

## 塩ストレスがエンサイの光化学反応に及ぼす影響

林 匠・井上直人・織井孝治

信州大学農学部, 南箕輪村, 〒399-4598

### 要 約

エンサイは熱帯圏でよく用いられている有用資源作物で、水辺に生育し、塩ストレス抵抗性も有している。この試験では、塩ストレス条件下での光合成明反応の特性を明らかにするため、パルス振幅変調法 (PAM) やレーザー励起蛍光分析法 (LIF)、また励起光源に LED を用いた LED 励起蛍光分析法 (LED-IF) を用いて、6 水準の塩ストレスを負荷したエンサイの葉を測定した。塩ストレスの負荷の為、ポット試験を実施した。塩化ナトリウムを 0 (対照区)、300、600、1200、1800、2400g・m<sup>-2</sup>施用した試験区を 4 反復で設け、1 ヶ月間栽培した。その結果、クロロフィル蛍光測定において、600g・m<sup>-2</sup>における F<sub>0</sub>/F<sub>m</sub> が小さく、F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> の値が大きい傾向が示された。また、SPAD においては、300と600g・m<sup>-2</sup>区の値が高かった。LED-IF と LIF の結果を考えると、エンサイが塩ストレス耐性を有するだけでなく、塩要求性を持つことが示唆された。

キーワード：エンサイ、塩ストレス、クロロフィル蛍光、光合成明反応

### 緒 言

エンサイ (*Ipomoea aquatica* Forsk.) は、ヒルガオ科 (*Convolvulaceae*) サツマイモ属 (*Ipomoea*) の熱帯の有用資源植物である。エンサイの原産地は、中国南部、東インド、東南アジアなどの湿地で、広く食用として栽培されている<sup>16)</sup>。栽培上の利点としては、水辺、過湿環境に適応していることや、さらに養分の過不足条件や塩ストレス条件など、非生物ストレス条件に耐性を有する点などが挙げられる<sup>6,22)</sup>。

Quyen ら (2016) による、重度の塩ストレスをエンサイに負荷し、そのストレス応答をエンサイの形態に着目して調査を行った研究において、対照区よりも処理区の生育が良いという結果が得られた<sup>24)</sup>。このことから、エンサイは塩要求性を有することが示唆されている。塩ストレスは、浸透圧異常による吸水阻害作用と、細胞内のイオンバランスの崩壊という 2 通りの経路から植物の生育に影響を及ぼす。植物は、塩に対する生育反応によって、塩感受性植物、耐塩性植物、塩生植物の 3 タイプに分類できる。ほとんどの植物は塩感受性植物に分類され、塩に対し、十分な防御性を有していない。一方、塩生植物は、他の 2 タイプの生育が阻害される程度の塩ストレス条件下では、逆に成長量を増加させるものもある<sup>28)</sup>。

以上のような、エンサイの持つ特殊な生理生態的

特徴を分析することは、植物生理の研究において、また、塩害地帯において有益である。

植物の生理形態的特徴を調査するにあたり、クロロフィル蛍光測定は非常に有用なツールである。それは、植物のストレス応答には、細胞内に含まれる脂質や機能性物質の量を調節する生理的防御と、形態的に環境に耐えうる構造に変化する形態的变化があり、それらはクロロフィル蛍光に影響を及ぼすためである<sup>10)</sup>。また、それ以外にもクロロフィル蛍光測定は多くの利点を有している。植物を非破壊、非接触で測定することができ、分析に薬品を必要としない点は、植物栄養診断する際にも有利に働くと考えられる<sup>2,3,5,12,14,17,18,23,26,27,30,31,32)</sup>。クロロフィル蛍光測定を行う機器として PAM 測定法や LIF 測定法が知られている。また、励起光源に LED を用い、機器系の大幅な安価化、小型化を可能にした LED-IF 測定器も、今後、発展が期待されている技術である。

塩ストレスは様々な経路から植物に影響を及ぼすが、特に影響が顕著なのが、光合成電子伝達系に存在する PSII 複合体の反応中心である<sup>2,13,25)</sup>。PSII 反応中心は、周囲のアンテナ組織からエネルギーを受け取り、電子を励起して次の行程へと送る役割を担っている。PSII は Hill 反応 ( $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4e^-$ ) により、植物体の細胞内酸素分圧、ひいては、ストレス条件下で発生が促進される活性酸素種に関連がある。そのため、植物は環境によって、光化学系量比を変化させ、環境に対する防御機構を構築、また生産性を律速していることが示唆されている<sup>12)</sup>。

そこで本研究では、エンサイの塩化ナトリウムに

受付日 2017年1月10日

受理日 2017年1月30日

よるストレスに対する応答について、その光合成反応に及ぼす影響に着目して、PAM 測定器、LIF 測定器及び LED-IF 測定器を用いて分析した。また、上記の測定機器の測定能を比較検討する目的も含まれており、上記のクロロフィル蛍光測定器 3 種に加え、多くの研究に広く用いられている SPAD 計の計 4 種の測定器を用い、塩ストレスを負荷したエンサイの光合成反応に関連する諸特性を測定した。

### 材料および方法

#### 1. エンサイ (*Ipomoea aquatica Forsk.*)

供試材料として、タキイ種苗株式会社のエンサイ（アサガオナ）を用いた。まず、種子表皮に傷をつけ、水に浸漬し、恒温機内にて十分に吸水させた。次に、28℃に設定した栽培室内で、発芽したエンサイ種子を、市販されている培土を充填した育苗箱で本葉 3～4 枚になるまで 1 カ月間栽培した。その後、培土を充填した 1/5000a ワグネルポットに、ポット当たり 3 個体ずつ移植した。その後、成長が良好な 1 個体を残し、1 本立ちにした。栽培室内の光合成有効量子束密度は葉面付近で約  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  だった。塩ストレスの負荷は、エンサイが十分に定着したと思われる移植後 3 日経過後、開始した。塩ストレスの負荷に用いた NaCl 溶液は、0g, 1g, 2g, 4g, 6g, 8g の NaCl を、約 500ml の水に完全に溶かすことで調整した。それぞれの NaCl の電気伝導度 (mS/cm) の目安は表 1 に記した。上記の NaCl 溶液を用いて、塩ストレスの負荷を 5 日おきに行った。計 6 回の塩の施用を行い、合計で  $\text{m}^2$  当たり 0g, 300g, 600g, 1200g, 1800g, 2400g が施用されている。以下、それぞれ S0, S300, S600, S1200, S1800, S2400 とする (表 1)。実験配置は一元配置、4 反復の乱塊法で、各反復から 3 葉ずつ、計 12 サンプル供試した。

#### 2. 測定機器

測定機器は PAM 測定器 (MINI-PAM2000, ドイツ WALZ 社)、SPAD 計 (SPAD-502, コニカミ

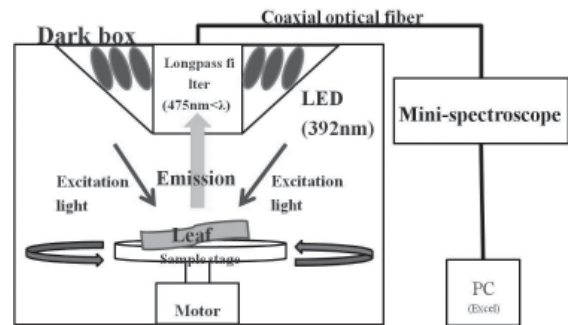


図 1 LED-IF 測定器の概略図

LED [OSV4HA3A11A]; OptoSupply

中心波長 392nm

励起強度 5～10mW

露光時間 1000msec.

ロングパスフィルター (475nm <); Edmund optics

光ファイバー [P600-1-VIS-NIR]; Oceanoptic

ミニ分光器 [TM-VIS/NIR, C10083CA]; 浜松ホトニクス

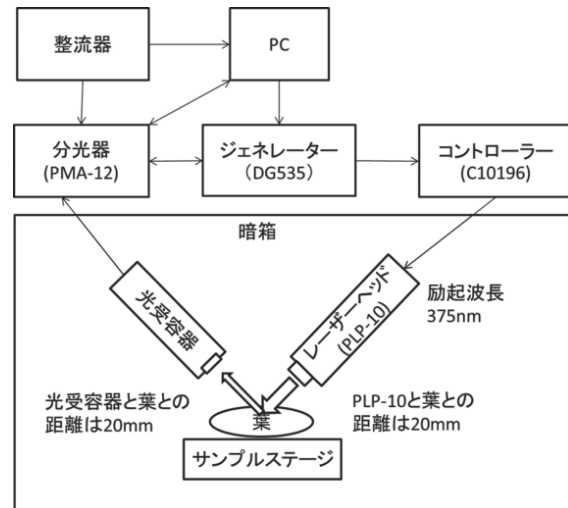


図 2 LIF 測定器の概略図

レーザーヘッド [PLP-10]; 浜松ホトニクス

中心波長 375nm

励起強度 2mW

露光時間 1000msec.

ジェネレーター [DG535]; 東京インスツルメンツ

分光器 (イメージインテンシファイア機能付き)

[PMA-12]; 浜松ホトニクス

表 1 区画の設定

区画	$\text{m}^{-2}$ 当たりの NaCl の総投入量	一回当たりの NaCl 投入量	NaCl 溶液の電気伝導度 (mS/cm) の目安
S0	0g	0g	0.0
S300	300g	1g	3.9
S600	600g	2g	7.8
S1200	1200g	4g	15.6
S1800	1800g	6g	23.4
S2400	2400g	8g	31.2

ノルタ社) と、自作の LIF 測定器 (図 1) 及び LED-IF 測定器 (図 2) の計 4 種を用いた。PAM 測定では、完全に暗黒状態にした室内でエンサイを測定し、蛍光パラメータ  $F_v/F_m$ 、 $F_o/F_m$  を取得した。LIF 測定器、LED-IF 測定器では、エンサイのクロロフィル蛍光スペクトル波形を取得し、PSII、PSI に由来する蛍光ピークの比率 PSI/PSII 値を算出した。その後、SPAD 計にて SPAD 値を取得した。

PAM 測定器を用いた植物の塩ストレス応答についての研究<sup>2,7,8,9,11,13,14,15,20,21,23,25)</sup> では、蛍光パラメータ  $F_v/F_m$  や  $F_o/F_m$  の、塩ストレスによる影響が報告されている。 $F_v/F_m$  は光合成量子収率を示す、植物生理学分野でよく用いられているパラメータであり、 $F_o/F_m$  は光合成の初期過程に存在する PSII 複合体の反応中心の損傷程度を示す指標である。それは、ストレス条件下における  $F_v/F_m$ 、 $F_o/F_m$  の変化は、 $F_m$  の減少、 $F_o$  の上昇に起因しているからである。植物にとって  $F_m$  の減少は、過剰な励起力を処理した結果であり、光障害に対する防御である<sup>1,7,17,19,25)</sup>。一方で、 $F_o$  の上昇は、PSII 複合体の反応中心の損傷、もしくはアンテナから反応中心に至る励起力伝達経路の阻害によるものである<sup>1,15,17,19,25)</sup>。

SPAD は光学濃度差方式で値を算出しており、この実験で使用した型では赤色光 ( $\lambda = 650\text{nm}$ ) と近赤外光 ( $\lambda = 940\text{nm}$ ) の吸光度の違いから、その値を求めている。それにより簡易に植物のクロロフィル量が推定できる。

### 3. 統計処理

各区の  $F_v/F_m$ 、 $F_o/F_m$ 、PSI/PSII 及び SPAD 値を、一元配置分散分析を用いて検定を行った。水準間差の有意な測定値において、Tukey-Kramer 法を用いて、多重比較を行った。

### 結果および考察

本研究では 6 水準の塩ストレス負荷区を設け、上記の 4 種の測定器を用いてエンサイの光合成能につ

いての情報を取得した。測定時のエンサイの外観については、図 3 に示した。統計処理の結果、 $F_v/F_m$  では有意な差が見られなかったが、 $F_o/F_m$ 、PSI/PSII、SPAD 値においては 5% 水準で有意な差が見られた (図 4)。

#### 1. $F_v/F_m$ 、 $F_o/F_m$

$F_v/F_m$  は、健全な植物体においては  $0.80 \leq F_v/F_m \leq 0.84$  の値をとる<sup>3,29)</sup>。しかし、本実験においては S1800、S2400 の一部のみで 0.80 を下回り、明らかに外観 (図 3) に異常をきたしている個体においても健全な数値を示すものが多数あった (図 4)。最も高い値を示したのは S600 であり、無処理区である S0 よりも健全であるという結果が得られた。

$F_o/F_m$  は、健全な個体では  $0.14 \leq F_o/F_m \leq 0.20$  の値をとり、通常、ストレス負荷により、値は大きくなる<sup>3,29)</sup>。本実験においては S1200 の一部から 0.20 を超えるものが出始め、S2400 ではほとんどの個体が 0.20 を大きく上回った (図 4)。範囲内で最も低い値を示したのは、S600 であり、無処理区である S0 よりも健全であるという結果が得られた。

以上より、PAM 測定においては  $F_v/F_m$ 、 $F_o/F_m$  の 2 つのパラメータにおいて、S600 のエンサイが最も健全であるという結果が得られた。PAM 測定は多くの研究で用いられている、実績のある指標である。また、エンサイの全体写真 (図 3) において S600 が最も生育が旺盛であった。これらのことから、エンサイの光合成生理において S600 が最も好適な環境であるといえる。

#### 2. PSI/PSII 量比

図 4 から、LED-IF 測定器及び LIF 測定器の蛍光パラメータ PSI/PSII では、S1200 までの下降傾向、S1800 の上昇傾向、S2400 の下降傾向が観察された。PSI/PSII は植物の光合成電子伝達系に存在する 2 つの複合体、PSII、PSI の量比を表す指標である<sup>12)</sup>。クロロフィル蛍光スペクトルに現れる PSII、PSI の情報は、植物の生理的、形態的ストレス応答

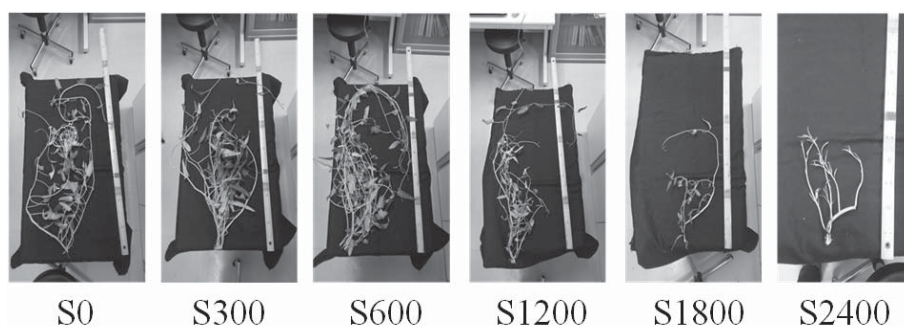


図 3 測定時のエンサイの様子

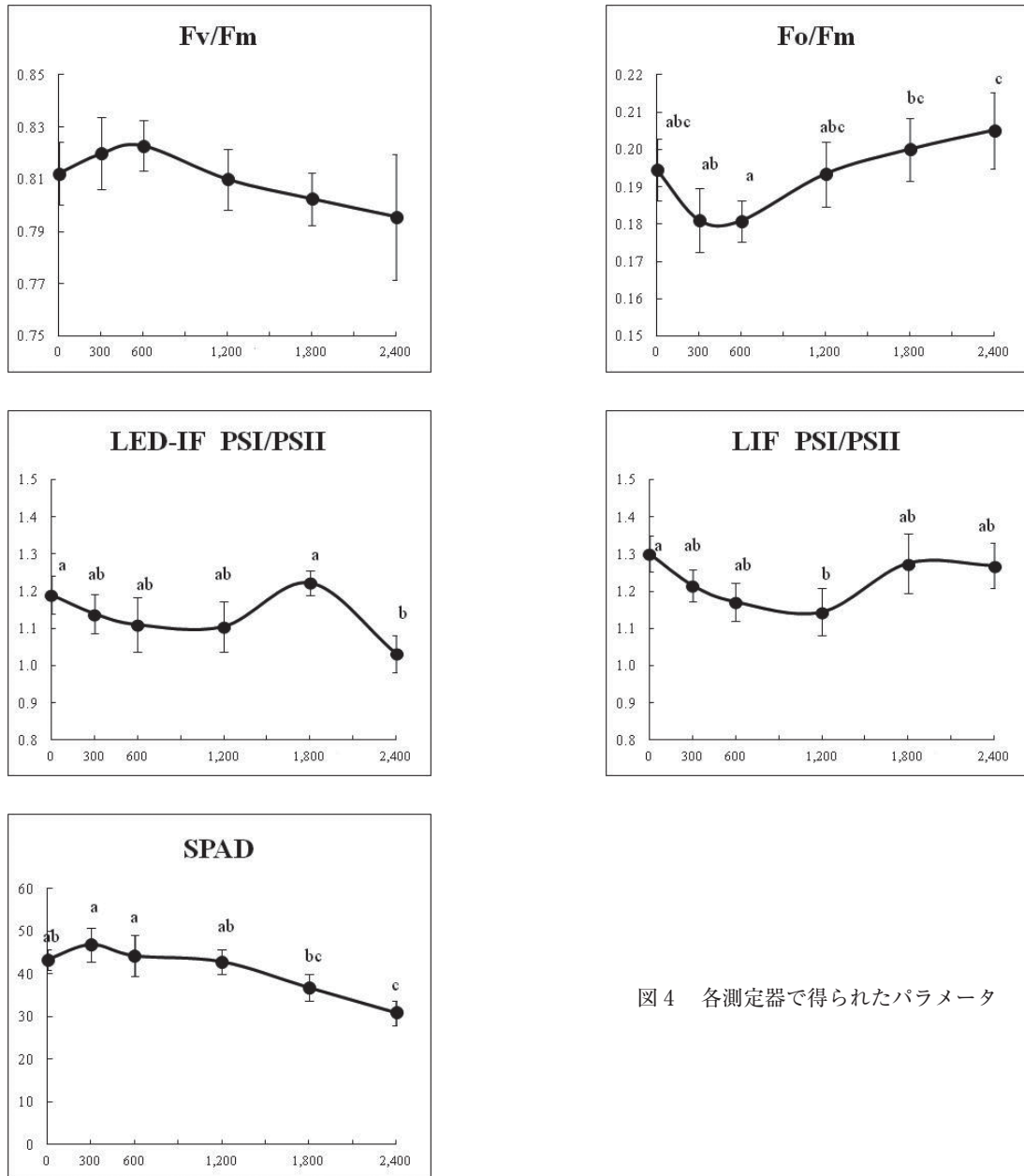


図 4 各測定器で得られたパラメータ

の影響を受ける<sup>4)</sup>。そのため、PSI/PSII は植物のストレス応答を総合的に判断できる指標である。

エンサイの全体写真 (図 3) や PAM 測定 (図 4) やにおいて、S600 区の生育が最も良い結果を示したことから、LIF 測定器及び LED-IF 測定器の PSI/PSII の S0 から S600 にかけての下降傾向は植物にとって好適なものであるとする。この区間で見られる PSI/PSII の低下は、光合成電子伝達系において PSII の占める割合が増加しているということである。これは Hill 反応： $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$  による電子の供給を重視したためであると考えられた。また、S1800 において PSI/PSII の急激な増加が起きている。これは、塩ストレス条件に起因する光阻害によるものであると考えられる。しかし、

PSII の割合の低下は、Hill 反応： $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$  による酸素分圧の上昇を避けることを意味し、同時にエンサイの防御反応であると考えられた。このことから、エンサイの塩要求性には許容量があり、それは S1200 から S1800 にかけて存在することが示唆された。

以上より、LIF 及び LED-IF 測定による結果では、塩ストレス負荷程度による、エンサイの光合成反応の傾向についての情報が得られることがうかがえた。

### 3. SPAD

本実験では、図 4 より、S300 にピークが見られた。また、S1800、S2400 では有意な下降が観察された。上記の PAM 測定器、LIF、LED-IF 測定器の結果

と同様に、S0よりもS300の方がよい結果が得られ、S1800付近に塩ストレスの許容量が存在することが示唆される結果となった。

## 結 論

以上の結果から、エンサイにNa要求性のあることが示唆された。また、本研究で実施した塩ストレス条件下では、S600程度の負荷が、最もエンサイの生育に適していることが分かった。

各測定を比較すると、多くの植物生理の研究で用いられており、実績のあるPAM測定データと、LIF、LED-IF測定及びSPAD測定では、似た傾向のデータが得られた。しかし、LIF及びLED-IF測定では、S1800で他の測定器のデータにおいては見られない挙動も確認することができた。この挙動に関して、光阻害による影響であると同時に、エンサイが酸素分圧の上昇を避け、酸化ストレスに対する防御系を構築し、光阻害に対抗しているのでは、と考えた。複雑な植物生理のメカニズムに対し、未だ不明瞭な部分の多いLIF、LED-IF測定であるが、エンサイの塩ストレスに対する光合成能の追跡に対し、PAM測定やSPAD測定にはない光化学系量比を推定できる利点があることが示唆された。

エンサイのような特殊な生理生態の特徴を有する植物のクロロフィル蛍光を分析することは、クロロフィル蛍光測定技術の発展においても有益である。より詳しく実践的に植物生理のメカニズムを追求し、その技術を実際の農業経営にフィードバックできるような研究を進めることが重要と考えた。

## 引用文献

- 1) Araus, J. L. and Hogan, K. P. 1994. Leaf structure and patterns of photoinhibition in two neotropical palms in clearings and forest understory during the dry season. *Am. J. Bot.* 81: 726-738.
- 2) Belkhdja, R. Morales, F. Abadia, A. Gomez-Aparisi, J. and Abadia, J. 1994. Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.* 104: 667-673.
- 3) Bilger, W. Schreiber, U. and Lange, O. L. 1987. Chlorophyll fluorescence as an indicator of heat induced limitation of photosynthesis in *Arbutus unedo* L. - In: Tenhunen, J. D. Catarino, F. M. Lange, O. L. and Oechel, W. C. (ed.): *Plant response to Stress*. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York - London - Paris - Tokyo. pp.391-399.
- 4) Buchanan B. B. Guruissem, W. and Jones, R. L. 監修：杉山達夫. 訳：岡田清考, 内藤 哲, 中村研三, 長谷俊治, 福田裕穂, 前島正義. 2000. *植物の生化学・分子生物学*. 学会出版センター. pp.537-539.
- 5) Cerovic Z. G. et al. 1999. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie.* 19: 543-578.
- 6) Cornelis, J. and Nutteren, J. A. 1982. Kangkong, an important vegetable in Asia. Report of a fact finding mission to Singapore, Malaysia and Thailand. Agricultural University, Wageningen. The Netherlands. p.48.
- 7) Demming-Adams, B. and Adams, W. W. III. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Biol.* 43: 599-626.
- 8) Dionisio-Sese, M. L. 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.
- 9) Everard, J. D. Gucci, R. Kann, S. C. Flore, J. A. and Loeschner, W. H. 1994. Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. *Plant Physiol.* 106: 281-292.
- 10) Gameiroa, C. Utkinb, A. B. Cartaxanad, P. Marques da Silvae, J. and Matose, A. R. 2016. The use of laser induced chlorophyll fluorescence (LIF) as a fast and non-destructive method to investigate water deficit in Arabidopsis. *Agricultural Water Management.* 164: 127-136.
- 11) Hasan, R. Kawasaki, M. Taniguchi, M. and Miyake, H. 2006. Salinity stress induces granal development in bundle sheath chloroplasts of maize an NADP-malic enzyme-type C4 plant. *Plant Prod. Sci.* 9: 256-265.
- 12) 林 匠. 井上直人. 関沼幹夫. 2015. 紫外レーザー励起時間分解蛍光計測を用いた植物栄養診断法の開発. *北陸作物学会報.* 50: 70-72.
- 13) James, R. A. Rivelli, A. R. Munns, R. and von Caemmerer, S. 2002. Factors affecting 29: 1393-1403.
- 14) Jimenez, M. S. Gonzalez-rodriguez, A. M. Morales, D. Cid, M. C. Socorro, A. R. and Caballero, M. 1997. Evaluation of chlorophyll fluorescence as a tool for salt stress detection in roses. *Photosynthetica.* 33: 291-301.

- 15) Koji Yamane, Michio Kawasaki, Mitsuka Taniguchi, and Hiroshi Miyake. 2008. Correlation between chloroplast ultrastructure and chlorophyll fluorescence characteristics in the leaves of rice (*Oryza sativa* L.) grown under salinity. *Plant production science*. 11(1): 139-145.
- 16) 小山鐵夫. 1984. 資源植物学. 講談社: pp.161-164.
- 17) Kuckenber, J. Tartachnyk, I. Schmitz-Eiberger, M. and Noga, G. J. 2007. UV-B induced damage and recovery processes in apple leaves as assessed by LIF and PAM fluorescence techniques. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 81: 77-85.
- 18) Krause, G. H. and Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu Rev. Plant Biol.* 42: 313-349.
- 19) La Porta, N. Bertamini, M. Nedunchezian, N. and Muthuchelian, K. 2004. High irradiance induced changes of photosystem 2 in young and mature needles of cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *Photosynthetica*. 42: 263-271.
- 20) Lu, C. and Zhang, J. 1998. Thermostability of photosystem II is increased in salt-stressed sorghum. *Aust. J. Plant Physical*. 25: 317-324.
- 21) 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.
- 22) Men, L. T. Ogle, B. and Son, V. V. 2010. Evaluation of water spinach as a protein source for Ba Xuyen and Large White sows. *Livestock Research for Rural Development*. 22(4) p.99.
- 23) Netondo, G. W. Onyango, J. C. and Beck, E. 2004. Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. *Crop Sci.* 44: 806-811.
- 24) Pham Nguyen To Quyen. 2016. 塩化ナトリウムがエンサイ (*Ipomoea aquatica* Forsk.) の成長に及ぼす効果. 信州大学大学院農学研究科修士論文.
- 25) Ranjbarfordoei, A. Samson, R. and Van Damme. 2006. Chlorophyll fluorescence performance of sweet almond [*Prunus dulcis* (Miller) D. Webb] in response to salinity stress induced by NaCl. *P. Photosynthetica*. 44(4): 513-522.
- 26) Saito Yasunori. et al. 2002. Remote estimation of the chlorophyll concentration of living trees using laser-induced fluorescence imaging lidar. *Optical Review*. 9(2): 37-39.
- 27) 齊藤保典. 2008. レーザー誘起蛍光分光法による植物生理情報のセンシング. *応用物理*. 77(11): 1328-1331.
- 28) 志水勝好. 2015. 塩分ストレス耐性の強い植物の生理機構とその利用. *沙漠研究*. 25(4): 305-308.
- 29) Schreiber, U. Kiah, M. Klimant, I. and Reising, H. 1996. Measurement of chlorophyll fluorescence within leaves using a modified PAM Fluorometer with a fiber-optic microprobe. *Photosynthesis Research*. 47: 103-109.
- 30) 関沼幹夫. 井上直人. 2014. 紫外レーザー励起蛍光分析による普通ソバの葉における窒素栄養の情報取得. *北陸作物学会報*. 49: 11-13.
- 31) 関沼幹夫. 井上直人. 2014. 紫外励起蛍光スペクトルによる植物栄養診断手法の開発—窒素施用によるソバ個葉の特性解析—. *北陸作物学会報*. 49: 14-17.
- 32) 関沼幹夫. 春日重光. 井上直人. 2015. 紫外励起蛍光スペクトルによる植物栄養診断手法の開発—花色によるソバ個葉の特性解析—. *北陸作物学会報*. 50: 61-63.

## Photochemical reaction of water spinach as influenced by salinity stress

Taku HAYASHI, Naoto INOUE and Koji ORII

Faculty of Agriculture, Shinshu University, Minamiminowa, 399-4598, Japan

### Summary

Water spinach, which is a useful vegetable cultivated in tropical and subtropical areas, is commonly grown under excessive moisture conditions and has a resistance to salinity stress. In this study, the methods of pulse amplitude modulation (PAM), laser-induced fluorescence (LIF), and LED-induced fluorescence (LED-IF) were used to clarify the response of photochemical reaction under salinity stress condition. Pot experiments were conducted with four replications under salinity stress condition. Sodium chloride was applied for the rates of 300, 600, 1200, 1800, and 2400g·m<sup>-2</sup> and the growth and parameters

related to the photochemical reaction were investigated at a vegetative growth period after one month. The  $F_o/F_m$  value of PAM for  $600\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$  was lower than those for other plots and the  $F_v/F_m$  value tended to be larger for the same. SPAD values for 300 and  $600\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$  were higher than those for other plots. From these results and the results from LED-IF and LIF, it was suggested that water spinach has a high tolerance to salinity stress and the required performance of Na.

**Key words** : chlorophyll fluorescence, photochemical response, salinity stress, water spinach