf	(%)	Third leaf	(%)	Fifth leaf	(%)
<i>O. rufipogon</i>	0	392 ± 6.5*	(100)* <sup>2</sup>	467 ± 21.0	(100)	304 ± 35.0	(100)
	40	429 ± 56.0	(110)	442 ± 7.5	(95)	75 ± 72.0	(25)
	80	365 ± 16.5	(93)	448 ± 10.0	(96)	82 ± 33.0	(27)
	120	264 ± 67.5	(67)	314 ± 35.5	(67)	25 ± 38.5	(8)
<i>O. latifolia</i>	0	438 ± 45.0	(100)	350 ± 48.0	(100)	166 ± 5.5	(100)
	40	495 ± 10.0	(113)	365 ± 66.5	(104)	166 ± 21.0	(100)
	80	482 ± 12.5	(110)	409 ± 35.5	(117)	182 ± 35.0	(109)
	120	461 ± 22.5	(105)	354 ± 32.5	(101)	12 ± 10.5	(7)

\* Values are means ± S.E.

\*<sup>2</sup> Values indicate the percentage to the control.

Table 5 Photosynthetic O<sub>2</sub> evolution rate of leaves of wild *Oryza* species grown at different NaCl levels

NaCl (mM)	O <sub>2</sub> evolution (μmol O <sub>2</sub> mgchl <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> )			
	<i>O. rufipogon</i>		<i>O. latifolia</i>	
0	79 ± 16.7*	(100) * <sup>2</sup>	82 ± 8.7	(100)
100	62 ± 13.3	( 78)	83 ± 6.9	(102)
300	59 ± 10.0	( 74)	79 ± 4.0	( 96)
655	25 ± 3.5	( 31)	49 ± 4.5	( 59)

\* Values represent means ± S.E. of there or four plants per treatment.

\*<sup>2</sup> Values indicate the percentage to the control.

に浸透調整はないと考えられるため、ここで測定された光合成速度の低下程度の違いは、葉片の光合成器官のNaCl耐性を反映していると考えられる。つまり、NaCl存在下で*O. latifolia*の光合成速度が維持されたのは、光合成関連酵素あるいは、チラコイド膜の耐塩性が高いためと考えられる。

以上のことから、*O. latifolia*は葉身にNa<sup>+</sup>を蓄積するにもかかわらず光合成速度を維持できること、それはNaCl存在下において1)気孔開度を維持できること、2)細胞内の浸透圧調節能が高いこと、3)CO<sub>2</sub>固定系の酵素活性が高いこと、及び4)チラコイド膜自体の耐塩性が高いこと等が要因として挙げられる。

引用文献

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.

Delifine, S., A. Alivino, M. Zacchini and F. Loreto 1998. Consequence of salt stress on conductance to CO<sub>2</sub> diffusion, Rubisco characteristics and anatomy of spinach leaves. Aust. J. Plant Physiol. **25**: 395-402.

Downton, W. J. S. 1977. Photosynthesis in salt-stressed Grapevines. Aust. J. Plant Physiol. **4**: 183-192.

Farquhar, G. D. and T. D. Sharkey 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol. **33**: 317-345.

平沢 正・飯田幸彦・石原 邦 1989 水稻葉身における空気湿度、葉の水ポテンシャルの低下に伴う光合成速度の減少の主たる要因の検討。日作紀 **58**: 383-389.

Ishii, R., T. Yamagishi and Y. Murata 1977. On a method for measuring photosynthesis and respiration of leaf slices with an oxygen electrode. Jap. J. Crop Sci. **46**: 53-57.

Kaiser, W. M. and U. Heber 1981. Photosynthesis under osmotic stress: Effect of high solute concentrations on the permeability properties of the chloroplast

envelope and on activity of stroma enzymes. Planta **153**: 423-429.

Kawamitsu, Y., R. Singh, B. J. Nelson, Y. Tamaki and S. Murayama 1999. Effects of nitrogen supply on growth characteristics and leaf photosynthesis in sugarcane. Sci. Bull. Fac. Agr., Univ. Ryukyus. **46**: 1-14.

Kawasaki, S., C. Borchert, M. Deyholos, H. Wang, S. Brazille, K. Kawai, D. Galbraith and H. J. Bohnert 2001. Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in Rice. The Plant Cell. **13**: 889-905.

Khan, M. S. A., A. Hamid, A. B. M. Salajuddun, A. Quasem and M. A. Karim 1997. Effect of sodium chloride on growth, photosynthesis and mineral ions accumulation of different types of rice (*Oryza sativa* L.). J. Agron. Crop Sci. **179**: 149-161.

Lakshmi, A., S. Ramanjulu, K. Veeranjanyulu and C. Sudhakar 1996. Effect of NaCl on photosynthesis parameters in two cultivars of mulberry. Photosynthetica **32**: 285-289.

Maegawa, H., E. Usui, N. Uchida, T. Yasuda and T. Yamaguchi 1987. Studies on the mechanism of salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.): Relation between salt content and photosynthesis. Japan J. Trop. Agr. **31**: 92-98.

Nagy, Z. and G. Galiba 1995. Drought and salt tolerance are not necessarily linked: A study on wheat varieties differing in drought tolerance under consecutive water and salinity stresses. J. Plant Physiol. **145**: 168-174.

Nakamura, I., S. Murayama, S. Tobita, B. B. Bong, S. Yanagihara, Y. Ishimine and Y. Kawamitsu 2002. Effect of NaCl on the photosynthesis, water relation and free proline accumulation in the wild *Oryza* species. Plant Prod. Sci. **5**: 305-310.

Porra, R. J., W. A. Thompson and P. E. Kriedemann 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及ぼす飽差の影響。光利用効率、CO<sub>2</sub>利用効率に着目して。日作紀 **56**: 163-170.

Seemann, J. R. and T. D. Sharkey 1986. Salinity and nitrogen effects on photosynthesis, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and metabolite pool sizes in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. **77**: 869-872.

Sharkey, T. D., K. Imai, G. D. Farquhar and I. R. Cowan 1982. A direct confirmation of the standard method of estimating intercellular partial pressure of CO<sub>2</sub>. Plant Physiol. **69**: 657-659.

Tsuchiya, M., M. Miyake and H. Naito 1994. Physiological response to salinity in rice plant.: III. A possible mechanism for Na<sup>+</sup> exclusion in rice root under NaCl-stress conditions. Jpn. J. Crop Sci. **63**: 326-332.