

23

No. 0123

ホウレンソウの NaCl 添加水耕栽培における光合成能の解析

Yasuomi Ibaraki, Seiji Hayakawa

Faculty of Agriculture, Yamaguchi University

ホウレンソウの水耕栽培では、培養液に NaCl を添加することで生長が促進される。本研究では、そのメカニズムに関する基礎的な知見を得ることを目的に、NaCl 添加の有無がホウレンソウの光合成光化学系 II (PSII) の量子収率に及ぼす影響を調べた。培養液に NaCl を添加した区 (40mM を添加) としない区 (対照区) で、PSII の最大の量子収率に対応する暗処理後のクロロフィル蛍光パラメータである F_v/F_m の経時変化を比較したところ、NaCl 添加区、対照区ともに、栽培初期には F_v/F_m 値が小さく、その後上昇し、また下降するというパターンが認められた (Fig.1)。また、NaCl 添加区は対照区に比べ、 F_v/F_m の値が高く推移し (Fig.1)、PSII の最大量子収率が高くなっていることが示唆された。さらに、連続暗処理によりホウレンソウ苗にストレスを与えた場合、NaCl 添加によって F_v/F_m の低下が抑えられた (Fig.2)。この NaCl 添加による PSII 量子収率の変化は、添加直後には見られず、数日後に観察された。以上の結果より、ホウレンソウの水耕栽培では、培養液への NaCl 添加により、PSII の最大量子収率が上昇する可能性が示唆された。この現象のメカニズムについては、今後、浸透ストレス等に着目した詳細な解析を行う予定である。

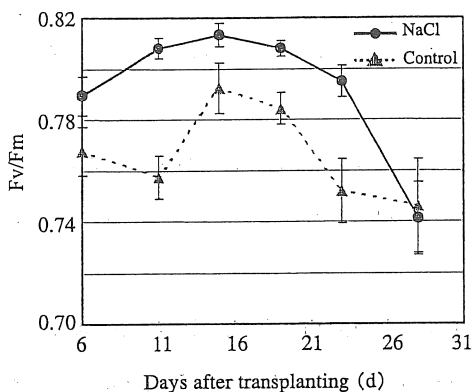


Fig.1 Changes in Chlorophyll fluorescence parameter F_v/F_m . NaCl was added on Day 6 after transplanting. Bar, SE (n=16).

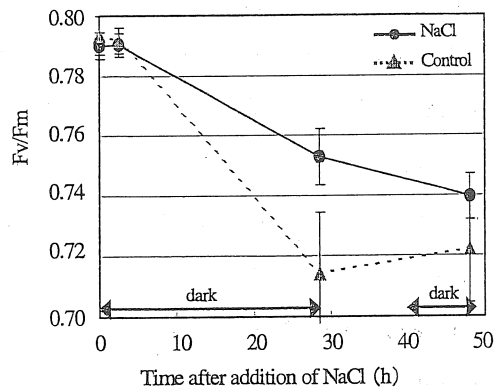


Fig.2 Effect of continuous dark on F_v/F_m . On Day 10 after transplanting, NaCl was added and continuous dark treatment started. Bar, SE (n=16).

23

助成番号 0123

ホウレンソウのNaCl添加水耕栽培における光合成能の解析

助成研究者名：荊木康臣（山口大学農学部）

共同研究者名：早川誠而（山口大学農学部）

1. 研究目的

ホウレンソウの水耕栽培において、数十 mM 程度の NaCl を培養液に添加することでホウレンソウの生長が促進される可能性があることが報告されている（星ら、1996）が、その効果の詳細な解析やメカニズムに関する研究はほとんど行われていないのが現状である。そこで本研究は、光合成への影響に焦点を絞り、培養液に NaCl を添加した時のホウレンソウの光合成の状態を、クロロフィル蛍光を用いて解析することを目的とする。

クロロフィル蛍光は、近年、光合成における光量子利用の状態を表す指標として、活発に利用されてきている（例えば Lu and Zhang, 1998; Goh *et al.*, 1999 など）。クロロフィル蛍光から導き出せるパラメータは、光合成の光化学系 II (PSII) における量子収率や電子伝達速度など、光合成器官の生理的状态を反映する。そこで、NaCl 添加水耕栽培におけるホウレンソウのクロロフィル蛍光を測定し、PSII の量子収率に関する情報を取得することを試みた。

2. 研究方法

2. 1 実験材料

実験には、ホウレンソウ（品種：オカメ）を用いた。ホウレンソウの種子を、一昼夜流水処理した後、ステンレスのトレイ（内寸 300 x 240 x 50mm）内で、蒸留水で湿らせた濾紙上に置き、暗黒条件下で発芽させた。発芽し胚軸が数 cm 程度になった幼苗（平均生体重 90mg）を、スポンジで挟み、水耕栽培用発砲プラスチックパネルの穴に挿入した。水耕栽培用パネルは、プラスチック製の栽培トレイ（内寸 315 x 220 x 95mm）内で、培養液上に浮かせた。栽培トレイあたり、2L の培養液を入れ、酸素供給のため、エアープンプで培養液に外気をバブリングした。栽培トレイは、温度 22℃、相対湿度 70% に制御した環境制御型グロースチャンバー内に設置した。制御の状況を Fig.1 に示す。栽培用の照明には、100W 白色蛍光灯を用い、明期 16 時間、暗期 8 時間の周期で、光を照射した。この時の栽培面における光強度の平均は、PPFD で約 $300\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ であった。

培養液には大塚肥料 A 処方 1 単位を用いた（以下標準培養液）。NaCl 添加区では、

標準培養液に 40 mM (2.34 g/L) の NaCl を添加した。この時の初期電気伝導度 (EC) は、 6.4 mScm^{-1} (標準培養液の EC は 2.4 mScm^{-1}) であった。培養液は 4 日ないし、5 日間隔で新しい液に交換した。1 栽培トレイあたり 8 個体の植物を栽培した。

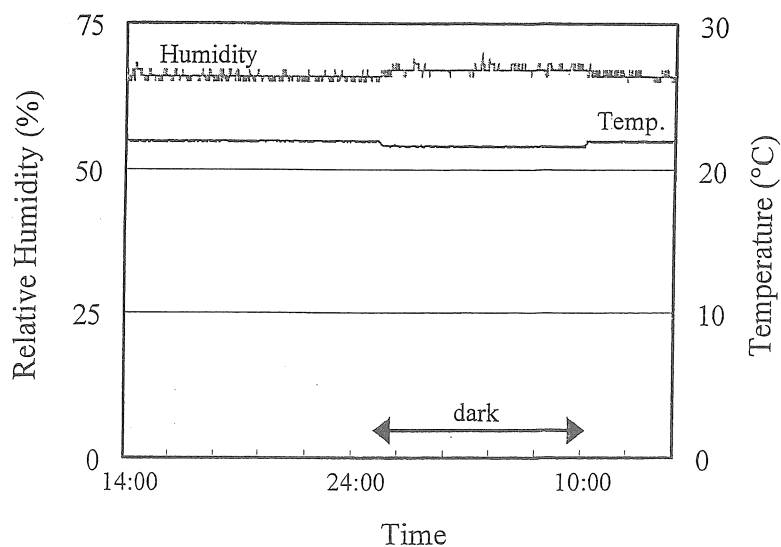


Fig.1 Control of air temperature and humidity in a growth chamber.

2. 2 クロロフィル蛍光による光合成光化学系 II の量子収率の解析

2. 2. 1 クロロフィル蛍光による光合成解析の原理

植物の葉内のクロロフィルによって吸収された光エネルギーは、光合成（電子伝達系）に利用されるが、利用できなかった光エネルギーは、熱および蛍光という形態で、再び放出される。蛍光を測定することで、主に光合成 PSII における電子伝達や熱散逸に関する情報を得ることができる。特に、飽和パルスを利用するクロロフィル蛍光測定では、PSII の量子収率に関する情報が取得できる。

PSII における電子伝達物質である Q_A を酸化状態に戻すために暗処理を行った後、微弱光（以下測定光）で励起されるクロロフィル蛍光 (F_0) と、飽和光（すべての Q_A を還元することのできる強度の光）照射時、測定光で励起されたクロロフィル蛍光 (F_m) は以下のような意味を持つ（式 1、2）。

$$F_0 = I \frac{k_f}{k_f + k_p + k_d} \quad (1)$$

$$F_m = I \frac{k_f}{k_f + k_d} \quad (2)$$

ここで、 k_f, k_p, k_d は、それぞれ、PSIIにおける蛍光、電子伝達、熱散逸の反応速度定数を表し、 I はPSIIに吸収された光強度（光量子束密度）を表す。そして、 F_0 と F_m からPSIIの最大（すべての Q_A が開いている状態での）の量子収率 Φ_p が計算される（式3）。

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m} = \frac{k_p}{k_f + k_p + k_d} = \Phi_p \quad (3)$$

さらに、Pulse Amplitude Modulation (PAM) 方式のクロロフィル蛍光測定装置では、周囲に光がある状況でも、感度よく蛍光の測定が可能であり、光が照射されている時の実際のPSIIの量子収率に対応したパラメータ $\Delta F/F_m'$ （式4）の推定も可能である。

$$\frac{\Delta F}{F_m'} = \frac{F_m' - F}{F_m'} \quad (4)$$

ここで、 F は周囲光がある状態で測定光によって励起された蛍光を、 F_m' は周囲光がある状態で飽和光を照射した時、測定光によって励起された蛍光を表す。

2. 2. 2 クロロフィル蛍光測定法

クロロフィル蛍光の測定には、PAM方式携帯用クロロフィル蛍光測定装置（Waltz, MINI-PAM）を用いた（Fig.2）。蛍光パラメータとしては、 F_v/F_m を測定した。なお、 $\Delta F/F_m'$ の測定も試みたが、グロースインキュベータ内において、光照射条件では、原因は不明であるが、クロロフィル蛍光の値が安定しなかった。よって、暗処理後のパラメータである（暗条件で測定可能である） F_v/F_m のみを測定した。測定開始から1時間前にグロースインキュベータ内の照明を消し暗処理を行い、測定時も照明を消したままにした。クロロフィル蛍光の測定には、MINI-PAM 付属の測定用ホルダーを用いて、葉面（向軸面）にホルダーの先端を接触させて測定した。各個体において一番大きい葉（展開してから時間の経過した葉）を測定対象とした。

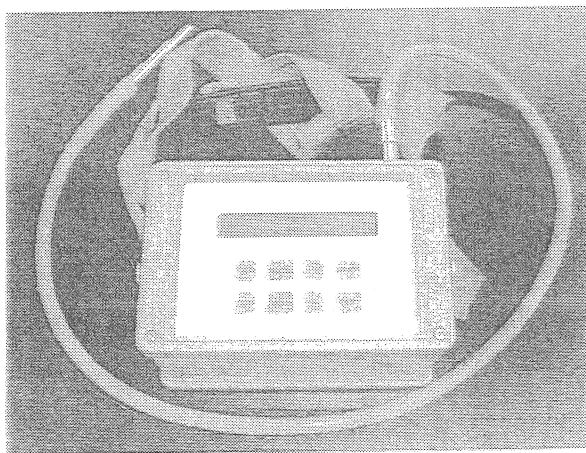


Fig.2 Chlorophyll fluometer (Waltz, MINI-PAM)

2. 3 実験方法

2. 3. 1 実験1

水耕栽培トレイに移植後6日目より、培養液にNaClを添加し、9日目よりFv/Fmの経時変化(9日目、13日目、17日目、23日目)を測定した。実験にはNaCl添加区、対照区ともに、16個体の植物を用いた。

2. 3. 2 実験2

水耕栽培トレイに移植後6日目より、培養液にNaClを添加し、移植後6日目(NaCl添加直前)、11日目、15日目、19日目、24日目、29日目にFv/Fmを測定した。実験にはNaCl添加区、対照区ともに、16個体の植物を用いた。また本実験では、画像解析を用いて投影面積の経時変化を推定した(2.4参照)。さらに、実験期間終了後に、生体重を地上部と地下部に分け、電子天秤(Shimadzu, BX4200H、最小単位:0.01g)で測定した。地上部は各個体別に、地下部はトレイ別に測定した。また、蛍光実体顕微鏡を用いて、葉の構造も観察した。

2. 3. 3 実験3

水耕栽培トレイに移植後6日目より、培養液にNaClを添加し、10日後よりグロースチャンバー内の温度を28℃に上げ、高温ストレスを与えた。Fv/Fmは、移植後6、10、11、12日に測定した。実験には、NaCl添加区、対照区ともに、16個体の植物を用いた。

2. 3. 4 実験4

水耕栽培しているホウレンソウの苗に対し、栽培トレイに移植後10日目の暗期の終わりから、NaClを培養液に添加し、連続暗処理を開始して、Fv/Fmの経時変化(連続暗処理開始から0、2.5、28.5、48時間後に測定)を測定した。実験にはNaCl添加区、対照区ともに、16個体の植物を用いた。

2. 4 画像解析による投影面積の測定

クロロフィル蛍光測定後に、デジタルカメラ(Nikon, CoolPix900)を用いて、各区のトレイ全体を撮影した。撮影した画像は、コンパクトフラッシュを介して、パソコンに取り込み(Fig.3-a)、画像処理ソフトウェア(Adobe, Photoshop 6.0)を用いて、まず、トレイの長辺の長さを用いて、画像の大きさの補正を行った後(Fig.3-b)、ホウレンソウの葉の部分のみを抽出し(Fig.3-c,d)、葉の部分のピクセル数を計測した。補正後の画像では、1pixelが3.5mmに相当する。ピクセル数から、投影面積を推定した。

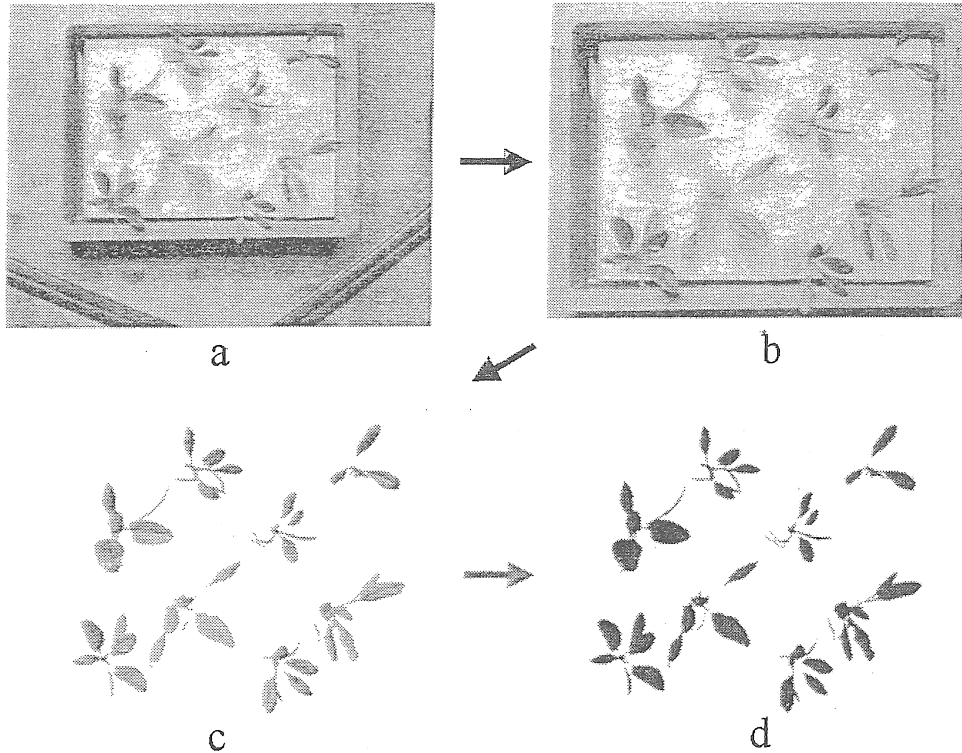


Fig3. Procedure of image processing for estimating projected area of spinach.

- a. original image, b. adjustment of image dimension,
- c. extraction of plants, d. thresholding

3. 結果

3. 1 実験 1

NaCl 添加区、対照区ともに、Fv/Fm の値は栽培初期（移植後初期）に低く、その後上昇し、また下降するというパターンが認められた（Fig.4）。また、NaCl 添加区の方が高い値で推移した。今回の条件においては、NaCl 添加区の移植後 13、17 日において、Fv/Fm の正常値といわれる 0.8-0.82 の範囲を示したが、対照区では、常に 0.8 を下回った。また、NaCl 添加区、対照区ともに、培養液へのこけの混入などにより、移植後 20 日目より生育不良が目視により認められた。23 日目における Fv/Fm が、両区とも正常値を大きく下回ったのはこのことに起因すると思われる。また、移植後 6 日目より NaCl を添加したが、その 3 日後である移植後 9 日目では、NaCl 添加と無添加の対照区で Fv/Fm おける明確な差は認められなかった。

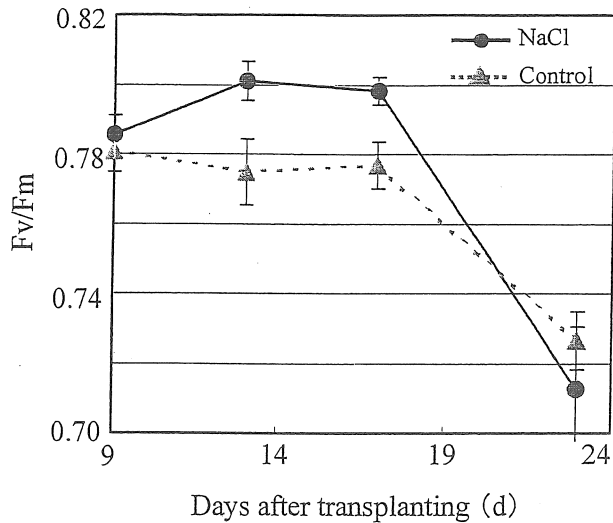


Fig.4 Changes in Chlorophyll fluoresce parameter F_v/F_m (Exp. 1). Bar, SE (n=16)

3. 2 実験 2

Fig.5 に投影面積の経時変化を、Table 1 に実験終了時の生体重を示す。また、Fig.6 に F_v/F_m の経時変化を示す。実験開始時（移植後 6 日目）における大きさには両区で差は認められなかったが、その後、投影面積は NaCl 添加区で明らかに大きくなった。基本的には、葉面積は指数的に増加すると考えられるが、測定した投影面積は、ほぼ直線的に増加した。これは、ある程度大きくなると葉が重なり合ったりすることで、投影面積と実際の葉面積は線形には対応しなくなる（葉面積の増加に対して投影面積の増加が鈍る）ことによると考えられる。

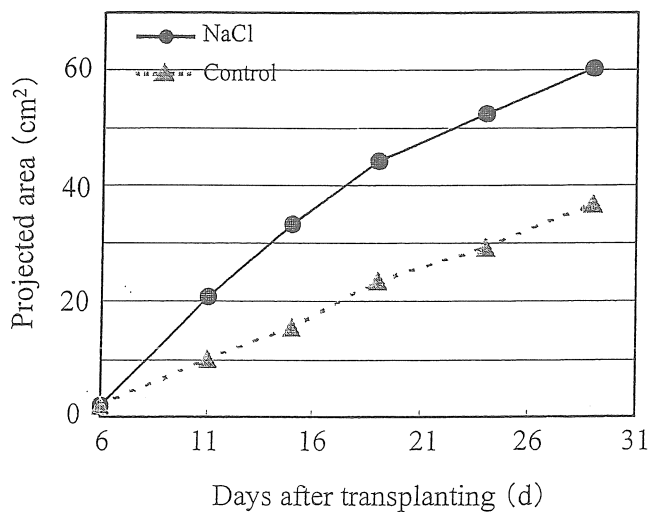


Fig.5 Changes in projected area of spinach (Exp. 2).

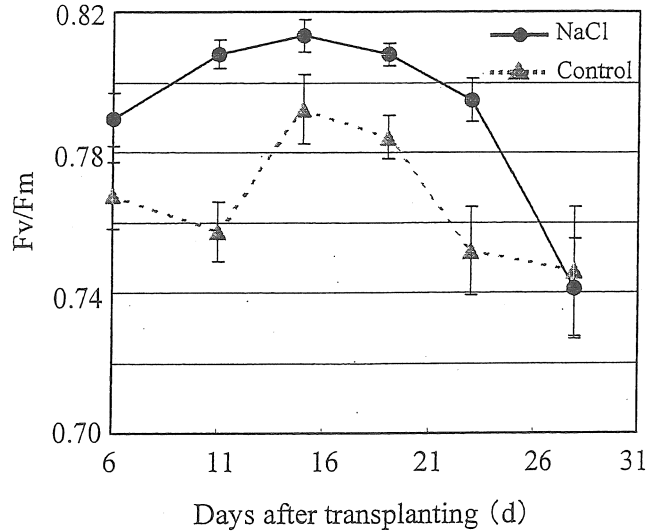


Fig.6 Changes in Fv/Fm (Exp. 2). Bar, SE (n=16)

投影面積と同様に、実験終了日における生体重は、地上部、地下部ともに NaCl 添加区で大きくなった (Table 1)。また、蛍光実体顕微鏡による観察では、両区の葉においてに構造上の違いは認められなかった。

Fv/Fm 値は実験開始時より、NaCl 添加区で大であった (Fig.6)。そして実験 1 と同じように、両区とも Fv/Fm の値は、移植後の日数が経過するに従って上昇し、その後下降するというパターンを示した。そして、移植後 29 日を除いて、NaCl 添加区で常に Fv/Fm は高い値を示した。

実験開始 (NaCl 添加時) で、すでに両区に Fv/Fm 値の差が生じていたことおよび生長速度の著しい差を考えると、本実験では、対照区と NaCl 添加区で実験材料の質的な違い (例えば生育ステージ) があったことも否定できないが、NaCl の添加によって NaCl と対照区における Fv/Fm の差は明らかに大きくなった。

Table 1. Comparison of fresh weights between treatments in Exp.2.

	Fresh Weight (g)	
	Shoot	Root
NaCl	9.7±1.1*	32.5
Control	5.2±1.2	19.6

* Average value ± SE (n=16).

3. 3 実験 3

Table 2 に、高温ストレスを与えた時の Fv/Fm の経時変化を示す。実験開始時 (NaCl

添加前)における Fv/Fm の値は、NaCl より対照区において大であったが、添加 4 日後においては、その大小関係は逆転し、NaCl の方が大きくなった。しかしその差は、微小であり、その後、高温ストレスを与えた後には、両区における Fv/Fm の明確な差は認められなかった。

Table 2. Changes in Fv/Fm under heat stress.

	Fv/Fm			
	0*	4*	5*	6*
NaCl	0.813±0.03**	0.819±0.03	0.810±0.03	0.811±0.03
Control	0.820±0.02	0.812±0.03	0.811±0.02	0.807±0.02

*Days after addition of NaCl to nutrient solution. Heat stress treatment was started on Day 5.

** Average value ± SE (n=16).

3. 4 実験 4

ホンレンソウ苗が、弱光(暗処理)によってストレスを受けている場合、ストレスを与えている時間(連続暗処理時間)の増加とともに、Fv/Fm が低下する傾向が認められた(Fig.7)。NaCl の培養液への添加により、数時間では、Fv/Fm への影響が認められなかったが、ストレスの程度増加に伴い、Fv/Fm の値に有意な差が認められた(Fig.7)。すなわち、NaCl 添加区において、Fv/Fm の低下が抑制された。

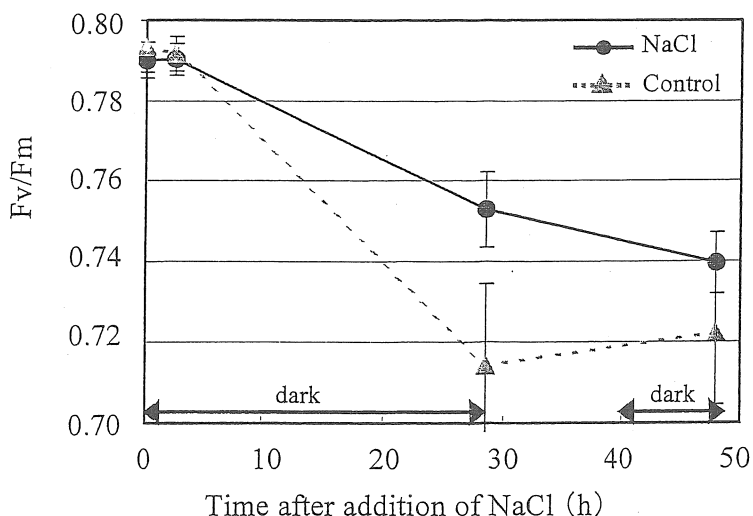


Fig.7 Effect of NaCl addition on Fv/Fm under continuous dark treatment

4. 考察

今回の実験では、測定対象葉には、各個体内で一番大きい葉を用いているため、全測定時で各個体同じ葉(本葉で葉齢の古い葉)を測定していると考えられる。よって、

Fv/Fm の経時変化は測定葉の葉齢の変化に基づいた Fv/Fm 値の変化を反映している可能性がある。通常、展開した直後の葉では Fv/Fm は低く出る傾向がある(荊木、2002)。実験 1、2 において、栽培初期に Fv/Fm 値が低く、その後上昇するのは、このことに起因する可能性があると考えられる。

今回の研究において行ったすべての実験において、NaCl 添加により、Fv/Fm 値が上昇する傾向が認められた。すなわち、PSII における最大の量子収率は、NaCl の添加によって上昇した。しかしながら、NaCl の培養液への添加後、Fv/Fm への影響が現われるには、数日程度の時間がかかっていることから、応答の速い系で光合成 PSII に NaCl 添加の影響があるのではなく、養分吸収やそれに伴う葉内生成物の組成の変化等を介し、光合成系に影響が及んでいる可能性があると考えられる。実際、NaCl の添加により葉内糖濃度の増加や、クロロフィル含量の増加が報告されている(星ら、1996)。今後、葉内物質の組成変化と関連付けて Fv/Fm の上昇する要因を探る必要があると思われる。

5. 今後の課題

今回の実験では、NaCl を添加した水耕栽培において、PSII の最大量子収率に対応した蛍光パラメータ Fv/Fm の増加が認められたが、そのメカニズムは不明である。培養液に NaCl 添加することで、培養液の水ポテンシャルも変化する。実際、今回の添加量においても培養液の EC 値は 2 倍以上になる。NaCl 自身 (Na^+ もしくは Cl^-) の効果なのか、浸透ストレスの影響なのかは、浸透圧調整剤などの利用により、今後十分に検討する必要がある。

6. 文献

星岳彦・石井雅彦・山田和治・三村聡 (1996) 塩化ナトリウム添加養液栽培ホウレンソウのイオン吸収特性と糖・クロロフィル含量. 日本農業気象学会 1996 年度全国大会講演要旨集 160-161

Goh C-H, Schreiber U, Hedrich R (1999) New approach of monitoring changes in chlorophyll *a* fluorescence of single guard cells and protoplasts in response to physiological stimuli. *Plant Cell Environment* 22:1071-1083

Lu C, Zhang J (1998) Modification in photosystem II photochemistry in senescent leaves of

maize plants. Journal of experimental Botany 49:1671-1679

荊木康臣 (2002) 光化学系 II 量子収率のデータベース化. 日本農業気象学会 2002 年度
全国大会講演要旨集.

Analysis of PSII quantum yield of spinach grown hydroponically in a high concentration of NaCl using chlorophyll fluorescence

Yasuomi Ibaraki, Seiji Hayakawa
Faculty of Agriculture, Yamaguchi University

Summary

Maximal quantum yield of photosynthetic photosystem II (PSII) was analyzed in spinach grown hydroponically to investigate effects of addition of NaCl to the nutrient solution using chlorophyll fluorescence. The chlorophyll fluorescence parameter F_v/F_m of spinach grown hydroponically with a nutrient solution added 40 mM NaCl (NaCl treatment) was compared to that of spinach grown with the normal nutrient solution (control) over a cultivation period of 29 d. For both treatments, there was a tendency that the value of F_v/F_m first increased and then decreased. The value of F_v/F_m of spinach in the NaCl treatment was always higher than that in control. This result suggested that maximal quantum yield of PSII increased by addition of NaCl to the nutrient solution. In addition, the effect of continuous dark on F_v/F_m of hydroponically grown spinach was investigated. Although the continuous dark caused a decrease in F_v/F_m for both treatments, addition of NaCl restrained reduction of F_v/F_m . From obtained results, it is suggested that addition of NaCl to the nutrient solution improves the quantum yield of hydroponically grown spinach. Further research on the mechanism of this effect will be necessary.