

イネ止葉における緑葉維持能力の多様性

小葉田亨¹⁾・富阪康平¹⁾・篠永美和¹⁾・Shaobing Peng²⁾

(¹⁾ 島根大学生物資源科学部, ²⁾ 華中農業大学植物科学技術学部)

要旨: 穂ぞろい期イネの止葉中央部葉片を 35℃ 暗黒下でプラスチックバイアル中の水に 1 週間程度浮かべ、培養後 / 培養前 SPAD 値比で示される緑葉維持能力 (GM) が遺伝的多様性をカバーする世界と日本のイネコアコレクションおよび中国の高収量 hybrid と inbred 品種でどれだけの変異があるかを調べた。その結果、ジャポニカの GM はインディカに比べやや高い傾向があり、また熱帯ジャポニカはジャポニカよりやや低かった。これらの品種の中から穂ぞろい期に SPAD 値が高いにもかかわらず GM が高く保たれる、あるいは GM が著しく低下する緑葉維持能力の典型的に異なる品種が見いだせた。また、中国の高収量 (9~11 t ha⁻¹) の hybrid や inbred イネの GM にも大きな品種間差が見られ、GM と収穫指数の間には正の直線関係があり、さらに GM と収量 / (茎葉重 × SPAD 値) との間にも正の直線関係があったため、緑葉維持能力が茎葉の子実収量生産効率を高めていることが示唆された。このように、イネの登熟期における緑葉維持能力には品種間に幅広い多様性があり、登熟期の子実生産効率を高める遺伝資源として利用できる可能性がある。

キーワード: イネ, インディカ, ジャポニカ, 世界のイネコアコレクション, 止葉, 日本のイネコアコレクション, 緑葉維持能力。

ソルガム (Borrell ら 2000) やコムギ (Spano ら 2003), イネ (Hoang and Kobata 2009a, Kobata ら 2015) において土壤乾燥や高温下で緑葉面積が低下しにくい性質を持つ Stay green 品種が見られ、特に登熟期における環境ストレス下での緑葉維持能力の子実生産への効果が期待されている。

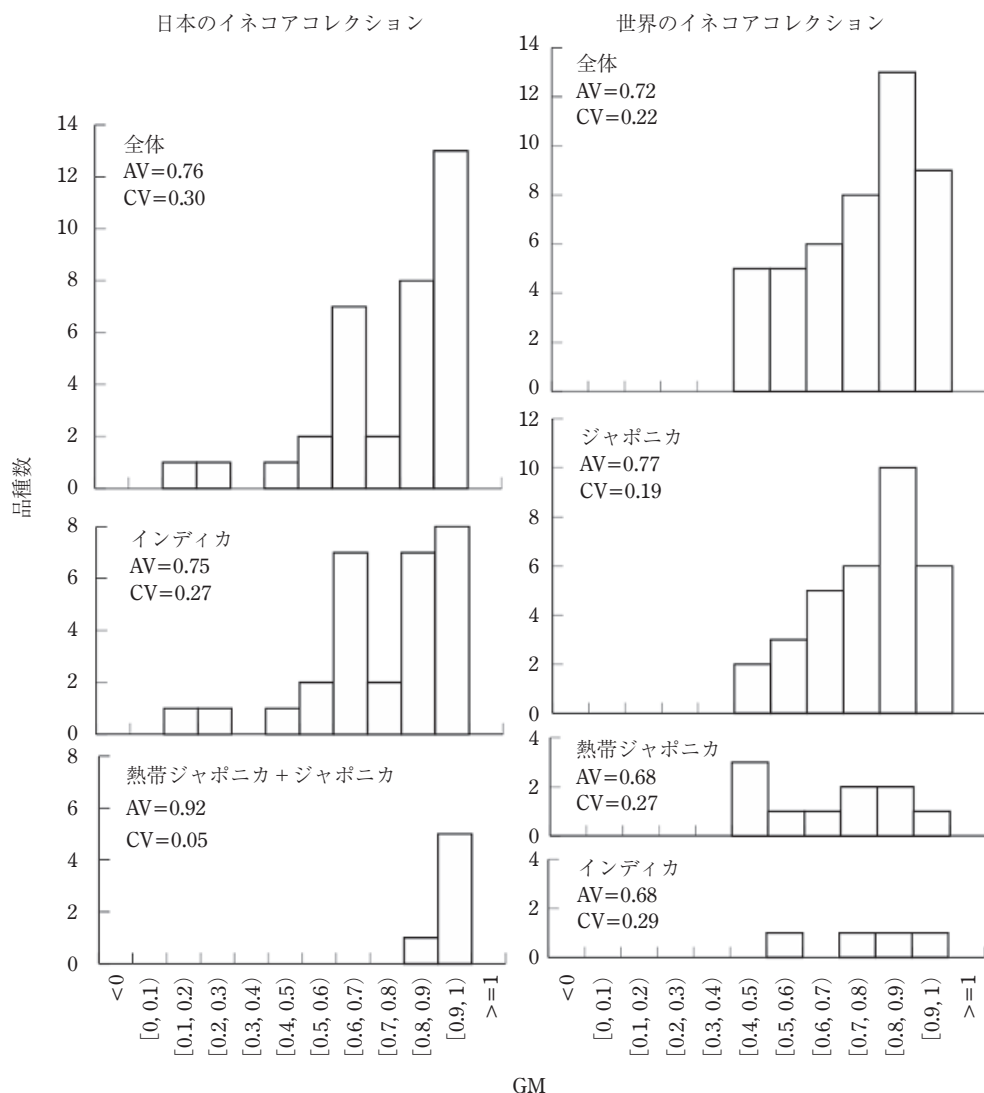
葉片を暗黒下 35℃ 恒温器のバイアル中の水に約 1 週間浮かべて葉緑素計で培養前 (SPAD_S) と後 (SPAD_E) に測定した SPAD 値比 (green maintenance index; GM = SPAD_E / SPAD_S) はイネの stay green 変異体の緑葉維持能力をよく反映した (Kobata ら 2015)。日本のイネコアコレクションの早生品種では GM と栽培条件下の止葉を含む上位 3 葉の SPAD 値維持能力との間には密接な関係があり、さらに GM は高温条件下での同化維持と密接な関係があった (Kobata ら 2015)。このように、登熟期止葉の緑葉維持能力の品種特性が環境ストレス下にあるイネの生産能力と関係があるとみなされた。しかし、多様なイネ品種間における緑葉維持能力の変異と分布は十分明らかにされていない。そこで、本報告はゲノムの多様性、形態的特性、地理的分布などを考慮に入れた遺伝的多様性を含む世界と日本のイネコアコレクション (Kojima ら 2005, NIAS 2009), および夏季高温にさらされる中国・長江中流域における現地 hybrid と inbred 多収品種における緑葉維持能力の変異を GM によって調べ、今後登熟期の生産機能向上に利用しうる登熟期のイネの Stay green 能力の多様性に関する情報を得ようとした。

実験材料および方法

1. 栽培条件

世界 (WRC) および日本 (JRC) のイネコアコレクション品種を島根大学付属農場 (標高 2 m, 緯度 35° 29' N, 経度 133° 04' E) における粘土質赤土 (mud-rich sediments of alluvium) の水田で栽培した。2009 年 5 月 12 日に育苗箱で育成したそれぞれの品種の 3 葉期の苗を 1 株 1 本植えて、よく耕作攪拌した水田に畦間 0.3 m 株間 0.15 m で品種当たり 1 条 2 m 移植した。基肥として窒素を硫酸で 4 g, カリを塩化カリで 12 g, リン酸をリン酸石灰で 10 g を m⁻² 当たり与え、それ以降すべての品種が出穂するまで 2 週間おきに追肥として窒素を硫酸で 1 g と与えた。

中国武漢市の華中農業大学付属農場の赤土粘土 (clay loam) の水田 (標高 23.3 m, 緯度 30° 28' N, 経度 114° 21' E) に 2013 年 5 月 9 日にインディカの hybrid 6 品種と inbred 3 品種の育苗苗を移植した。各品種 5 m × 6 m に畦間 0.2 m と株間 0.2 m で 1 株 1 本植し、m² 当たり元肥としてリン酸 2 g とカリ 2.5 g, 追肥としてカリを 2.5 g と与え、4 反復乱塊法とした。土壌と灌漑水には窒素が多く含まれており (土壌窒素含量 81 mg kg⁻¹) 窒素施肥は行わなかった。登熟期にあたる 7~8 月の日平均気温は 31℃, 最高平均気温 34.6~36.2℃ と極めて高かった。収量構成要素と地上部乾物重の測定のために成熟期に各区品種の 12 株の地上部を斜線方向に採取し、茎葉部と穂に分けて 80℃ で乾燥した後秤量した。穂から籾を外して籾数を数え、風選によって充実籾を分けそのうちの 30 g を



第1図 世界および日本のイネコアカレクションの品種全体、ジャポニカ、熱帯ジャポニカ、インディカの止葉葉片の緑葉維持能力 ($GM = SPAD_E / SPAD_S$, $SPAD_E$ = 培養後の SPAD 値, $SPAD_S$ = 培養前の SPAD 値) の頻度分布. AV は GM の平均値, CV は変動係数 (coefficient of variation) を示す.

取って充実粒数と 80℃ で乾燥した粒重を測定した. 収量は各区品種の 5 m² を刈り取り 14% の水分含量で表した.

2. 緑葉維持能力の評価

穂ぞろい期の止葉を切除し, 水を満たしたプラスチック袋に入れ実験室に持ち帰った後, 葉身中央部約 5 cm を切り取った 5 枚の葉片を蓋に直径 0.5 cm の穴をあけ蒸留水を満たした容量 0.06 L のプラスチックバイアル (New sample vial, NO. 7, As One, Osaka, Japan) に入れた (Kobata 2015). この容器を 35℃ の暗黒の恒温器で 7-8 日間培養した. 葉緑素計 (SPAD-502, Minolta Co., Ltd., Tokyo) で葉緑素量を表す SPAD 値 (Inada 1965) を培養前 ($SPAD_S$) と後 ($SPAD_E$) に測定し, $GM = SPAD_E / SPAD_S$ を緑葉維持能力とした. ただし, 屋外で出穂しなかったあるいはデータの取れなかった WRC の品種 (46 品種中 9 品種) と JRC (50 品種中 3 品種) は除かれた.

3. 実験結果

世界のイネコアカレクションの GM は 0.1~0.9 の分布を持ち, 0.9 で一番品種数が多かった (第1図-左). 世界のイネコアカレクションの大部分はインディカで占められているため, 全品種の GM はインディカの GM と似た分布を示した. 一方, 熱帯ジャポニカとジャポニカはインディカよりも高い分布を示した. 日本のイネコアカレクション品種の GM は 0.4~0.9 の分布を示し, 大部分を占めるジャポニカの分布は全体の分布に類似したのに対して熱帯ジャポニカとインディカはやや低い分布を示した (第1図-右). 世界のイネコアカレクションにおいてジャポニカおよび熱帯ジャポニカとインディカとの間には 5% 水準で有意差があった (Steel-Dwass の検定) ものの日本のイネコアカレクションにおいては有意差はなかった. インディカと世界のイネコアカレクション品種の GM の変動係数 (coefficient of variation, CV) 0.30 に比べ日本のイネコアカ

第1表 世界および日本のイネコアコレクションの緑葉維持能力 ($GM=SPAD_E/SPAD_S$).

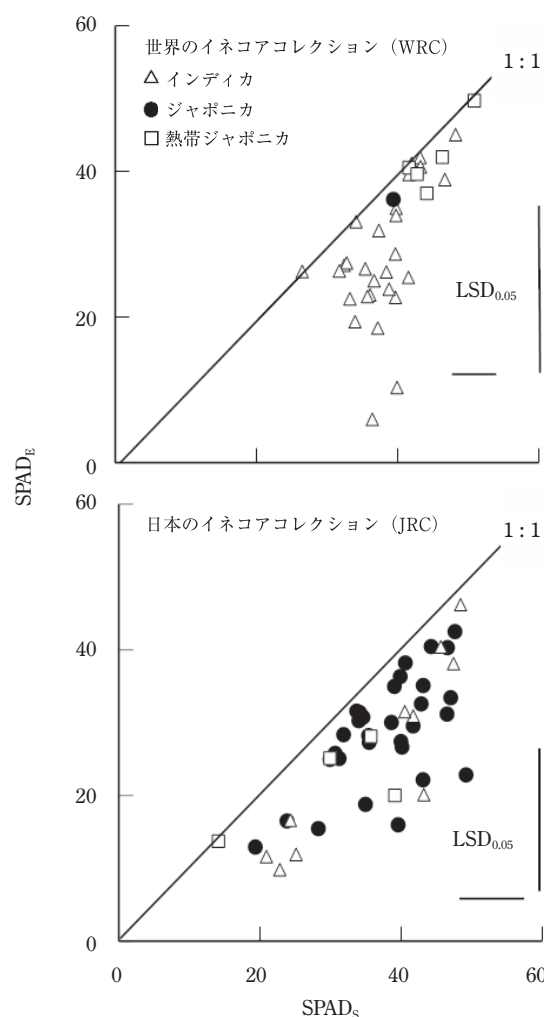
$SPAD_E$ = 培養後の SPAD 値, $SPAD_S$ = 培養前の SPAD 値) の典型的に異なる品種. 葉片培養前の SPAD 値がほぼ同様に高く GM が大きく異なる品種について緑葉維持能力の高および低の品種に分類した.

緑葉維持能力のランク	品種名	ID	原産地	亜種	GM ($SPAD_E/SPAD_S$)
世界のイネコアコレクション					
高	PADI PERAK	WRC 49	インドネシア	熱帯ジャポニカ	0.98 (49.7/50.9)
	SHWE NANG GYI	WRC 21	ミャンマー	インディカ	0.93 (45.1/48.2)
	KHAU MAC KHO	WRC 48	ベトナム	熱帯ジャポニカ	0.91 (42.0/46.4)
	IR 58	WRC 14	フィリッピン	インディカ	0.97 (41.9/43.2)
低	NEPAL 8	WRC 27	ネパール	インディカ	0.57 (22.7/39.7)
	ANJANA DHAN	WRC 30	ネパール	インディカ	0.25 (10.4/39.9)
日本のイネコアコレクション					
高	入間錦	JRC 07	埼玉	熱帯ジャポニカ	0.96 (46.2/48.4)
	関山	JRC 36	青森	ジャポニカ	0.89 (42.5/47.6)
	平山	JRC 10	東京	熱帯ジャポニカ	0.89 (40.4/45.6)
	冷立稲	JRC 45	山形	ジャポニカ	0.87 (40.3/46.6)
低	赤毛	JRC 17	秋田	ジャポニカ	0.51 (22.2/43.1)
	雷電	JRC 53	関東東山	ジャポニカ	0.40 (16.0/39.6)

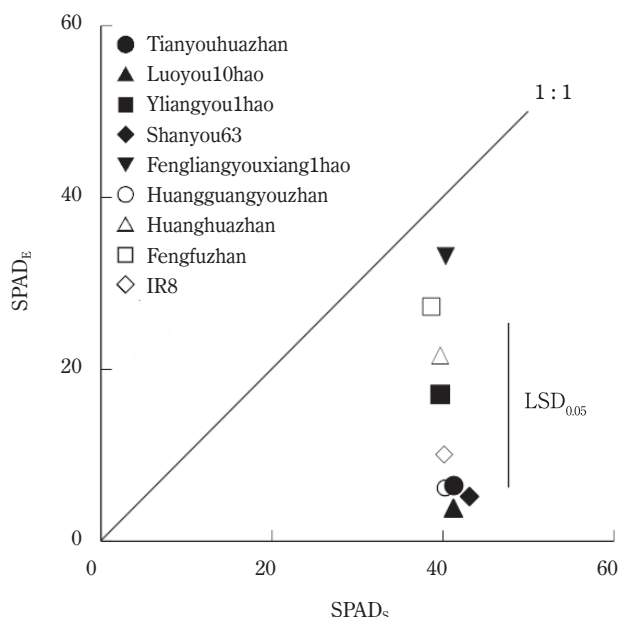
コレクションのそれは 0.22 とやや小さかった. 日本晴の高緑葉維持能力突然変異体 sgr-2 の $GM=0.89$ より高い緑葉維持能力を持つ品種が世界のイネコアコレクションで 10 品種, 日本のコアコレクション品種で 14 品種程度あった.

これらの品種の中から $SPAD_S$ が高く, GM が典型的に異なる品種を示すと, 世界のイネコアコレクション品種では $SPAD_S$ が 43~51 で $SPAD_E$ が有意に高く GM が大きい品種 (PADI PERAK, SHEWE HANG, KHAU MAC KHO, IR58) と $SPAD_S$ が 40 前後であっても GM が低く $SPAD_E$ が有意に低い品種 (NEPAL 8, ANJANA DHAN) があった (第1表, 第2図). 日本のコアコレクション品種の GM 低下幅は世界のイネコアコレクションよりも小さい傾向があるものの, $SPAD_S$ が 40~46 前後で $SPAD_E$ が有意に高く GM の大きい品種 (入間錦, 関山, 平山, 冷立稲) と, $SPAD_S$ が 40~43 あったものの $SPAD_E$ が有意に低く GM の低い品種 (赤毛, 雷電) があった (第1表, 第2図).

中国におけるインディカの hybrid と inbred の $SPAD_S$ はいずれも 40 前後で有意な品種間差はないにもかかわらず $SPAD_E$ は 5~30 と品種間に有意差があった (第3図). 比較に用いた IR8 に比べても値が有意に高い品種があった. これらの品種の中の収量最大値は Tianyouhuazhan の 10.6 t ha^{-1} と最低の Fengfuzhan の 8.7 t ha^{-1} で, 全品種の平均と標準偏差は $9.5 \pm 0.7 \text{ t ha}^{-1}$, $CV=0.07$ ($n=8$) と高い水準にあった. これらの登熟歩合は $84.3 \pm 4.7\%$ であった. 地上部の全生産量は収量と同じ品種で最大 19.2 t ha^{-1} と最小 15.3 t ha^{-1} で全品種平均で $17.4 \pm 1.4 \text{ t ha}^{-1}$, $CV=0.08$ であった. これらの品種の GM と収量および全生産量との間には明確な関係がなかったものの, 収穫指数と GM の間には hybrid と inbred を含めて高い正の関係があった (第4図).



第2図 世界および日本のイネコアコレクションの止葉葉片の培養前 ($SPAD_S$) と後 ($SPAD_E$) の SPAD 値. 各点は 5 反復の平均値, 縦線と横線は Tukey 法による 5% の最小有意差 ($LSD_{0.05}$) を示す.

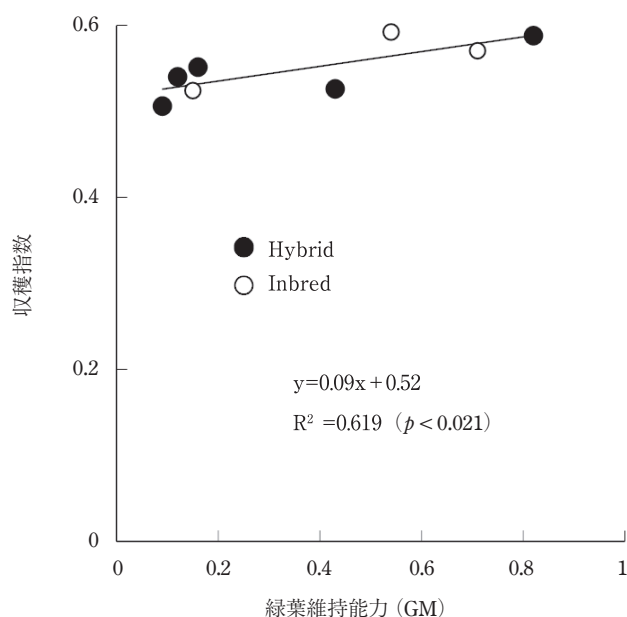


第3図 中国武漢における hybrid と inbred 水稻品種と IR8 の止葉葉片の培養前 (SPAD_s) と後 (SPAD_e) の SPAD 値. 各点は 5 反復の平均値, 縦線と横線は Tukey 法による 5% での最小有意差 (LSD_{0.05}) を示す.

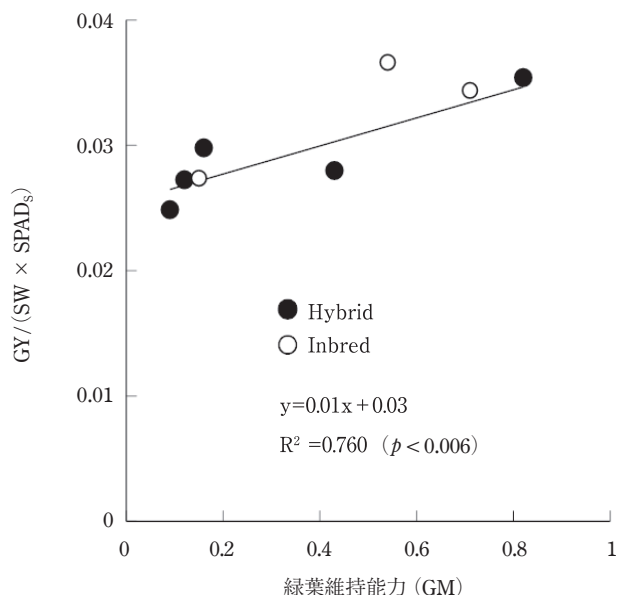
考 察

イネコアコレクションにおいて止葉片の培養により幅広い緑葉維持能力の品種間差が認められたことは、登熟期の葉身における葉緑素の分解しやすさに品種間で大きな変異があることを示唆した。また、ジャポニカは緑葉維持能力がインディカよりもやや高いと見なされた。ただし、日本のコアコレクション品種では収集地域が近接した品種間でも GM が大きく異なり、また採取地不明の 8 品種を除いた品種の採取された地域の緯度と GM との間に有意な関係はなかった ($r=0.211, p=0.197$) ことから、緯度が大きく影響する気温や日長 (JMA 2020) と GM との間には関連性が認められなかった。従って、採種された栽培地域の環境的要因が GM に影響を与えているようには見なされなかった。

緑葉維持能力の遺伝的背景については、イネの stay green 突然変異系統において葉緑素の分解過程が阻害されることが知られている (Kusaba ら 2007) もの、子実の充実が不良で葉から子実への窒素移行が阻害され登熟を低下させる可能性があり生産的に有効とは言えない (Thomas and Howarth 2000, Spano ら 2003)。一方、ベトナムのインディカを含むイネ在来品種の緑葉維持能力は土壌乾燥下の乾物生産維持 (Hoang and Kobata 2009a) と、また、日本のイネコアコレクション早生品種の緑葉維持能力は高温下における光合成や登熟維持 (Kobata ら 2015) と関係があった。ソルガムの場合は緑葉維持能力の高い品種の性質が干ばつ下の生産を高めるために育種利用されている (Borrell ら 2000)。子実生産に貢献する緑葉維持



第4図 中国の hybrid (黒塗) と inbred (白抜) 水稻品種の止葉葉片の緑葉維持能力 (GM) (第3図) と収穫指数 (harvest index) との関係. 収穫指数は収量と全重の 4 反復の平均値から求めた.



第5図 中国の hybrid (黒塗) と inbred (白抜) 水稻品種における茎葉重 (straw weight; SW, g m^{-2}) で重み付された総茎葉 SPAD 値当たりの子実収量 (grain yield; GY, g m^{-2}) [$\text{GY}/(\text{SW} \times \text{SPAD}_s)$] と緑葉維持能力 (GM) との関係.

能力には葉自体の葉緑素維持能力と共に窒素吸収能力 (Borrell and Hammer 2000, Kobata and Hoang 2010) に関係する大きな根系分布 (Hoang and Kobata 2009b) などが加わった葉身葉緑素の単なる分解阻害のみではない要因 (Thomas and Howarth 2000, Kobata ら 2015) も関与していると考えられるため、本葉片培養法による品種特性が直ちに栽培的に有用な特性を示すとは言えない。ただし、中

国の多収 ($9-11 \text{ t ha}^{-1}$) hybrid および inbred イネ品種における止葉片による GM と収穫指数との間の正の直線関係は、高温環境下で栽培されてもこれらの高収量品種では緑葉維持能力が全生産量に対する子実生産効率を高めることを示唆した。この時、穂ぞろい期における SPAD_s を収穫期の茎葉部重 (SW) で重み付した茎葉の葉緑素量 (SW × SPAD_s) で収量 (GY) を除した総茎葉 SPAD 値当たりの子実収量 [GY/(SW × SPAD_s)] と GM との間には有意な正の直線関係があった (第5図)。多収 hybrid イネでは登熟期間中に茎葉部重が子実の炭水化物ソースとして 30% 程度低下する場合があるものの (Katsura ら 2007)、登熟歩合の低い hybrid イネでは同期間の茎葉部重の低下は比較的少ないとされている (Yang ら 2002)。従って、成熟期の茎葉重は登熟初期の茎葉重に比べやや過小評価される可能性があるものの、GM が大きいほど登熟初期の茎葉の総葉緑素当たりの子実生産効率が高いことを示唆している。また、SPAD 値はイネ葉身窒素含量をよく反映する (Yang ら 2014) ため、葉身の緑葉維持能力が高い品種では茎葉窒素当たりの子実生産効率が高いことを示唆している。

以上からイネの緑葉維持能力には大きな品種的多様性があることが示された。このような緑葉維持能力の農業生産的な貢献については、日射乾物転換効率と GM との関係などによるさらなる解析、評価が必要であろう。

引用文献

- Borrell, A.K. and Hammer, G.L. 2000. Nitrogen dynamics and the physiological basic of stay-green in sorghum. *Crop Sci.* 40: 1295-1307.
- Borrell, A.K., Hammer, G.L. and Douglas, A.C.L. 2000. Does maintaining green leaf area in sorghum improve yield under drought? 1. Leaf growth and senescence. *Crop Sci.* 40: 1026-1037.
- Hoang, T.B. and Kobata, T. 2009a. stay-green in rice (*Oryza sativa* L.) of drought-prone areas in desiccated soils. *Plant Prod. Sci.* 12: 397-408.
- Hoang, T.B. and Kobata, T. 2009b. Root contribution to stay-green in rice (*Oryza sativa* L.) subjected to desiccated soils in the post-anthesis period. *Root Res.* 18: 5-13.
- Inada, K. 1965. Studies on a method for determining the deepness of green color and chlorophyll content of intact crop leaves and its practical applications. 2. Photoelectric characters of chlorophyll-meter and correlation between the reading and chlorophyll content in leaves. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* 33: 301-308.
- JMA. 2020. 日本気象協会. <http://www.jma.go.jp/jma/index.html> (2020 年 6 月 15 日閲覧).
- Katsura, K., Maeda, S., Horie, T. and Shiraiwa, T. 2007. Analysis of yield attributes and crop physiological traits of Liangyoupeijiu, a hybrid rice recently bred in China. *Field Crops Res.* 103: 170-177.
- Kobata, T. and Hoang, T.B. 2010. Is the stay-green a stable strategy for development of drought resistance in rice? In *Proc. 3rd Int. Rice Congress (IRRC28)*, Hanoi. 3764.
- Kobata, T., Shinonaga, M., Yoshida, H., Tomisaka, K. and Akai, K. 2015. Stay-green trait assessment using the leaf incubation method to examine the maintenance of assimilation rates under high temperature conditions during the grain-filling period. *Plant Prod. Sci.* 18: 254-266.
- Kojima, Y., Ebana, K., Fukuoka, S., Nagamine, T. and Kawase, M. 2005. Development of an RFLP-based rice diversity research set of germplasm. *Breed. Sci.* 55: 431-440.
- Kusaba, M., Ito, H., Morita, R., Iida, S., Sato, Y., Fujimoto, M., Kawasaki, S., Tanaka, R., Hirochika, H., Nishimura, M. and Tanaka, A. 2007. Rice non-yellow coloring1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell* 19: 1362-1375.
- NIAS 2009. NIAS Genebank. http://www.gene.affrc.go.jp/databases-core_collections_wr.php (2020 年 6 月 15 日閲覧).
- Spano, G., Di Fonzo, N., Perrotta, C., Platani, C., Ronga, G., Lawlor, D.W., Napier, J.A. and Shewry, P.R. 2003. Physiological characterization of 'stay green' mutants in durum wheat. *J. Exp. Bot.* 54: 1415-1420.
- Thomas, H. and Howarth, C.J. 2000. Five ways to stay-green. *J. Exp. Bot.* 51: 329-337.
- Yang, J., Peng, S., Zhang, Z., Wang, Z., Visperas, R. M. and Zhu, Q. 2002. Grain and dry matter yields and partitioning of assimilates in japonica/ indica hybrid rice. *Crop Sci.* 42: 766-772.
- Yang, H., Yang, J., Lv, Y. and He, J. 2014. SPAD values and nitrogen nutrition index for the evaluation of rice nitrogen status. *Plant Prod. Sci.* 17: 81-92.

Diversity of Stay Green Traits in Flag Leaf of Rice : Tohru KOBATA¹⁾, Kouhei TOMISAKA¹⁾, Miwa SHINONAGA¹⁾ and Shaobing PENG²⁾
(¹⁾Fac. Life Science, Shimane Univ., Matsue, 690-8504, Japan; (²⁾College of Plant Sci. and Tec., Huazhong Agricultural Univ.)

Abstract : Cultivar variances in the stay green trait of flag leaves in NIAS World (WRC), Japanese (JRC) rice core collection and Chinese high yielding hybrid and inbred cultivars were investigated. A leaf color reading (SPAD) was determined using the chlorophyll meter at the center of the flag leaf segment floated on water at 35°C under dark conditions for one week. There was a large cultivar variance in a ratio of after (SPAD_E) to before (SPAD_S) incubation in SPAD (GM= SPAD_E/SPAD_S). In WRC and JRC cultivars, GM in japonica rice tended to occupy a higher rate than indica and tropical japonica rice. There were typical cultivars of high GM in which both SPAD_E and SPAD_S were significantly high. In Chinese high yielding rice ($9-11 \text{ t ha}^{-1}$), the GM diversely differed and positively related with harvest index and the grain yield per total straw weight × SPAD value. These relationships suggested that higher GM increased the productivity of straw for the grain yield due to maintenance of chlorophyll function. It was suggested that the stay green trait is widely distributed in rice resources and it can be used for the improvement of rice production.

Key words : Flag leaf, Indica, Japanese rice core collection, Japonica, Rice, Stay green, World rice core collection.