

C4作物トウモロコシにおける光合成特性の変異と弱光順応に関する研究

屋比久, 貴之

<https://doi.org/10.15017/1931961>

出版情報 : 九州大学, 2017, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

C₄作物トウモロコシにおける光合成特性の変異と
弱光順応に関する研究

屋比久 貴之

2018

目 次

第 1 章	緒言.....	1
第 2 章	トウモロコシとテオシントにおける光合成能および資源利用効率の 変異とその制御要因	
	はじめに.....	6
	材料および方法.....	8
	結果.....	17
	考察.....	31
	摘要.....	37
第 3 章	トウモロコシ個葉における光合成特性の弱光順応	
	はじめに.....	40
	材料および方法.....	42
	結果.....	46
	考察.....	62
	摘要.....	68
第 4 章	トウモロコシ個体群の下位葉における光合成特性の弱光順応と個体群 光合成に対する下層部の貢献度	
	はじめに.....	71
	材料および方法.....	73
	結果.....	77

考察.....	93
摘要.....	97
第 5 章 総合考察.....	100
謝辞.....	105
引用文献.....	106

略語表

ADP,	adenosine diphosphate ; アデノシン二リン酸
ATP,	adenosine triphosphate ; アデノシン三リン酸
BS,	bundle sheath ; 維管束鞘
BSA,	bovine serum albumin ; ウシ血清アルブミン
BSC,	bundle sheath cell ; 維管束鞘細胞
CAM,	crassulacean acid metabolism ; ベンケイソウ型有機酸代謝
CCM,	CO ₂ -concentrating mechanism ; CO ₂ 濃縮機構
C _a ,	ambient CO ₂ concentration ; 大気 CO ₂ 濃度
Chl,	chlorophyll ; クロロフィル
C _i ,	intercellular CO ₂ concentration ; 細胞間隙 CO ₂ 濃度
DTT,	dithiothreitol
EDTA,	ethylenediaminetetraacetic acid ; エチレンジアミン四酢酸
<i>F</i> ,	cumulative leaf area index ; 積算葉面積指数
FAA,	Formalin-Acetic acid-Alcohol ; ホルマリン-酢酸-アルコール
GL,	guard cell length ; 孔辺細胞長
<i>g_s</i> ,	stomatal conductance ; 気孔伝導度
Hepes,	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
<i>K</i> ,	extinction coefficient ; 群落吸光係数
LAI,	leaf area index ; 葉面積指数
IVD,	interveinal distance ; 維管束間距離
LCP,	light compensation point ; 光補償点
LHCII,	light harvesting complex II ; 集光性色素タンパク質複合体 II
LSP,	leaf soluble protein ; 葉内可溶性タンパク質
M,	mesophyll ; 葉肉

MC, mesophyll cell ; 葉肉細胞

MDH, malate dehydrogenase ; リンゴ酸脱水素酵素

ME, malic enzyme ; リンゴ酸酵素

N, nitrogen ; 窒素

NAD, nicotinamide adenine dinucleotide ; ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ; ニコチンアデニンジヌクレオチドリン酸

OAA, oxaloacetic acid ; オキサロ酢酸

PCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase ; ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ

PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase ; ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ

PFD, photon flux density ; 光量子束密度

PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride ; フッ化フェニルメチルスルホニル

P_N , net photosynthetic rate ; 純光合成速度

P_{2000} , net photosynthetic rate at $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PFD ; PFD が $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の時の純光合成速度

P_{max} , maximum net photosynthetic rate ; 光飽和時の最大純光合成速度

PNUE, photosynthetic nitrogen use efficiency ; 光合成窒素利用効率

PSII, photosystem II ; 光化学系 II

PWUE, photosynthetic water use efficiency ; 光合成水利用効率

R_d , dark respiration rate ; 暗呼吸速度

Rubisco, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase ; リブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ

SD, stomatal density ; 気孔密度

SLW, specific leaf weight ; 比葉重

S_t , the integral of incident solar radiation ; 太陽光の照射量

T_r , transpiration rate ; 蒸散速度

Tris, Tris (hydroxymethyl)-aminomethane ; トリス

VPD, vapor pressure deficit ; 飽差

Y , yield potential ; 生産能力

$\delta^{13}C$, carbon isotope ratio ; 炭素同位体比

ϵ_c , the efficiency with which the intercepted radiation is converted into biomass ; 光のバイオマスへの変換効率

ϵ_i , the efficiency with which that the radiation is intercepted by the crop ; 作物の光捕集効率

ϵ_p , the efficiency with which biomass is partitioned into the harvested product ; 収穫部位へのバイオマス転流効率

θ , convexity of photosynthetic light curve ; 光-光合成曲線の曲率

Φ , photosynthetic quantum yield ; 量子収率

第1章 緒言

現在、世界人口は急激に増加し続けており、2050年には世界人口は約98億人に達すると予想されている(United Nations, 2017)。また、それに伴って食糧不足も深刻化しており、2050年までには2006年の生産量より6割の食糧増産が必要とされている(FAO, 2016)。したがって、さらなる作物収量の向上は、今後も作物学の主要な課題の一つである。一方、先進国においては化学肥料の多投入による富栄養化などの環境汚染が生じ、開発途上国においては経済的コストの面から十分に化学肥料を投入できないなどの問題がある。さらに、化石燃料や水など資源の枯渇も深刻化の一途を辿り、今後は、これまで以上に様々な制約の下で作物の収量性の向上を達成しなければならないと考えられる。このような背景から、資源低投入かつ持続可能な農業体系の確立が大きな課題となっている。

光合成は植物の物質生産を直接担う生理反応であり、作物の生産性の向上を図る上で最も重要な要因のひとつである。あらゆる条件下において、光合成による太陽光エネルギーのバイオマスへの変換効率が低いことは、作物の生産性を高める上で重要である。理想的な条件における作物の潜在的な生産能力(Y)は、栽培期間における太陽光の照射量(St)、光捕集効率(ϵ_i)、捕集した光のバイオマスへの変換効率(ϵ_c)、および収穫部位へのバイオマスの転流効率(ϵ_p)により構成されている(Monteith, 1977; Zhu et al., 2010)。 ϵ_i は個体群の構造、発達速度および寿命や葉の光吸収率、 ϵ_c は葉の光合成速度や呼吸速度、 ϵ_p は全バイオマスエネルギーの収穫部位への配分量によってそれぞれ決定される(Zhu et al., 2010)。これまでに主要作物の Y は特に ϵ_i 、 ϵ_p の面から改善されてきたが、これらのパラメータのさらなる向上の余地はそれほど大きくはないと考えられている(Long et al., 2006; Zhu et al., 2010; Evans, 2013)。その一方で、これまでに収量性の向上が ϵ_c の向上によって達成された例はほとんど知られていない(Long et al., 2006; Zhu et al., 2010; Evans, 2013)。そのため今後、 ϵ_c 、すなわち光合成能力の向上による作物の生産性の向上が期待されており、個葉およ

び個体群レベルで光合成を高めるための研究の重要性が高まっていくと考えられる。また、作物の光合成能を高めるためには、作物それ自体ばかりでなく近縁野生種について、光合成能力の変異幅やその制御要因について研究することが必要である(Flood et al., 2011)。

植物の光合成炭素代謝機構には3タイプが存在し、それぞれC₃型、C₄型、ベンケイソウ型有機酸代謝(CAM)型光合成と呼ばれている。その中でもC₄光合成を行うC₄植物は、葉肉細胞(MC)と維管束鞘細胞(BSC)という2種類の光合成細胞における代謝反応の分業によりCO₂濃縮機構(CCM)を働かせている(Hatch, 1987)。C₄植物では、まず葉の気孔から取り込まれた大気CO₂が、MC内に存在しているホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)の働きによりCO₂受容体のホスホエノールピルビン酸(PEP)と結合することによりC₄化合物が合成される。C₄化合物はBSCに輸送された後C₄酸脱炭酸酵素による脱炭酸を受け、発生したCO₂はBSC内のCO₂濃度を高める。その結果、リブローズ1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(Rubisco)のオキシゲナーゼ反応を抑制して光呼吸を抑え、効率的にC₃回路を働かせることができる(Hatch, 1987)。そのため、C₄植物は光呼吸が活発となる強光、高温下でC₃植物に比べ高い光合成能力を示し、乾物生産能力も高い(Brown, 1999; Ghannoum. et al., 2011)。C₄植物は被子植物の全種数の約3%を占めるに過ぎないが、全陸地におけるバイオマス生産の約1/4を担っている(Sage et al., 1999)。また、C₄植物はCCMの働きによりC₃植物に比べ低い気孔開度で、また少ないRubiscoタンパク質量で効率よく光合成を行えることから、水および窒素(N)利用効率が高く(Ghannoum et al., 2011)、資源低投入のもとでの作物の生産性向上を図る上でも有用であると考えられている(Carpita and McCann, 2008)。

C₄植物は、BSCにおけるC₄化合物の脱炭酸過程の違いにより、NADP-リンゴ酸酵素(NADP-ME)型、NAD-リンゴ酸酵素(NAD-ME)型、PEPカルボキシキナーゼ(PCK)型という3つのサブタイプに分けられている(Hatch, 1987)。C₄サブタイプ間で、BSCにおけるオルガネラの配置や葉緑体グラナの発達程度、スベリン層の有無

などの構造的特性に違いが見られる。また、C₄サブタイプ間でMCおよびBSCにおけるエネルギー要求性が異なり、そのためCO₂固定における量子収率(Φ)も異なる(Ehleringer and Pearcy, 1983; von Caemmerer and Furbank, 2016)。生態学的にも差異が見られ、イネ科C₄植物ではサブタイプによって降水量に対する地理的分布パターンや窒素利用効率が異なることが報告されている(Ellis et al., 1980; Schulze et al., 1996; Ghannoum et al., 2005)。このようにC₄植物はサブタイプ間でも生理学的、生化学的、生態学的特性に差異があるため、C₄植物の光合成・物質生産特性を理解していくためには、それぞれのサブタイプ毎にその特性を明らかにしていくことが必要である。

従来、NADP-ME型C₄植物ではBSCにおけるC₄酸脱炭酸酵素としてNADP-MEのみを用いていると考えられてきた。しかし、Wingler et al.(1999)はNADP-ME型C₄作物のトウモロコシにおいて、BSC内のC₄化合物の脱炭酸反応にNADP-MEのみならずPCKも併用していることを明らかにした。それ以後、トウモロコシ以外にも様々なNADP-ME型C₄植物種で脱炭酸反応にPCKを併用している可能性が示されており(Koteyeva et al., 2015)、近年ではPCKを用いるNADP-ME型C₄植物の光合成経路のモデルも提唱されている(Furbank, 2011)。しかし、NADP-ME型C₄植物におけるPCKの生理・生化学的意義については、不明な点が多い。

C₄光合成はアデノシン三リン酸(ATP)を用いてCCMを作動させるため、C₃光合成よりも光エネルギー要求性が高い(Ehleringer and Pearcy, 1983; Hatch, 1987)。また、C₄光合成では、一度PEPCにより固定されたCO₂がC₄化合物としてBSCへ輸送され、脱炭酸されたCO₂はRubiscoにより再固定される。しかし、一部のCO₂はRubiscoによって固定されずにBSC外へと漏出することが知られている。漏出したCO₂をMCで再固定するとき余分なエネルギーを要するため、BSCからのCO₂漏出は特に弱光下でC₄植物の光合成効率の低下を引き起こす主な原因となっている(Kromdijk et al., 2014; Sage, 2014)。さらに、C₄植物の葉はC₃植物の葉に比べ維管束密度が高く、緻密な維管束組織を形成するために多くのエネルギーを必要とするこ

となども相まって、C₄植物は弱光環境下でC₃植物に比べ有利とはいえないと考えられており(Sage, 2006), 実際に, 弱光環境に適応したC₄植物はあまり多くは知られていない(Sage and Stata., 2015). このような背景もあり, C₄植物における弱光環境の光合成特性に着目した研究は近年盛んになっているが(Kromdijk et al., 2008, 2014; Ubierna et al., 2011, 2013; Bellasio and Griffiths., 2014a, b), C₃植物に比べ少ないのが現状である. また, 実際の圃場の作物個体群を想定すると, 単純な弱光順応性の研究ばかりでなく, 個体群の形成過程を考慮して, 個体群下位葉が経験するような, 強光下で展開した葉がその後個体群の成長に伴い, どのように弱光順応するのかを理解することがより重要である. しかし, C₄作物についてそのような視点から研究した例は少ない.

トウモロコシは, イネ, コムギとともに世界三大穀物のひとつとして数えられ, 農業上重要な作物である. トウモロコシはイネ科 NADP-ME 型 C₄作物であるが, このサブタイプにはソルガム, サトウキビ, ネピアグラス, ススキなどが含まれ, C₄作物の中でも特に生産性や N 利用効率が高いグループとして知られている(Zhu et al., 2010; Ghannoum et al., 2011). また, これらの作物は近年バイオエネルギー作物として注目されているが, 化石燃料の枯渇や温室効果ガスの削減に対する関心が世界的に高まるのに伴い, これらの作物の需要は今後益々高まると考えられる(Jones, 2011). したがって, イネ科 NADP-ME 型 C₄作物の光合成能力や生産性をより一層高めていくための研究は重要であるといえよう.

以上のような観点から, 本研究は C₄作物のトウモロコシの光合成能力を個葉および個体群レベルで向上させることを目指して行ったものである.

まず, 第2章では, トウモロコシおよびその野生種であるテオシントの計26系統を用いて, 個葉光合成能力および資源利用効率の変異の実態とその制御要因について生理・生化学的および形態学的特性に着目して網羅的に解析した.

第3章では, 圃場環境下のトウモロコシ個体群下位葉が経験する光環境の変遷を遮光処理実験により再現することにより, 強光下で形成されたトウモロコシの葉が

どのように弱光へ順応するのかについて、生理・生化学的並びに形態学的に解析した。

第4章では、第3章で見出されたトウモロコシの葉における弱光への再順応現象が実際の圃場環境で生育しているトウモロコシ個体群でも同様に起こっているのかを検討した。また、トウモロコシ個体群の下層部の葉が、現実の個体群全体の光合成にどの程度寄与しているのかを明らかにして、弱光に曝された下層葉の光合成・生産性を理解することの重要性を提案した。

最後に、第5章では、第2~4章の結果を踏まえてトウモロコシ並びにイネ科 NADP-ME 型 C₄ 作物の個葉光合成能力および資源利用効率の向上の可能性について論じた。また、トウモロコシ個体群における弱光環境での光合成研究の重要性および今後の展開について論じた。そして、トウモロコシの生産性を向上させる上で光合成能力を高めることの重要性について考察した。

第2章 トウモロコシとテオシントにおける光合成能および資源利用効率の変異とその制御要因

はじめに

植物の光合成能力は種間や種内で大きな遺伝的変異を示し、ある作物における光合成能の品種間差の実態を明らかにすることは、生産性の高い作物品種の作出を目指す上で重要である(Flood et al., 2011). これまでに主要な C₃ 作物における光合成能の品種間差が調査されてきた(Flood et al., 2011; Driever et al., 2014). C₄ 作物においてもトウモロコシやサトウキビなどについて光合成能の品種間差が報告されている(Heichel and Musgrave, 1969; Baer and Schrader, 1985; Nose et al., 1994). トウモロコシの光合成能の品種間差に関する報告には 2 倍以上の大きな変異があったというものから(Heichel and Musgrave, 1969; Crosbie et al., 1977), それほど大きくはないといったものまで様々であるため(Duncan and Hesketh, 1968; Baer and Schrader, 1985), 再度検証を行う必要があると考えられる.

C₃ 作物における光合成能の品種間差の制御要因についてはこれまで多くの研究が行われているが、C₄ 植物に関する研究はそれほど多くはない. C₃ 植物と比べると C₄ 植物の光合成代謝機構は複雑であり、葉の形態的特性も C₃ 植物と大きく異なる(Hatch, 1987; Sage, 2006). また、C₄ 植物はサブタイプによっても光合成能力を制御する要因が異なる可能性が考えられる. イネ科 NADP-ME 型 C₄ 作物であるトウモロコシにおける光合成能の品種間差に関する報告は多く見られるが、その詳細な制御要因については十分に調査されてはいない. またトウモロコシは C₄ 光合成代謝において NADP-ME とともに PCK を用いて脱炭酸反応を行うが(Wingler et al., 1999), これまでのところ C₄ 光合成に対する PCK の寄与率に品種間差があるかについては知られていない.

C₄ 植物は、CCM の働きによって N および水分を節約できることから、光合成室

素利用効率(PNUE)および光合成水利用効率(PWUE)として表される資源利用効率が C₃ 植物に比べ高い(Brown, 1977; Long, 1999; Ghannoum et al., 2011). また, イネ科 C₄ 植物では生化学的サブタイプによっても異なり, NADP-ME 型が NAD-ME 型よりも高い傾向がある(Ghannoum et al., 2011). 土壌の N や水分の利用効率は, 自然環境における植物の生存のみならず, 作物の生産性にも関わる重要な要因である. 光合成能と同様に, PNUE および PWUE についても品種および種間差があると考えられるが, C₄ 作物における知見は少なく, さらなる検討が必要である.

本章では, イネ科 NADP-ME 型 C₄ 作物であるトウモロコシおよびその野生種であるテオシントにおける光合成能力の品種および種間差とその制御要因を明らかにするとともに, PNUE および PWUE の遺伝的変異の実態を明らかにすることを目的とした.

材料および方法

植物材料および栽培方法

植物の栽培は 2014 年の 7 月中旬から 9 月中旬に九州大学農学部キャンパスの屋外で行った。材料として、トウモロコシ(*Zea mays* L.)22 系統、またその野生種とされるテオシント 4 種(*Z. mays* L. ssp. *mexicana*, *Z. perennis*, *Z. diploperennis*, *Z. nicaraguensis*)より各 1 系統ずつ用い、計 4 種 26 系統を供試した(第 1 表)。種子は育苗箱に播種し、10 日間育苗後、壤土を詰めた 5 L ポットに移植した。化成肥料を用いポットあたり窒素, リン酸, カリの全量がそれぞれ 1.6 g となるように施肥し、灌水は充分に行った。栽培期間中の平均気温は 26 °C, 日中の最大光量子束密度 (PFD)は 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上であった。移植後 3~4 週間の植物体(第 1 図)の上位完全展開葉について、光合成に関わる生理・生化学的および形態学的特性を解析した。1 系統あたり 5 個体を育成し、このうち成長のよい 3~5 個体を測定に用いた。

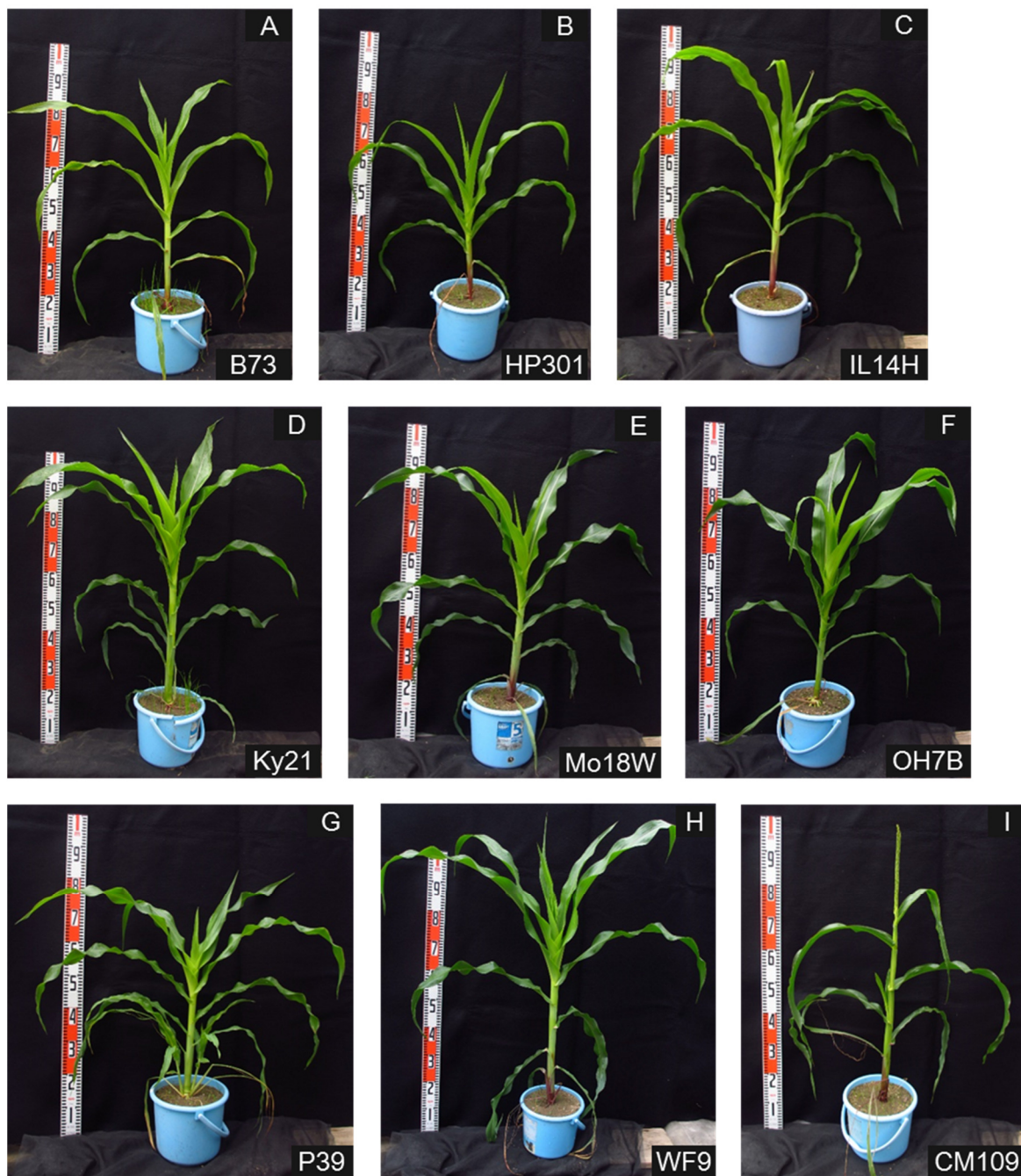
2014 年に実験したトウモロコシおよびテオシントのうち、光合成速度(P_N)の上位、中位および下位にある系統よりそれぞれ 1 つずつ、計 3 系統を選び、2015 年の 9 月下旬から 11 月上旬に九大農学部キャンパスのビニルハウス内で栽培した。栽培期間中のハウス内の日中平均気温は約 25 °C, 日中の最大 PFD は約 1600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, その他の栽培条件については 2014 年と同様であった。移植後 3~4 週間の上位完全展開葉について、光合成ガス交換測定を行った。

光合成ガス交換特性

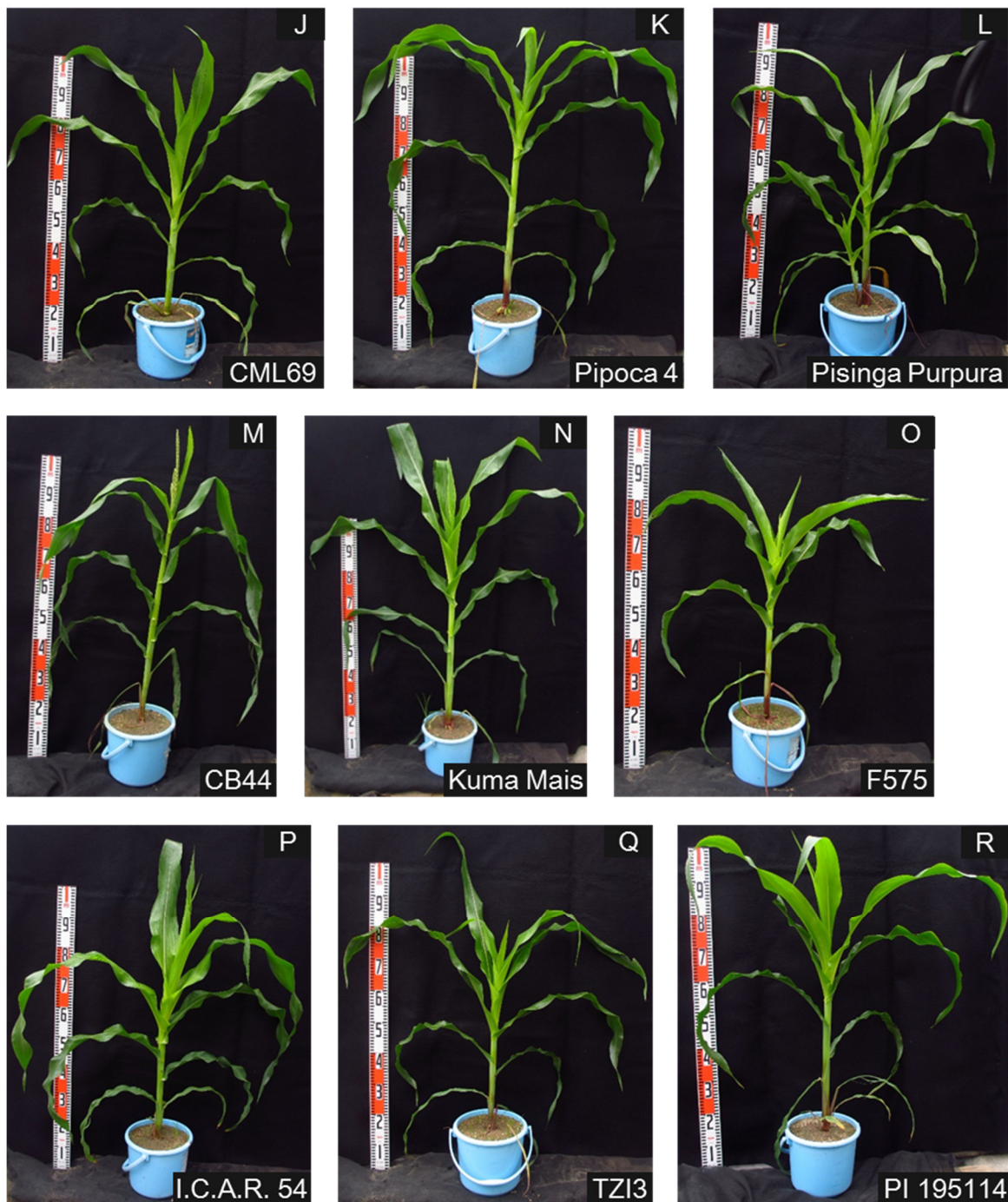
光合成ガス交換は携帯型光合成測定装置(LI-6400XT, LI-COR, USA)を用いて行った。2014 年の測定条件は光強度 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 葉温 30.0 \pm 0.5 °C, 湿度 60 \pm 0.5 %, CO₂ 濃度を 380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ とした。光合成ガス交換パラメータとして P_N , 気孔コンダクタンス(g_s), 蒸散速度(T_r), 細胞間隙 CO₂ 濃度(C_i)を測定した。 P_N を T_r で除することにより PWUE を算出した。

第1表. 供試したトウモロコシおよびテオシント.

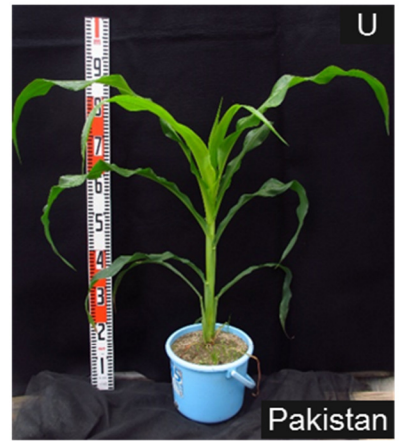
種名	系統	栽培地・採取地
<i>Zea mays</i>	B73	Iowa, USA
	HP301	Indiana, USA
	IL14H	Illinois, USA
	Ky21	Kentucky, USA
	Mo18W	Missouri, USA
	OH7B	Ohio, USA
	P39	Indiana, USA
	WF9	Indiana, USA
	CM109	Canada
	CML69	Mexico
	Pipoca 4	Brazil
	Pisinga purpura	Peru
	CB44	Netherlands
	Kuma mais	Netherlands
	F575	France
	I.C.A.R. 54	Romania
	TZI3	Nigeria
	PI 195114	Ethiopia
	Homedale	South Africa
	Georgian local 1	Russia
Pakistan	Pakistan	
Ki3	Thailand	
<i>Z. mays</i> ssp. <i>mexicana</i>	Ames 8083	Mexico
<i>Z. diploperennis</i>	PI 441930	Mexico
<i>Z. perennis</i>	Ames 21875	Mexico
<i>Z. nicaraguensis</i>	PI 615697	Nicaragua



第1図. 光合成測定時期 (移植4週間後)におけるトウモロコシ系統(A-V) およびテオシント系統(W-Z)の植物体の外観(A-I).



第1図. 続き(J-R).



第1図. 続き(S-Z).

2015 年の実験では、CO₂ 濃度に対する P_N の反応曲線(A-C_i カーブ)の作成を行った。光強度 2000 μmol m⁻² s⁻¹, 葉温 30.0±0.2 °C, 湿度 60±0.2%, CO₂ 濃度は 0~1200 μmol mol⁻¹ の間に 10 段階を設定した。まず CO₂ 濃度 380 μmol mol⁻¹ の条件下で P_N および g_s を安定化させた後、CO₂ 濃度を徐々に最低値まで下げた。その後再び 380 μmol mol⁻¹ に上げた後、徐々に最大値まで上昇させた。

生理学的特性

光合成ガス交換特性を測定した葉から葉片(3.4 cm²)をとり、Arnon (1949)の方法により Chl 含量を測定した。葉片(5.7 cm²)を 80 °C で 2 日乾燥させて単位葉面積当たりの乾物重(比葉重; SLW)を算出した。光合成測定葉の 1 枚下の葉を乾燥後に粉碎し、そのうち 0.3 g についてケルダール法により N 含量を測定した。光合成測定葉の一部は液体 N で凍結固定後、-80°C で保存した。氷冷した乳鉢に凍結保存していた葉片 0.1 g, Polyclar AT 5 mg, 石英砂 0.1 g, 抽出液[50 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 1 mM EDTA-Na, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.02 % (v/v) Triton X-100, 0.002% (w/v) Leupeptin] 1 mL を加え摩砕した後、2 重のガーゼでろ過した。その後ろ液を 4 °C, 12000 r.p.m. で 5 分間遠心後、上清について葉内可溶性タンパク質(LSP)含量を Bradford(1976)の方法により定量した。

光合成関連酵素活性

晴れた日の午前中に光合成測定葉の一部を液体 N で凍結固定後、-80 °C で保存し、酵素活性の測定に用いた。

氷冷した乳鉢に葉片を 0.2 g, polyclar AT 10 mg, 石英砂 0.2 g, 抽出液[50 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 1 mM EDTA-2Na, 5 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 0.02 % (v/v) Triton X-100, 0.5 % (w/v) BSA]1 mL を加え摩砕した後、2 重のガーゼでろ過し、粗抽出液とした。粗抽出液の一部を用いて Chl 含量を測定した。残りの粗抽出液は 4 °C, 12000 r.p.m. で 5 分間遠心後、上清を分光学的手法による酵素活性の測定に用いた。測定温度は

30°C, 反応液の全量は 1 mL, そのうちサンプル上清は 10 μ L とした.

PEPC 活性の反応液は, 70 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 0.2 mM NADH, 5 U リンゴ酸脱水素酵素(MDH)およびサンプル上清を含み, 5 mM PEP の添加により反応を開始させた.

NADP-ME 活性の反応液は, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.2 mM EDTA-2Na, 5 mM リンゴ酸, 5 mM DTT, 0.5 mM NADP およびサンプル上清を含み, 10 mM MgCl₂ の添加により反応を開始させた.

PCK 活性は Sharwood et al.(2014)の方法を一部改変して行った. 反応液は 100 mM HEPES-KOH (pH 7.0), 100 mM KCl, 90 mM KHCO₃, 4% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 2 mM MnCl₂, 0.14 mM NADH, 6 U MDH, 1 mM ADP およびサンプル上清を含み, 5 mM PEP により反応を開始させた.

Rubisco 活性の反応液は, 50 mM HEPES-KOH (pH8.0), 2.5 mM DTT, 1 mM EDTA, 5 mM ATP, 5 mM ホスホクレアチン, 0.16 mM NADH, 5 U ホスホグリセリン酸ホスホキナーゼ, 5 U グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ, 5 U ホスホクレアチンキナーゼ, 10 mM NaHCO₃, 20 mM MgCl₂ およびサンプル上清を含み, 0.6 mM リブローズ 1,5-ビスリン酸の添加により反応を開始させた. なお, Rubisco 活性測定用のサンプル上清については, 最終濃度がそれぞれ 10 mM となるように MgCl₂ と NaHCO₃ を加え, 室温で 10 分以上活性化させた.

炭素同位体比($\delta^{13}\text{C}$ 値)

1 系統当たり 3~5 個体について光合成測定葉の一部を 80 °C で乾燥後, それぞれ別個に乳鉢で粉砕した. その後, 各個体から同一量のサンプルを乳鉢に加え十分に混和し, 測定用サンプルとした. ¹³C の測定は昭光サイエンス(北葛飾, 埼玉)に委託した. 葉サンプルの 2 mg について ¹²C と ¹³C 量を元素分析/同位体比質量分析計 (EA/ IRMS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を用いて Sato and Suzuki(2010)の方法により測定した. $\delta^{13}\text{C}$ 値は Pee Dee ベレムナイトを標準試料として算出した.

葉の形態的特性

光合成測定葉から 25 mm^2 の葉片を切り出し、ホルマリン-酢酸-アルコール(FAA) 固定液で 1 日固定した。その後、Ueno et al. (2005)の方法を改変した以下の方法により切片を透明化し、気孔密度(SD)、孔辺細胞長(GL)および維管束間距離(IVD)を測定した。FAA で固定した葉片を 70%エタノールに浸漬し、 80°C 、2 日間の熱処理を行うことにより脱色した。その際、1 日に 1 回以上液の交換を行った。完全に脱色後 80%乳酸に交換し、 80°C で 1 日熱処理した。その後、葉片を飽和抱水クロロール溶液に浸漬し、透明化を行った。

透明化した葉片の両面について光学顕微鏡下で気孔数、GL および IVD を測定した。気孔数の測定は 400 倍(視野 3.913 mm^2)で行い、1 枚の葉片について片面あたり 4 視野を測定後、その平均値から SD (単位面積あたりの両面の総数)を算出した。GL の測定は 600 倍で行い、1 枚の葉片について片面あたり 20 個、両面で計 40 個の長辺を測定後、その平均値とした。IVD は隣接する小維管束の中心から中心までの距離とし、1 つの葉片につき 10 箇所計測し、その平均値を算出した。

光合成測定葉の中間部付近から葉片(2 mm^2)を切り出し、3%グルタルアルデヒド(v/v)を含む 50 mM リン酸緩衝液(pH 6.8)に浸漬後、アスピレーターで 10 分間脱気し固定液を細胞間隙内に浸透させた。その後 1 時間 30 分静置することで前固定を行った。続いて 50 mM リン酸緩衝液(pH 6.8)により洗浄後、2%(v/v)オスミウム酸を含む 50 mM リン酸緩衝液(pH 6.8)で 2 時間の後固定を行った。後固定後、アセトンの希釈系列液による脱水を行い、Quetol 樹脂(日新 EM, 東京)に包埋した。ガラスナイフを装着したウルトラマイクロトームを用いて厚さ約 $1 \mu\text{m}$ の横断準超薄切片を作成し、スライドガラスに貼り付け後、トルイジンブルーO で染色し、光学顕微鏡下で観察した。切片をデジタルカメラで撮影後、画像をコンピュータに取り込み ImageJ (Schneider et al. 2012)を用いて葉厚の測定を行った。葉厚は 1 枚の葉につき 10 箇所測定し、その平均値とした。

統計解析

統計解析ソフトのエクセル統計 2015(社会情報サービス, 東京)を用い, 統計解析を行った. 全てのパラメータに関して分散分析(ANOVA)を行った. 各パラメータの系統毎の平均値を用いてパラメータ間のピアソンの積率相関係数を算出し, パラメータ間の相関関係を分析した.

結果

ガス交換特性

供試したトウモロコシおよびテオシントのガス交換特性には有意な変異が見られた($P < 0.01$; 第 2 表). P_N の最大値は PI 195114 の $46.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 最小値は Ames 21875 の $32.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であり, P_N の系統間の変異は 1.45 倍であった(第 2 図 A; 第 2 表). 供試したテオシントのうち 3 系統(PI 441930, Ames 21875, PI 615697)の P_N は低かったが, トウモロコシの亜種であるテオシント(Ames 8083)の P_N は中間に位置していた(第 2 図 A). P_N と g_s および T_r との間には高い正の相関が見られたが(第 3 図 A, B), P_N と C_i/C_a の間には有意な相関は見られなかった(第 3 図 C).

生理・生化学的特性

今回調査した生理学特性は, $\delta^{13}\text{C}$ 値を除き有意な変異を示した($P < 0.01$; 第 3 表). 特に Chl 含量および LSP ではそれぞれ 2.1 倍, 2.6 倍と変異幅が大きく, それらと P_N との間には高い正の相関が見られた(第 3 図 D, E). P_N と N 含量との間にも正の相関が見られたが(第 3 図 F), SLW および $\delta^{13}\text{C}$ 値との間には有意な相関は見られなかった(第 3 図 G, H). $\delta^{13}\text{C}$ 値は変異幅が 1.1 倍と最も小さく, すべてのパラメータとの間に相関は見られなかった(第 3, 4, 5 表).

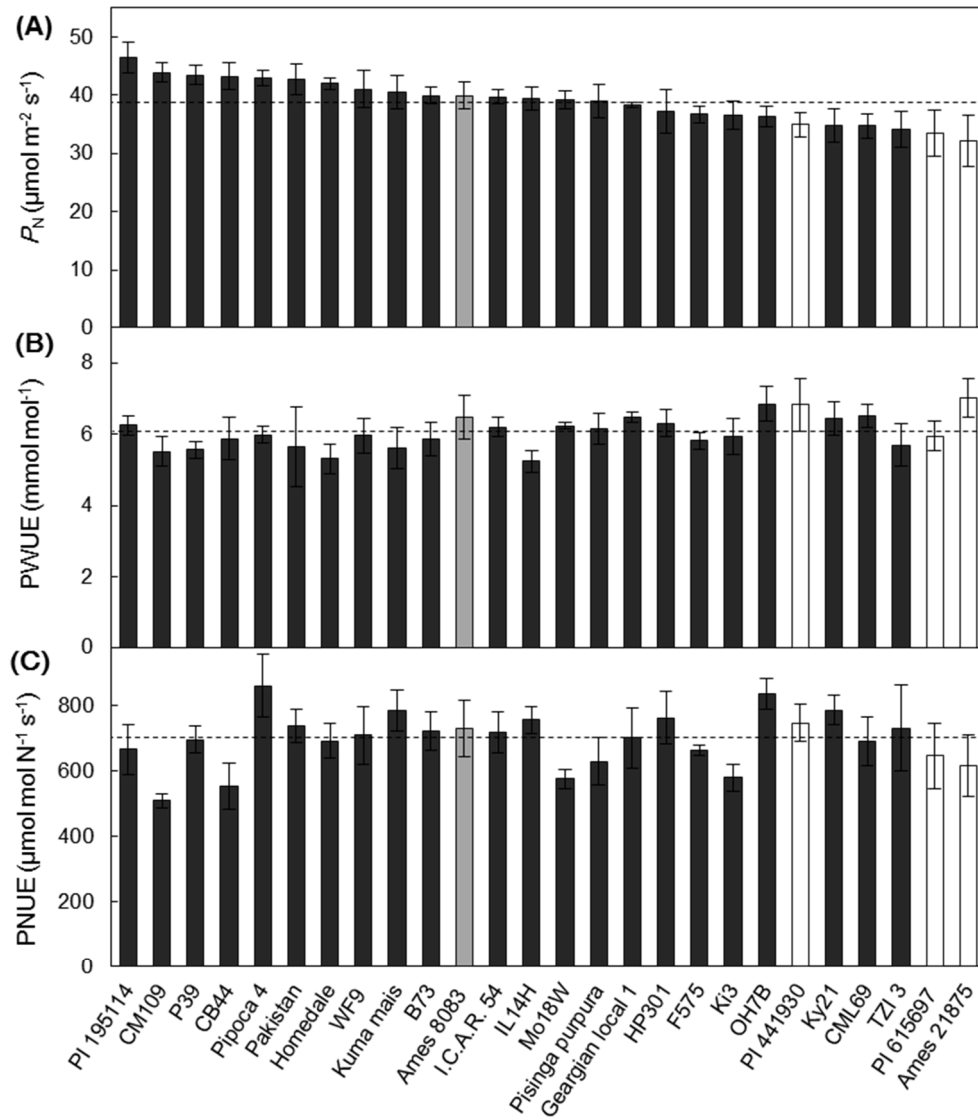
P_N と PEPC 活性との間には有意な相関は見られなかった(第 4 図 A). 一方, P_N と Rubisco および脱炭酸酵素である NADP-ME の活性との間に正の相関が見られた(第 4 図 B, D). もう一つの脱炭酸酵素である PCK の活性には系統間で 9.0 倍の変異が見られ, P_N の上位 2 系統(PI 195114, CM 109)では特に高かった(第 6 表). また 2 種類の脱炭酸酵素活性を合計した値(NADP-ME 活性 + PCK 活性; 脱炭酸能)に占める PCK 活性の割合(PCK 率)には 5.4 倍の変異が見られた(第 6 表). P_N と PCK 活性および脱炭酸能との間には正の相関が見られたが, PCK 率には有意な相関は見られなかった(第 4 表). また, Chl 含量および SLP と PEPC 活性との間には有意な相関

第2表. トウモロコシおよびテオシントにおける光合成速度(P_N), 気孔伝導度(g_s), 蒸散速度(T_r), 細胞間隙 CO_2 濃度と大気 CO_2 濃度の比(C_i/C_a)および光合成水利用効率(PWUE).

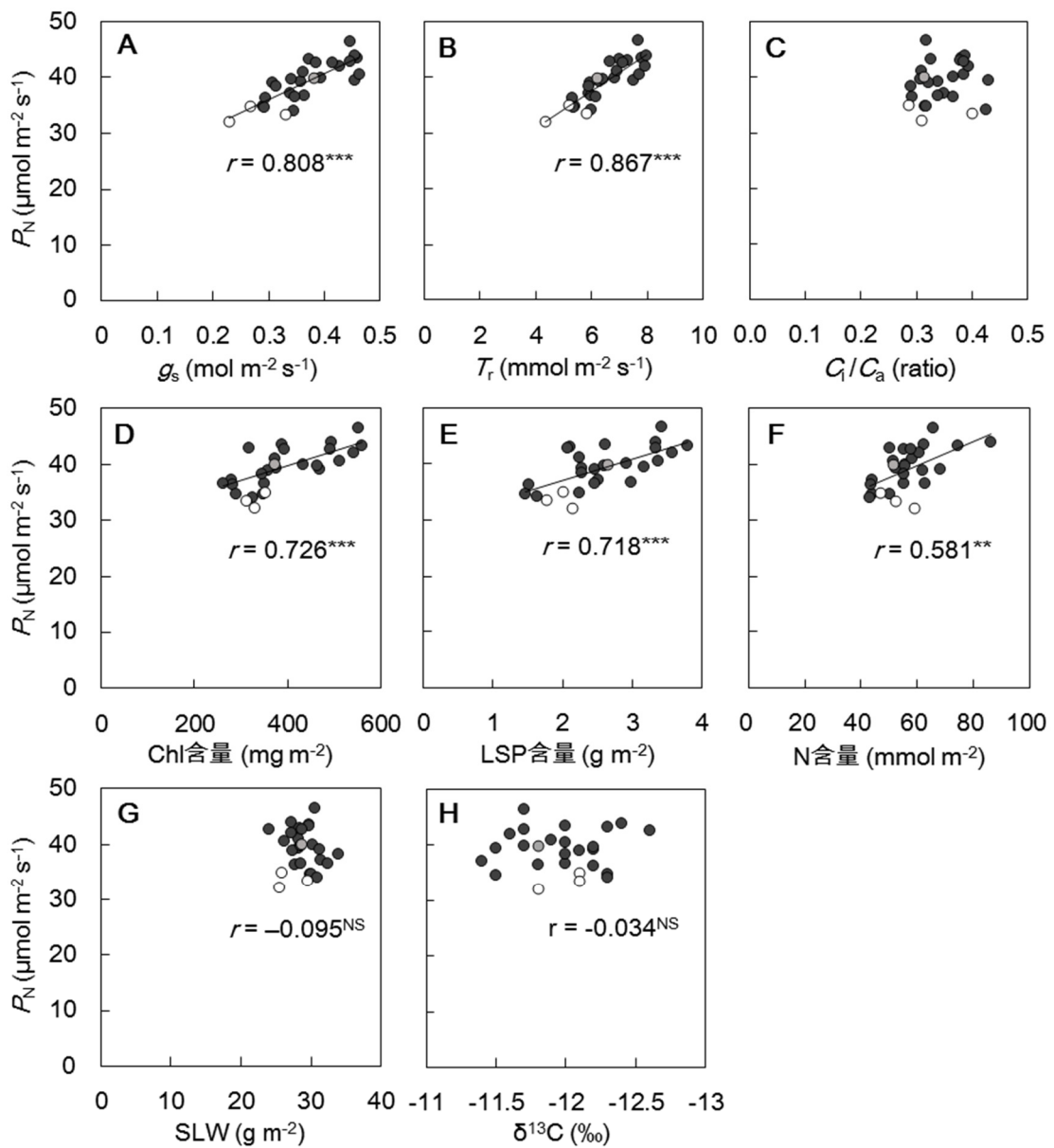
種名	系統	P_N	g_s	T_r	C_i/C_a	PWUE
		($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		(mmol mol^{-1})
<i>Z. mays</i>	B73	39.9	0.393	6.85	0.366	5.86
	HP301	37.2	0.339	5.90	0.349	6.30
	IL14H	39.4	0.456	7.52	0.431	5.25
	Ky21	34.7	0.291	5.39	0.317	6.46
	Mo18W	39.2	0.358	6.28	0.339	6.24
	OH7B	36.3	0.295	5.33	0.292	6.85
	P39	43.5	0.459	7.81	0.381	5.56
	WF9	41.0	0.363	6.91	0.311	5.96
	CM109	43.9	0.454	7.97	0.388	5.52
	CML69	34.7	0.292	5.34	0.317	6.51
	Pipoca 4	42.9	0.447	7.32	0.379	5.98
	Pisinga purpura	39.0	0.307	5.96	0.323	6.15
	CB44	43.2	0.372	7.00	0.327	5.88
	Kuma mais	40.5	0.464	7.72	0.386	5.62
	F575	36.7	0.364	5.98	0.340	5.82
	I.C.A.R. 54	39.7	0.341	6.40	0.307	6.20
	TZI3	34.1	0.345	6.00	0.427	5.70
	PI 195114	46.5	0.446	7.67	0.318	6.25
	Homedale	42.0	0.428	7.94	0.394	5.31
	Geargian local 1	38.3	0.313	5.92	0.290	6.48
Pakistan	42.7	0.414	7.15	0.385	5.65	
Ki3	36.5	0.347	6.18	0.367	5.92	
<i>Z. mays</i> ssp. <i>mexicana</i>	Ames 8083	39.9	0.380	6.21	0.314	6.48
<i>Z. diploperennis</i>	PI 441930	34.9	0.267	5.19	0.286	6.83
<i>Z. perennis</i>	Ames 21875	32.1	0.230	4.35	0.309	7.02
<i>Z. nicaraguensis</i>	PI 615697	33.5	0.330	5.81	0.400	5.95
	平均値	38.9	0.365	6.47	0.348	6.07
	S.D.	3.7	0.066	0.98	0.043	0.47
	最大値	46.5	0.464	7.97	0.431	7.02
	最小値	32.1	0.230	4.35	0.286	5.25
	最大値/最小値	1.45	2.02	1.83	1.51	1.34
	C.V.(%)	9.51	18.02	15.15	12.23	7.67
	F値	7.605 ^{***}	11.908 ^{***}	11.829 ^{***}	2.493 ^{**}	3.375 ^{***}

^{**}, ^{***}はそれぞれ 1%, 0.1%水準で有意差がある.

C.V., 変動係数(= S.D./ 平均値×100).



第 2 図. トウモロコシおよびテオシントにおける光合成速度(P_N ; A), 光合成水利用効率(PWUE; B)および光合成窒素利用効率(PNUE)の比較, 平均値 \pm S.D. ($n=3\sim 5$). 黒色はトウモロコシ, 灰色, 白色の棒はそれぞれテオシントのうちトウモロコシ亜種および別種を示している.



第3図. トウモロコシおよびテオシントにおける光合成速度(P_N)と気孔伝導度(g_s ; A), 蒸散速度(T_r ; B), 細胞間隙 CO_2 濃度と大気 CO_2 濃度の比(C_i/C_a ; C), 比葉重(SLW; D), クロロフィル(Chl)含量(E), 葉内可溶性タンパク質(LSP)含量(F), 葉内窒素(N)含量(G)および炭素同位体比($\delta^{13}\text{C}$; H)との関係. 各プロットは1系統の平均値を示す($n=3\sim5$). 黒色のプロットはトウモロコシ, 灰色, 白色のプロットはそれぞれテオシントのうちトウモロコシ亜種および別種を示している. ***は0.1%水準で有意な相関があることを示し, NSは有意な相関がない(t検定).

第3表. トウモロコシおよびテオシントにおけるクロロフィル(Chl)含量, 可溶性タンパク(LSP)含量, 葉内窒素(N)含量, 比葉重(SLW), 光合成 N 利用効率(PNUE), および炭素同位体比($\delta^{13}\text{C}$).

種名	系統	Chl含量 (mg m^{-2})	LSP 含量 (g m^{-2})	N含量 (mmol m^{-2})	SLW (g m^{-2})	PNUE ($\mu\text{mol mol}^{-1} \text{N s}^{-1}$)	$\delta^{13}\text{C}$ (%)
<i>Z. mays</i>	B73	432	2.92	55.6	30.2	722	-11.7
	HP301	280	2.52	44.0	31.4	764	-11.4
	IL14H	375	3.17	52.2	28.2	757	-11.5
	Ky21	347	2.25	44.2	29.9	787	-12.3
	Mo18W	469	2.27	68.1	31.3	576	-12.2
	OH7B	283	1.52	43.4	27.7	837	-12.2
	P39	388	2.61	62.4	29.7	697	-12
	WF9	373	2.24	58.1	28.2	710	-11.9
	CM109	493	3.33	86.1	27.3	510	-12.4
	CML69	294	1.46	50.5	30.1	691	-11.5
	Pipoca 4	318	2.12	50.2	28.4	862	-11.7
	Pisinga purpura	387	2.47	62.1	27.3	630	-12.1
	CB44	559	3.80	74.7	29.8	553	-12.3
	Kuma mais	511	3.38	51.6	26.2	787	-12
	F575	349	2.99	55.4	28.6	663	-12
	I.C.A.R. 54	464	2.60	55.9	28.6	720	-12.2
	TZ13	326	1.63	43.3	31.0	731	-12.3
	PI 195114	551	3.42	65.8	30.5	668	-11.7
	Homedale	542	3.57	60.8	27.2	693	-11.6
	Georgian local 1	345	2.27	55.2	34.0	703	-12
Pakistan	492	3.34	57.9	24.0	737	-12.6	
Ki3	262	2.46	63.0	32.4	580	-11.8	
<i>Z. mays</i> ssp. <i>mexicana</i>	Ames 8083	372	2.66	51.5	28.8	732	-11.8
<i>Z. diploperennis</i>	PI 441930	352	2.02	47.0	25.9	748	-12.1
<i>Z. perennis</i>	Ames 21875	330	2.15	58.9	25.6	618	-11.8
<i>Z. nicaraguensis</i>	PI 615697	312	1.77	52.4	29.6	647	-12.1
	平均値	393	2.57	56.5	28.9	700	-12.0
	S.D.	88	0.65	9.8	2.3	84.2	0.3
	最大値	559	3.80	86.1	34.0	862	-11.4
	最小値	262	1.46	43.3	24.0	510	-12.6
	最大値/最小値	2.13	2.59	1.99	1.42	1.69	0.90
	C.V.(%)	22.50	25.41	17.28	7.78	12.03	2.55
	F値	17.178 ^{***}	9.906 ^{***}	14.094 ^{***}	5.467 ^{***}	5.810 ^{***}	-

***は0.1%水準で有意差がある.

C.V., 変動係数(= S.D./ 平均値×100).

第4表. トウモロコシおよびテオシントにおける生理的および生化学的パラメータ間の相関係数(r). P_N , 光合成速度; g_s , 気孔伝導度; T_r , 蒸散速度; C_i/C_a , 細胞間隙 CO_2 濃度と大気 CO_2 濃度比; $PWUE$, 光合成水利用効率; LSP , 可溶性タンパク; Chl , クロロフィル; SLW , 比葉重; $PNUE$, 光合成窒素利用効率.

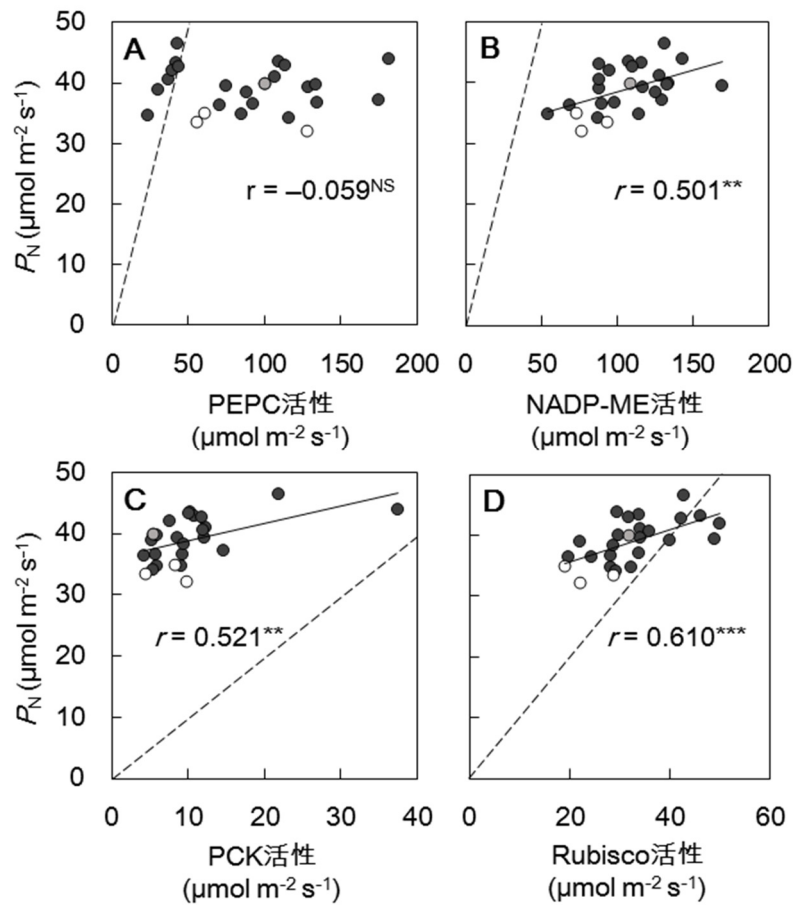
	P_N	g_s	T_r	C_i/C_a	$PWUE$	LSP 含量	SLW	Chl 含量	N 含量	$PNUE$	$\delta^{13}C$	Rubisco 活性	PEPC 活性	NADP-ME 活性	PCK 活性	脱炭酸能	PCK率
P_N	1																
g_s	0.813 ***	1															
T_r	0.878 ***	0.961 ***	1														
C_i/C_a	0.169 NS	0.632 ***	0.557 **	1													
$PWUE$	-0.510 **	-0.805 ***	-0.819 ***	-0.835 ***	1												
LSP 含量	0.718 ***	0.671 ***	0.724 ***	0.276 NS	-0.592 **	1											
SLW	-0.095 NS	-0.092 NS	-0.102 NS	-0.076 NS	0.069 NS	-0.233	1										
Chl 含量	0.726 ***	0.558 **	0.671 ***	0.129 NS	-0.433 *	0.809 ***	-0.279 NS	1									
N 含量	0.581 **	0.372 NS	0.487 *	0.080 NS	-0.342 NS	0.576 **	-0.030 NS	0.614 ***	1								
$PNUE$	-0.098 NS	0.040 NS	-0.056 NS	-0.010 NS	0.135 NS	-0.287 NS	-0.161 NS	-0.311 NS	-0.832 ***	1							
$\delta^{13}C$	-0.034 NS	0.095 NS	0.037 NS	0.045 NS	0.022 NS	-0.026 NS	0.252 NS	-0.268 NS	-0.247 NS	0.214 NS	1						
Rubisco活性	0.610 ***	0.652 ***	0.692 ***	0.419 *	-0.615 ***	0.668 ***	-0.003 NS	0.667 ***	0.301 NS	-0.070 NS	0.176 NS	1					
PEPC活性	-0.059 NS	0.013 NS	-0.055 NS	0.051 NS	0.018 NS	-0.099 NS	0.205 NS	-0.234 NS	0.114 NS	-0.129 NS	-0.008 NS	-0.211 NS	1				
NADP-ME活性	0.501 **	0.492 *	0.519 **	0.223 NS	-0.440 *	0.541 **	0.212 NS	0.389 *	0.344 NS	-0.141 NS	0.039 NS	0.519 **	0.368 NS	1			
PCK活性	0.521 **	0.439 *	0.469 *	0.117 NS	-0.225 NS	0.438 *	-0.104 NS	0.423 *	0.633 ***	-0.382 NS	-0.149 NS	0.188 NS	0.396 *	0.437 *	1		
脱炭酸能	0.457 *	0.491 *	0.509 **	0.267 NS	-0.438 *	0.467 *	0.150 NS	0.326 NS	0.385 NS	-0.182 NS	0.012 NS	0.414 *	0.486 *	0.958 ***	0.597 **	1	
PCK率	0.387 NS	0.186 NS	0.225 NS	-0.107 NS	0.001 NS	0.344 NS	-0.088 NS	0.319 NS	0.560 **	-0.400 *	-0.100 NS	0.119 NS	0.313 NS	0.175 NS	0.860 ***	0.288 NS	1

*, **, ***はそれぞれ5%, 1%, 0.1%水準で有意差な相関があり, NSは有意な相関がないことを示す.
脱炭酸能, NADP-ME 活性+PCK 活性; PCK 率, PCK 活性/(NADP-ME 活性+PCK 活性).

第5表. トウモロコシおよびテオシントにおける生理的特性および葉の形態的特性のパラメータ間の相関係数(r). P_N , 光合成速度; g_s , 気孔伝導度; T_r , 蒸散速度; C_i/C_a , 細胞間隙 CO_2 濃度と大気 CO_2 濃度比; $PWUE$, 光合成水利用効率; LSP , 可溶性タンパク; Chl , クロロフィル; SLW , 比葉重; $PNUe$, 光合成窒素利用効率; IVD , 維管束間距離; SD , 気孔密度; GL , 孔辺細胞長; $SD \times GL$, 総孔辺細胞長.

	P_N	g_s	T_r	C_i/C_a	$PWUE$	LSP 含量	Chl 含量	N 含量	SLW	$PNUe$	$\delta^{13}C$
葉厚	0.272 NS	0.172 NS	0.147 NS	-0.045 NS	-0.046 NS	0.213 NS	0.153 NS	0.264 NS	-0.024 NS	-0.202 NS	-0.035 NS
IVD	0.133 NS	-0.012 NS	-0.031 NS	-0.230 NS	0.246 NS	-0.007 NS	-0.116 NS	0.047 NS	0.250 NS	-0.025 NS	0.227 NS
SD	-0.017 NS	0.102 NS	0.143 NS	0.171 NS	-0.412 *	0.135 NS	-0.103 NS	0.004 NS	0.138 NS	-0.060 NS	-0.035 NS
GL	0.030 NS	-0.109 NS	-0.153 NS	-0.132 NS	0.307 NS	-0.043 NS	0.114 NS	0.036 NS	-0.350 NS	0.017 NS	0.068 NS
$SD \times GL$	0.002 NS	0.101 NS	0.137 NS	0.181 NS	-0.415 *	0.165 NS	-0.058 NS	0.011 NS	0.019 NS	-0.053 NS	-0.022 NS

*, **, ***はそれぞれ 5%, 1%, 0.1%水準で有意差な相関があり, NSは有意な相関がないことを示す.
C.V., 変動係数(= S. D./ Avg. $\times 100$).



第4図. トウモロコシおよびテオシントにおける光合成速度(P_N)とPEPC活性(A), NADP-ME活性(B), PCK活性(C)およびRubisco活性(D)との関係. 各プロットは1品種の平均値を示す($n=3\sim5$). 黒色のプロットはトウモロコシ, 灰色, 白色のプロットはそれぞれテオシントのうちトウモロコシ亜種および別種を示している. **,***はそれぞれ1%, 0.1%水準で有意な相関があることを示し, NSは有意な相関がない(t検定).

第6表. トウモロコシおよびテオシントにおける Rubisco 活性, PEPC 活性, NADP-ME 活性, PCK 活性, 脱炭酸能および PCK 率.

種名	系統	Rubisco	PEPC	NADP-ME	PCK	脱炭酸能	PCK率
		活性 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	活性 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	活性 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	活性 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		
<i>Z. mays</i>	B73	29.9	100	134	5.4	139	3.9
	HP301	34.0	175	129	14.7	146	13.2
	IL14H	48.8	75	169	8.7	182	5.0
	Ky21	28.2	85	114	9.1	123	7.6
	Mo18W	40.1	128	117	12.1	130	9.8
	OH7B	19.8	71	69	4.2	75	5.8
	P39	33.7	109	108	10.2	115	6.7
	WF 9	34.1	107	128	12.3	143	8.8
	CM 109	29.5	182	143	37.4	189	19.8
	CML69	32.3	24	54	5.9	62	8.9
	PIPOCA 4	31.9	114	88	10.7	97	10.6
	PISINGA PURPURA	22.2	30	88	5.3	93	6.4
	CB 44	46.1	42	116	10.1	103	13.1
	KUMA MAIS	35.8	37	88	11.9	97	7.4
	F575	28.2	135	98	9.3	109	10.6
	I.C.A.R 54	34.2	134	133	5.9	141	5.4
	TZI 3	29.3	116	88	5.3	95	5.3
	PI 195114	42.8	43	131	21.9	139	14.8
	HOMEDALE	49.9	39	95	7.6	102	6.4
	GEARGIAN LOCAL	28.8	88	125	9.5	135	6.6
PAKISTAN	42.2	44	110	11.8	120	8.9	
KI3	24.3	92	90	5.7	97	6.6	
<i>Z. mays</i> ssp. <i>mexicana</i>	Ames 8083	31.9	100	108	5.4	113	3.8
<i>Z. diploperennis</i>	PI 441930	19.0	60	73	8.3	79	10.0
<i>Z. perennis</i>	Ames 21875	22.1	128	76	9.8	85	9.7
<i>Z. nicaraguensis</i>	PI 615697	28.7	56	93	4.5	106	3.6
	平均値	32.6	89.0	106.4	10.1	116.0	8.4
	S.D.	8.4	43.5	26	6.8	30.4	3.7
	最大値	49.9	181.6	169.2	37.4	188.9	19.8
	最小値	19.0	23.8	54	4.2	62.4	3.6
	最大値/最小値	2.62	7.64	3.11	8.97	3.03	5.42
	C.V.(%)	25.7	48.8	24.6	67.0	26.2	44.6
	F値	23.737***	44.181***	12.445***	16.237***	15.495***	11.367***

***は 0.1%水準で有意差がある.

C.V., 変動係数(= S.D./ 平均値×100); 脱炭酸能, NADP-ME 活性+PCK 活性;
PCK 率, PCK 活性/(NADP-ME 活性+PCK 活性).

は見られなかったが、他の3つの酵素活性との間には正の相関が見られた(第4表).

葉の形態的特性

葉厚および IVD は品種・種間差はそれぞれ 1.5 倍および 1.4 倍であった(第7表). 気孔特性について, SD および SD×GL はそれぞれ 2.4 倍および 2.3 倍の変異が見られた(第7表). なお, 向軸側と背軸側表皮の SD 比は平均 0.71, GL 比は平均 1.04 であった(データは未記載). P_N と葉厚, IVD および気孔の量的特性との間には相関は見られなかった(第5表).

A-C_i 曲線

P_N が上位, 中位, 下位にあるものから 3 系統を選び, A-C_i 曲線を作成した(第5図). P_N は大気 CO₂ 濃度下における C_i でいずれの種においてもほぼ最大値を示した. 3 系統において大気 CO₂ 濃度以上では g_s が低下し(データは未記載), PISINGA PURPURA および PI 615697 では P_N は低下した(第5図).

PNUE および PWUE

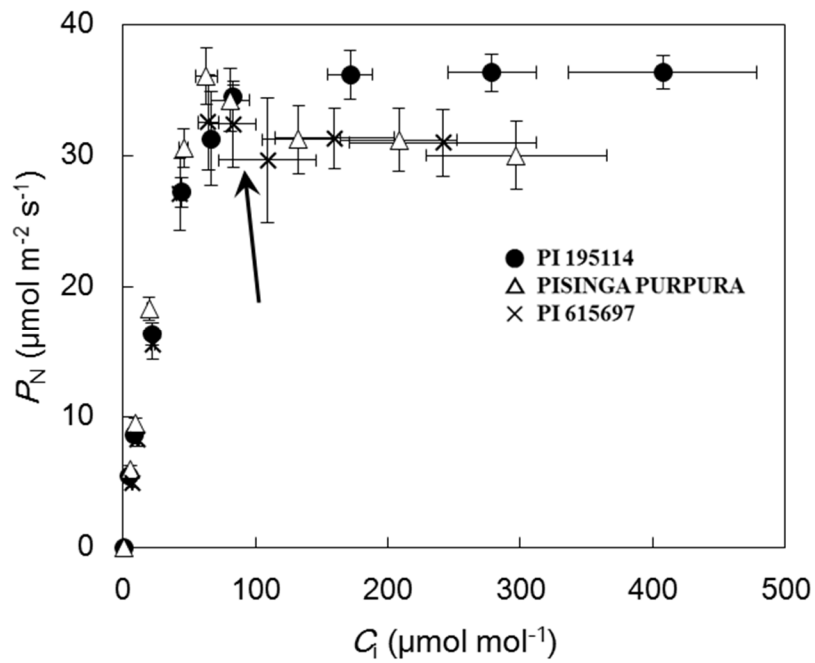
PNUE の系統間の変異は 1.7 倍であり, 最大値が PIPOCA 4 の $862 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{N s}^{-1}$, 最小値が CM 109 の $510 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{N s}^{-1}$, 平均は $700 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{N s}^{-1}$ であった(第2図 C; 第2表). 光合成における瞬間的な水利用効率を示す PWUE の系統間の変異は 1.3 倍であり, PNUE よりも変異幅は小さかった(第2図 B; 第2表). 最大値は *Z. perennis* (Ames 21875) の $7.02 \mu\text{mol mmol}^{-1}$, 最小値は IL14H の $5.25 \mu\text{mol mmol}^{-1}$, 平均は $6.07 \mu\text{mol mmol}^{-1}$ であった(第2表). テオシントの4種については, PNUE は上位にあるもの(PI 441903, Ames 8083)と下位にあるもの(PI 615697, Ames 21875)に分かれたが, PWUE は PI 615697 を除いた3種はいずれも上位に位置していた(第2図 B, C; 第2, 3表). PNUE は P_N を N 含量で除した値であるが, N 含量と高い相関が見られた一方, P_N との間には相関は見られなかった(第4表). PWUE と $\delta^{13}\text{C}$ 値

第7表. トウモロコシおよびテオシントにおける葉厚, 維管束間距離(IVD), 気孔密度(SD), 孔辺細胞長(GL)および総孔辺細胞長(SD×GL).

系統	葉厚 (μm)	IVD (μm)	SD (no mm^{-2})	GL (μm)	SD×GL ($\mu\text{m mm}^{-2}$)
B73	168	118	152	46.1	7036
HP301	177	139	144	43.2	6193
IL14H	163	119	142	48.5	6869
Ky21	154	119	137	46.6	6404
Mo18W	214	132	83	49.3	4106
OH7B	186	138	115	50.7	5831
P39	197	131	150	46.5	6906
WF9	169	131	173	44.4	7697
CM109	156	111	159	44.2	7006
CML69	152	122	118	50.6	5947
Pipoca 4	166	128	100	53.3	5352
Pisinga purpura	196	124	129	49.7	6360
CB44	162	129	135	48.6	6514
Kuma mais	179	132	111	45.0	5007
F575	180	114	203	46.2	9283
I.C.A.R. 54	180	129	120	50.1	5983
TZI3	140	112	161	45.7	7321
PI 195114	185	141	102	54.7	5553
Homedale	181	118	142	50.0	7114
Geargian local 1	166	125	147	45.1	6583
Pakistan	202	127	114	53.1	6049
Ki3	208	155	125	45.8	5641
Ames 8083	191	130	107	51.6	5489
PI 441930	149	112	133	45.4	5989
Ames 21875	176	134	92	58.1	5305
PI 615697	171	121	122	50.9	6200
平均値	176	127	131	48.6	6298
S.D.	19	10	27	3.7	1002
最大値	214	155	203	58.1	9283
最小値	140	111	83	43.2	4106
最大値/最小値	1.52	1.40	2.43	1.35	2.26
C.V.(%)	10.6	8.2	20.3	7.6	15.9
F値	7.862 ^{***}	5.775 ^{***}	9,334 ^{***}	7.373 ^{***}	10.085 ^{***}

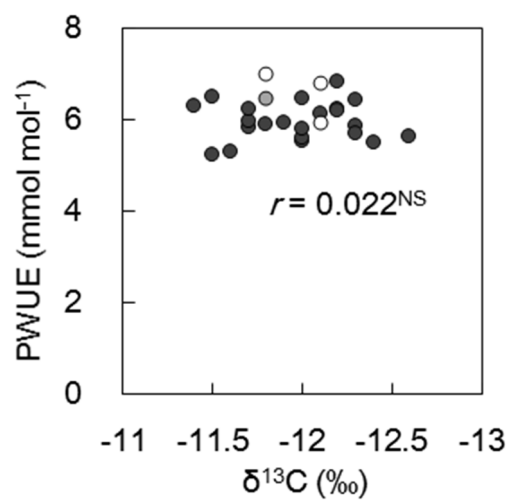
***は0.1%水準で有意差がある.

C.V., 変動係数(= S.D./ 平均値×100).



第5図. トウモロコシおよびテオシントにおける光合成速度(P_N)の細胞間隙 CO_2 濃度(C_i)応答曲線. 平均値 \pm S.E.($n=3$). 矢印付近のプロットは大気 CO_2 条件($380 \mu\text{mol mol}^{-1}$)における P_N と C_i の関係を示す.

の間には相関は見られなかった(第6図; 第4表). SD および SD×GLの間には低い負の相関が見られた(第5表).



第 6 図. トウモロコシおよびテオシントにおける光合成水利用効率(PWUE)と炭素同位体比($\delta^{13}\text{C}$)との関係. 各プロットは 1 品種の平均値を示す($n=3\sim 5$). 黒色のプロットはトウモロコシ, 灰色, 白色のプロットはそれぞれテオシントのうちトウモロコシ亜種および別種を示している. NS は有意な相関がない(t 検定).

考 察

光合成に関わる生理学的特性

過去の研究では、トウモロコシの光合成速度の品種間差は2倍以上あるとの報告も見られるが(Heichel and Musgrave, 1969; Crosbie et al., 1977), 本研究ではそれらとは異なる低い変異幅(1.45 倍)を示した(第 2 表). また本実験の供試品種として, Heichel and Musgrave (1969)において P_N に 2 倍以上の差が認められている CM 109 と WF 9 を実験したが, いずれの品種も P_N は $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上と高く, 大きな差は見られなかった(第 2 図 A; 第 2 表). 本研究では光合成を活発に行っている栄養成長期の若い上位完全展開葉を用いた. 一方, Heichel and Musgrave (1969)は雌穂が着節位置である上位から 5, 6 番目の葉を用いた. しかし, その手法によると, 系統ごとに早晚性をはじめとした様々な形質が異なることから, 個葉の老化の程度も異なってくることが予想され, それが光合成能の系統間差に反映された可能性がある. Duncan and Hesketh (1968)は, 本研究と同様に栄養成長期におけるトウモロコシの上位完全展開葉について P_N を測定しており, その品種間の変異は本研究の結果と類似している. よって本研究で得られた結果は, トウモロコシとテオシントの生理的に活発な葉における P_N の変異の実態を表しているといえよう.

P_N と g_s の間に高い正の相関関係があることは様々な植物において確認されているが(Wong et al., 1985; Fischer et al., 1998; Kanemura et al., 2007; Fernandez et al., 2015; Tsutsumi et al., 2017), 本研究でもその関係が見出された(第 3 図 A; 第 4 表). トウモロコシは CCM を有することから, 気孔における物理的 CO_2 拡散過程が主体的に P_N を制御しているとは考えにくい. また大気 CO_2 濃度以上の CO_2 濃度においても P_N が上昇し続ける C_3 植物とは異なり, C_4 植物の A- C_i 曲線は大気 CO_2 濃度でほとんど飽和することが知られており(Pearcy and Ehleringer, 1984; Wong et al., 1985), 本実験においても A- C_i 曲線は大気条件とほぼ同じ CO_2 濃度下で飽和していた(第 4 図). この結果は, C_4 植物では g_s が P_N を制限するわけではないことを裏付けるも

のである(Farquhar and Sharkey, 1982). 本研究でも見出されたように, C_4 植物における P_N と g_s の密接な関係(第3図 A)を説明する要因に関しては未だ明らかではないが, 葉内部の CO_2 濃度が葉肉の光合成と気孔開度を協調的に調節しているという仮説(Lawson et al., 2014)により, この関係を説明することができるかもしれない. しかし, この関係性を実証するためには今後さらなる研究が必要であろう.

P_N と葉内 N 含量, Chl 含量および LSP 含量との間には正の相関が見られた(第3図 D-F; 第4表). P_N と葉内 N 含量との相関についてはトウモロコシを含む様々な植物種で報告されている(Wong et al., 1985; Sage and Percy, 1987; Macclough et al., 1993; Makino et al., 2003; Tsutsumi et al., 2017). N はタンパク質の原料として重要であり, 本実験の結果はトウモロコシおよびテオシントの P_N の変異に光化学系のタンパク質や酵素タンパク質の量が深く関わっていることを示している. 一方, P_N と SLW との間には有意な相関は見られなかった(第3図 G; 第4表). SLW は, 葉の充実度や厚さの指標として用いられる. マメ科およびアブラナ科植物, またアマランス属において P_N と SLW との間には正の相関が見られ(Pearce et al., 1969; Dornhoff and Shibles, 1970; Hobbs, 1988; Islam et al., 1994; Suresh et al., 1997; Tsutsumi et al., 2017), P_N の高い個体を選抜する際の指標となり得るとの報告もある(Dornhoff and Shibles, 1970). しかし, 本研究ではこのような関係は見られなかった. また, サトウキビやイネ属でも見られていないことから(Kiran et al., 2013; Nose et al., 1994), P_N と SLW との関係は植物種によって異なる可能性が考えられた.

光合成に関わる生化学的特性

P_N と PEPC 活性には相関は見られなかったが, P_N と NADP-ME, PCK および Rubisco の活性との間に正の相関が見られた(第4図 B-D; 第4表). Nose et al. (1994) は, 野生種を含むサトウキビ属において P_N と Rubisco 含量および NADP-ME 活性との間に正の相関があることを示しており, 本研究の結果と一致した. C_4 植物では C_3 植物同様, Rubisco 活性と P_N との間に高い正の相関があることが明らかとなっ

ている(Ghannoum et al. 2011; Tsutsumi et al. 2017). 本実験では, いくつかの系統において Rubisco 活性は P_N に比べて低かった(第 4 図 D; 第 4 表). 理論的には, C_4 植物において P_N と Rubisco 活性はおおよそ 1 対 1 の関係か, あるいは Rubisco 活性が P_N よりも高いことが必要である(Ghannoum et al., 2011). すなわち, 本研究のデータはある P_N 値を達成するために必要な Rubisco 活性が得られていないことを意味している. Baer and Schrader (1985)はトウモロコシの Rubisco の全活性が初期活性よりも低いことを示した. その中でフェノール等の影響による不活性化が全活性に関与した可能性を指摘しており, 本実験でもそのような不活性化が起こった可能性は否定できないだろう. NADP-ME 型 C_4 植物において P_N と NADP-ME の間に正の相関があることについては, イネ科植物において報告されている(Nose et al., 1994; Usuda, 1984). 一方, NADP-ME 遺伝子を導入したキク科 C_4 植物 *Flaveria bidentis* の形質転換体を用いた研究では, 野生型植物では NADP-ME を過剰に有しており, 一定量減少させても P_N に影響しなかった(Pengelly et al. 2012). NADP-ME 型 C_4 植物における, P_N と NADP-ME 活性の関係を調査した研究は未だ不足しているが, 本研究の結果および *Flaveria* の研究結果からすると, NADP-ME 活性が P_N に与える影響は植物種によって異なる可能性が考えられる.

トウモロコシを含む一部の NADP-ME 型イネ科 C_4 植物では, NADP-ME のほかに PCK も C_4 化合物の脱炭酸酵素として働いていることが明らかになっている(Walker et al. 1997; Wingler et al. 1999). これまでに NADP-ME 型 C_4 植物における PCK の品種・種間差を調査した研究は見られず, 本研究はそれに言及した初の報告である. 本研究では, PCK 活性には大きな品種・種間差が見られた. 代謝産物のメタボローム解析により, トウモロコシの維管束鞘(BS)における C_4 化合物の 10~14% は PCK の働きによって脱炭酸されていると見積もられているが(Arrivault et al., 2017), その寄与率は本実験における NADP-ME 活性と PCK 活性から推定された値とおおよそ一致していた(第 6 表). 本実験では, 特に PI 195114 および CM 109 の 2 系統は高い PCK 活性を示すと同時に P_N も上位に位置したことから(第 2 図 A; 第

2, 6 表), その関連性が示唆される.

葉の形態的特性

本実験においては, P_N と葉厚および IVD との間に相関は見られなかった(第 5 表). C_4 光合成は MC と BSC の共働により成り立っていることから, 一つの細胞内で光合成が完結する C_3 植物に比べ葉の内部構造の変異は制限される(Ghannoum et al., 2011; Tsutsumi et al., 2017). 葉の充実度を示す SLW が他の形質に比較して変異が少なかったことから, 葉の内部構造特性の変異は P_N に影響するほど大きくはないことが考えられた.

本実験では SD と GL の間に負の相関があり, これは他の植物における報告とも一致している(Büßsis et al., 2006; Lawson and Blatt, 2014; Tsutsumi et al., 2017). 系統間の SD の変異は GL の変異よりも大きく(第 5 表), SD は GL よりも物理的および遺伝的にその変異を制限されていないことが示唆された.

気孔の量的特性と P_N , g_s および T_r との間には相関は見られなかった(第 5 表). 過去にもイネやアマランサスの系統間では気孔の量的特性と P_N および g_s の間に明確な関連性が認められておらず(川満ら, 1989; Tsutsumi et al., 2017), 本研究の結果と一致している. このことを理解する上で, SD や GL といった気孔の量的特性は理論上の気孔コンダクタンスの最大値を決定する要因ではあるが, 実際の植物においては必ずしも常に最大値が発揮されているわけではないことに留意する必要がある. しかし, 過去にはいくつかの C_3 および C_4 植物において SD とガス交換特性との間に相関関係が見出されている(川満ら, 1994; Tanaka et al., 2008; 吉田ら, 1976). Kawamitsu et al.(2002)は, 異なる植物種間において SD と g_s および T_r との間に有意な正の相関があることを認めているが, この関係は VPD によって影響を受けることを示している. VPD が低い場合は, 葉は乾燥ストレスを受けず, 多くの気孔が開いた状態になり, 気孔の開口ポテンシャルはガス交換に反映されるだろう. 逆に VPD が高い場合は, 葉が乾燥ストレスを受け気孔の開口度は低くなると予想され,

気孔とガス交換との間の関連性が見えづらくなると推論できる。今後、VPD を変化させた場合の気孔の量的形質とガス交換特性の関係について検討する必要があるろう。

資源利用効率の遺伝的変異

PNUE はトウモロコシおよびテオシントの系統間で約 1.7 倍の変異が見られ、平均値は約 $700 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{N s}^{-1}$ であった(第 3 表)。この値は過去に報告された C_3 植物ばかりでなく C_4 植物の値よりも高く (Pooter and Evans, 1998; Vogan and Sage, 2014; Ghannoum et al., 2011; Tsutsumi et al., 2017), トウモロコシの PNUE はイネ科 NADP-ME 型 C_4 植物の中でも最も高い値に位置づけられた。また、トウモロコシの PNUE の系統間の変異に P_N よりも葉内 N 含量が関わっていると考えられ(第 3 図; 第 4 表), 葉内 N 含量が低い系統ほど高い PNUE を示した。このような関係にどのような生理的メカニズムが関与しているのか, 興味深い問題として残る。栽培作物の野生種はしばしば人為的な栽培環境に比べ過酷な環境に生育しており, 作物が栽培化される間に失った有用形質を保有している場合がある(Scafaro et al., 2010; Hamaoka et al., 2013)。そのことから本研究に用いたテオシントでも高い PNUE を有している可能性が期待されたが, そのような傾向は見られなかった(第 2 図 C)。

光合成における瞬間的な水利用効率を示す PWUE に関しては, 系統間の変異は約 1.3 倍と大きくなかった(第 2 表)。またトウモロコシおよびテオシントの全系統の平均値は $6.07 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であり, この値は過去に報告された C_4 植物の値と比べて低く位置づけられた(Osmond et al., 1982; Togawa and Ueno, 2015; Tsutsumi et al. 2017)。

C_3 植物では, $\delta^{13}\text{C}$ 値と PWUE との間に正の相関があることが知られており, $\delta^{13}\text{C}$ 値は PWUE の高い品種の選抜に利用されている(Farquhar and Richards, 1984; Hall et al. 1994)。しかし本研究でトウモロコシおよびテオシントの $\delta^{13}\text{C}$ 値の系統間の変異は 1.1 倍と全てのパラメータの中でも低く(第 3 表), また $\delta^{13}\text{C}$ 値と PWUE との間

には相関は見られなかった(第6図; 第4表). O'Leary(1988)はトウモロコシ120品種について $\delta^{13}\text{C}$ 値を測定し, 品種間で有意な変異はないことを報告した. また, Henderson et al.(1998)は温室内および圃場で育成したソルガム30品種について $\delta^{13}\text{C}$ 値を測定したが, その変異幅は C_3 植物より小さく, また C_3 植物に見られるほど PWUE を反映しないことを明らかにした. 植物体乾物中の $\delta^{13}\text{C}$ 値は, 光合成を行う際の炭素同位体分別の結果を反映している. C_3 植物では炭素同位体分別と C_i/C_a 比の相関性が高いことから, $\delta^{13}\text{C}$ 値は C_i/C_a と密接な関係がある PWUE の指標とすることができる. 一方, C_4 植物では C_i/C_a 自体の変異が小さく, また炭素同位体分別は C_i/C_a よりも維管束鞘細胞における CO_2 漏出との関係が深いため, $\delta^{13}\text{C}$ 値は PWUE の指標とはなりにくいことが指摘されている(Henderson et al. 1998; Ghannoum et al. 2011). 本研究からも, C_4 作物の品種において $\delta^{13}\text{C}$ 値を PWUE の指標として用いることは困難だと考えられた.

本研究ではSDおよびSD×GLとPWUEの間に低い負の相関が見られた(第5表). 気孔頻度の減少は, 蒸散による水の損失を減少させると考えられる. Tanaka et al.(2010)はダイズの潜在的な気孔コンダクタンスの最大値と気孔密度との間に関係性を見出し, 気孔密度などの形態的特性の操作による水利用性の改良の可能性を示唆している. トウモロコシにおいても気孔密度をターゲットとしたPWUE改善の可能性が考えられる. *Z. nicaraguensis*(PI 615697)を除くテオシント3系統では他のトウモロコシ系統と比較してPWUEが高い傾向にあった(第2図B; 第2表). *Z. nicaraguensis* の生育地は河口や川などに近い湿潤環境であることが知られており(Bird, 2000; Iltis and Benz, 2000), PWUEが低かったのはそのような生育地の環境を反映しているのかもしれない.

摘 要

トウモロコシ 22 系統およびテオシント 4 種 4 系統を含む 26 系統について、光合成能力および資源利用効率の変異およびその制御要因を明らかにすることを試みた。

1. トウモロコシおよびテオシントの 26 系統における P_N の最大値は PI 195114 の $46.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、最小値は Ames 21875 (*Z. perennis*) の $32.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であり、系統間の P_N の変異は 1.45 倍であった。
2. P_N とその他のガス交換特性との間の相関関係を調べたところ、 P_N と g_s および T_r との間に正の相関が見られた。しかし、A- C_i 曲線による解析から、気孔における CO_2 拡散過程は P_N の制御要因ではないと考えられ、 P_N と g_s の間に見られる関係性には葉肉レベルの光合成など、他の機構が関わっている可能性が考えられた。
3. その他の生理的特性のうち、葉内の Chl, N および LSP 含量と P_N との間には正の相関が見られ、 P_N の高低に光化学系や光合成関連酵素タンパク質の量が関わっていると考えられた。 P_N と SLW および $\delta^{13}\text{C}$ 値との間に相関は見られなかった。
4. P_N と光合成関連酵素である NADP-ME, PCK および Rubisco の活性との間に正の相関が見られたことから、 C_4 回路における脱炭酸以降の過程が P_N の制御因として重要であると考えられた。 P_N と PEPC の間には相関は見られず、MC における CO_2 の初期固定は P_N の制御要因ではないと考えられた。

5. 本研究によりイネ科 NADP-ME 型 C₄ 作物における PCK 活性の系統間差が初めて明らかとなり，トウモロコシおよびテオシントの系統間で PCK 活性に 9.0 倍という大きな変異が見出された。
6. P_N と葉厚，IVD および気孔特性との間に相関関係は見られなかったことから，トウモロコシおよびテオシントにおいて，このような葉の形態的特性は P_N の制御要因ではないと考えられた。
7. ガス交換特性と気孔の量的特性との間に相関関係が認められなかったことから，ガス交換特性には気孔の量的特性よりも，環境要因によって左右される気孔の実際の開度がより影響していると考えられた。
8. PNUE の変異は約 1.7 倍であった。全系統の平均値は約 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ であり，この値は他のイネ科 NADP-ME 型 C₄ 植物で報告された値と比較すると高かった。また，PNUE の変異には P_N よりも葉内 N 含量の影響が大きいと考えられた。
9. PWUE の変異は約 1.3 倍であった。全系統の平均値は 6.07 $\mu\text{mol mmol}^{-1}$ であり，この値は他のイネ科 NADP-ME 型 C₄ 植物で報告された値と比べて低かった。また，PWUE と $\delta^{13}\text{C}$ 値との間に有意な相関はなく，トウモロコシおよびテオシントにおいては $\delta^{13}\text{C}$ 値は PWUE を推定する指標とはなり得ないことが明らかとなった。
10. PWUE と SD および SD \times GL との間には低いながらも負の相関が見られ，気孔特性を改変することによりトウモロコシの PWUE を改善できる可能性が示さ

れた。

第3章 トウモロコシ個葉における光合成特性の弱光順応

はじめに

光合成による作物の収量性の向上は、実際の圃場における作物個体群の光合成を高めることで達成される(Evans, 2013)。そのため、個体群を想定した光合成特性に関する知見を得ることが重要である。個体群においては、上層部は高い光条件のもとで光合成を行うことができるが、下層部には葉の相互遮蔽の結果、弱光環境が生じ、光が制限されている(Long et al., 2006)。Long et al. (1993)は、個体群における炭素同化量の約 50%が光の制限された環境下で行われた光合成に由来すると報告している。個体群下層部の葉は、もともとは生育の初期に強光下で形成されたものであるが、個体群の成長とともに上部に新葉が形成され、弱光環境に置かれるようになる。そのため、一度強光下に順応していた葉は弱光環境に再順応していかなければ非効率であると考えられる。特に、C₄ 光合成は弱光環境に対して不利と考えられていることから(Sage, 2006)、弱光順応性が個体群全体の光合成や生産性に与える影響は大きいと考えられるが、C₄ 植物における葉の展開後の弱光順応に関する知見は充分とはいえない。

これまで、弱光下における C₃ 植物個葉の光合成に関わる生理・生化学的特性については数多くの研究が報告されている(Björkman, 1981; Givnish, 1988)。その中には、弱光条件下で形成された葉の葉緑体特性についての研究も多い(Björkman et al, 1972; Louwarse and Zweerde, 1977; Meier and Lichtenthaler, 1981; Pearcy and Franceschi, 1986)。しかし、一度展開して完成された葉の弱光への再順応について、葉緑体等の微細構造にまで注目して解析した研究はほとんど見られない。前述したように、作物個体群レベルの光合成を理解する上では、展開後の葉における弱光への再順応機構について考慮することが重要であると考えられる。また、C₄ 植物においては C₄ 回路で大気 CO₂ を固定する MC と、C₃ 回路で炭酸同化を行う BSC とでは葉緑体の

特性が異なる。特に、NADP-ME 型の C₄ 植物では MC と BSC の葉緑体の構造は大きく異なり (Edwards and Voznesenskaya, 2011), 葉の分化段階において、何らかの制御機構の働きにより異なる構造的・機能的特性を持つ葉緑体が形成されると考えられる。C₄ 植物において、一度完成した葉が新しい光環境に順応する間に、MC および BSC の葉緑体はその構造を再構築するのか否かはほとんど知られていない。また、弱光に対する C₄ 植物葉の細胞の葉緑体やミトコンドリアの構造的変化は、MC および BSC における光合成特性や呼吸特性に大きく影響する可能性がある。光合成および呼吸特性の変化は、弱光下における C₄ 光合成の効率に関わっており、実際に BSC における CO₂ 漏出を推定するときにも光強度の違いによって異なるモデルを用いることが推奨されている (Ubierna et al., 2013)。したがって、弱光に対するオルガネラレベルの順応機構を明確にすることは、C₄ 光合成モデルをより正確なものにするためにも重要である。

本章では、寒冷紗による遮光処理を用いたポット試験により、強光下で展開した葉の光合成特性がその後の弱光環境に対してどのように順応するのかを、生理・生化学的特性や葉の形態学的特性を解析することにより調査し、その実態を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

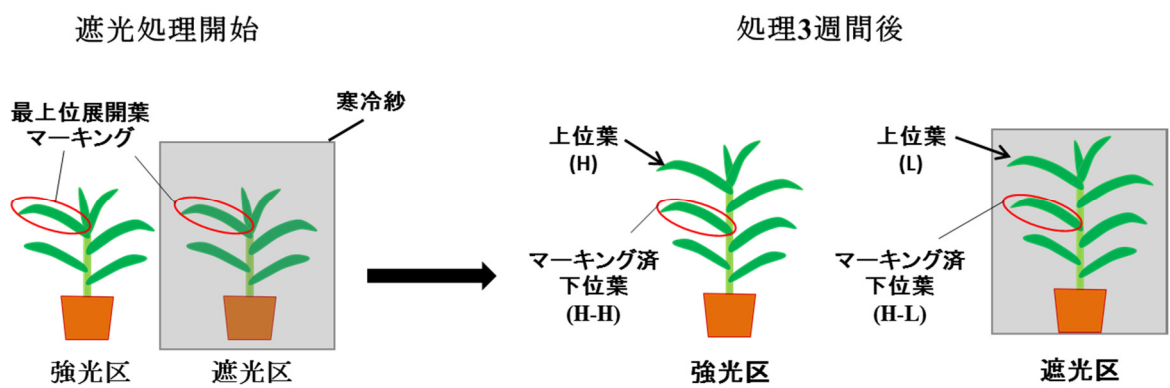
栽培方法および遮光処理方法

植物の栽培は 2016 年の 8 月中旬から 10 月中旬に九州大学農学部箱崎キャンパスのビニルハウス内で行った。材料としてトウモロコシ(*Zea mays*)を用い、P1690(パイオニアエコサイエンス)を供試品種とした。種子は育苗箱に播種し、2 週間育苗後、壤土を詰めた 5 L ポットに移植し(1 個体/ポット)、処理前まで 3 週間育成した。化成肥料を、ポットあたり窒素、リン、カリの全量がそれぞれ 1.0 g となるように施肥し、十分な灌水を行った。ビニルハウス内の日中平均気温は約 29°C、最大 PFD は約 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。

移植 3 週間後に、ビニルハウスに縦 1.6 m、横 2.0 m、高さ 1.5 m の枠を寒冷紗 3 枚で覆った遮光区(遮光率約 80%)および遮光なしの強光区を設け、その中で植物を 3 週間育成した(第 7 図)。遮光処理の直前に、植物の最上位完全展開葉をマーキングし、強光下で展開した葉の目印とした。処理前と処理中の光条件によって、処理開始後強光下で展開した H 葉と弱光下で展開した L 葉、また処理前の強光下で展開後、それぞれ 3 週間の強光および弱光に曝された H-H 葉および H-L 葉という 4 種類の光条件が異なる葉を設定して、その後の調査に用いた。植物は処理区ごとに 5 個体ずつ育成し、3~5 個体を以下の測定に用いた。

光合成ガス交換およびクロロフィル蛍光特性

携帯型光合成測定装置(LI-6400XT, LI-COR)を用いて 4 種類の葉の光-光合成曲線を作成した。測定前に葉をアルミホイルで遮光し、30 分以上暗順化させた。測定条件は葉温 30°C、湿度 60%、CO₂ 濃度 380 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ とした。光強度を暗黒より徐々に高めていき、PFD が 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 200, 300, 500, 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となるように 11 段階を設けた。光合成ガス交換パラメータとして P_N , g_s , T_r , C_i を測定した。光-光合成曲線の初期勾配部分にあたる 5 点について回帰直線を作成し、



第7図. トウモロコシの遮光処理方法と植物体における上位葉および下位葉の位置
 (H) 強光下で新たに展開した成熟葉
 (L) 弱光下で新たに展開した成熟葉
 (H-H) 強光下で展開後, 3週間強光に曝された成熟葉
 (H-L) 強光下で展開後, 3週間弱光に曝された成熟葉

y 軸との交点を暗呼吸速度(R_d), x 軸との交点を光補償点(LCP), また直線の傾きを光合成量子収率(Φ)とした.

生理学的特性

光合成ガス交換を測定した葉を用いて, 生理学的特性を調査した. 測定葉より葉片(1.1 cm²)をとり, Porra et al.(1989)の方法により Chl 含量を測定した. また, 葉片(2.6 cm²)を 80°Cで 2 日乾燥させ, SLW を算出した. 残りの葉を乾燥後に粉碎し, ケルダールガニンゲ氏変法(元村, 1990)により全葉内 N 含量を測定した.

光合成関連酵素活性

酵素活性測定の方法は第 2 章と同様である. 光合成測定葉の一部を液体 N で凍結固定後-80°Cで保存し, 酵素活性の測定に用いた. サンプルングは晴れた日の午前中に各処理環境下で行った.

葉の形態および微細構造特性

第 2 章と同様に, 光合成測定葉の一部を FAA によって固定し, IVD を測定した.

光学顕微鏡による葉の内部構造の解析は, 第 2 章と同様に葉片を Quetol 樹脂に包埋し, それから準超薄切片を作成し, ImageJ を用いて行った. 葉厚は 1 枚の葉につき 10 箇所測定し, その平均値とした. 細胞サイズについては, 1 枚の葉につき MC を 30 個以上, BSC を 15 個以上測定し, その平均値とした. また隣合った小維管束 2 個分の範囲について, 葉内(M)組織の面積を測定後, 葉内の M/BS 断面積比を算出した.

Quetol 樹脂に包埋した葉組織から, ダイヤモンドナイフを装着したウルトラミクロトームを用いて超薄切片を作成し, フォルムバル支持膜を張ったグリッド上に載せた. その後, クエン酸鉛による染色を行い, 透過型電子顕微鏡(JEM-100CX II

K, 日本電子)下で MC および BSC に含まれる葉緑体およびミトコンドリアの数, および葉緑体のグラナ数を調査した. 切片の撮影後, 像をデジタル化してコンピュータに取り込み, ImageJ を用いて葉緑体とミトコンドリアのサイズ(断面積)および葉緑体のグラナ面積を測定した. 1 細胞当たりの葉緑体およびミトコンドリア数は, MC および BSC それぞれ 1 枚の葉につき 15 細胞以上を計測し, その平均値とした. また, 葉緑体とミトコンドリアのサイズは 1 枚の葉につき MC および BSC に含まれるそれぞれ 20 個以上のオルガネラを測定し, その平均値とした.

統計解析

統計解析ソフトのエクセル統計 2015(社会情報サービス, 東京)を用い, 上位葉間および下位葉間について t 検定を行った.

結 果

光合成ガス交換特性

P_N は、光強度の増大とともに上昇し、PFD が $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上では H 葉が L 葉より、また H-H 葉が H-L 葉よりも高かった(第 8 図 A, B). また、H および H-H 葉では PFD が $500\sim 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ においても P_N は上昇傾向にあり、完全に飽和していなかったが、L および H-L 葉では P_N は PFD が $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で完全に飽和しており、PFD が $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ からの上昇幅は小さかった. 一方、 $100\sim 120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以下の低照度下では H 葉が L 葉より、また H-H 葉が H-L 葉より低い P_N を示す傾向があったが、同時に Φ は H 葉が L 葉より、また H-H 葉が H-L 葉よりも高かった(第 8 図 C, D; 第 8 表). PFD が $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ での光合成速度(P_{2000})は L 葉で H 葉より 58%, また H-L 葉で H-H 葉より 45%低下していた(第 8 表). 遮光区では、LCP および R_d は低下し、それぞれ H 葉が L 葉より、また H-H 葉が H-L 葉より高かった(第 8 表).

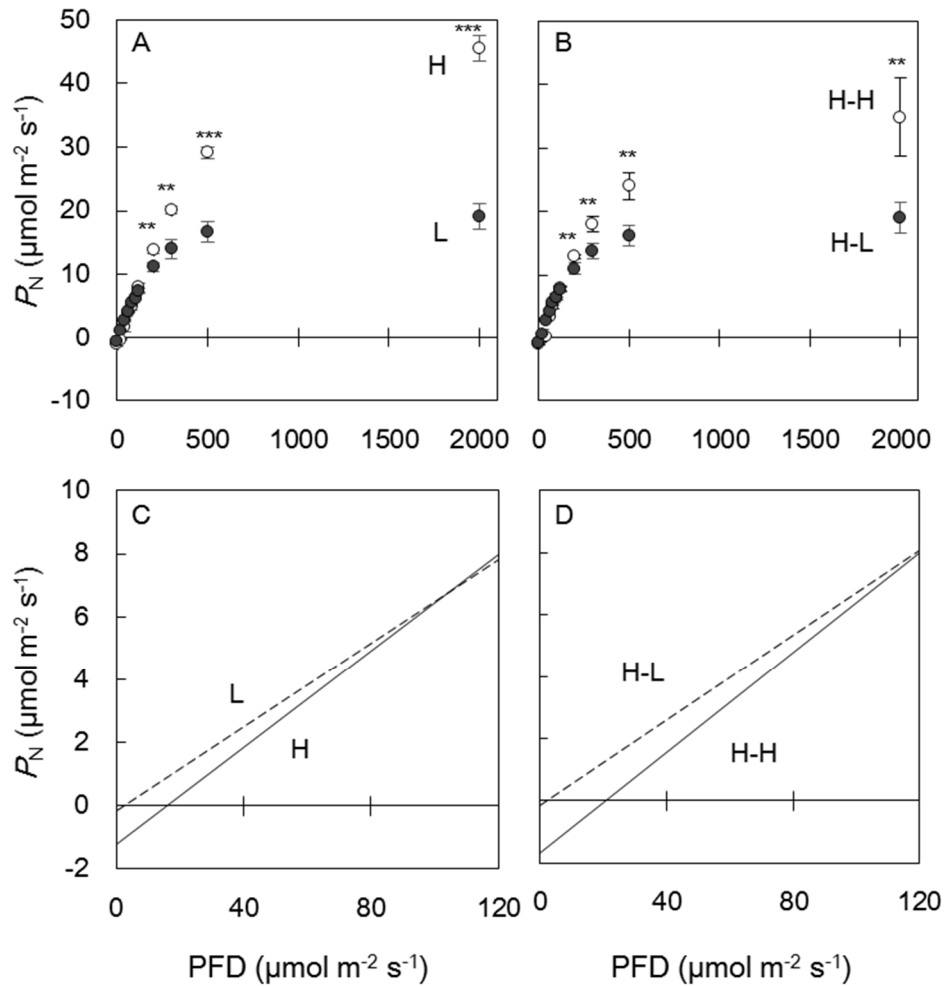
生理・生化学的特性

葉内 N 含量、葉面積あたりの Chl 含量、Chl a/b 比および SLW は H 葉が L 葉より、また H-H 葉が H-L 葉よりも高かった(第 9 表). 葉の乾物重あたりの Chl 含量は H 葉が L 葉より、また H-H 葉が H-L 葉よりも低かった(第 9 表).

光合成関連酵素である PEPC, NADP-ME, PCK および Rubisco の活性は H 葉が L 葉より、また H-H 葉が H-L 葉より高かった(第 10 表). C_4 回路と C_3 回路のバランスを示す PEPC/Rubisco 活性比は、H と L 葉および H-H と H-L 葉の間で有意な差はなかった(第 10 表).

葉の形態的特性

H 葉は L 葉よりも厚くかつ IVD が大きく、また MC および BSC のサイズも大き



第 8 図. トウモロコシの H と L 葉(A, C)および H-H と H-L 葉(B, D)の光-光合成曲線. C, D は弱光域の拡大図. 平均値 \pm SD(n=3-4). **, ***はそれぞれ 1%, 0.1%水準で有意差がある(t 検定).

第 8 表. トウモロコシの上位葉および下位葉における PPFD が $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ での光合成速度(P_{2000}), 量子収率(Φ), 光補償点(LCP)および暗呼吸速度(R_d)の比較.

葉位	葉処理区	P_{2000} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Φ (mol mol^{-1})	LCP ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	R_d ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
上位葉	H	45.6±2.1	0.078±0.008	17.2±3.1	1.32±0.29
	L	19.1±2.0 ***	0.064±0.002 *	5.6±1.7 ***	0.4±0.13 **
下位葉	H-H	34.9±6.1	0.082±0.005	22.9±2.5	1.77±0.27
	H-L	19.0±2.4 **	0.060±0.010 **	6.8±3.1 ***	0.49±0.22 ***

*, **, ***はそれぞれ 5%, 1%および 0.1%水準で有意差がある(t 検定).

第9表. トウモロコシの上位葉および下位葉における葉内窒素(N)含量, クロロフィル(Chl)含量, Chl a/b 比および比葉重(SLW)の比較.

葉位	葉処理区	N含量	Chl含量		Chl a/b	SLW
		(mmol m ⁻²)	(mg m ⁻²)	(mg g ⁻¹ DW)	(ratio)	(g m ⁻²)
上位葉	H	98.3±8.5	432±40	10.4±0.7	4.83±0.14	41.6±1.1
	L	49.8±2.5 ***	224±14 ***	12.2±1.1 *	4.44±0.19 **	18.4±1.5 ***
下位葉	H-H	64.9±5.8	398±64	13.2±2.4	4.29±0.16	30.5±2.0
	H-L	42.6±6.0 **	275±27 *	17.1±2.0 *	3.56±0.25 **	16.2±2.2 ***

*, **, ***はそれぞれ 5%, 1%および 0.1%水準で有意差がある(t 検定).

第 10 表. 上位葉および下位葉における PEPC, NADP-ME および PCK の活性および PEPC 活性と Rubisco 活性の比(PEPC/Rubisco)の比較.

葉位	葉処理区	PEPC活性 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	NADP-ME活性 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	PCK活性 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Rubisco活性 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	PEPC/Rubisco (ratio)
上位葉	H	85.3±9.6	73.8±6.9	15.6±4.7	27.0±4.2	3.24±0.78
	L	19.8±5.7 ***	24.2±4.2 ***	3.9±1.2 **	9.4±4.3 **	2.27±0.45 ^{NS}
下位葉	H-H	44.0±17.5	60.4±6.5	6.0±1.1	18.6±4.6	1.93±0.41
	H-L	14.4±6.1 *	36.7±10.4 *	2.5±1.0 **	7.3±4.9 *	1.73±0.54 ^{NS}

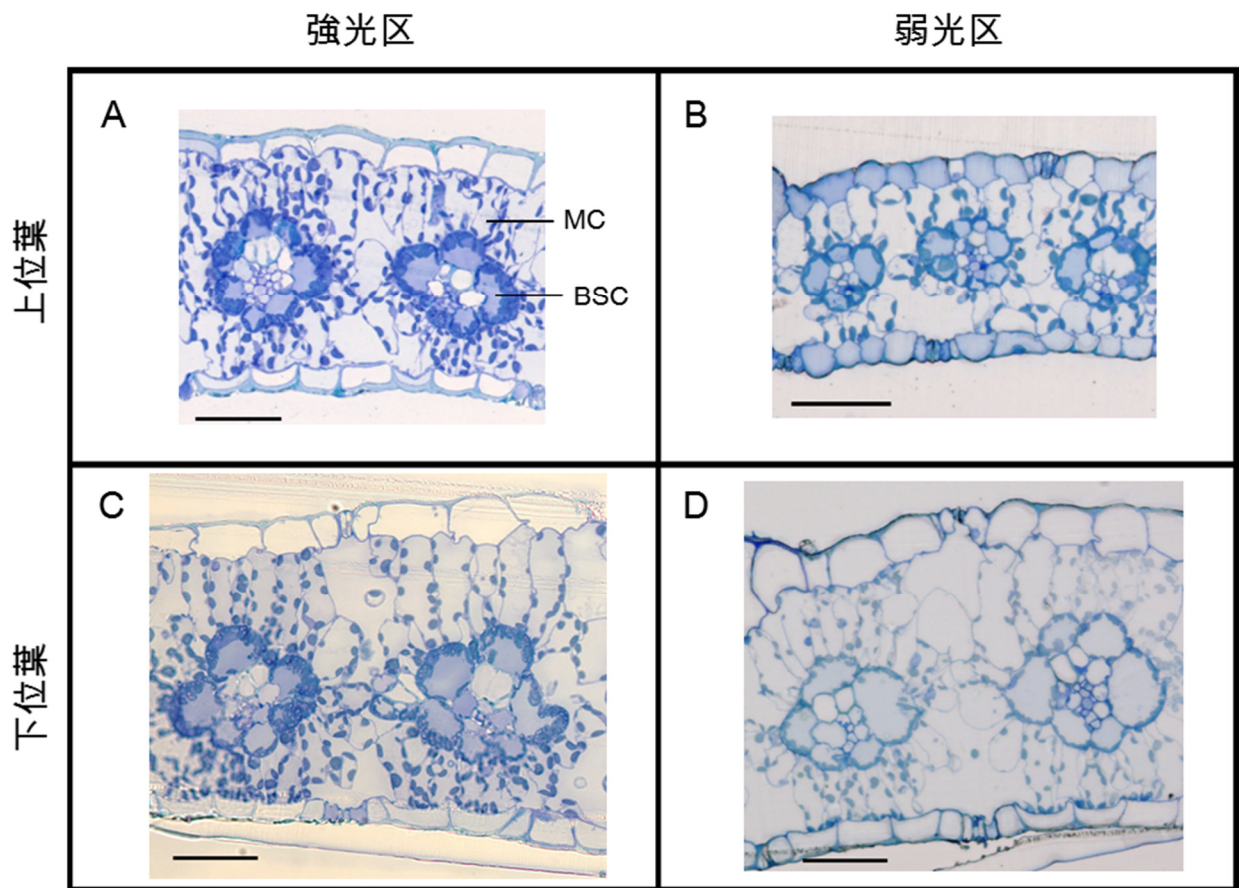
*, **, ***はそれぞれ 5%, 1%および 0.1%水準で有意差がある(t 検定). NS は有意な差がない.

かった(第9図 A, B; 第11表). また, M/BS 断面積比は H 葉が L 葉よりも低かった(第11表). H-H 葉と H-L 葉を比較すると, 葉厚, IVD, MC および BSC のサイズ, また M/BS 比のすべてのパラメータで有意な差は見られなかった(第9図 C, D; 第11表).

葉緑体およびミトコンドリアの量的特性

電子顕微鏡観察により, 葉緑体およびミトコンドリアの量的特性を詳細に調査した. MC の葉緑体サイズは H-H 葉が H-L 葉よりも大きかったが, H および L 葉の間には差はなかった. BSC の葉緑体サイズは H および H-H 葉が L および H-L 葉よりも大きかった(第12表). MC および BSC における単位細胞面積あたりの葉緑体数については, H および L 葉, また H-H および H-L 葉の間で差はなかった(第12表). MC および BSC における細胞1個あたりの葉緑体数は, H 葉が L 葉より多かったが, H-H および H-L 葉の間には差は見られなかった(第12表). 単位細胞面積当たりの葉緑体総断面積(葉緑体サイズ×個数)を表す葉緑体占有率は, BSC では H 葉が L 葉より 25%, また H-H 葉が H-L 葉より 45% 高かったが, MC では H-H 葉が H-L 葉よりも 31% 高かったものの, H および L 葉の間には差はなかった(第13表). また H および H-H 葉に対するそれぞれ L および H-L 葉における変化量(Δ)は上位葉, 下位葉ともに BSC が MC よりも大きかった(第13表).

葉緑体の構造については, MC の葉緑体では多層のグラナ構造が発達していたが(第10図), BSC の葉緑体ではグラナ構造はほとんど発達しておらず, 2~3 層から成るグラナが見られるのみであった(第11図). 葉緑体1個あたりのグラナ数は BSC では H および L 葉, また H-H および H-L 葉の間で差はなく, MC では H-H 葉が H-L 葉よりも多かったが, H および L 葉の間に差はなかった(第14表). MC の葉緑体におけるグラナ面積は H 葉よりも L 葉で大きかったが, H-H 葉および H-L 葉では差は見られなかった(第11図 A, B; 第14表). また H-H 葉の BSC の葉緑体には多くのデンプン粒が蓄積していた(第11図 C). H-H および H-L 葉では BSC の葉緑体



第9図. トウモロコシの上位葉および下位葉の横断切片の比較. (A) H 葉, (B) L 葉, (C) H-H 葉, (D) H-L 葉. 図中のバーは 10 μm を示す. BSC, 維管束鞘細胞; MC, 葉肉細胞.

第 11 表. トウモロコシの上位葉および下位葉における内部構造特性の比較.
 IVD, 維管束間距離; M, 葉肉組織; BS, 維管束鞘組織; MC, 葉肉細胞; BSC,
 維管束鞘細胞.

葉位	葉処理区	葉厚 (μm)	IVD (μm)	M/BS (ratio)	細胞サイズ	
					MC (μm^2)	BSC (μm^2)
上位葉	H	144 \pm 5	103 \pm 5	2.77 \pm 0.08	356 \pm 35	412 \pm 24
	L	100 \pm 13 ***	63 \pm 9 **	2.97 \pm 0.14 *	238 \pm 13 ***	196 \pm 46 ***
下位葉	H-H	184 \pm 16	122 \pm 12	3.32 \pm 0.13	567 \pm 68	563 \pm 37
	H-L	167 \pm 17 ^{NS}	106 \pm 17 ^{NS}	3.26 \pm 0.13 ^{NS}	503 \pm 59 ^{NS}	523 \pm 110 ^{NS}

*, **, ***はそれぞれ 5%, 1%および 0.1%水準で有意差がある(t 検定). NS は有意な差がない.

第 12 表. トウモロコシの上位葉および下位葉における葉緑体の量的特性の比較. MC, 葉肉細胞; BSC, 維管束鞘細胞.

葉位	葉処理区	葉緑体サイズ		葉緑体数/細胞面積		葉緑体数/細胞	
		MC (μm^2)	BSC	MC (no. $\mu\text{m}^{-2}\times 1000$)	BSC	MC (no./cell)	BSC
上位葉	H	12.1 \pm 0.7	13.4 \pm 1.4	17.9 \pm 2.1	25.3 \pm 1.5	6.3 \pm 0.5	9.6 \pm 1.2
	L	12.4 \pm 1.7 ^{NS}	10.0 \pm 1.2 ^{**}	18.8 \pm 0.6 ^{NS}	26.7 \pm 4.8 ^{NS}	4.5 \pm 0.3 ^{***}	5.1 \pm 0.5 ^{***}
下位葉	H-H	14.4 \pm 0.5	15.5 \pm 1.1	12.2 \pm 2.5	19.7 \pm 1.5	6.8 \pm 0.8	11.1 \pm 1.3
	H-L	10.6 \pm 0.2 ^{***}	9.3 \pm 0.4 ^{***}	11.3 \pm 1.6 ^{NS}	17.9 \pm 1.5 ^{NS}	5.7 \pm 1.1 ^{NS}	9.4 \pm 2.3 ^{NS}

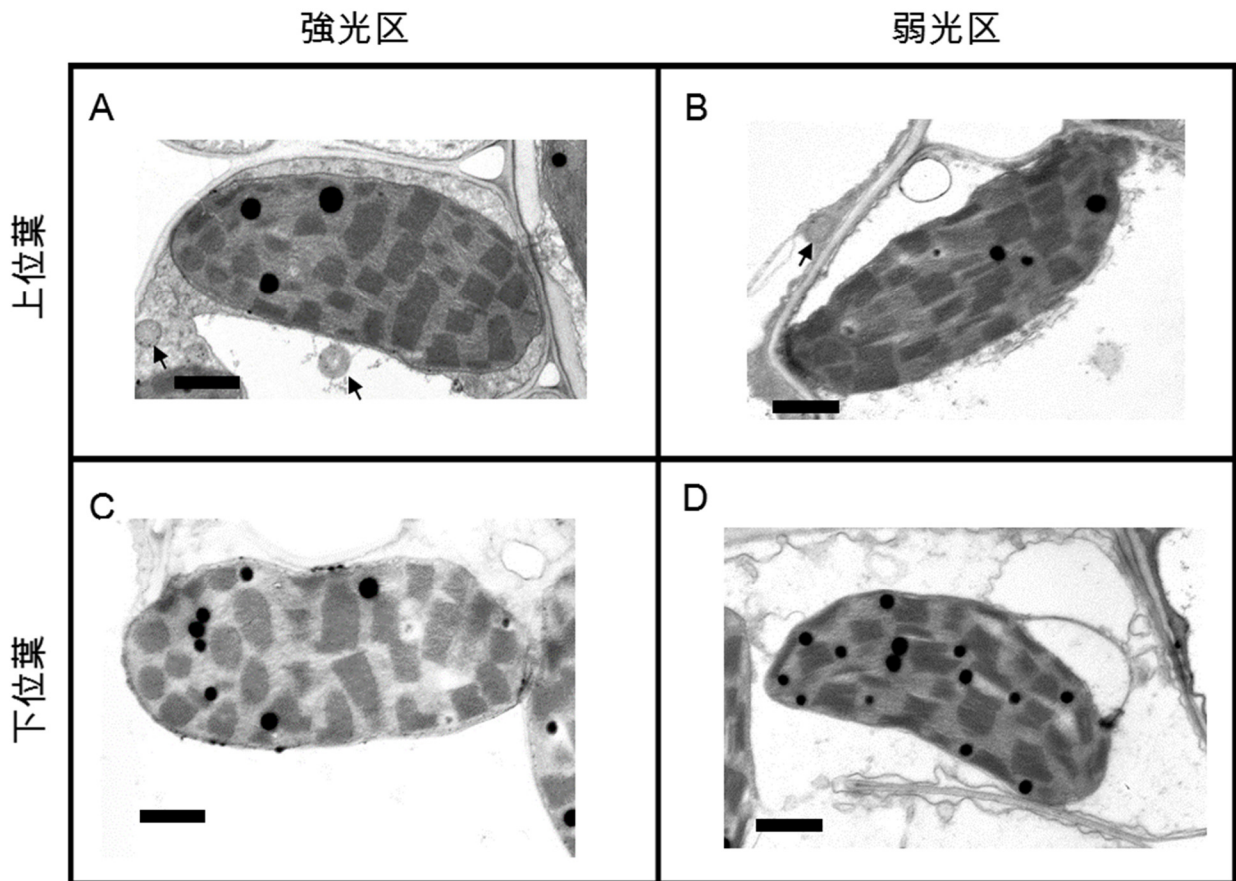
** , ***はそれぞれ 1%および 0.1%水準で有意差がある(t 検定). NS は有意な差がない.

第 13 表. トウモロコシ上位葉および下位葉における細胞面積あたりの葉緑体の断面積×数(占有率)の比較. MC, 葉肉細胞; BSC, 維管束鞘細胞.

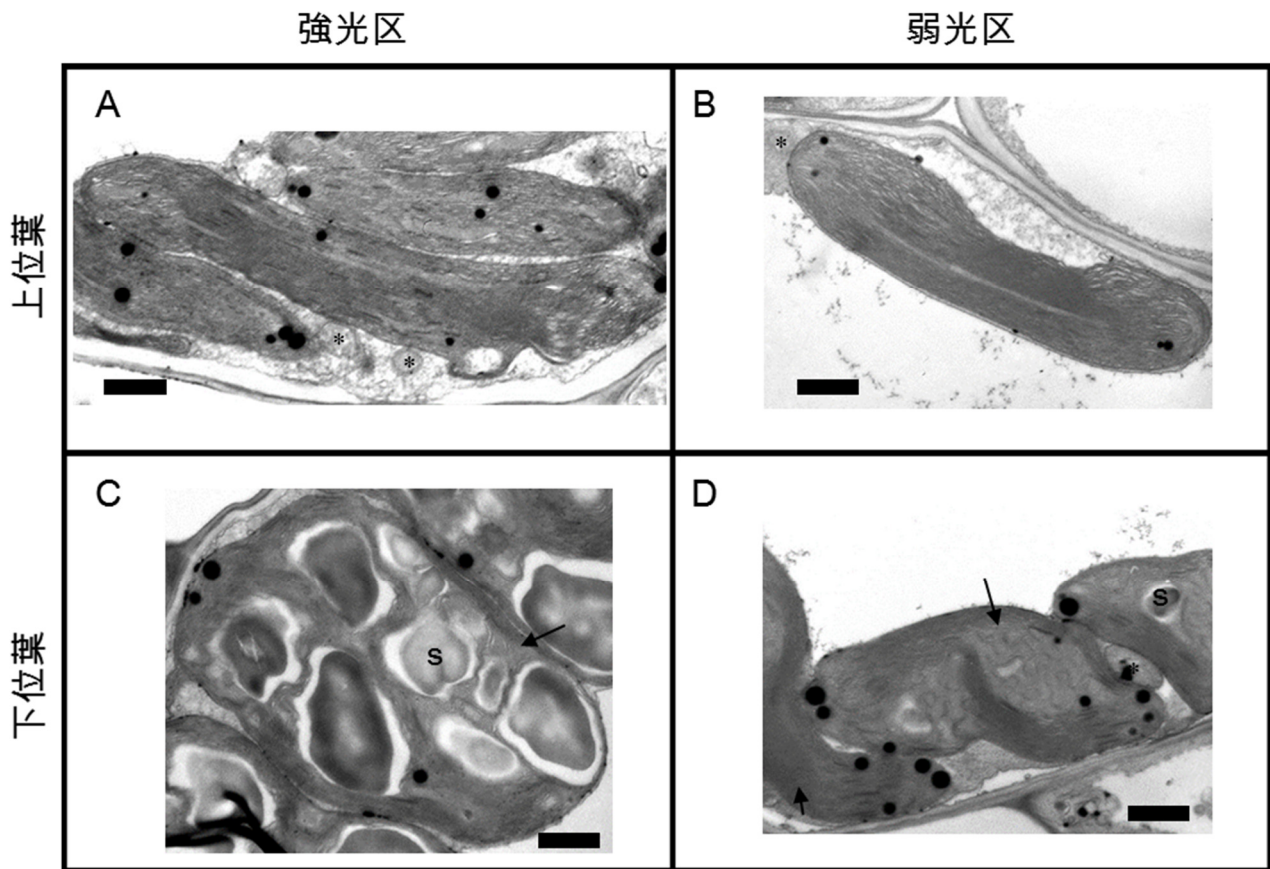
葉位	葉処理区	葉緑体占有率		Δ (H - L, H-H - H-L)	
		MC (%)	BSC (%)	MC (%)	BSC (%)
上位葉	H	21.8±3.1	35.0±3.4	0.3 (1)	7.1 (25)
	L	21.5±0.3 ^{NS}	26.4±3.0 [*]		
下位葉	H-H	17.4±3.4	30.5±3.0	5.3 (31)	13.8 (45)
	H-L	12.1±1.6 [*]	16.7±2.0 ^{***}		

^{*}, ^{***}はそれぞれ 5%および 0.1%水準で有意差がある(t 検定). NS は有意な差がない.

Δ は H および H-H 葉に対するそれぞれ L および H-L 葉の変化量. ()内は変化率(%)を示す.



第 10 図. トウモロコシの上位葉および下位葉の葉肉細胞における葉緑体の微細構造. (A) H 葉, (B) L 葉, (C) H-H 葉, (D) H-L 葉. 図中のバーは 1 μm . 矢印はミトコンドリアを示す.



第 11 図. トウモロコシの上位葉および下位葉の維管束鞘細胞における葉緑体の微細構造. (A) H 葉, (B) L 葉, (C) H-H 葉, (D) H-L 葉. 図中のバーは 1 μm . 矢印は回旋状構造を示す部分を指す. s, デンプン粒; *, ミトコンドリア.

第 14 表. トウモロコシの上位葉および下位葉における葉緑体のグラナ構造特性の比較. MC, 葉肉細胞; BSC, 維管束鞘細胞.

葉位	葉処理区	グラナ数/葉緑体		グラナサイズ		グラナ面積/葉緑体面積	
		MC (no.)	BSC	MC (μm^2)	BSC	MC (ratio)	BSC
上位葉	H	26.7±2.6	12.2±2.7	0.177±0.022	nd	0.387±0.022	nd
	L	26.1±2.9 ^{NS}	9.8±2.9 ^{NS}	0.213±0.036 ^{NS}	nd	0.446±0.019 ^{**}	nd
下位葉	H-H	26.7±1.7	11.4±2.5	0.206±0.025	nd	0.411±0.016	nd
	H-L	21.9±1.5 [*]	9.4±1.1 ^{NS}	0.183±0.037 ^{NS}	nd	0.417±0.005 ^{NS}	nd

*は 5%水準で有意差がある(t 検定). NS は有意な差がない.
nd, データ未検出.

のチラコイドが部分的に回旋状構造を示した(第 11 図 C, D).

ミトコンドリアのサイズは MC では処理間で差は見られなかったが, BSC では H 葉が L 葉よりも大きく, H-H および H-L 葉の間には差はなかった(第 15 表). 単位細胞面積あたりのミトコンドリア数については, BSC では H 葉が L 葉より, また H-H 葉が H-L 葉よりも多かったが, MC では逆に H 葉が L 葉より, また H-H 葉が H-L 葉よりも少なかった(第 15 表). 細胞 1 個あたりのミトコンドリア数は BSC では H 葉が L 葉より, また H-H 葉が H-L 葉よりも多かったが, MC では H-H 葉よりも H-L 葉が多く, H および L 葉の間には差はなかった(第 15 表). 単位細胞面積あたりのミトコンドリアの占有率は, BSC では H 葉が L 葉より, また H-H 葉が H-L 葉よりも高かったが, MC では反対に低かった(第 16 表). また H および H-H 葉に対する L および H-L 葉の Δ は BSC が MC よりも大きかった(第 16 表).

第 15 表. トウモロコシの上位葉および下位葉におけるミトコンドリアの量的特性の比較. MC, 葉肉細胞; BSC, 維管束鞘細胞.

葉位	葉処理区	ミトコンドリアサイズ		ミトコンドリア数/細胞面積		ミトコンドリア数/細胞	
		MC	BSC	MC	BSC	MC	BSC
		(μm^2)		$(\text{no. } \mu\text{m}^{-2} \times 1000)$		(no./cell)	
上位葉	H	0.233±0.029	0.462±0.061	8.2±0.9	27.2±2.8	2.9±0.4	11.2±1.5
	L	0.226±0.045 ^{NS}	0.303±0.044 ^{**}	11.2±2.1 [*]	21.4±1.8 [*]	2.7±0.6 ^{NS}	4.8±0.5 ^{***}
下位葉	H-H	0.238±0.062	0.371±0.026	5.5±0.8	19.5±1.7	3.1±0.4	10.9±0.8
	H-L	0.251±0.009 ^{NS}	0.411±0.038 ^{NS}	7.8±1.1 [*]	11.2±3.2 ^{**}	3.9±0.1 [*]	5.7±1.5 ^{***}

*, **, ***はそれぞれ 5%, 1%および 0.1%水準で有意差がある(t 検定). NS は有意な差がない.

第 16 表. トウモロコシの上位葉および下位葉における細胞面積あたりのミトコンドリアの断面積×数(占有率)の比較. MC, 葉肉細胞; BSC, 維管束鞘細胞.

葉位	葉処理区	ミトコンドリア占有率		Δ (H - L, H-H - H-L)	
		MC	BSC	MC	BSC
		(%)		(%)	
上位葉	H	0.19±0.03	1.25±0.17		
	L	0.28±0.03 **	0.61±0.03 **	-0.09 (-48)	0.65 (52)
下位葉	H-H	0.13±0.03	0.75±0.10		
	H-L	0.20±0.03 *	0.49±0.10 *	-0.07 (-51)	0.25 (34)

*, **はそれぞれ 5%および 1%水準で有意差がある(t 検定). NS は有意な差がない.

Δ は H および H-H 葉に対するそれぞれ L および H-L 葉の変化量. ()内は変化率(%)を示す.

考察

光合成ガス交換およびその他の生理学的特性

強光区と遮光区において形成された4タイプの葉では、光条件の違いによって光合成ガス交換特性に差異が見られた。HおよびH-H葉ではそれぞれLおよびH-L葉よりも強光域における P_N が高く、反対にLおよびH-L葉では弱光域における P_N が高い傾向にあり、その要因は Φ の上昇ではなく、主に R_d およびLCPの減少によるものであると考えられた(第8図; 第8表)。これは陰葉にみられる一般的な特性であり(Björkman, 1981; Givnish, 1988; Pearcy, 1998), このことからH-L葉は展開後の遮光処理によって光合成特性の弱光順応が起こったと考えられた。またそれぞれの光合成特性の弱光順応は、他の C_3 植物において展開後に見られるものと類似した反応であった(Bunce et al., 1977; Hikosaka et al., 1996)。

その他の生理学的特性については、L葉およびH-L葉ではそれぞれH葉およびH-H葉よりも葉内N含量、SLWが低く、Chl a/b比が高かった(第9表)。これらの反応も光合成ガス交換特性と同様、陰葉でみられる典型的なものである(Björkman, 1981; Givnish, 1988; Pearcy, 1998)。Chl含量は弱光に順応した葉で高くなると考えられているが、本研究では葉面積あたりではHおよびH-H葉がそれぞれLおよびH-L葉よりも高かった(第9表)。しかし、乾物重あたりではHおよびH-H葉の方がそれぞれLおよびH-L葉よりも低かった(第9表)。Chlは光捕集色素であり、チラコイド膜上で明反応を行う光化学系とともに存在するため、最大光合成速度と相関性が高い。よって、弱光に順応する間にChlが増加しても、最大 P_N の低下やそれに伴った光合成関連タンパク質などの低下程度がより大きかったため、LおよびH-L葉ではChl含量が低かったと考えられる。これは、光合成特性の光強度に対する可塑性の高い陽生植物によく見られる傾向と一致する(Björkman, 1981; Davies et al., 1986; Pengelly et al., 2010)。逆に、光強度に対する光合成特性の可塑性が低い陰生植物では、陽生植物に比べ P_N やSLWが光強度に対して大きく変化しないため、弱光

下の葉面積あたりの Chl 含量が強光下のものに比べると、維持するかまたは高くなる場合がある(Winter et al., 1982; Pearcy and Franceschi, 1986; Ward and Woolhouse, 1986a). 本研究の L および H-L 葉で見られたように、乾物重あたりの Chl 含量が高まることは弱光下に曝された様々な植物において観察されている一般的な反応である(Boardman, 1977; Pearcy, 1998).

L および H-L 葉における葉内 N 含量の低下は P_N の低下に関連していると考えられる(Pons, 2016). また葉内 N 含量の主な低下要因として Rubisco をはじめとした光合成関連酵素含量の低下が考えられる. 本研究において、光合成関連酵素活性は H および H-H 葉よりもそれぞれ L および H-L 葉で低かった (第 10 表). 弱光下の葉における Rubisco の含量および活性の低下に関する報告は多く、 C_3 , C_4 植物種に関わらず一般的な反応として知られており、 C_4 植物では C_4 回路の酵素に関しても同様に低下することが明らかになっている(Björkman, 1981; Ward and Woolhouse, 1986b; Pengelly et al. 2010; Sharwood et al., 2014). 一方、展開後の葉における Rubisco の弱光応答の例として、Hikosaka et al. (1996) および Yamasaki et al. (1996) は C_3 植物の展開後の葉や群落下層部の葉を用い、光強度の減少とともに Rubisco 含量が大きく低下することを示している. よって、L および H-L 葉における P_N の低下の背景には、弱光下での Rubisco をはじめとした光合成関連酵素の減少が関連しているものと考えられる.

以上の結果より、 C_4 植物のトウモロコシでも L 葉および H-L 葉は遮光処理によって、光合成およびそれに関連した生理・生化学的特性の弱光順応が起こっていることが明らかとなった.

葉の構造的特性

L 葉は H 葉よりも、葉厚、MC および BSC のサイズが小さかった(第 11 表). 強光下よりも弱光下で形成された葉の葉厚の低下は典型的な反応の一つであり、 C_3 および C_4 植物のどちらでも観察されている(Louwerse and Zwerde, 1977; Ward and

Woolhouse, 1986a; Yano and Terashima, 2004; Pengelly et al., 2010). C₃植物の陰葉における葉厚の低下は、主に柵状組織層が減少する影響が大きい(Givnish, 1988; Pearcy, 1998). 一方、トウモロコシをはじめとしたC₄植物の葉では、MCはBSを取り囲むように1層あるのみで、C₃植物の葉に比べ発達してはいない(Sage et al., 2014). これはMCとBSCの密接な協働が、C₄植物のCCMを効率よく働かせる上で重要なためだと考えられる. そのような構造的制約があるため、弱光下のトウモロコシにおいてはMCのみでなくBSCも協調して小型化し、全体的な葉組織の縮小が起こった結果、葉厚が低下したと考えられる. 一方、H-H葉およびH-L葉の間にはH葉およびL葉の間に見られたような葉の骨格の変化は見られず、M/BS組織の面積比にも差はなかった(第9図; 第11表). ある環境下で形成した葉では、その後の環境の変化に対する葉の構造的特性などの変化は小さい(Pearcy, 1998; Sage and McKown, 2006). H-H葉およびH-L葉はどちらも強光下で形成し展開した葉である. H-H葉はその後も強光を受け続けたが、H-L葉では遮光処理のため光強度が低下した. H-L葉はこのような光強度の低下にも関わらず、葉の骨格構造が変化せず、陽葉の組織構造を維持したと考えられた. 強光条件から弱光条件に移行したC₃植物の葉においても同様の結果が確認されている(Bunce et al., 1977; Brooks et al., 1996). 葉の骨格構造が変化しなかったにも関わらず、葉の密度の指標であるSLWはH-L葉よりもH-H葉が高かったことには(第9表)葉内含有物の変化が関わっていると考えられる.

電子顕微鏡によるオルガネラの観察では、HおよびL葉、H-HおよびH-L葉との間で単位細胞面積当たりの葉緑体数は変化しなかったが、葉緑体サイズはMCにおいてH-H葉がH-L葉より大きく、またBSCにおいてはHおよびH-H葉がそれぞれLおよびH-L葉よりも大きかった(第12表). また、単位細胞面積当たりの葉緑体の占有率は、MCではH-H葉がH-L葉よりも大きく、一方、BSCではHおよびH-H葉がそれぞれLおよびH-L葉よりも大きかった(第13表). 過去の研究において、トウモロコシやハツカダイコンでは弱光下で形成された葉の葉緑体は強光下

のものよりも小さいと報告されている(Louwerse and Zweerde, 1977; Meier and Lichtenthaler, 1981). これに対し, 陰葉の葉緑体は陽葉の葉緑体より大きいという報告もいくつか見られ, 特に C₃ 植物においてはこれが一般的であるように考えられているが(Björkman et al, 1972; Boardman, 1977; Givnish, 1988), C₄ 植物においては十分な情報があるとはいえない. 葉緑体サイズに関しては, 植物種によって弱光に対する反応が異なり, C₄ 植物にまでは一般化できないと考えられ, また光合成型の違いによる反応性の差異は今後の研究対象として興味深いものであろう.

葉緑体のチラコイド膜構造については, H 葉よりも L 葉の MC 葉緑体における葉緑体当たりのグラナ面積比が大きかったが, H-H および H-L 葉の間には MC 葉緑体におけるグラナの発達程度に差はなかった(第 14 表). また, いずれの葉の MC においてもグラナ 1 個あたりのサイズには差はなかった(第 14 表). 葉緑体の構造特性に関する過去の報告と比較すると, 陰葉の葉緑体におけるチラコイド膜やグラナの発達程度に関する傾向は一貫しており, 弱光下の葉の葉緑体ではグラナを構成するチラコイド膜が増加し, グラナ層数が多くなる傾向が見られる(Björkman, 1981; Meier and Lichtenthaler, 1981; Percy and Franceschi, 1986). トウモロコシやソルガムなどのイネ科 NADP-ME 型 C₄ 植物では, MC の葉緑体のグラナ構造は一般的な C₃ 植物と同程度に発達しているが, BSC の葉緑体はグラナ構造が発達しておらず, 存在しても 2~3 層のものが数個見られるのみである(Edwards and Voznesenskaya, 2011). Ward and Woolhouse (1986a)によれば, トウモロコシの BSC 葉緑体では弱光に応答したグラナ層の発達が見られず, また BSC の葉緑体にかなり発達したグラナを有する陰生のイネ科 NADP-ME 型 C₄ 植物である *Paspalum conjugatum* においても同様であった. 一方, Jiang et al. (2011)によるソルガムを用いた実験では, 弱光下で展開した葉の MC 葉緑体は, 強光下で展開した葉よりも葉緑体に占めるグラナの面積が大きいことを明らかにしており, 本研究の結果と一致している. これらの結果より, トウモロコシの MC および BSC の間では, 葉緑体レベルの弱光順応反応が異なっている可能性がある.

本研究においては、H-L 葉は H-H 葉よりも Chl a/b 比が低かった(第 9 表). 弱光下の葉における Chl a/b 比の低下は、光化学系 II (PSII)のアンテナを形成する集光性色素タンパク質複合体 II (LHCII)の増加に関連することが知られており(Björkman, 1981; Anderson, 1999), また LHCII は葉緑体のグラナに多く存在することが知られている(Anderson et al, 2008). トウモロコシおよびその他のイネ科 NADP-ME 型 C₄ 植物の展開後の葉における BSC の葉緑体では、塩処理を施した場合にグラナの発達がみられたという報告がある(Hasan et al., 2005; Omoto et al., 2010). このような知見から、H-L 葉においても展開後の弱光順応によって葉緑体におけるグラナの発達が期待されたが、そのような結果は得られなかった. 一方で、トウモロコシにおける MC および BSC の葉緑体では、PSII および LHCII はグラナが未発達なチラコイド膜上にも存在し、また、その量は弱光下で増加することが示されている(Drozak and Romanowska, 2006; Romanowska et al., 2008). よって、H-L 葉でみられた Chl a/b 比の低下(第 9 表)は、ストロマチラコイドにおける LHCII などの集光性アンテナが増加したことに起因する可能性がある. 展開後の葉の弱光順応に応じた LHCII 含量の変化については、今後調査する必要がある.

ミトコンドリアの量的特性のうち、単位細胞面積あたりのミトコンドリア数は、BSC では H および H-H 葉よりもそれぞれ L および H-L 葉で少なかったが、MC ではその逆の傾向を示した(第 15 表). また、ミトコンドリアサイズは BSC では H 葉では L 葉よりも大きかったが MC では差はなく、また H-H および H-L 葉の間には両細胞のミトコンドリアともに差はなかった(第 15 表). さらに単位細胞面積あたりのミトコンドリア占有率は、BSC では H および H-H 葉が L および H-L よりもそれぞれ大きく、MC では BSC とは逆の傾向を示し、また MC よりも BSC の Δ が大きかった(第 16 表). C₄ 植物の MC と BSC におけるミトコンドリア呼吸の貢献度については、充分には解明されているとはいえない. 現在、最もよく用いられる von Caemmerer (2000)の C₄ 光合成の生化学モデルでは、MC ミトコンドリアの呼吸速度の割合として R_d の 1/2 の値が用いられているが、C₄ 植物ではサブタイプ間でも BSC

ミトコンドリアの役割が大きく異なるため、この値は過度に簡略化されたものといえよう。実際に、C₄植物のMCとBSCにおけるミトコンドリアの量的特性は、サブタイプ間で異なることが報告されている(Yoshimura et al., 2004)。光呼吸における役割も加味すると、BSCにおけるミトコンドリアの量的特性がR_dに与える影響はMCよりも大きい可能性が考えられる。したがって、LおよびH-L葉がHおよびH-H葉よりもR_d、LCPが低かったのには、BSCにおけるミトコンドリアの量的特性の変化が大きく関わっていることが推測された。C₄植物において、葉のオルガネラレベルの量的特性が弱光に対しどのように反応するかについては不明な点が多い。C₄植物におけるCCM効率を下げる要因の一つにBSCからのCO₂漏出が挙げられるが、CO₂漏出は特に弱光下で増加すると報告されており、現在、これに関連した研究は盛んに行われている(Kromdijk et al., 2008, 2014; Ubierna et al., 2011, 2013; Bellasio and Griffiths., 2014a, b)。BSCからCO₂が漏出すると、MCにおいて漏出したCO₂を再固定するために余分なエネルギーが必要となり、それが光合成効率を下げる原因となると考えられている(Kromdijk et al., 2014)。本研究において、L葉はH葉よりもBSCの葉緑体量を低下させたがMCでは変化が起こらず、一方でMCのミトコンドリア量は増加させた(第12, 13, 15, 16表)。この結果は、弱光下でBSCからのCO₂漏出が増大することにより、C₄光合成全体におけるMCのエネルギー要求性が増大したためであるかもしれない。BSCからのCO₂漏出とオルガネラの量的特性との関係については未だ十分に研究されておらず、今後のさらなる研究が必要とされるテーマだと考えられる。

摘 要

本章では、圃場環境下のトウモロコシ個体群下位葉が経験する光環境の変遷(強光から弱光)を想定して、強光下で形成された葉がどのように弱光順応するのかを調査した。強光下で栽培したトウモロコシの植物体を、育成途中で3週間遮光処理により弱光下に置いたもの、およびそのまま強光下で育成したもの(コントロール)に分けて、以下の4種類の葉を得た。すなわち、強光下で新しく展開した葉(H)、弱光下で新しく展開した葉(L)、処理前の強光下で展開後3週間の強光に曝された葉(H-H)、処理前の強光下で展開後3週間の弱光に曝された葉(H-L)である。これらの葉の比較解析により、トウモロコシの葉の弱光順応機構を検討した。

1. P_N は、PFD が $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上では H および H-H 葉がそれぞれ L および H-L 葉より高かった。また H および H-H 葉では PF D が $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ でも完全に飽和していなかった。一方、PF D が $100\sim 120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以下の弱光域では H および H-H 葉がそれぞれ L および H-L 葉よりも低い傾向を示した。以上から、弱光処理によりトウモロコシの葉では光合成特性の弱光順応が起こったと考えられた。
2. Φ , LCP および R_d は H および H-H 葉がそれぞれ L および H-L 葉よりも高かった。したがって、弱光域において L および H-L 葉の P_N が高い傾向を示したのは、 Φ の上昇よりも R_d の低下によるものと考えられた。
3. 葉内 N 含量および葉面積あたりの Chl 含量および SLW は、いずれも H および H-H 葉がそれぞれ L および H-L 葉より高かった。また光合成関連酵素であ

る PEPC, NADP-ME, PCK および Rubisco の活性も H および H-H 葉がそれぞれ L および H-L 葉よりも高かった。以上の特性は、弱光順応過程における強光域の P_N の低下に関連していると考えられた。

4. 葉の乾物重あたりの Chl 含量は H および H-H 葉よりもそれぞれ L および H-L 葉が高く、また Chl a/b 比は H および H-H 葉がそれぞれ L および H-L 葉よりも高かった。これらの結果から、トウモロコシの葉は遮光処理によって光捕集能を高めていると考えられた。
5. 葉の形態的特性については、H 葉は L 葉よりも葉厚および MC と BSC のサイズが大きかったが、H-H 葉および H-L 葉の間には有意差はなかった。したがって、弱光順応の間に H-L 葉は葉の骨格構造それ自体は変化させないことが明らかとなった。
6. 単位細胞面積あたりの葉緑体の占有率は、MC では H-H 葉が H-L 葉より大きく、BSC では H および H-H 葉がそれぞれ L 葉および H-L 葉よりも大きかった。したがって、弱光順応過程においては特に BSC における葉緑体の量的特性の変化が光合成特性の変化に大きく関わっていると考えられた。
7. 単位細胞面積あたりの葉緑体数は H および H-H 葉とそれぞれ L および H-L 葉の間に差はなかった。一方、葉緑体サイズは、MC では H-H 葉が H-L 葉より大きく、BSC では H および H-H 葉がそれぞれ L および H-L 葉よりも大きかった。したがって、弱光順応過程における葉緑体の量的特性の変化には、数よりもサイズが影響していると考えられた。

8. MCにおける葉緑体あたりのグラナ面積比はH葉よりL葉で大きかったが、H-H葉およびH-L葉の間で差は見られず、またグラナ1個あたりのサイズはHおよびH-H葉とそれぞれLおよびH-L葉の間で差はなかった。したがって、弱光順応過程ではMC葉緑体のグラナ構造の変化を伴わないことが示された。
9. H-H葉およびH-L葉の間ではMCおよびBSC葉緑体のグラナ構造に差は見られなかったが、Chl a/b比はH-H葉よりH-L葉が低かった。したがって、Chl a/b比の変化にはストロマチラコイドにおけるPSIIおよびLHCIIの増加が関連している可能性が示唆された。
10. 単位細胞面積あたりのミトコンドリアの占有率は、MCではHおよびH-H葉がLおよびH-L葉よりも低かったが、BSCではその反対の傾向を示した。
11. 単位細胞面積あたりのミトコンドリア数は、BSCではHおよびH-H葉がそれぞれLおよびH-L葉より多かったが、MCにおいてはその反対の傾向を示した。また、ミトコンドリアサイズはMCではH葉よりL葉が大きかったが、H-H葉とH-L葉の間に差はなく、BSCではH葉とL葉、またH-H葉とH-L葉の間に差は見られなかった。したがって、弱光順応過程でのミトコンドリアの量的特性の変化にはサイズよりも数の変化が大きく影響していると考えられ、葉緑体とは異なる傾向を示した。

第4章 トウモロコシ個体群の下位葉における光合成特性の弱光順応と個体群 光合成に対する下層部の貢献

はじめに

第3章では、ポットで育成したトウモロコシを実験的に弱光条件下において、展開後の葉の弱光順応機構を明らかにした。一方、圃場における栽培環境下でも同様の弱光順応が起こっているのかは明らかではない。圃場のトウモロコシ個体群の下位葉は時間の経過とともに異なる光環境を経験する。すなわち、個体群形成の初期に強光下で展開した葉は、植物体の成長とともにその上部に新たな葉が展開し、それに伴う相互遮蔽の結果、光環境は徐々に弱光へと移行する。また、圃場で栽培された個体群では、光強度の変化のみならず、上層部から下層部へいくに従って葉による光吸収の結果、赤色光/遠赤色光(R/FR)比が低下するなど、光質の変化も起こる(Pons, 2016)。従って、光強度以外にも様々な環境要因が作用する圃場環境下の個体群の下位葉でも、前章にみられたような弱光順応が実際に起こるのかを検証することが必要である。

個体群光合成に対する下層部の葉の貢献度に関する研究は、これまであまり多くはない。Long et al. (1993)は、葉面積指数(LAI)を3とした場合の作物個体群において、約50%の葉は光が制限された環境下で光合成を行っていることを報告している。また、最近 Pignon et al. (2017)は、トウモロコシおよび多年生のイネ科 *C₄* 作物である *Miscanthus × giganteus* における群落光合成速度を推定し、上層部と下層部における光合成効率を報告した。しかし、いずれの報告においても群落光合成に対する層別の光合成の具体的な貢献度についてはあまり触れていない。下層部の葉の光合成が個体群全体の光合成にどの程度貢献しているのかを明らかにすることは、トウモロコシにおける今後の収量性増大へのポテンシャルを考察する上で重要である。

そこで本章では、まず圃場で栽培されているトウモロコシ個体群における下位葉の光合成特性の弱光順応性を明らかにしようとした。次に個体群光合成モデルを用いて、トウモロコシ個体群において各層の光合成が群落全体の光合成にどの程度貢献しているのかを推定することを試みた。

材料および方法

栽培方法

トウモロコシの栽培は2016年、2017年の2年間、5月中旬～8月中旬にかけて九州大学箱崎キャンパス内の圃場で行い、P1690 (パイオニアエコサイエンス)を供試品種とした。播種日は2016年5月17日、2017年5月16日であった。施肥条件は福岡県飼料作物施肥基準に従い、窒素、リン酸、カリが基肥としてそれぞれ10aあたり10kgとなるように施肥し、5～6葉期に窒素およびリン酸をそれぞれ10aあたり10kgとなるように追肥した。施肥前に深さ10cm付近の土壌を採取後、農大式簡易土壌診断キットみどりくん(藤原製作所)を用いた土壌診断を行い、施肥量を決定した。2016年は条間を60cmに固定し、株間を調節することにより栽植密度を変化させ、60cm×24cmの慣行区(6.9本m²)および60cm×60cmの疎植区(2.8本m²)の2処理区を設けた。2017年は栽植密度60cm×24cmの慣行区のみとした。2016年度、2017年度のいずれにおいてもトウモロコシの全栽培面積13m×14mの圃場を3.6m×3.6mの9つのプロットに区画分けした後、それぞれに慣行区および疎植区を配分し、乱塊法に則って圃場試験を行った。雄穂が抽出し、個体群の形成が完了した子実肥大期について、以下の各項目を測定した。

光環境の測定

全天および個体群内における光強度を、光量子センサー(MIJ-14PAR Type2, 日本環境計測)を用いて測定した。2016年度は光合成測定葉の位置で日中の光強度の日変化を測定した。2017年度は全天光強度の日変化を測定した。

光合成ガス交換測定

測定方法は第3章と同様である。2016年度の測定条件は葉温33℃, 湿度60%,

CO₂ 濃度 400 μmol mol⁻¹ とした。また、2017 年度の測定ではチャンバー内の湿度が VPD<2 kPa となるように調節した。光強度は PFD を 0 μmol m⁻² s⁻¹ より徐々に高めていき、0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 250, 500, 800, 1100, 1500, 2000 μmol m⁻² s⁻¹ の 14 段階とした。2016 年度は上位葉(上から数えて第 3 葉目)および下位葉(上から数えて第 9 葉)について光合成ガス交換特性を測定した。また 2017 年度は様々な葉位の葉について光合成ガス交換特性を測定し、回帰式によって光合成ガス交換特性と葉内 N 含量との関係を得るのに用いた。なお、第 3 葉は上位葉の中でも特に高い P_N を有することを確認した上で上位葉として選定した。

生理学的特性

第 3 章と同様の方法により、光合成ガス交換を測定した葉を用いて Chl 含量、SLW および葉内 N 含量を調査した。2017 年度においては、層別刈り取り後の葉について、各層別の葉における Chl 含量、SLW および葉内 N 含量を測定した。

葉の形態的特性

2016 年度の光合成ガス交換測定葉を用いて、第 3 章と同様の方法により樹脂包埋した葉片から葉横断切片を作成して、葉厚と IVD を測定した。

個体群の構造特性

2017 年度の光合成ガス交換測定後に、60 cm×60 cm 区画について 20 cm 毎の層別に層別刈り取りを行った。光量子センサーで全天の光強度と同時に層別の光強度を各層当たり 10~20 点測定し、相対光強度を算出した。その後、個体群上部から同化器官(葉+枯死葉)と非同化器官(茎, 子実など)に分けて刈り取りを行った。刈り取ったサンプルは 80°C で完全に乾燥させた後、乾物重を測定した。葉は刈り取り後、速やかに水を張ったポリ袋に回収し、4°C で一晩冷蔵保存し、葉面積計(AAM-9, 林電工)を用いて葉面積を測定後乾燥させた。乾燥処理前の葉の一部

は Chl 含量および SLW の測定に用いた。また、乾物重測定後の葉は粉碎後、N 含量の測定に用いた。葉面積の測定後、層ごとに単位面積当たりの葉面積を示す LAI を算出した。

モデルによる個体群光合成速度の算出

・光のモデル

2017 年度のデータを用いて、モデルによる個体群光合成速度の算出を行った。方法については Hikosaka et al. (2016)の方法によった。

個体群における垂直方向の光強度は Beer-Lambert の法則に従い、以下の式によって近似できる(Monsi and Saeki, 1953)。

$$I = I_0 \exp(-KF) \quad (1)$$

ここで、 I はある葉層における光強度、 I_0 は個体群最上部の光強度を示し、 K は群落吸光係数、 F は積算葉面積指数を示す。また、ある葉層において葉群が受ける光強度 I_c は以下の式によって表せる。

$$I_c = I_0 K \exp(-KF)/(1-m) \quad (2)$$

ここで、 m は光の透過率あるいは反射率を示す。葉の光吸収率を α 、反射率を r 、透過率を t とすると、葉が受ける光は以下のように表せる。

$$\alpha + r + t = 1 \quad (3)$$

多くの葉では光の反射率および透過率は同程度の値を示すことから(彦坂, 2016), m は以下の式で表せる。

$$m = 1 - \alpha \quad (4)$$

光合成測定装置の LI-6400XT では、トウモロコシの葉の標準値として赤色光および青色光の光吸収率をそれぞれ 0.85, 0.90 としており、それをもとにした光合成ガス交換測定中の葉の光吸収率は以下の式によって算出される (LI-COR Biosciences, 2012)。

$$\alpha = [\alpha_{blue}B + \alpha_{red}(100 - B)] / 100 \quad (5)$$

ここで、 α_{blue} および α_{red} は青色光および赤色光の光吸収率を示し、 B は照射時の青色光の比率を示す。式(5)によって葉の光吸収率を計算した結果、ガス交換測定葉の光吸収率の平均値は 0.85 であったため、 $\alpha = 0.85$ 、また式(4)より $m = 0.15$ とした。

・光合成のモデル

光と個葉光合成速度の関係は、以下の非直角双曲線の式によって近似される。

$$P_N = [\Phi I' + P_{\max} - \{(\Phi I' + P_{\max})^2 - 4\Phi I' \theta P_{\max}\}^{1/2}] / 2\theta - R_d \quad (6)$$

ここで、 P_{\max} は光飽和時の光合成速度、 R_d は暗呼吸速度、 θ は光-光合成曲線の曲率を示す。

光合成ガス交換を測定して Φ および R_d を直線回帰によって求めた後、KaleidaGraph(Synergy Software)を用いて光-光合成曲線と式(6)のフィッティングを行うことにより P_{\max} と θ を算出した。その後、 P_{\max} 、 Φ 、 θ および R_d と葉内 N 含量との間で直線回帰を行うことで、以下の式が得られる(Hirose and Werger, 1987)。

$$P_{\max} = a_m + b_m N_L$$

$$\Phi = a_p + b_p N_L$$

$$\theta = a_t + b_t N_L$$

$$R_d = a_r + b_r N_L \quad (7)$$

ここで、 a_i および b_i は定数、また N_L は葉内 N 含量を示す。個体群各層における葉内 N 含量から式(7)を用いてそれぞれのパラメータを算出し、式(6)に代入することにより各層の P_N を算出した。

個体群の各層における P_N は LAI との積によって得られ、群落光合成速度(P_c)は個体群上部の光強度 I_0 に対する各層の P_N の総和として求めた。

統計解析

統計処理の方法は第 3 章と同様である。

結 果

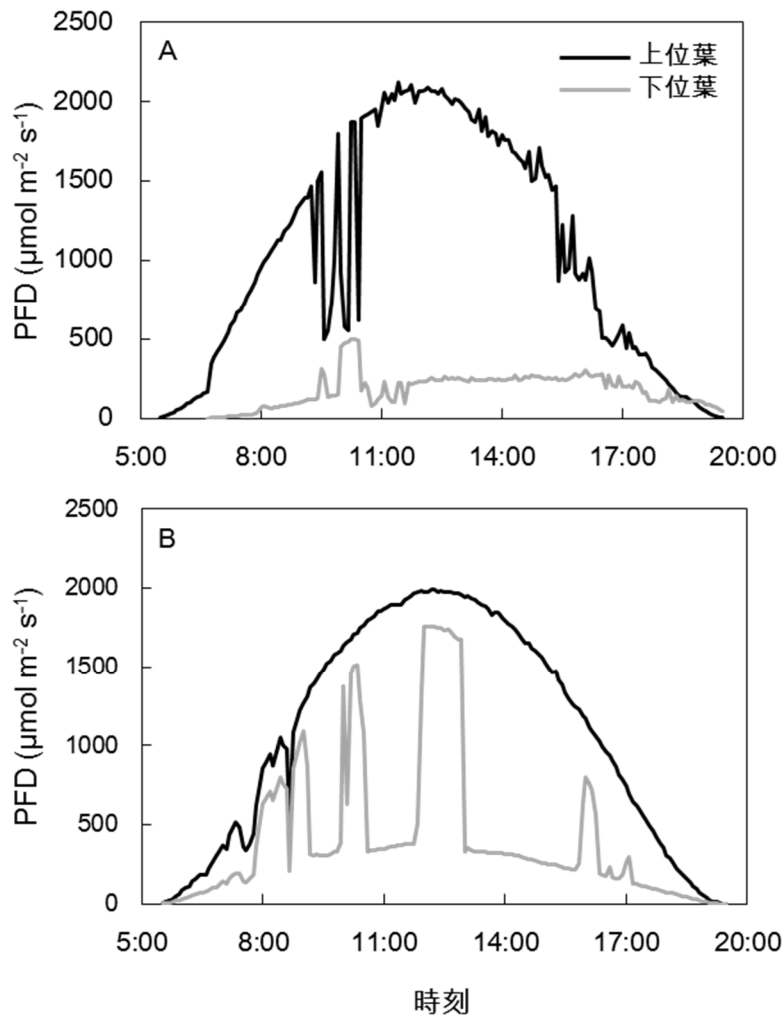
2016 年度実験

2016 年度実験において、下位葉(第 9 葉)における日中の相対的光強度の平均は慣行および疎植区においてそれぞれ上位葉(第 3 葉)の 16%、37%であった。光強度の日変化の詳細を見ると、慣行区の下位葉では常に弱光環境に置かれていたが、疎植区の下位葉では数十分～数時間、上位葉の 70～90%の強光が当たる時間帯が日に数回見られた(第 12 図 A, B)。

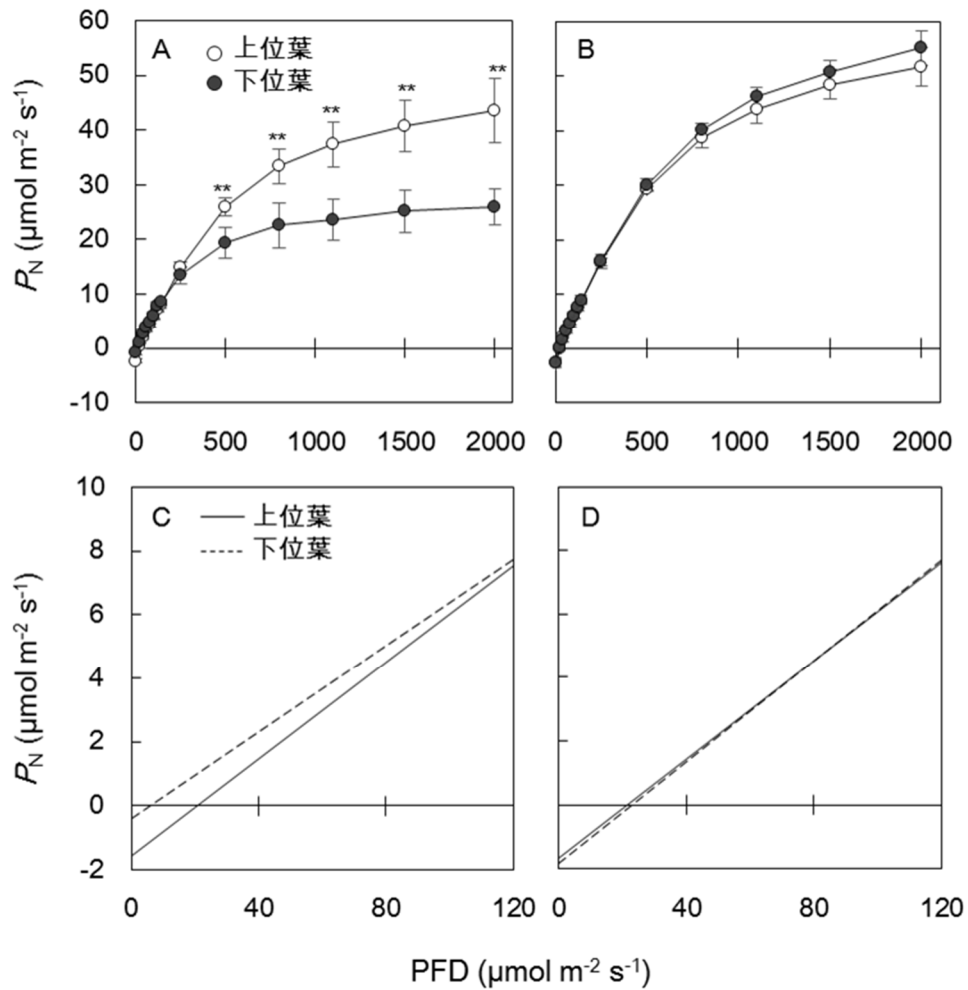
P_N を比較すると、慣行区では $PFD \geq 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で下位葉よりも上位葉が有意に高かったが、弱光下においては下位葉が上位葉を上回る傾向がみられた(第 13 図 A, C)。また、慣行区において Φ 、LCP および R_d などのガス交換パラメータは上位葉が下位葉よりも高かった(第 17 表)。疎植区においては、全光強度下において上位葉と下位葉の間で P_N に差は見られず(第 13 図 B, D)、 Φ 、LCP および R_d にも差はなかった(第 17 表)。

ガス交換特性以外の生理的特性については、慣行区では葉内 N 含量、Chl a/b 比および SLW は上位葉が下位葉よりも高かった(第 18 表)。Chl 含量は単位面積当たりでは差はなかったが、単位重量当たりでは下位葉が上位葉よりも高かった。疎植区では、葉内 N 含量は上位葉と下位葉に差はなかったが、Chl a/b 比および SLW は上位葉が下位葉よりも高かった。また Chl 含量は単位葉面積あたり、単位重量あたりのいずれも下位葉が上位葉よりも高かった(第 18 表)。

葉の形態的特性については、慣行区および疎植区の両処理区において、葉厚や IVD は上位葉と下位葉の間に差は見られなかった(第 19 表)。一方、葉の横断切片像を比較すると、BS 細胞内における葉緑体の占有面積は慣行区では上位葉が下位葉よりも大きかったが(第 14 図 A, C)、疎植区では上位葉と下位葉の間で明確な差は見られなかった(第 14 図 B, D)。



第 12 図. 慣行区(A)および疎植区(B)のトウモロコシ個体群の上位葉および下位葉における光強度の日変化.



第13図. 慣行区(A, C) および疎植区(B, D)のトウモロコシ個体群の上位葉および下位葉における光-光合成曲線. C, Dは弱光域の拡大図. 平均値 \pm SD. **は1%水準で有意差がある(t検定).

第 17 表. 慣行区および疎植区のトウモロコシ個体群の上位葉および下位葉における PFD が $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の時の光合成速度(P_{2000}), 量子収率(Φ), 光補償点(LCP)および暗呼吸速度(R_d)の比較.

栽植密度	葉位	P_{2000} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Φ (mol mol^{-1})	LCP ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	R_d ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
慣行区	上位葉	43.5±5.8	0.073±0.004	22.1±2.9	1.80±0.28
	下位葉	26.0±3.2 **	0.060±0.003 **	7.5±5.1 **	0.45±0.36 ***
疎植区	上位葉	51.6±3.6	0.072±0.004	23.2±5.1	2.08±0.64
	下位葉	55.2±3.2 NS	0.074±0.004 NS	23.9±6.5 NS	2.04±0.61 NS

, *はそれぞれ 1%, 0.1%水準で有意差がある(t 検定). NS は有意な差がない.

第 18 表. 慣行区および疎植区のトウモロコシ個体群の上位葉および下位葉における葉内窒素(N)含量, クロロフィル(Chl)含量, Chl a/b 比, および比葉重(SLW)の比較.

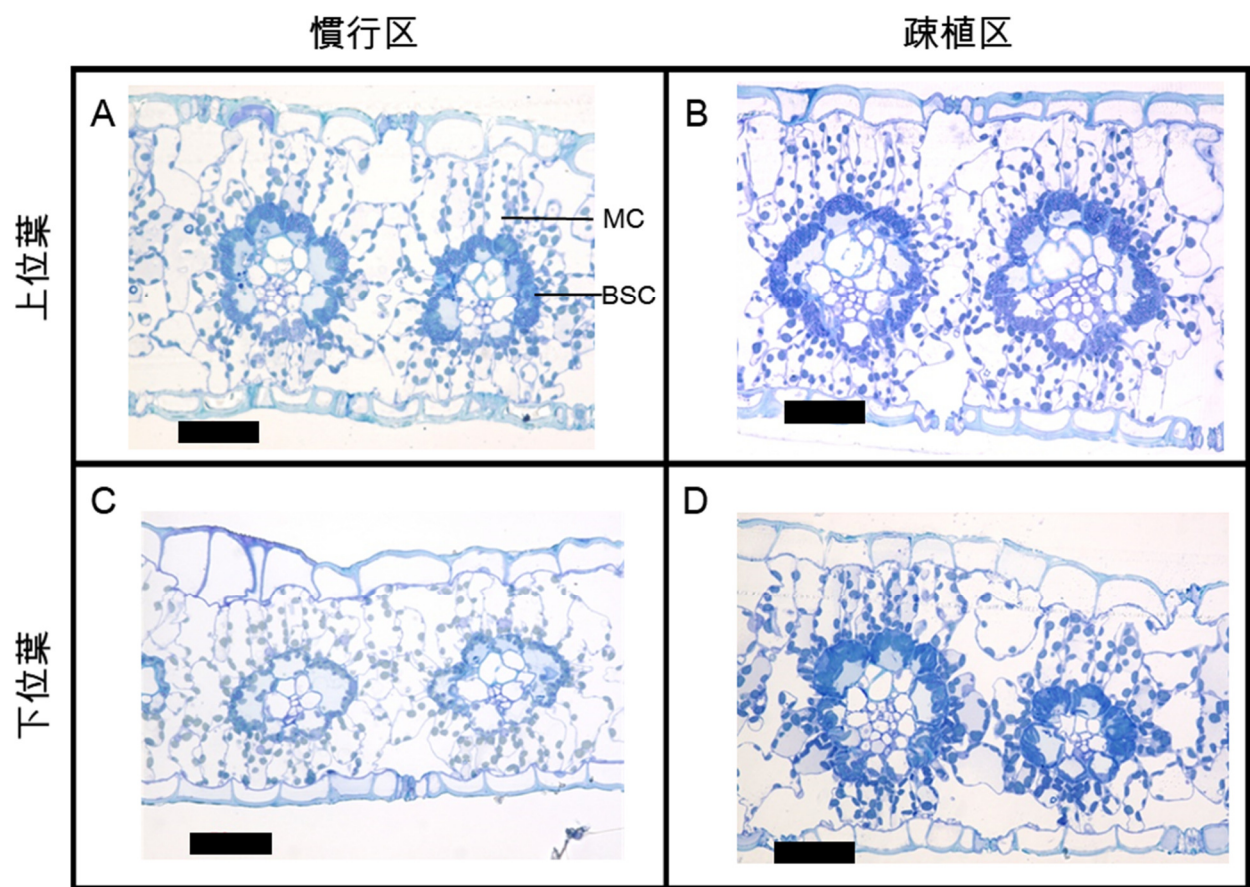
栽植密度	葉位	N含量	Chl含量		Chl a/b	SLW
		(mmol m ⁻²)	(mg m ⁻²)	(mg g ⁻¹ DW)	(ratio)	(g m ⁻²)
慣行区	上位葉	78.6±5.7	507±47	9.0±0.3	4.65±0.08	56.0±3.7
	下位葉	58.2±10.7 *	481±72 ^{NS}	12.3±0.4 ***	3.93±0.26 **	38.9±5.0 **
疎植区	上位葉	101.0±5.1	612±57	9.5±1.6	4.92±0.04	65.7±5.7
	下位葉	92.1±9.6 ^{NS}	722±58 *	15.5±1.5 **	4.01±0.16 ***	46.6±3.3 **

*, **, ***はそれぞれ 5%, 1%, 0.1%水準で有意差がある(t検定). NSは有意な差がない.

第 19 表. 慣行区および疎植区のトウモロコシ個体群の上位葉および下位葉における葉厚および維管束間距離(IVD)の比較.

栽植密度	葉位	葉厚 (μm)	IVD (μm)
慣行区	上位葉	181 \pm 10	131 \pm 8
	下位葉	176 \pm 20 ^{NS}	140 \pm 6 ^{NS}
疎植区	上位葉	219 \pm 7	139 \pm 7
	下位葉	205 \pm 11 ^{NS}	141 \pm 3 ^{NS}

NS は有意な差がない.



第 14 図. 慣行区および疎植区のトウモロコシ個体群における上位葉および下位葉の横断切片の比較. 慣行区上位葉, (B) 疎植区上位葉, (C) 慣行区下位葉, (D) 疎植区下位葉. 黒色のバーは 50 μm を示す. BSC, 維管束鞘細胞; MC, 葉肉細胞.

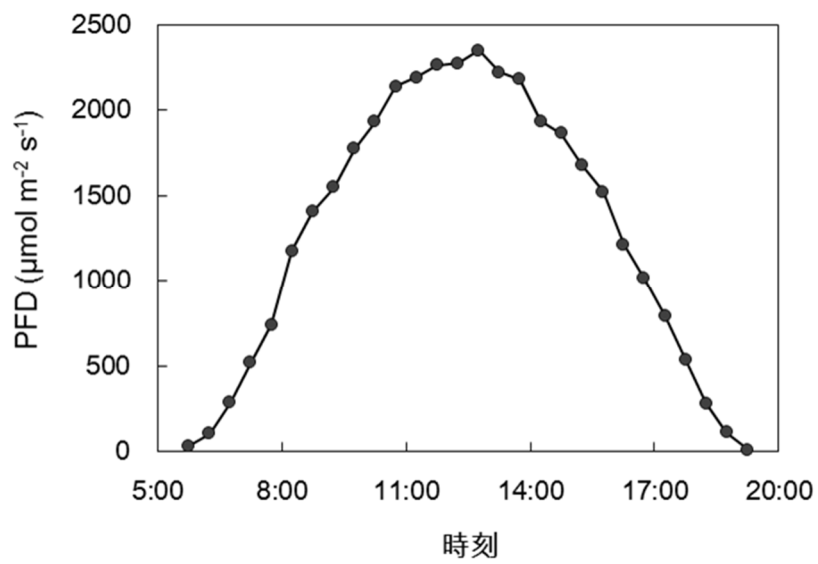
2017 年度実験

2017 年度実験において、光合成測定時期における日中の平均 PFD は約 $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、最大 PFD は約 $2350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった(第 15 図).

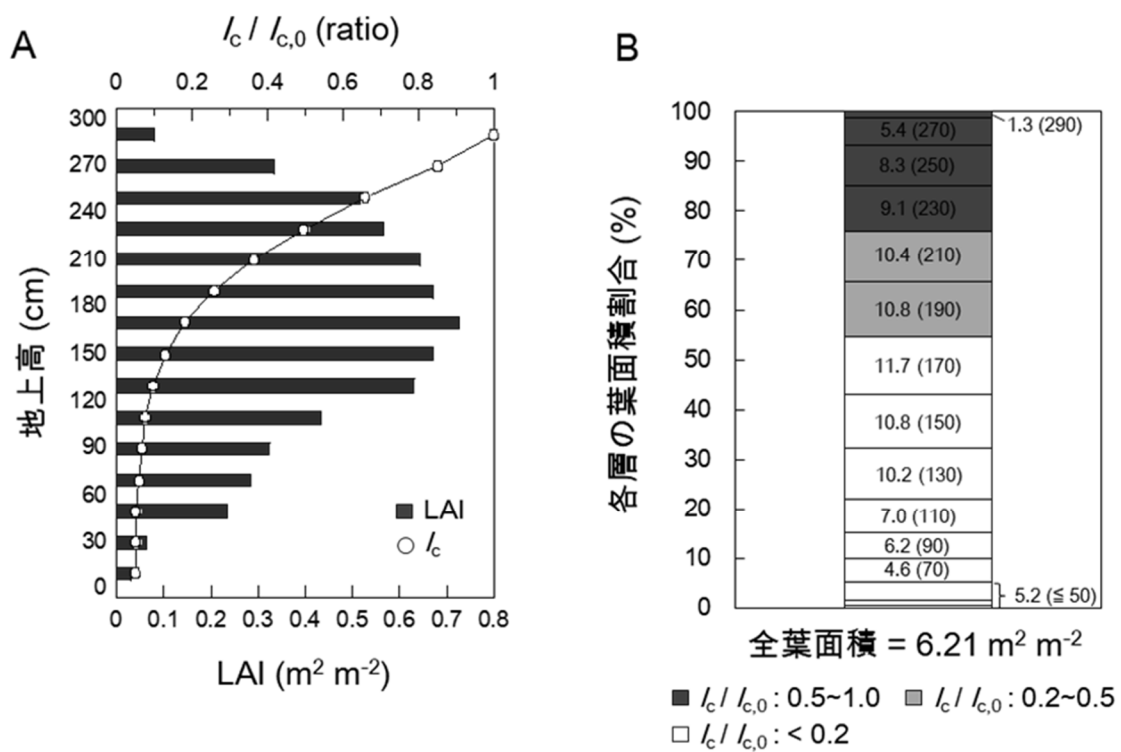
個体群内の相対照度および葉面積を測定し、式(1)をもとに K を算出したところ、 $K=0.494$ となった. また、各層の葉面積を測定後 LAI を算出し、式(2)によって各層の葉が受ける光強度 I_c を算出した. I_c の相対値と各層の LAI の関係を第 15 図に示した. 個体群における LAI の分布は 190 cm の層をピークとした山型であった(第 16 図 A). I_c の相対値($I_c/I_{c,0}$)は、個体群最上層から 150 cm 層まで急激に低下しており、230 cm 層で最上層の約 50%、また 170 cm 層以下では 20%以下であった(第 16 図 A). また、個体群全体の葉面積に占める各層の葉面積の割合は最上層から 230 cm 層で約 24%、230~190 cm 層で約 21%、170 cm 層以下では 55%であった(第 16 図 B).

層別の葉における生理的特性については、葉内 N 含量および SLW は上層から下層にいくに従って低下する傾向が見られた(第 17, 18 図). ただし、葉内 N 含量については最上層部がいく分低い傾向を示した(第 17 図). Chl 含量は、葉面積当たりでは上層部と下層部で大きな差は見られず、葉の乾物重当たりでは下層部にいくに従って増加する傾向が見られたが、両パラメータともに最下層付近では低下した(第 19 図 A, B). Chl a/b 比は最上層から 230 cm 層までは上層から下層にいくに従って低下する傾向が見られたが、それ以下では一定の低い値を維持した(第 19 図 C).

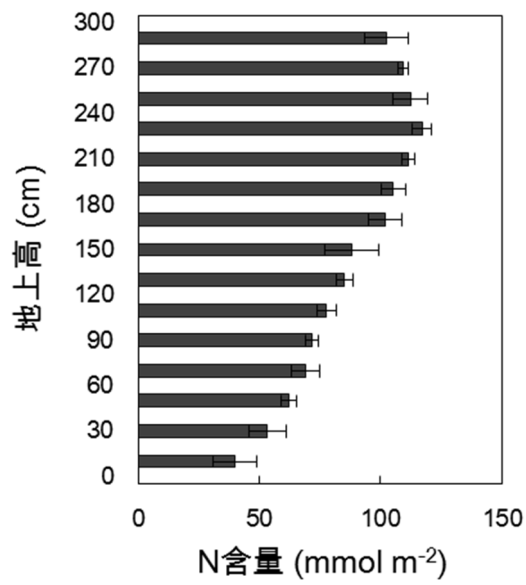
個体群内の様々な位置の葉の光-光合成曲線を作成し、群落光合成の算出に必要な P_{\max} , Φ , θ および R_d を得た後、それぞれのパラメータと葉内 N 含量の関係を得た(第 20 図). P_{\max} , Φ および R_d は葉内 N 含量との間に正の相関があり、 θ と葉内 N 含量との間には負の相関があった. また 4 つのパラメータと葉内 N 含量との直線回帰によって、それぞれのパラメータに関して以下に示す葉内 N 含量の関数を得た.



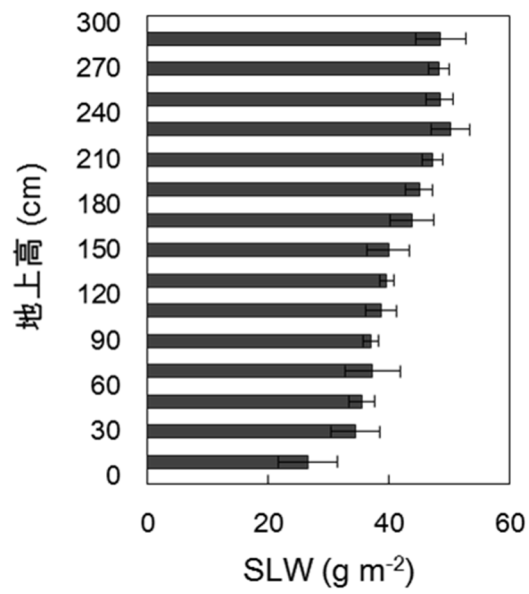
第 15 図. 2017 年度の光合成測定時期の全天光強度の日変化.



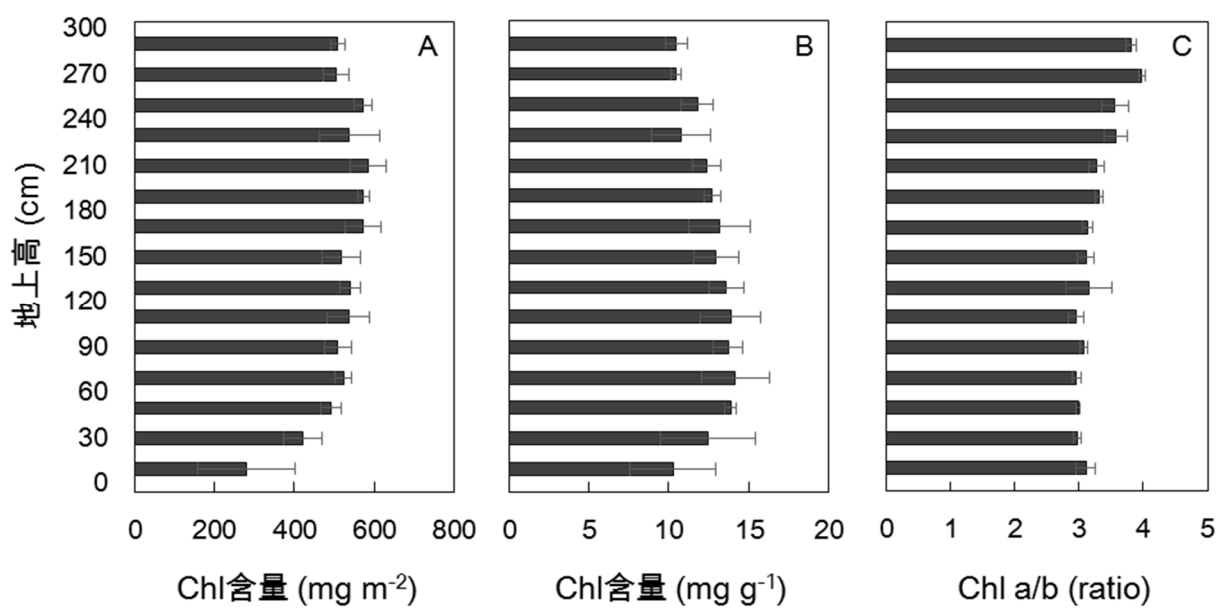
第 16 図. トウモロコシ個体群(慣行区)における層別の葉面積指数(LAI)の分布と相対的光強度($I_c/I_{c,0}$)との関係(A)および全葉面積に対する各層の葉面積の割合(B). B の棒内の数値は各層の全体に対する割合(%), ()内の数値は各層の高さ(cm)を示す.



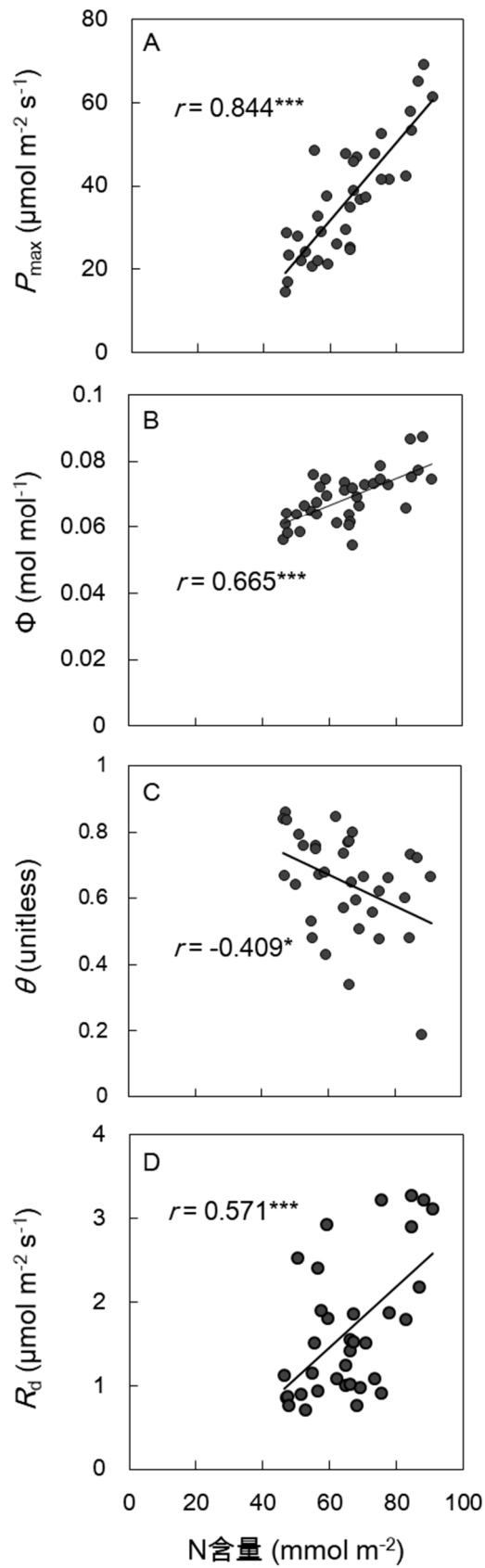
第17図. トウモロコシ個体群(慣行区)における層別の葉内窒素(N)含量. 平均値±SD.



第 18 図. トウモロコシ個体群(慣行区)における層別の比葉重(SLW). 平均値±SD.



第 19 図. トウモロコシ個体群(慣行区)における層別の葉面積当たり(A), 葉乾物重量当たり(B)のクロロフィル(Chl)含量および Chl a/b 比(C). 平均値±SD.



第 20 図. トウモロコシ個体群(慣行区)における個葉の葉内 N 含量と光飽和光合成速度(P_{\max} ; A), 量子収率(Φ ; B), 光-光合成曲線の曲率(θ ; C)および暗呼吸速度(R_d ; D)との関係. *, ***はそれぞれ 5%, 0.1%水準で有意な相関がある.

$$P_{\max} = -24.372 + 0.9356 N \quad (r = 0.844, P < 0.001)$$

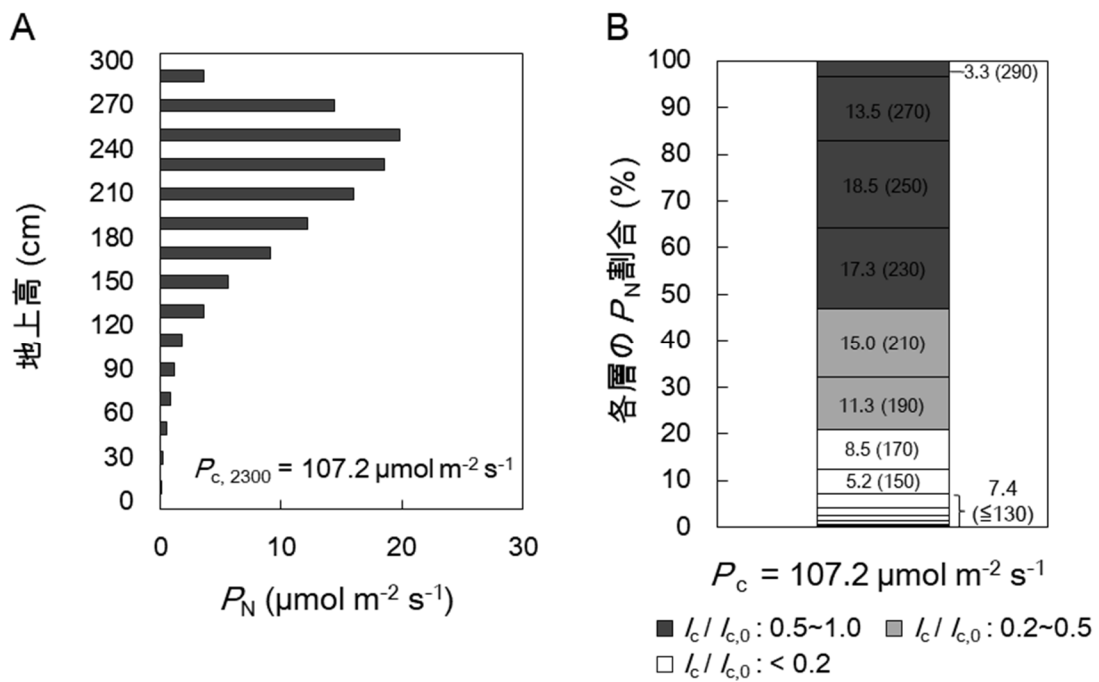
$$\Phi = 0.0421 + 0.0004 N \quad (r = 0.665, P < 0.001)$$

$$\theta = 0.9617 + 0.0048 N \quad (r = -0.409, P < 0.05)$$

$$R_d = -0.7291 + 0.0363 N \quad (r = 0.571, P < 0.001)$$

これらの関数と層別の葉内 N 含量から、葉の 4 つのパラメータを算出後、式(6)に代入した。

群落光合成速度を算出した結果、日中最大 PFD 下における P_c は $107.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった(第 21 図 A)。 P_c の内訳に着目すると、層別の P_N は最上層から深くなるにつれて上昇し、250 cm 層において最大値を示した後、それ以下の層で徐々に低下していった(第 21 図 A)。 P_c に占める各層の P_N の割合を見ると、最上層が受ける光の 50%以上を受け最上層から 230 cm 層までの P_N が、 P_c の 53%という高い割合を担っていた(第 21 図 B)。一方、それ以下の層の P_N の割合は、最上層の 20~50%以下の光を受け 210~190 cm 層および 20%以下の光を受け 170 cm 層以下ではそれぞれ P_c の 26%および 21%程度であった(第 21 図 B)。



第 21 図. トウモロコシ個体群(慣行区)における $\text{PFD} = 2300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の時の層別の光合成速度(P_N)および群落光合成速度(P_c ; A)および層別の P_N の P_c に対する割合(B). B の棒内の数値は各層の P_N の P_c に対する割合(%), ()内の数値は各層の高さ(cm)を示す.

考察

2016 年度の実験では、慣行区の上位葉と下位葉における光環境に差がみられた(第 12 図 A). また慣行区の上位葉と下位葉では光合成ガス交換特性やその他の生理的特性および葉内部の構造にも差がみられ(第 13, 14 図; 第 17-19 表), 下位葉の特徴は第 3 章における H-L 葉の特徴と類似していた. よって第 3 章の H-L 葉において見られた葉の展開後の光合成特性の弱光順応は、圃場環境下のトウモロコシ個体群の下位葉でも実際に起こっていることが明らかとなった.

疎植区においても上位葉と下位葉における光環境には慣行区ほど大きくはなかったものの差がみられ、日中の平均光強度は 37%に低下していた(第 12 図 B). しかし、疎植区の下位葉では、日中の太陽の角度の変化によって上位葉による遮光を受けない時間帯があり、その間は上位葉が受ける光強度に近い光を受けていた. 一定期間の強光の存在は、疎植区の下位葉が光合成をはじめとして上位葉と同等の特性を有していた理由の一つであると考えられる. また、光環境以外の理由として、疎植区では慣行区に比べ栽植密度が低いことから、植物体の栄養状態がよく、そのため下位葉の老化の進行が遅れた可能性も考えられる. しかし、Ma et al. (2017)は *M. × giganteus* を用いた実験の中で、高 N 条件下でも弱光条件に曝した個体の光合成能力は強光条件の個体よりも低く、栄養状態が良い場合でも光環境が著しく変化すれば光合成能力に影響することを示している. したがって、本実験で疎植区の上位葉と下位葉の光合成ガス交換特性に差がなかったのは、栽植密度を変化させたことによる光環境の変化が主な要因であると考えられた.

2016 年度の実験において、慣行区の下位葉は上位葉よりも Φ が低下した(第 17 表). Φ は光合成の光利用効率の指標として用いられており、 Φ が高いことは特に弱光環境下や群落レベルの光合成において重要であると考えられている(Long et al., 1993; Ehleringer et al., 1997). 植物の Φ に関する報告は多く見られ、弱光下で育成した植物に関しては維持あるいは向上したという報告があり(Ehleringer and

Pearcy, 1983; Ward and Woolhouse, 1986a; Tazoe et al., 2008; Pengelly et al., 2010), 個体群レベルにおいては, コムギやオート麦では下層部において Φ を維持したという報告がある(Beyschlag et al., 1990). しかし, 最近, Pignou et al. (2017)はトウモロコシおよび *M. × giganteus* の個体群を上層と下層に分けて詳細に解析して, 下位葉の Φ は上位葉よりも低下することを明らかにしており, 本実験の結果と一致している. また, Kromdijk et al.(2008)も *M. × giganteus* 個体群下層部の葉では Φ は低下する傾向を示すことを認めている. 弱光下で Φ が維持されたという報告のほとんどは, 寒冷紗などを用いた人工的な弱光環境下で形成された陰葉による結果である. また, Beyschlag et al. (1990)が実験したコムギやオート麦は C_3 植物であるが, C_3 および C_4 などの光合成型の違いが圃場環境下の弱光への順応性の差に影響している可能性が示唆されている(Kephart et al., 1992). 圃場環境での個体群下位葉では, 光強度以外の環境要因や老化なども Φ に大きく関わっていると考えられるため, 遮光処理実験のような弱光下で生育した植物から得られた結果とは異なり, 個体群下位葉で Φ が低下することは妥当であると考えられる.

2016年度の実験では, 慣行区および疎植区において上位葉よりも下位葉の方が Chl a/b 比は低く, Chl 含量は上位葉と同等あるいは上位葉より高かった(第 18 表). この傾向は 2017 年度の実験における慣行区の上層部と下層部の比較においてもほぼ同様であった(第 19 図). Chl 含量の増加および Chl a/b 比の低下は弱光環境下で生育した植物の葉(陰葉)で見られ, これにより光捕集効率が高まると考えられている(Björkman, 1981; Givnish, 1988). 作物個体群においては葉の相互遮蔽の影響により下層部が弱光環境に置かれるため, 光勾配に応じた個体群下層部の Chl a/b 比の低下は多くの作物で観察されている(Evans, 1993; Li et al. 2015; Li et al., 2015).

2017年度の実験では, 直接光と散乱光を区別しない多層モデルを用いることにより群落光合成速度を算出した. 非直角双曲線式(6)に代入するパラメータと N 含量との間に有意な相関が見られたことから(第 20 図), 一定の信頼性をもって群落光合成速度を推定できたと評価されよう. これまでに多様な方法で群落光合成の

モデリングが行われており、本実験と同様のモデルを用いた群落光合成に関する報告が多数見られる(Hirose and Werger, 1987; Hikosaka et al. 1998, 2003; Tominaga et al., 2015). 一方で、本実験のように全ての光を Lambert-Beer 則に従い減衰する散乱光であると仮定する方法は、より実際の光環境に近い直達光、散乱光を想定した光モデルを使用した場合に比べ、個体群に降り注ぐ光強度が高い場合の群落光合成速度を過大評価しているという指摘もある(Hikosaka, 2016). したがって、本研究における個体群光合成を解釈する場合その点について留意が必要であり、また今後正確な個体群光合成速度を推定する上では、光要因についてさらなる検討が必要である.

本研究では、日中最大光強度(PFD=2300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)における P_c は 103.6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であり(第 21 図 A), またその時の個体群における積算 LAI は約 6.2 であった(第 16 図). Wei et al. (2016)は、複数の土壌 N 処理区で育成したトウモロコシ個体群について、正午を挟んだ強光時の個体群光合成速度を実測しているが、LAI が 6 付近の個体群における P_c は 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度と報告している. また、Liu et al. (2015)は、LAI が 6~7 前半のトウモロコシ個体群における昼間の強光時の P_c (実測値)を 60~70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度としている. しかし、後者は上位葉を取り除く処理を行っており、さらに栽植密度が本実験の約 1.5 倍とかなり大きいため、 P_c は理想的な条件より低下していると推察される. 本研究において推定された P_c は、上述のように幾分過大評価している可能性があるものの、ほぼ妥当な値ではないかと考えられた.

2017 年度実験では、トウモロコシ個体群全体の光合成(P_c)に対する各層における光合成の割合を算出した. 日中最大 PFD 時のトウモロコシ個体群の P_c のうち、最上層の 50%以下の PFD で行われる光合成が約半分を担っていることが明らかとなり(第 21 図 B), またその葉面積の割合は約 76%と大きかった(第 21 図 B). Long (1993)は群落光合成モデルにより作物個体群の光合成量をシミュレーションし、LAI が 3 の作物個体群において遮光された葉が行う光合成量は日中を通し

て全体の約 45%と推定している。また、LAI が 5 の作物個体群においては直接光が当たる葉が行う光合成量は日中最大 PFD 時で全体の約 40%以下であるとしている。また、Kromdijk et al. (2008)は、*M. × giganteus* の個体群ではかなりの葉が弱光下で光合成を行っていることを示している。これらの結果は、作物個体群では弱光下に置かれている葉の割合が多く、弱光下の光合成能を高めたり効率化することが個体群全体の光合成にを向上させる上で重要であることを示唆している。

摘 要

前章で見出されたトウモロコシの葉の弱光順応が、実際の圃場環境で栽培されているトウモロコシ個体群でも同様に起こっているのかを検討した。また、トウモロコシ個体群の下層部の葉が実際の個体群全体の光合成にどの程度寄与しているのかを群落光合成モデルを用いて推定した。

1. 個体群下層部の光強度を変化させるために栽植密度を変えた慣行区と疎植区を設けてトウモロコシ個体群を育成した。下位葉の受ける光強度は慣行区と疎植区でそれぞれ上位葉の 16%, 37%であった。また、疎植区の下位葉では上位葉の 70~90%の光が当たる時間帯が日に数回見られたが、慣行区では見られなかった。
2. 慣行区では、PFD が $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上の強光域で上位葉の P_N は下位葉の P_N よりも高かったが、それ以下の弱光域では上位葉の P_N より下位葉の P_N が高い傾向が見られた。また、 Φ , LCP および R_d は上位葉が下位葉よりも高かった。疎植区では上位葉と下位葉の間でガス交換パラメータに有意な差はなかった。
3. 慣行区では葉内 N 含量, Chl a/b 比および SLW は上位葉が下位葉よりも高かったが、Chl 含量は単位葉面積あたりでは差がなく、葉の乾物重あたりでは上位葉よりも下位葉が高かった。疎植区では上位葉と下位葉の間でいずれのパラメータ間にも差は見られなかった。
4. 葉厚や IVD などの葉の形態的特性は、慣行区および疎植区において上位葉

と下位葉の間に差は見られなかった。一方、BSCにおける葉緑体の占有率は慣行区では上位葉が下位葉よりも大きかったが、疎植区では上位葉と下位葉の間に明確な差はなかった。

5. 光合成ガス交換特性、その他の生理的特性および葉の形態学的特性のいずれにおいても、慣行区の下位葉の特徴は第3章におけるH-L葉の特徴と類似していたが、疎植区の下位葉ではそのような傾向は見られなかった。したがって、第3章において見出された光合成特性の弱光順応は、慣行区のトウモロコシ個体群下層部の葉でも同様に起こっていると結論づけられた。
6. 次に、個体群下層部の光合成を評価するために、圃場で慣行区と同じ栽植密度でトウモロコシを育成した。この個体群では、光合成測定時期における日中の平均 PFD は約 $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、最大 PFD は約 $2350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。
7. トウモロコシ個体群における層別の LAI 分布は 190 cm をピークとした山型であった。層別の相対的 I_c は個体群最上層から 150 cm 層までに急激に低下し、230 cm 層で最上層の 50%、170 cm 層以下では 20%以下となった。また、個体群の全葉面積のうち、個体群最上層の PFD の 100~50%の光を受けるとする葉面積の割合は 24%となり、同様に最上層の PFD の 50~20%および 20%以下の光を受けるとする葉面積の割合はそれぞれ 21%および 55%であった。
8. 層別の生理学的パラメータについては、葉内 N 含量が最上層部で幾分低い値を示した以外は、葉内 N 含量および SLW は上層から下層に向かうにしたがって低下する傾向が見られた。一方、Chl 含量は葉面積あたりでは上層部と

下層部で大きな差はなかったが、葉の乾物重あたりでは下層に向かうにしたがって増加する傾向が見られた。また、Chl a/b 比は最上層から 230 cm 層までは低下する傾向が見られたが、それより下層ではほとんど一定の低い値を示した。以上の結果から、上層から下層に向かうにしたがい、葉内タンパク含量を低下させながら、一方で光捕集能を積極的に高めているものと考えられた。

9. 個体群に降り注ぐ光を散乱光と仮定した多層モデルによる個体群光合成速度 P_c を算出した結果、日中最大 PFD 下の P_c は $103.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。また、 P_c に対する層別の P_N の割合は、個体群最上層の PFD の 100~50%の光を受ける最上層から 230 cm 層までで 53%となった。また最上層の 20~50%以下の光を受ける 210~190 cm 層および 20%以下の光を受ける 170 cm 層以下では、それぞれ P_c の 26%および 21%であった。
10. 以上の結果より、トウモロコシの個体群における全葉面積の約 3/4 の葉は最上層の 50%以下の光強度で光合成を行っており、またそれらが個体群光合成に占める割合は全体の約半分程度と大きいことが示された。

第5章 総合考察

世界的な人口増加による食料需要の増加，資源の枯渇，温暖化などの環境問題が深刻化する中で，作物の生産性の向上とともに，資源低投入および環境保全型の農業体系の確立が求められている．それらを達成するためには，あらゆる視点から作物の生産性の向上を試みる必要があるだろう．本章では，第2~4章で得られた実験結果を総合的に踏まえた上で，今後のトウモロコシおよびC₄作物における光合成および生産性の向上の取り組みの必要性と展望を考察したい．

本研究では，第2章において，トウモロコシの個葉の最大光合成能力および資源利用効率を高める上での知見を得た．また第3，4章ではトウモロコシの個葉および個体群の弱光環境における光合成能力を高める上での基礎的知見を得た．光合成能力を高めることによる作物の生産性向上の試みは，過去から現在に至るまで数多く行われている．その一方で，その実現の可能性については常に議論が絶えない．その理由として，多くの作物において光合成と収量の間には明確な関連性が見られないこと，作物の収量性は光合成能力だけではなく，むしろ光合成産物の行き先となるシンクによってより強い制限を受けていることなどが指摘されている(Zhu et al., 2010)．その他，これまでの光合成と収量性に関する研究の多くが，主に個葉の最大光合成能力に着目して行われてきたことも大きな原因であろう．実際の栽培環境下で個葉の最大光合成能力を生かせるのは，個体群上層部の葉など全体の一部であり，さらに一日の中でも昼間の太陽高度が高い時間帯のみだからである．しかし，実際に光合成能力が収量性に関与していることを示す報告があることもまた事実である(Murata, 1981; Fischer et al., 1998; Ding et al., 2005, 2007)．Zhu et al. (2010)は，Monteith (1977)の式においてこれまでに収量性を高めてきた主な要因である ϵ_i や ϵ_p を今後向上させることはほとんど期待できないとしている．したがって，今後作物の収量性を高めていく上で ϵ_c ，すなわち光合成能力やその効率を高める研究は不可欠といえ，またこれまでにその取り組みが充分

に達成されていないことを踏まえると、より魅力的な研究課題であることは疑いなかろう。ただし、従来行われてきた個葉の最大光合成能力に着目した研究のみならず、作物の個体群レベルで実際に経験するあらゆる環境下を想定し、光合成能力を高める必要があるだろう。その意味では、個葉の最大光合成能力は、強光の当たる個体群上層部の光合成を考える上で重要であり、引き続き高めるための努力が必要であろう。また、今後の課題である資源低投入下での作物の生産性の向上を図る上では、光合成能を高めると同時に光合成資源利用効率を高める必要性も大きいと考えられる。

光合成能力の向上による生産性の高い品種の育成を目指すとき、遺伝資源の多様性に着目することは重要である(Flood et al., 2011)。これまでに作物の栽培化や品種改良は、主に十分な施肥条件の下で収量を増大させるという観点から行われてきているが、そのような一定の方向性に限定された品種改良の結果、栽培品種の持つ遺伝的多様性は徐々に狭まってきた(Zamir, 2001; Zhang et al., 2017)。そのような背景とともに、これまでに光合成能力を高めることによる作物の生産性の向上が成功していないことを踏まえると、これまで収量性に直接関わらなかったがために、優れた光合成能力を有する品種やそれに関わる有用な形質なども栽培化の過程で失われてきた可能性があるだろう。したがって今後、光合成能力による生産性の向上に取り組む上で、大規模に遺伝資源を再調査することは意義があるかも知れない。また、その際には理想的な栽培環境を想定するだけでなく、今後の作物生産が経験すると考えられる環境(資源低投入、高 CO₂ 大気条件など)を想定して、資源利用効率などにも着目しながら研究を進めていくことも重要であろう。

前述のような遺伝資源の多様化という面では作物の野生種(近縁種)は重要である。作物の野生種は品種改良を進めていくための遺伝資源として重要であることは古くから指摘されているが、分子生物学的手法や育種技術の発達により遺伝的情報を利用しやすくなったことや、以前に比べ遠縁の交雑も容易となったことにより、その利用度は高まっている(Hajjar an Hodgkin, 2007)。作物の野生種は、作物

が栽培されている環境と比較すると過酷な環境で生育していることが多く、そのような環境下で生存競争をしていく上で有用な形質を有していることも多い (Hamaoka et al., 2013; Scafaro et al., 2010). そのような観点から本研究では、トウモロコシおよびその野生種であるテオシント 4 種についても供試し、光合成能力や資源利用効率について検討した(第 2 章). これまでにイネ(Scafaro et al., 2010), コムギ(Munns et al., 2012)およびダイズ(Li et al., 2008)などの主要作物の育種において野生種の有用形質を導入することに成功した例が見られる. また、トウモロコシにおいても実際に野生種の有用形質を利用した改良研究がなされており、*Z. nigaraguensis* の有する耐湿性に関わる QTL を導入することにより耐湿性の高い F₁ 系統が得られている(Mano and Omori, 2015). 本実験においては、*Z. nicaraguensis* を除くテオシントは PWUE が高い傾向にあった(第 2 章). このような結果は、野生種を利用することによる品種改良の可能性を示唆するものである.

近年では、分子生物学的手法の発達に伴い、形質転換体を用いることにより光合成能力の制御要因を明らかにする試みが行われている. von Caemmerer and Furbank (2016)は C₄ 植物の光合成能を高めるための要因について詳細に検討し、PEPC による炭酸固定過程、Rubisco タンパク質の活性および CO₂ 親和性、PEP の再生産過程、CO₂ の拡散過程および電子伝達活性などを挙げている. しかし、*Flaveria bidentis* のような遺伝子操作が可能なモデル C₄ 植物における C₄ 光合成の制御要因が明らかになったとしても、それが他の C₄ 植物にも当てはまるのかは明らかではない. また、本研究のトウモロコシでは SLW は P_N の制御要因ではないことが示されたが、Tsutsumi et al. (2017)はアマランサス属において両者に相関性を見出している. 逆に、本研究で P_N と C₄ 酸脱炭酸酵素活性との間に見られた正の相関関係は、アマランサス属においては見られなかった(Tsutsumi et al., 2017). 他の様々な特性についても同様の相反する事象が見られる可能性は大いにあろう. よって、C₄ 光合成の制御要因として可能性が示されているものばかりでなく、そうでない形質についても目を向けて、品種間や種間で関係性を検証するこ

とは今後も重要であると考えられる。

本研究では、初めて NADP-ME 型 C₄ 植物における PCK 活性の系統間差を調査した(第 2 章)。現在のところ、NADP-ME 型 C₄ 植物が PCK 活性を有することの生理学的意義は知られていない。Sharwood et al. (2014)はトウモロコシにおいて塩ストレスまたは遮光下で、C₄ 化合物の脱炭酸反応における NADP-ME 活性に対する PCK 活性の比率が変化することを報告している。したがって、2 種類の C₄ 酸脱炭酸酵素は、環境条件に応じて相互に補完し合っているのかもしれない(Bellasio and Griffiths, 2014)。トウモロコシの PCK は明暗条件によって調節されるリン酸化部位を有しておらず、暗黒条件下でも活性を維持している(Walker et al., 2002)。また、BSC 内で PCK によって脱炭酸された C₄ 酸は PEP に変換されるため、PPDK によるピルビン酸から PEP への合成反応をバイパスでき、この反応過程で必要となる ATP を節約できることが考えられる(Kanai and Edwards, 1999)。よって CO₂ 固定に対する ATP 利用効率が高くなる可能性があり、このことは PCK 活性をもつ NADP-ME 型 C₄ 植物では、PCK は弱光のような光エネルギーが制限される環境における光合成の効率化に関わっている可能性を示唆している。また、PPDK による PEP の再生産過程は、C₄ 光合成の律速要因の一つとしても挙げられていることから(Usuda et al., 1984; Wang et al., 2008; von Caemmerer and Furbank, 2016)、PCK の働きによって PPDK の働きが一部補助されることにより、光合成の効率化に寄与しているのかもしれない。このように、NADP-ME 型 C₄ 植物における PCK の役割についてはいくつかの可能性が考えられ、今後さらなる研究が必要とされる。

第 3, 4 章では、トウモロコシの展開後の葉の弱光順応性について個葉レベルで明らかにしたが、これまでに C₄ 植物におけるこのような現象を葉の微細構造を含めて調査した例はほとんど見あたらず、今回、新たな知見が得られた。現在の作物栽培においては、過去に比べより高密度に栽植されるようになってきており(Richards, 2000)、作物の品種改良もそれを念頭に行われてきたが、このことはトウモロコシにおいても同様である(Duvick et al., 2004)。高密度栽培では、植物個体

同士の相互遮蔽が大きくなり、弱光環境が多くなることが予想される。このような中で個体群としての光合成能力を高めるという点では、葉の角度をより垂直に近づけるなど、個体群の構造的特性の改良により光捕集能を高めることが行われてきた。これから引き続き高密度の作物栽培が行われていく中で、今後のトウモロコシにおける育種目標として、弱光への耐性が掲げられている(Duvick et al., 2004)。作物個体群の弱光環境における光合成特性の改善がもたらす潜在的意義を考えると、今後この視点に基づく密植栽培適応品種の作出が期待されるだろう。本研究はトウモロコシにおける弱光順応機構の一端を明らかにしたものであるが、これらの知見をもとに光合成の弱光順応性という見地から、より密植栽培に適した品種の作出が可能になるかもしれない。

本研究では、群落光合成モデルを利用して、個体群下層部において多くの葉が弱光環境下での光合成を強いられていることを明らかにし、それらが作物の生産性に与える影響は大きいことを示した(第4章)。Long (1993)も弱光環境下の光合成効率を高めることが作物の生産性を高める上で重要であることをシミュレーションによって示している。群落下層部などの弱光環境下の光合成において有利な個葉レベルの特性として、 Φ が高く、 R_d が低いこと(Pearcy, 1998)、時折差し込む変動光(サンフレック)を効率的に利用できることなどが挙げられる(Lawson et al., 2012)。さらに、 C_4 植物においてはBSCからの CO_2 漏出を抑制することも重要である(Kromdijk et al., 2014; Sage et al., 2014)。実際の作物個体群における下層部の葉の弱光順応を考慮した上で、これらの要因を改良していくことは、トウモロコシ個体群下層部における光合成効率を高めることにつながる可能性があるだろう。

謝 辞

本研究を遂行および取りまとめるにあたり，終始懇切丁寧な御指導，御助言を賜った九州大学大学院農学研究院植物生産生理学分野教授，上野修博士に篤く感謝の意を表します．

また，本研究の遂行および取りまとめるにあたり，有意義な御助言と御校閲を頂いた，九州大学大学院農学研究院植物生産生理学分野准教授，齋藤和幸博士に篤く御礼申し上げます．

学位論文の作成にあたり，貴重な御助言と御校閲頂いた九州大学農学研究院農業生産生態学分野教授，望月俊宏博士に篤く御礼申し上げます．

また，本研究の遂行にあたり，有意義な御助言および御激励を頂いた九州大学大学院作物学分野助教，濱岡範光博士，北海道大学大学院農学研究院作物学研究室助教，中島大賢博士に心より感謝申し上げます．

本研究の遂行にあたり，多大な御協力を頂いた九州大学農学部植物生産生理学研究室卒業生の赤松沙耶氏並びに同研究室学部４年生の田坂朋子氏に深く感謝致します．

本研究に取り組むにあたり，御援助および御激励を頂いた，九州大学植物生産生理学研究室卒業生の畠山友翔氏をはじめとした同研究室諸先輩方並びに卒業生諸氏に深く感謝申し上げます．

さらに本研究の遂行にあたり，御援助および御激励頂いた九州大学生物資源環境科学府植物生産生理学研究室修士課程の大野じゅみん氏，依光由記氏，田中幹大氏をはじめ，同研究室の４年生諸氏並びに金谷知美氏をはじめとした同研究室事務職員各位に深く感謝致します．

引用文献

- Anderson, J. M. (1999). Insights into the consequences of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26, 625–639.
- Anderson, J. M., Chow, W. S., & De Las Rivas, J. (2008). Dynamic flexibility in the structure and function of photosystem II in higher plant thylakoid membranes: the grana enigma. *Photosynthesis Research*, 98, 575–587.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplast: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1–15, 1949.
- Arrivault, S., Obata, T., Szecówka, M., Mengin, V., Guenther, M., Hoehne, M., Fernie, A. R., & Stitt, M. (2017). Metabolic pools and carbon flow during C₄ photosynthesis in maize: ¹³CO₂ labeling kinetics and cell type fractionation. *Journal of Experimental Botany*, 68, 283–298.
- Baer, G. R., & Schrader, L. E. (1985). Relationships between CO₂ exchange rates and activities of pyruvate, Pi dikinase and ribulose bisphosphate carboxylase, chlorophyll concentration, and cell volume in maize leaves. *Plant Physiology*, 77, 612–616.
- Bellasio, C., & Griffiths, H. (2014a). The operation of two decarboxylases, transamination, and partitioning of C₄ metabolic processes between mesophyll and bundle sheath cells allows light capture to be balanced for the maize C₄ pathway. *Plant Physiology*, 164,

466–480.

Bellasio, C., & Griffiths, H. (2014b). Acclimation of C₄ metabolism to low light in mature maize leaves could limit energetic losses during progressive shading in a crop canopy. *Journal of Experimental Botany*, *65*, 3725–3736.

Beyschlag, W., Barnes, P. W., Ryel, R., Caldwell, M. M., & Flint, S. D. (1990) Plant competition for light analyzed with a multispecies canopy model. II. Influence of photosynthetic characteristics on mixtures of wheat and wild oat. *Oecologia*, *82*, 374–380.

Bird, R. M. C. K. (2000). A remarkable new teosinte from Nicaragua: growth and treatment of progeny. *Maize Genetic Cooperation Newsletter*, *74*, 58–59.

Björkman, O. (1981). Responses to different quantum flux densities. In O. L. Lange, & P. S. Nobel (Eds.) *Encyclopedia of plant physiology*, (Vol. 12a, pp. 57–107). Berlin: Springer.

Björkman, O., Boardman, N. K., Anderson, J. M., Thorne, S. W., Goodchild, D. J., & Pylotis, N. A. (1972). Effect of light intensity during growth of *Atriplex patula* on the capacity of photosynthetic reactions, chloroplast components and structure. *Carnegie Institution of Washington Year Book*, *71*, 115–135.

Boardman, N.K. (1977). Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Review of Plant Physiology*, *28*, 355–377.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254.
- Brooks, J. R., Sprugel, D. G., & Hinckley, T. M. (1996). The effects of light acclimation during and after foliage expansion on photosynthesis of *Abies amabilis* foliage within the canopy. *Oecologia*, *107*, 21–32.
- Brown, R. H. (1977). A difference in N use efficiency in C₃ and C₄ plants and its implications in adaptation and evolution. *Crop Science*, *18*, 93–98.
- Brown, R. H. (1999). Agronomic implications of C₄ photosynthesis. In R. F. Sage, & R.K. Monson (Eds.), *C₄ plant biology*. (pp. 473–507). San Diego: Academic Press.
- Bunce, J. A., Patterson, D. T., & Peet, M. M. (1977). Light acclimation during and after leaf expansion in soybean. *Plant Physiology*, *60*, 255–258.
- Büßis, D., von Groll, U., Fisahn, J., & Altmann, T. (2006) Stomatal aperture can compensate altered stomatal density in *Arabidopsis thaliana* at growth light conditions. *Functional Plant Biology*, *33*, 1037–1043.
- Carpita, N. C., & McCann, M. C. (2008). Maize and sorghum: genetic resources for bioenergy grasses. *Trends in Plant Science*, *13*, 415–420.
- Cernusak, L. A., Ubierna, N., Winter, K., Holtum, J. A. M., Marshall, J. D., & Farquhar, G.

- D. (2013). Environmental and physiological determinants of carbon isotope discrimination in terrestrial plants. *New Phytologist*, *200*, 950–965.
- Crosbie, T. M., Mock, J. J., & Pearce, R. B. (1977). Variability and selection advance for photosynthesis in Iowa stiff stalk synthetic maize population. *Crop Science*, *17*, 511–514.
- Davies, E. C., Chow, W. S., Le Fay, J. M., & Jordan, B. R. (1986). Acclimation of tomato leaves to changes in light intensity; effects on the function of the thylakoid membrane. *Journal of Experimental Botany*, *37*, 211–220.
- Ding, L., Wang, K. J., Jiang, G. M., Liu, M. Z., & Gao, L. M. (2007). Photosynthesis rate and yield formation in different maize hybrids. *Biologia Plantarum*, *51*, 165–168.
- Ding, L., Wang, K. J., Jiang, G. M., Liu, M. Z., Niu, S. L., & Gao, L. M. (2005). Post-anthesis changes in photosynthetic traits of maize hybrids released in different years. *Field Crops Research*, *93*, 108–115.
- Dornhoff, G. M., & Shibles, R. M. (1970). Varietal differences in net photosynthesis of soybean leaves. *Crop Science*, *10*, 42–45.
- Dow, G. L., Bergmann, D. C., & Berry, J. A. (2014). An integrated model of stomatal development and leaf physiology. *New Phytologist*, *201*, 1218–1226.
- Driever, S. M., Lawson, T., Andralojc, P. J., Raines, C. A. & Parry, M. A. J. (2014). Natural

variation in photosynthetic capacity, growth, and yield in 64 field-grown wheat genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 65, 4959–4973.

Drozak, A., & Romanowska, E. (2006). Acclimation of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize to different irradiances during growth. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1757, 1539–1546.

Duncan, W. G., & Hesketh, J. D. (1968). Net photosynthetic rates, relative leaf growth rates, and leaf numbers of 22 races of maize grown at eight temperatures. *Crop Science*, 8, 670–674.

Duvick, D. N., Smith, J. S. C., & Cooper, M. (2004). Long-term selection in a commercial hybrid maize breeding program. *Plant Breeding Reviews*, 24, 109–151.

Edwards, G. E., & Voznesenskaya, E. V. (2011). C₄ photosynthesis: Kranz forms and single-cell C₄ in terrestrial plants. In A. S. Raghavendra & R. F. Sage (Eds.), *C₄ photosynthesis and related CO₂ concentrating mechanisms* (pp. 29–61). Dordrecht: Springer.

Ehleringer, J. R., Cerling, T. E., & Helliker, B. R. (1997). C₄ photosynthesis, atmospheric CO₂, and climate. *Oecologia*, 112, 285–299.

Ehleringer, J. R., & Pearcy, R. W. (1983). Variation in quantum yield for CO₂ uptake among C₃ and C₄ plants. *Plant Physiology*, 73, 555–559.

- Ellis, R. P., Vogel, J. C., & Fuls, A. (1980). Photosynthetic pathways and the geographical distribution of grasses in south west Africa/Namibia. *South African Journal of Science*, 76, 307–314.
- Evans, J. R. (1993). Photosynthetic acclimation and nitrogen partitioning within alucerne canopy. I. Canopy characteristics. *Australian Journal of Plant Physiology*, 20, 55–67.
- Evan, J. R. (2013). Improving photosynthesis. *Plant Physiology*, 162, 1780–1793.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2016). *The state of food and agriculture: Climate change, agriculture and food security*. Rome: FAO.
- Farquhar, G. D., & Richards, R. A. (1984). Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology*, 11, 539–552.
- Farquhar, G. D., & Sharkey, T. D. (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*, 33, 317–345.
- Fernandez, M. G. S., Strand, K., Hamblin, M. T., Westgate, M., Heaton, E., & Kresovich, S. (2015). Genetic analysis and phenotypic characterization of leaf photosynthetic capacity in a sorghum (*Sorghum* spp.) diversity panel. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 62, 939–950.
- Fischer, R. A., Rees, D., Sayre, K. D., Lu, Z. M., Condon, A. G., & Saavedra, A. L. (1998).

Wheat yield progress associated with higher stomatal conductance and photosynthetic rate, and cooler canopies. *Crop Science*, 38, 1467–1475.

Flood, P. J., Harbinson, J., & Aarts, M. G. M. (2011). Natural genetic variation in plant photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 16, 327–335.

Furbank, R. T. (2011). Evolution of the C₄ photosynthetic mechanism: are there really three C₄ acid decarboxylation types? *Journal of Experimental Botany*, 62, 3103–3108.

Ghannoum, O., Evans, J. R., Chow, W. S., Andrews, T. J., Conroy, J.P., & von Caemmerer, S. (2005). Faster Rubisco is the key to superior nitrogen-use efficiency in NADP-malic enzyme relatives to NAD-malic enzyme C₄ grasses. *Plant Physiology*, 137, 638–650.

Ghannoum O., Evans J. R., & von Caemmerer S. (2011). Nitrogen and water use efficiency of C₄ plants. In A. S. Raghavendra & R. F. Sage (Eds.), *C₄ photosynthesis and related CO₂ concentrating mechanisms* (pp. 129–146). Dordrecht: Springer.

Ghannoum, O., von Caemmerer, S., & Conroy, J. P. (2001). Carbon and water economy of Australian NAD-ME and NADP-ME C₄ grasses. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28, 213–223.

Givnish, T. J. (1988). Adaptation to sun and shade—a whole-plant perspective. *Australian Journal of Plant Physiology*, 15, 63–92.

- Hajjar, R., & Hodgkin, T. (2007). The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*, *156*, 1–13.
- Hall, A. E., Richards, R. A., Condon, A. G., Wright, G. C., & Farquhar, G. D. (1994). Carbon isotope discrimination and plant breeding. *Plant Breeding Reviews*, *12*, 81–113.
- Hamaoka, N., Uchida, Y., Tomita, M., Kumagai, E., Araki, T., & Ueno, O. (2013) Genetic variations in dry matter production, nitrogen uptake, and nitrogen use efficiency in the AA genome *Oryza* species grown under different nitrogen conditions. *Plant Production Science*, *16*, 107–116.
- Hasan, R., Ohnuki, Y., Kawasaki, M., Taniguchi, M., & Miyake, H. (2005). Differential sensitivity of chloroplasts in mesophyll and bundle sheath cells in maize, an NADP-malic enzyme-type C₄ plant, to salinity stress. *Plant Production Science*, *8*, 567–577.
- Hatch, M. D. (1987). C₄ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Bioenergetics*, *895*, 81–106.
- Heichel, G. H., & Musgrave, R. B. (1969). Varietal difference in net photosynthesis of *Zea mays* L. *Crop Science*, *9*, 483–486.
- Henderson, S., von Caemmerer, S., Farquhar, G. D., Wade, L., & Hammer, G. (1998) Correlation between carbon isotope discrimination and transpiration efficiency in lines

of the C₄ species *Sorghum bicolor* in the glasshouse and the field. *Australian Journal of Plant Physiology*, 25, 111–123.

Hikosaka, K. (1996). Effects of leaf age, nitrogen nutrition and photon flux density on the organization of the photosynthetic apparatus in leaves of a vine (*Ipomoea tricolor* Cav.) grown horizontally to avoid mutual shading of leaves. *Planta*, 198, 144–150.

Hikosaka, K., Kumagai, T., & Ito, A. (2016). Modeling canopy photosynthesis. In K. Hikosaka, U. Niinemets, & N. P. R. Anten (Eds.) *Canopy photosynthesis: from basics to applications. Advances in Photosynthesis and Respiration* (Vol. 42, pp. 239–268). Dordrecht: Springer.

Hikosaka, K., Sudoh, S., & Hirose, T. (1999) Light acquisition and use by individuals competing in a dense stand of an annual herb, *Xanthium canadense*. *Oecologia*, 118, 388–396.

Hikosaka, K., Yamano, T., Nagashima, H., & Hirose, T. (2003) Light-acquisition and use of individuals as influenced by elevated CO₂ in even-aged monospecific stands of *Chenopodium album*. *Functional Ecology*, 17, 786–795.

Hirose T., & Werger M.J.A. (1987). Maximising daily canopy photosynthesis with respect to the leaf nitrogen allocation pattern in the canopy. *Oecologia* 72, 520–526.

Hobbs, S. L. A. (1987). Genetic variability in photosynthesis and other leaf characters in Brassica. *Photosynthetica*, 22, 388–393.

- Iltis, H. H., & Benz, B. F. (2000). *Zea nicaraguensis* (Poaceae), a new teosinte from pacific coastal Nicaragua. *Novon*, 10, 382–390.
- Islam, M. T., Agata, W., Kubota, F., & Hamid, A. (1994). Evaluation of characteristics related to photosynthetic rate and leaf area production in mungbean genotypes. *Japanese Journal of Crop Science*, 63, 503–509.
- Jiang, C. D., Wang, X., Gao, H. Y., Shi, L., & Chow, W. S. (2011). Systemic regulation of leaf anatomical structure, photosynthetic performance, and high-light tolerance in sorghum. *Plant Physiology*, 155, 1416–1424.
- Jones, M. B. (2011). C₄ species as energy crops. In A. S. Raghavendra & R. F. Sage (Eds.), *C₄ photosynthesis and related CO₂ concentrating mechanisms* (pp. 379–397). Dordrecht: Springer.
- Kanai, R., & Edwards, G. E. (1999). The biochemistry of C₄ photosynthesis. In R. F. Sage, & R.K. Monson (Eds.), *C₄ plant biology*. (pp. 49–87). San Diego: Academic Press.
- Kanemura, T., Homma, K., Ohsumi, A., Shiraiwa, T., & Horie, T. (2007). Evaluation of genotypic variation in leaf photosynthetic rate and its associated factors by using rice diversity research set of germplasm. *Photosynthesis Research*, 94, 23–30.
- 川満芳信・魏錦城・片山忠夫・縣和一 (1989). 水稻における光呼吸速度の品種間差異. 九大農学芸誌, 43, 135–144.

川満芳信・比屋根真一・野瀬昭博 (1994). サトウキビ葉身の光合成速度及び気孔伝導度に及ぼす気孔密度の影響. 沖縄農業, 29, 2–8.

Kawamitsu, Y., Hiyane, S., Tamashiro, Y., & Hakoyama, S. (2002). Regulation of photosynthesis and water use efficiency in relation to stomatal frequency and interveinal distance in C₃- and C₄-grass species. *Environmental Control in Biology*, 40, 365–374.

Kephart, K. D., Buxton, D. R., & Taylor, S. E. (1992). Growth of C₃ and C₄ perennial grasses under reduced irradiance. *Crop Science*, 32, 1033–1038.

Kiran, T. V., Rao, Y. V., Subrahmanyam, D., Rani, N. S., Bhadana, V. P., Rao, P. R., & Voleti, S. R. (2013). Variation in leaf photosynthetic characteristics in wild rice species. *Photosynthetica*, 51, 350–358.

Koteyeva, N. K., Voznesenskaya, E. V., & Edwards, G. E. (2015). An assessment of the capacity for phosphoenolpyruvate carboxykinase to contribute to C₄ photosynthesis. *Plant Science*, 235, 70–80.

Kromdijk, J., Schepers, H. E., Albanito, F., Fitton, N., Carroll, F., Jones, M. B., Finnan, J., Lanigan, G. J., & Griffiths, H. (2008). Bundle sheath leakiness and light limitation during C₄ leaf and canopy CO₂ uptake. *Plant Physiology*, 148, 2144–2155.

Kromdijk, J., Ubierna, N., Cousins, A. B., & Griffiths, H. (2014). Bundle-sheath leakiness in C₄ photosynthesis: a careful balancing act between CO₂ concentration and

assimilation. *Journal of Experimental Botany*, 65, 3443–3457.

Lawson, T., & Blatt, M. R. (2014). Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiology*, 164, 1556–1570.

Lawson, T., Kramer, D. M., Raines, C. A. (2012). Improving yield by exploiting mechanisms underlying natural variation of photosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 215–220.

Lawson, T., Simkin, A. J., Kelly G., & Granot, D. (2014). Mesophyll photosynthesis and guard cell metabolism impacts on stomatal behavior. *New Phytologist*, 203, 1064–1081.

Li, D., Pfeiffer, T. W., & Cornelius, P. L. (2008). Soybean QTL for yield and yield components associated with *Glycine soja* alleles. *Crop Science*, 48, 571–581.

Li, J., Xie, R. Z., Wang, K. R., Ming, B., Guo, Y. Q., Zhang, G. Q., & Li, S. K. (2015). Variations in maize dry matter, harvest index, and grain yield with plant density. *Agronomy Journal*, 107, 829–834.

Li, T., Liu, Y., Shi, L., & Jiang, C. (2015). Systemic regulation of photosynthetic function in field-grown sorghum. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, 86–94.

LI-COR Biosciences. (2012). *Using the LI-6400/LI-6400: Portable photosynthesis system*. Lincoln: LI-COR Biosciences.

- Liu, T., Gu, L., Dong, S., Zhang, J., Liu, P., & Zhao, B. (2015). Optimum leaf removal increases canopy apparent photosynthesis, ^{13}C -photosynthate distribution and grain yield of maize crops grown at high density. *Field Crops Research*, *175*, 32–39.
- Long, S. P. (1993). The significance of light-limiting photosynthesis to crop canopy carbon gain and productivity: a theoretical analysis. In Y. P. Abrol, & P. M. Govindjee (Eds.), *Photosynthesis: Photoreactions to Plant Productivity* (pp. 547–560). New Delhi: Oxford & IBH Publishing.
- Long, S. P. (1999). Environmental responses. In R. F. Sage, & R.K. Monson (Eds.), *C₄ plant biology*. (pp. 209–243). San Diego: Academic Press.
- Long, S. P., Zhu, X. G., Naidu, S. L. & Ort D. R. (2006). Can improvement in photosynthesis increase crop yields? *Plant, Cell and Environment*, *29*, 315–330.
- Louwerse, W., & Vanderzweerde, W. (1977). Photosynthesis, transpiration and leaf morphology of *Phaseolus vulgaris* and *Zea mays* grown at different irradiances in artificial and sunlight. *Photosynthetica*, *11*, 11–21.
- Ma, J. Y., Sun, W., Koteyeva, N. K., Voznesenskaya, E., Stutz, S. S., Gandin, A., Smith-Moritz, A. M., Heazlewood, J. L., & Cousins, A. B. (2017). Influence of light and nitrogen on the photosynthetic efficiency in the C₄ plant *M. × giganteus*. *Photosynthesis Research*, *131*, 1–13.
- Makino, A., Sakuma, H., Sudo, E., & Mae, T. (2003). Differences between maize and rice

- in N-use efficiency for photosynthesis and protein allocation. *Plant and Cell Physiology*, 44, 952–956.
- Mano, Y., & Omori, F. (2015). Flooding tolerance in maize (*Zea mays* subsp. *mays*) F1 hybrids containing a QTL introgressed from teosinte (*Zea nicaraguensis*). *Euphytica*, 205, 255–267.
- McCouch, S. (2004). Diversifying selection in plant breeding. *PLoS Biology*, 2, e347.
- McCullough, D. E., Aguilera, A., & Tollenaar, M. (1994). N uptake, N partitioning, and photosynthetic N-use efficiency of an old and a new maize hybrid. *Canadian Journal of Plant Science*, 74, 479–484.
- Meier, D., & Lichtenthaler, K. (1981). Ultrastructural development of chloroplasts in radish seedlings grown at High- and Low-light conditions and in the presence of the herbicide bentazon. *Protoplasma*, 107, 195–207.
- Monsi, M., & Saeki, T. (1953). Über den lichtfaktor in den pflanzengesellschaften und seine bedeutung für die stoffproduktion. *Japanese Journal of Botany* 14, 22–52.
- Monteith, J. L. (1977) Climate and the efficiency of crop production in Britain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 281, 277–294.
- 元村佳恵 (1990). 窒素化合物. 東北大学農学部農学科編. 最新農学実験の基礎. ソフトサイエンス社. 東京. 216–221.

- Munns, R., James, R. A., Xu, B., Athman, A., Conn, S. J., Jordans, C., & Gilliam, M. (2012). Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nature Biotechnology*, *30*, 360–364.
- Murata, Y. (1981). Dependence of the potential productivity and efficiency in solar energy utilization on leaf photosynthetic capacity in crop species. *Japanese Journal of Crop Science*, *50*, 223–232.
- Nose, A., Uehara, M., & Kawamitsu, Y. (1994). Variations in leaf gas exchange traits of *Saccharum* including feral sugarcane, *Saccharum spontaneum* L. *Japanese Journal of Crop Science*, *63*, 489–495.
- O’Leary, M. H. (1988). Carbon isotopes in photosynthesis. *Bioscience*, *38*, 328–336.
- Omoto, E., Taniguchi, M., & Miyake, H. (2010). Effects of salinity stress on the structure of bundle sheath and mesophyll chloroplasts in NAD-malic enzyme and PCK type C₄ plants. *Plant Production Science*, *13*, 169–176.
- Osmond, C. B., Winter, K., & Ziegler, H. (1982). Functional significance of different pathways of CO₂ fixation in photosynthesis. In O. L. Lange, P. S. Nobel & C. B. Osmond (Eds.), *Encyclopedia of plant physiology, New series* (Vol. 12B, pp. 479–547). Berlin: Springer.
- Parry, M. A. J., Andralojc, P. J., Scales, J. C., Salvucci, M. E, Carmo-Silva, A. E., Alonso, H., & Whitney, S. M. (2013) Rubisco activity and regulation as targets for crop

improvement. *Journal of Experimental Botany*, 64, 717–730.

Pearce, R. B., Carlson, D. K., Barnes, D. K., Hart, R. H., & Hanson, C. H. (1969). Specific leaf weight and photosynthesis in alfalfa. *Crop Science*, 9, 423–426.

Pearcy, R. W. (1998). Acclimation to sun and shade. In A. S. Raghavendra (Eds.) *Photosynthesis: a comprehensive treatise* (pp. 250–263). New York: Cambridge University Press.

Pearcy, R. W., & Ehleringer, J. (1984). Comparative ecophysiology of C₃ and C₄ plants. *Plant, Cell and Environment*, 7, 1–13.

Pearcy, R. W., & Franceschi, V. R. (1986). Photosynthetic characteristics and chloroplast ultrastructure of C₃ and C₄ tree species grown in high light and low light environments. *Photosynthesis Research*, 9, 317–331.

Pengelly J.J.L., Sirault X.R.R., Tazoe Y., Evans J.R., Furbank R.T., & von Caemmerer S. (2010). Growth of the C₄ dicot *Flaveria bidentis*: photosynthetic acclimation to low light through shifts in leaf anatomy and biochemistry. *Journal of Experimental Botany* 61, 4109–4122.

Pengelly, J. J. L., Tan, J., Furbank R. T. & von Caemmerer, S. (2012). Antisense reduction of NADP-malic enzyme in *Flaveria bidentis* reduces flow of CO₂ through the C₄ cycle. *Plant Physiology*, 160, 1070–1080.

- Pignon, C. P., Jaiswal, D., McGrath, J. M., & Long, S. P. (2017) Loss of photosynthetic efficiency in the shade. An Achilles heel for the dense modern stands of our most productive C₄ crops? *Journal of Experimental Botany*, 68, 335–345.
- Pons, T. L. (2016). Regulation of leaf traits in canopy gradients. In K. Hikosaka, U. Niinemets, & N. P. R. Anten (Eds.) *Canopy photosynthesis: from basics to applications. Advances in Photosynthesis and Respiration* (Vol. 42, pp. 143–168). Dordrecht: Springer.
- Poorter, H., & Evans, J., R. (1998). Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific leaf area. *Oecologia*, 116, 26–37.
- Porra, R. J., Thompson, W. A., & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted in four different solvents. *Biochimica Biophysica Acta*, 975, 389–394.
- Richards, R. A. (2000). Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *Journal of Experimental Botany*, 51, 447–458.
- Romanowska, E., Kargul, J., Powikrowska, M., Finazzi, G., Nield, J., Drozak, A., & Pokorska, B. (2008). Structural organization of photosynthetic apparatus in agranal chloroplasts of maize. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 26037–26096.
- Sage, R. F. (2006). Is C₄ photosynthesis less phenotypically plastic than C₃ photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, 57, 303–317.

Sage, R. F. (2014). Stopping the leaks: new insights into C₄ photosynthesis at low light.

Plant, cell and Environment, 37, 1037–1041.

Sage, R. F., Khoshravesh, R., & Sage, T. L. (2014). From proto-Kranz to C₄ Kranz:

building the bridge to C₄ photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 65, 3341–3356.

Sage, R. F., & McKown, A. D. (2006). Is C₄ photosynthesis less phenotypically plastic

than C₃ photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, 57, 303–317.

Sage, R. F., & Percy, R. W. (1987). The nitrogen use efficiency of C₃ and C₄ plants. II.

Leaf nitrogen effects on the gas exchange characteristics of *Chenopodium album* L. and *Amaranthus retroflexus* L. *Plant Physiology*, 84, 959–963.

Sage, R. F., & Stata, M. (2015). Photosynthetic diversity meets biodiversity: The C₄ plant

example. *Journal of Plant Physiology*, 172, 104–119.

Sage, R. F., Wedin, D. A., & Li, M. (1999). The biogeography of C₄ photosynthesis:

patterns and controlling factors. In R. F. Sage, & R.K. Monson (Eds.), *C₄ plant biology*. (pp. 313–373). San Diego: Academic Press.

Sato, R., & Suzuki, Y. (2010). Carbon and nitrogen stable isotope analysis by EA/IRMS.

Researches in Organic Geochemistry, 26, 21–29.

Scafaro, A. P., Haynes, P. A., & Atwell, B. J. (2010) Physiological and molecular changes

in *Oryza meridionalis* Ng., a heat-tolerant species of wild rice. *Journal of Experimental Botany*, 61, 191–202.

Schulze, E. D., Ellis, R., Schulze, W., Trimborn, P., & Ziegler, H. (1996). Diversity, metabolic types and $\delta^{13}\text{C}$ carbon isotope ratios in the grass flora of Namibia in relation to growth form, precipitation and habitat conditions. *Oecologia*, 106, 352–369.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIfaH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671–675.

Sharwood, R. E., Sonawane, B. V., & Ghannoum, O. (2014). Photosynthetic flexibility in maize exposed to salinity and shade. *Journal of Experimental Botany*, 65, 3715–3724.

Suresh, K., Rao, K. L. N., & Nair, T. V. R. (1997). Genetic variability in photosynthetic rate and leaf characters in *Brassicaceae* coenospecies. *Photosynthetica*, 33, 173–178.

Tanaka, Y., Fujii, K., & Shiraiwa, T. (2010). Variability of leaf morphology and stomatal conductance in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Cultivars. *Crop Science*, 50, 2525–2532.

Tanaka, Y., Shiraiwa, T., Nakajima, A., Sato, J., & Nakazaki T. (2008) Leaf gas exchange activity in soybean as related to leaf traits and stem growth habit. *Crop Science*, 48, 1925–1932.

Taylor, S. H., Hulme, S. P., Rees, M., Ripley, B. S., Woodward, F. I., & Osborne, C. P.

- (2010). Ecophysiological traits in C₃ and C₄ grasses: a phylogenetically controlled screening experiment. *New Phytologist*, *185*, 780–791.
- Tazoe, Y., Hanba, Y. T., Furumoto, T., Noguchi, K., & Terashima, I. (2008). Relationships between quantum yield for CO₂ assimilation, activity of key enzymes and CO₂ leakiness in *Amaranthus cruentus*, a C₄ dicot, grown in high or low light. *Plant and Cell Physiology*, *49*, 19–29.
- Togawa, Y., & Ueno, O. (2015). Comparison of resource use efficiencies involved in photosynthesis among biochemical subtypes of C₄ grasses. *Abstracts of 239th Meeting of the Crop Science Society of Japan* (pp. 209). Tokyo.
- Tominaga, J., Yabuta, S., Fukuzawa, Y., Kawasaki, S., Jaiphong, T., Suwa, R., & Kawamitsu, Y. (2015). Effects of vertical gradient of leaf nitrogen content on canopy photosynthesis in tall and dwarf cultivar of sorghum. *Plant Production Science*, *18*, 336–343.
- Tsutsumi, N., Tohya, M., Nakashima, T., & Ueno, O. (2017). Variations in structural, biochemical, and physiological traits of photosynthesis and resource use efficiency in *Amaranthus* species (NAD-ME-type C₄). *Plant Production Science*, *20*, 300–312.
- Ubierna, N., Sun, W., & Cousins, A. B. (2011). The efficiency of C₄ photosynthesis under low light conditions: assumptions and calculations with CO₂ isotope discrimination. *Journal of Experimental Botany*, *62*, 3119–3134.

- Ubierna, N., Sun, W., Kramer, D. M., & Cousins, A. B. (2013) The efficiency of C₄ photosynthesis under low light conditions in *Zea mays*, *Miscanthus × giganteus* and *Flaveria bidentis*. *Plant, Cell and Environment*, 36, 365–381.
- Ueno, O., Kawano, Y., Wakayama, M., & Takeda, T. (2006). Leaf vascular systems in C₃ and C₄ grasses: a two-dimensional analysis. *Annals of Botany*, 97, 611–621.
- Ueno O., & Sentoku, N. (2006). Comparison of leaf structure and photosynthetic characteristics of C₃ and C₄ *Alloteropsis semialata* subspecies. *Plant, Cell and Environment*, 29, 257–268.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs. (2017). *World Population prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables*. Working Paper No. ESA/P/WP/248.
- Usuda, H. (1984). Variations in the photosynthetic rate and activity of photosynthetic enzymes in maize leaf tissue of different ages. *Plant and Cell Physiology*, 25, 1297–1301.
- Usuda, H., Ku, M. S. B., & Edwards, G. E. (1985). Influence of light intensity during growth on photosynthesis and activity of several key photosynthetic enzymes in a C₄ plant (*Zea mays*). *Physiologia Plantarum*. 63, 65–70.
- Vogan, P. J., & Sage, R. F. (2011). Water-use efficiency and nitrogen-use efficiency of C₃-C₄ intermediate species of *Flaveria* Juss (Asteraceae). *Plant, Cell and Environment*,

34, 1415–1430.

von Caemmerer, S. (2000). *Biochemical models of leaf photosynthesis*. Canberra: CSIRO Publishing.

von Caemmerer, S., & Furbank, R. T. (2016). Strategies for improving C₄ photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 31, 125–134.

von Caemmerer, S., Millgate, A., Farquhar, G. D., & Furbank, R. T. (1997). Reduction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by antisense RNA in the C₄ plant *Flaveria bidentis* leads to reduced assimilation rates and increased carbon isotope discrimination. *Plant Physiology*, 113, 469–477.

Walker, R. P., Acheson, R. M., Técsi, L. I., & Leegood, R. C. (1997). Phosphoenolpyruvate carboxykinase in C₄ plants: its role and regulation. *Australian Journal of Plant Physiology* 24, 459–468.

Walker, R. P., Chen, Z. H., Acheson, R. M., & Leegood, R. C. (2002). Effects of phosphorylation on phosphoenolpyruvate carboxykinase from the C₄ plant Guinea grass. *Plant Physiology*, 128, 165–172.

Wang, D., Portis Jr., A. R., Moose, S. P., & Long, S. P. (2008). Cool C₄ photosynthesis: pyruvate P_i dikinase expression and activity corresponds to the exceptional cold tolerance of carbon assimilation in *Miscanthus × giganteus*. *Plant Physiology*, 148, 557–567.

Ward, D. A., Woolhouse, H.W. (1986a). Comparative effects of light during growth on photosynthetic properties of NADP-ME type C₄ grasses from open and shaded habitats. I. Gas exchange, leaf anatomy and ultrastructure. *Plant, Cell and Environment*, 9, 261–270.

Ward, D. A., & Woolhouse, H. W. (1986b). Comparative effects of light during growth on photosynthetic properties of NADP-ME type C₄ grasses from open and shaded habitats. II. Photosynthetic enzyme activities and metabolism. *Plant, Cell and Environment*, 9, 271–277.

Wei, S., Wang, X., Shi, D., Li, Y., Zhang, J., Liu, P., Zhao, B., & Dong, S. (2016). The mechanisms of low nitrogen induced weakened photosynthesis in summer maize (*Zea mays* L.) under field conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 105, 118–128.

Wingler, A., Walker, R. P., Chen, Z. H. & Leegood, R. C. (1999). Phosphoenolpyruvate carboxykinase is involved in the decarboxylation of aspartate in the bundle sheath of maize. *Plant Physiology*, 120, 539–545.

Winter, K., Schmitt, M. R., & Edwards, G. E. (1982). *Microstegium vimineum*, a shade adapted C₄ grass. *Plant Science Letters*, 24, 311–318.

Wong, S. C., Cowan, I. R., & Farquhar, G. D. (1985). Leaf conductance in relation to rate of CO₂ assimilation. 1. Influence of nitrogen nutrition, phosphorous nutrition, photon flux density, and ambient partial pressure of CO₂ during ontogeny. *Plant Physiology*, 78, 821–825.

- Yamasaki, T., Kudoh, T., Kamimura, Y., & Katoh, S. (1996). A vertical gradient of the chloroplast abundance among leaves of *Chenopodium album*. *Plant, Cell and Physiology*, 37, 43–48.
- Yano, S., & Terashima, I. (2004). Developmental process of sun and shade leaves in *Chenopodium album* L. *Plant, Cell and Environment*, 27, 781–793.
- 吉田智彦 (1976). オオムギの気孔数について. I. 気孔数と光合成速度との関係. 育雑 26: 130–136.
- Yoshimura, Y., Kubota, F., & Ueno, O. (2004). Structural and biochemical bases of photorespiration in C₄ plants: quantification of organelles and glycine decarboxylase. *Planta*, 220, 307–317.
- Zamir, D. (2001). Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature reviews. Genetics*, 2, 983–989.
- Zhang, H., Mittal, N., Leamy, L. J., Barazani, O., & Song, B. H, (2017) Back into the wild—Apply untapped genetic diversity of wild relatives for crop improvement. *Evolutionary Applications*, 10, 5–24.
- Zhu, X. G., Long, S. P., & Ort, D. R. (2010). Improving photosynthetic efficiency for greater yield. *Annual Review of Plant Biology* 61, 235–261.