

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011.

課題番号：21780015

研究課題名（和文）野生稻における耐塩性機作の解明

研究課題名（英文） Mechanism of salt tolerance in wild *Oryza* species.

研究代表者

仲村 一郎（NAKAMURA ICHIRO）

琉球大学・農学部・助教

研究者番号：70381209

研究成果の概要（和文）：野生稻の耐塩性について、乾物生産，光合成およびイオン動態に着目し、耐塩性栽培イネと比較検討した。これまで未調査であった *O. officinalis* の幼苗期以外の耐塩性は、耐塩性野生種の *O. latifolia* と同等の耐塩性を有することがわかった。また、塩ストレスの各器官への影響は種によって異なっていた。最上位葉の Na^+ 含量を調べたところ、*O. latifolia*、および *O. officinalis* では耐塩性栽培イネに比べ高い値を示した。葉位別の Na^+ の蓄積パターンは、野生稻では下位葉に Na^+ を多く蓄積する傾向がみられ、栽培イネと野生稻で異なっていた。野生稻の光合成速度は塩処理後もほとんど低下しなかった。一方で、酸素放出速度は塩処理により増加した。以上のことから、耐塩性野生稻は電子伝達系において栽培イネとは異なる特異的な耐塩性機構を有することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The dry matter production and physiological response of wild *Oryza* species (*O. latifolia* and *O. officinalis*) to salinity stress were investigated by comparing with check varieties of *O. sativa* L. cv. Pokkali (salt-tolerant) and *O. rufipogon* (salt-susceptible). *O. officinalis* showed resistance to salinity as high as *O. latifolia*. The degree of decline in dry matter production of each part (root, leaf sheath, leaf blade) was different among the varieties after NaCl treatment. Top leaf Na^+ content per unit of dry-matter under 100mM NaCl condition in *O. latifolia* and *O. officinalis* increased 6.0 times and 5.2 times, respectively, as compared with Pokkali. Accumulation pattern of leaf blade Na^+ content in salt tolerant wild *Oryza* species were different from that in salt tolerance varieties, Pokkali. The wild *Oryza* species accumulated more Na^+ in lower leaf blade than in upper leaf blade. Carbon assimilation and oxygen evolution rate was examined under salinity conditions. The carbon assimilation rate of the wild *Oryza* species hardly decreased at 21 day after salt treatment. On the other hand, the oxygen evolution rate increased by salinity stress. The result of photosynthetic activity indicates that wild *Oryza* species has notable salt tolerance ability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・作物学・雑草学

キーワード：野生植物資源

1. 研究開始当初の背景

熱帯・亜熱帯を中心とする乾燥地域では熱帯林や農地の開発や、低質水の灌漑により、塩類集積土壌が急速に増加し続けている。今後の人口増加、耕作地の減少等を考えると、今後は塩類集積土壌や汽水域といった高塩濃度環境下でも生育できる作物の育成が求められている。

これまで耐塩性イネ (*Oryza sativa* L.) の耐塩性の高さは、根におけるナトリウムの排除機能によるものであった。申請者らは、国際農林水産業研究センターにおける幼苗期における選抜試験により、耐塩性が高いと評価された野生稲 4 種のうち *O. latifolia* を材料に、異なる生育ステージにおける耐塩性を評価した。

その結果、*O. latifolia* において、これまでのイネの耐塩性機構とは異なる機構を有していることが分かった。すなわち、耐塩性栽培品種よりも塩を多く吸収・蓄積するが、耐塩性栽培品種が枯死するような高塩環境下でも生育が可能であった。また、通常、植物は塩の吸収によって葉身水ポテンシャルが低下するとそれに伴い光合成速度も低下するが、*O. latifolia* はそのような状況でも光合成（炭素固定速度）を維持するといった特徴を有していた。

2. 研究の目的

Oryza 属野生種の中には耐病害虫性などの農業上有用な形質をもつ種が存在することはわかっていたが、耐塩性についてはほとんど研究されていなかった。我々の研究で、野生稲 *O. latifolia* Desv. は耐塩性栽培イネの耐塩性機構とは異なる塩耐性機構を持つことが明らかとなった。すなわち地上部への

Na⁺の吸収量が多いにも関わらず、光合成速度をほとんど低下させない機構を有していることである。これまで、*O. latifolia* 以外の野生種の耐塩性を幼苗期以外のステージで評価をした報告はほとんどない。そこで、本研究では、*O. latifolia* 以外の *Oryza* 属近縁野生種と耐塩性栽培品種 *Oryza sativa* L. cv. Pokkali を用いて乾物生産、イオン吸収、適合溶質（プロリン）の蓄積、および光合成面から野生稲の耐塩性を評価した。

3. 研究の方法

栽培条件：材料には、*Oryza officinalis* Wall ex Watt、*Oryza australiensis* Domin、*Oryza latifolia* Desv. (耐塩性野生稲)、*Oryza rufipogon* Griff. (感受性野生稲)、*Oryza sativa* L. cv. Pokkali (耐塩性栽培稲) の *Oryza* 属 5 種を用いた。発芽後、葉齢が 3~4 葉期に達した生育良好な個体を選抜し、吉田氏液を用いて水耕栽培を行った。水耕液の更新は 7 日毎に行い、pH が 5.0~5.5 になるように毎日調整した。塩処理区は、播種後 60 日目に無処理、50mM、100mM を設定した。

生育形質の調査：塩処理 32 日目に、供試個体を根、茎、葉に解体し、各器官の生重を測定した。その後 80℃で 72 時間乾燥させ、乾物重を測定した。葉については解体後直ちに葉面積計を用いて葉面積を測定した。また、葉身水分含量は、葉身生重から葉身乾物重を差し引いた値とした。

イオン含量測定：塩処理 32 日目に、供試個体を蒸留水で洗浄し、器官ごとに細かく切断し、80℃で 72 時間以上乾燥した。乾燥した試料を粉砕機で細かく粉砕した。粉砕試料 0.25g に対し、1N の硝酸を 50ml 加え、80℃

で 24 時間静置した。その後抽出液を孔径 0.45 μm 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サンプルとした。測定には、ICP-AES を用いた。

個葉の光合成速度の測定：測定葉は、塩処理後 3 日、7 日、14 日および 21 日の主稈の最上位展開葉を用いた。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で測定葉に 30 分程度光を照射した。その後、携帯型光合成測定装置を用い葉身中央部の光合成速度を測定した。測定条件は、導入空気量 450ml min⁻¹、光強度は約 1500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、葉温 30 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ であった。

酸素放出速度の測定：塩処理 3 日、7 日および 21 日目に、主稈の第 I 葉（最上位展開葉）、第 III 葉および第 V 葉を採取し測定に用いた。測定葉は、測定前に中央部位を 1cm² 切り取り、超純水中に 24 時間浸漬した。その後 0.5mM の硫酸カルシウム二水和物を含む 50mM HEPES(pH7.2) 緩衝液中で、採取した 1cm² 葉片を約 40 等分に切断し、2~3 分脱気した。切断した葉は、酸素電極の測定用キュベット内の緩衝液を 3ml 中に入れ、5 分間ハロゲン光を前照射した後、30mM NaHCO₃ を添加し、酸素放出を検出した。測定には、Clark-type 液相型酸素電極を用いた。測定条件は、反応液温度を 25 $^{\circ}\text{C}$ 、光強度を 55000lux とした。

クロロフィル含量の測定：クロロフィル含量の測定は、Porra *et al.* (1989) に従った。酸素放出速度の測定後、直ちに測定葉を回収し、N, N-ジメチルホルムアミドを用いクロロフィル抽出を行った。抽出後、分光光度計を用いて、663.8nm と 646.8nm の波長の吸光度を測定した。クロロフィル a+b 含量は、Porra *et al.* (1989) の分子吸光係数を用いて

算出した。

プロリン含量の測定：測定には塩処理 3 日、7 日および 21 日目に、主稈に隣接する分けつの第 I 葉（最上位展開葉）および第 III 葉の 2 枚を用いた。採取した 2 枚の葉は、液体窒素で凍結させ測定するまで -20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。測定およびプロリン含量の算出方法は、Bates ら (1973) に従った。

4. 研究成果

第 10 葉齢期における野生稻 *O. officinalis*、*O. australiensis*、*O. latifolia* の耐塩性を NaCl 処理後の生長、乾物生産について、Pokkali (耐塩性品種) および *O. rufipogon* (感受性野生稻) と比較検討した。

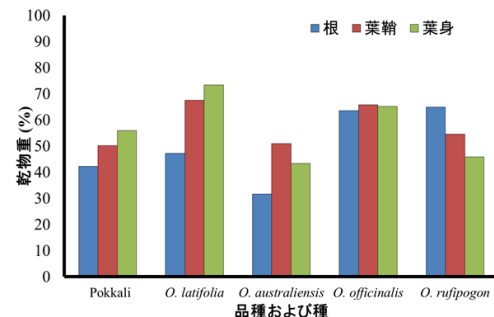


図1. 各器官の対照区に対する塩処理区の乾物重の割合(塩処理後32日).

乾物重では、耐塩性品種の Pokkali よりも *O. latifolia* および *O. officinalis* は塩処理による影響は認められなかった。また、各器官における塩処理区の乾物重の割合は、Pokkali, *O. latifolia* および *O. australiensis* では根で、*O. rufipogon* では、葉身で、*O. officinalis* では各器官で同程度の値を示し、種によって塩ストレスの影響が出やすい部位に違いがあることがわかった (図 1)。

それぞれの種の葉位別 Na⁺含量を調べたところ、Pokkali において最も葉身 Na⁺含量が低く、同品種は根で Na⁺を排除し地上部に Na⁺を移行させない反応を示した (図 2)。

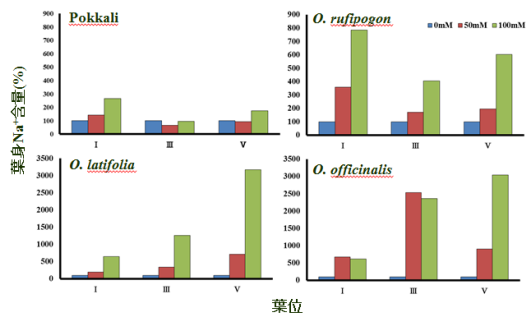


図2. 各葉位における葉身Na⁺含量の割合(塩処理後21日目).

一方、*O. officinalis* および *O. latifolia* の最上位葉では、Pokkali に比べそれぞれ、5.2 倍および 6 倍多く Na⁺を蓄積した。また、両耐塩性野生種では、上位葉より下位葉に多く Na⁺を蓄積する傾向が見られた。さらに、*O. officinalis* および *O. latifolia* は塩ストレス後にプロリン含量の上昇、ならびに葉身水分含量を高く維持する反応を示した。このことから、両野生種では、プロリンを蓄積することにより浸透圧の調節をすることが示唆された。これまでの結果から、*O. officinalis* は、*O. latifolia* と同様に塩ストレスに対して塩耐性機構を有することが示唆された。

乾物生産に密接にかかわる光合成の活性について各種間で比較検討した。*O. officinalis* および *O. latifolia* は Na⁺を葉身に多く蓄積するにも関わらず、炭素固定速度の低下程度は Pokkali よりも少なかった。また、酸素放出速度と葉身 Na⁺含量との相関関係を調べたところ、*O. officinalis* および *O. latifolia* は Pokkali よりも低い相関係数であった。このことから、*O. officinalis* および *O. latifolia* の電子伝達系は、耐塩性栽培品種よりも塩に対する耐性を持つことが示唆された。*O. officinalis* および *O. latifolia* の酸素放出速度は、塩処理後に増加した(図 3)。このことから、耐塩性野生種では、塩処理により電子伝達系が活性化されたことが示唆された。

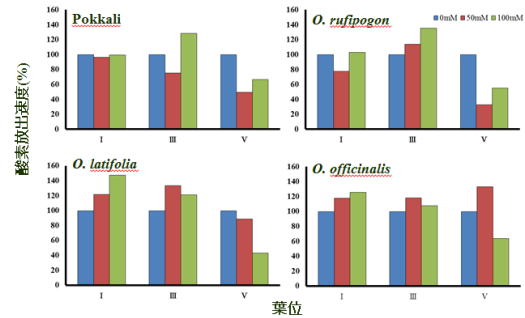


図3. 葉位別の酸素放出速度の割合(塩処理後21日目).

塩処理後 21 日目の *O. officinalis* および *O. latifolia* の光合成速度は、7%および 9%低下した。一方、酸素放出速度は増加したことから、塩ストレスによって、ATP や NADPH を過剰に生産している可能性が考えられた。葉緑体内の過剰な ATP や NADPH の蓄積は、葉緑体内が過還元状態となり、光障害を引き起こすと考えられる。また電子伝達系が活性化することで O₂ や H₂O₂ などの活性酸素が生産され、酸化ストレスを引き起こす。*O. officinalis* および *O. latifolia* は、1 ヶ月の塩処理を行っても葉身に光障害の症状が観察されないことから、塩ストレスによって合成される ATP や NADPH を炭素固定系以外で消費することにより、塩ストレスを回避していると考えられる。

以上のことから、野生種 *O. officinalis* および *O. latifolia* は、イネの耐塩性品種育成のための育種素材として、重要な遺伝資源だと考えられる。また、塩ストレスによって、*O. officinalis* および *O. latifolia* の酸素放出速度が活性化した意義については、今後さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Nakamura, I., Hossain Md. A., Akamine H., Nishizawa Y., Tamaki M. and Motomura K. 2011. Salinity Effects on Growth

Characteristics, Biomass Accumulation and Some Physiological Changes of Torpedograss (*Panicum repens* L.). Trop. Agr. Develop. 査読有, 55(2): 75-83.

〔学会発表〕(計4件)

- ① 西澤優・仲村一郎・モハメド アムザド ホサイン・玉城政信. NaCl ストレスが *Oryza* 属4種の光合成明反応系に与える影響. 日作記.81(1). 2012年3月29日. 東京農工大学.
- ② 西澤優・仲村一郎・赤嶺光・モハメド アムザド ホサイン・玉城政信. 塩ストレス下における *Oryza* 属5種の乾物生産及び光合成能力. 日作記.80(1): 370-371. 2011年3月30日. 東京農業大学.
- ③ 西澤優・仲村一郎・モハメドアムザドホサイン・玉城政信・本村恵二. *Oryza* 属4種の葯培養における培地の検討. 熱帯農業研究 第3巻 別2: 117-118. 2010年10月10日. 沖縄コンベンションセンター.
- ④ Hossain Md. A., Nakamura I., Akamine H., Tamaki M. and Motomura K. Salt effect on growth characteristics and biomass accumulation of Torpedograss (*Panicum repens* L.). J. Weed Sci. Tech. Vol.55. (Sup.): 59. 2010年4月11日. 福井県 AOSSA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲村 一郎 (NAKAMURA ICHIRO)
琉球大学・農学部・助教
研究者番号：70381209

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：