

青色光がイネおよびホウレンソウの
光合成特性と成長に及ぼす影響

Effects of Blue Light on Photosynthetic Characteristics
and Growth of Rice and Spinach

2007 年 3 月

東京大学 大学院農学生命科学研究科 生物・環境工学専攻

松田 怜

指導教員 蔵田 憲次 教授

Abbreviations

2-ME	2-mercaptoethanol
A_{20}	Light-saturated rate of photosynthesis at a $p\text{Ci}$ of 20 Pa
$A_{>60}$	Light-saturated rate of photosynthesis at a $p\text{Ci}$ above 60 Pa
A_c	RuBP carboxylation-limited rate of photosynthesis
ADP	Adenosine-5'-diphosphate
A_j	Electron transport-limited rate of photosynthesis
ANCOVA	Analysis of covariance
A_p	Pi regeneration-limited rate of photosynthesis
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
CBB	Coomassie brilliant blue
Chl	Chlorophyll
cry	Cryptochrome
cv	Cultivar
Cyt	Cytochrome
DTT	Dithiothreitol
DW	Dry weight
EC	Enzyme Commission number
EDTA	Ethylenediamine- N, N, N', N' -tetraacetic acid
F6P	Fructose-6-phosphate
FBP	Fructose-1,6-bisphosphate
Fru	Fructose
ϕ	Initial slope of the PPFD-response curve of electron transport rate
g	Gravitational acceleration

G1P	Glucose-1-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
Glc	Glucose
Γ_*	CO ₂ compensation point in the absence of mitochondrial respiration
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
<i>I</i>	Incident PPFD
<i>J</i>	Electron transport rate
J_{\max}	Maximum electron transport rate
K_c	Michaelis-Menten constant of Rubisco for CO ₂
K_o	Michaelis-Menten constant of Rubisco for O ₂
LA	Leaf area
LAR	Leaf area ratio
LDS	Lithium dodecylsulfate
LED	Light-emitting diode
LHCI	Light-harvesting Chl <i>a/b</i> -binding protein of PSI
LHCII	Light-harvesting Chl <i>a/b</i> -binding protein of PSII
LSU	Large subunit of Rubisco
LWR	Leaf weight ratio
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
NADP ⁺	Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, oxidized form
NADPH	Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form
NAR	Net assimilation rate
NR	Nitrate reductase
<i>P</i>	Probability
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis

pCa	Ambient CO ₂ partial pressure
pCi	Intercellular CO ₂ partial pressure
PFD	Photon flux density
P_{FR}	The form of phytochrome absorbing maximally far-red light
PGA	3-phosphoglyceric acid
phot	Phototropin
phy	Phytochrome
Pi	Orthophosphate
PPFD	Photosynthetic photon flux density
Ppi	Pyrophosphate
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
P_{TOTAL}	Total phytochrome
PVDF	Polyvinylidene difluoride
r^2	Coefficient of determination
R_d	Mitochondrial respiration in the light
RGR	Relative growth rate
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphate
SDS	Sodium dodecylsulfate
SLA	Specific leaf area
SSU	Small subunit of Rubisco
Suc	Sucrose
TNC	Total non-structural carbohydrate
T_p	Rate of triose phosphate export

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
θ	Convexity of the PPFD-response curve of electron transport rate
U	Enzyme unit
VPD	Vapor pressure deficit
V_{cmax}	Maximal Rubisco carboxylation rate
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume

目次

第 1 章 緒言	1
1. 本研究の背景と目的	2
2. 本論文の構成	5
第 2 章 赤色光への青色光の付加がイネの乾物生産に及ぼす影響	6
1. 序論	7
2. 赤色光および赤青混合光照射下で成育したイネ葉の光合成特性	10
2.1 はじめに	10
2.1 C ₃ 光合成モデル	12
2.2 材料および方法	17
2.2.1 供試植物および成育条件	17
2.2.2 光環境条件	19
2.2.3 光合成速度測定	20
2.2.4 生化学分析	21
2.2.5 統計処理	25
2.3 結果	31
2.3.1 光合成特性	31
2.3.2 光合成関連タンパク質量	32
2.4 考察	41
3. 赤色光および赤青混合光照射下におけるイネの成長	44
3.1 はじめに	44
3.2 材料および方法	46
3.2.1 供試植物, 成育条件および光環境条件	46

3.2.2 成長解析および窒素定量	46
3.2.3 生化学分析	48
3.2.4 統計処理	48
3.3 結果	49
3.3.1 成育	49
3.3.2 成長解析	50
3.3.3 窒素分配	50
3.3.4 葉位別の窒素量, Rubisco 量および Chl 量	51
3.4 考察	57
4. 結論	60
第 3 章 ホウレンソウの光順化応答における青色光の作用	61
1. 序論	62
2. 青色光強度とホウレンソウの個葉レベルの光順化応答との関係	64
2.1 はじめに	64
2.2 材料および方法	67
2.2.1 供試植物および成育条件	67
2.2.2 光環境条件	69
2.2.3 光合成速度測定	69
2.2.4 生化学分析	69
2.2.5 統計処理	70
2.3 結果および考察	74
3. 青色光強度とホウレンソウの個体レベルの光順化応答との関係	80
3.1 はじめに	80
3.2 材料および方法	83

3.2.1 供試植物, 成育条件および光環境条件	83
3.2.2 成育調査および窒素定量	83
3.2.3 炭水化物定量	84
3.2.4 統計処理	85
3.3 結果および考察	87
4. 結論	95
第4章 結語	97
1. 本論文の総括	98
2. 今後の展開	101
要約	103
引用文献	108
参考図書	125
謝辞	126

第 1 章

緒言

1. 本研究の背景と目的

青色光は、高等植物の形態形成や器官の運動のみならず、光合成や乾物生産にも顕著な影響を及ぼす光の波長成分である。青色光が形態形成や器官の運動に及ぼす影響に関する研究の端緒を開いたのは、1817年の Poggioli による、芽生えの光屈性が青色光に高い感度を有することの発見である。その後、光屈性以外にも、胚軸・子葉の伸長成長、花芽形成、概日リズム制御、葉緑体定位運動、気孔開口、光周性など多くの応答が、青色光によって制御されていることが明らかとなった。現在では、それらの形態形成や器官の運動に関わる cryptochrome (cry) , phototropin (phot) , FKF1 などの青色光受容体分子 (Briggs and Huala 1999, Christie and Briggs 2001, Lin 2000, Imaizumi et al. 2003) や、シグナル伝達機構 (Lin 2000, Liscum et al. 2003) , さらにはそれらの応答の生理的意義 (例えば, Zeiger et al. 1981, Kasahara et al. 2002, Takemiya et al. 2005) に至るまで、多くの知見が蓄積している。

波長組成が光合成や乾物生産に及ぼす影響に関する研究は、McCree (1972) や Inada (1976) による光合成の作用スペクトルの決定によって大きく進展した。1980年代には人工光を栽培光源として利用する植物生産施設が検討されはじめ、さまざまな光源を用いた植物の栽培試験が行われた (例えば, Tibbitts et al. 1983) 。そして、波長組成が植物の成育に及ぼす影響も議論されるようになった。そのような中で、波長組成の中でも特に青色光強度が乾物生産に顕著な正の影響を及ぼすことが報告された。例えば Britz and Sager (1990) は、青色光成分を著しく欠く低圧ナトリウムランプを栽培光源としてダイズを育成すると、白色蛍光灯に比較して、光合成有効光量子束密度 (PPFD) は同じでも乾物生産が抑制されることを報告した。また栽培光の PPFD に占める青色光量子束密度 (PFD) の比率 (青色光比率) が低いほど個体乾物重が減少す

ることが、ハウレンソウ (Hanyu and Shoji 2000b) やレタス (Dougher and Bugbee 2001) で観察された。さらに、赤色発光ダイオード (LED) に青色光を総 PPF_D の 1-10% の比率で付加して長期間照射すると、赤色光単独で照射するのに比較して、乾物重が著しく増加することも数種の植物種を用いた研究から明らかにされた (Brown et al. 1995, Goins et al. 1997, Yorio et al. 2001) 。しかし、異なる青色光強度下で成育した植物の乾物生産の差をもたらす要因については現在も明らかにされていない。人工光利用型の植物生産施設においては、適切な光源や照明方法を用いることで、限定されたエネルギー下において効率的な植物生産を行うことが可能である。長期的な青色光照射が乾物生産に関わる因子に及ぼす影響を明確にすることは、そのような光源や照明法の選択・開発につながるものと考えられる。

他方、自然光においては、青色光強度は季節や時刻によって異なる (Smith 1982) 。また、植物葉は青色光をよく吸収するため、植物群落の上部と下部の光環境の間には著しい青色光強度の差が認められる (Smith 1982) 。したがって、植物は照射光中の青色光強度を感知することで、時空間的に変動する周囲の光環境を認識し、それに順応している可能性がある。自然環境下における青色光の作用に関して、青色光が強光・弱光に対する光順化応答を誘導するシグナルとして働くという仮説が提唱されている (Senger and Bauer 1987, Anderson et al. 1995) 。ここで光順化応答とは、成育環境の光強度下において光エネルギーを効率よく光合成や成長に利用するために植物が示す応答のことを指す。しかし、植物が光強度を認識するためのシグナルとして、照射光中の青色光成分の有無を感知しているのか、あるいは青色光強度を感知しているのかについて調べた研究は見あたらない。青色光強度と光順化応答の程度との関係に関する知見は、光順化における青色光の作用に関する最も基礎的な知見の 1 つであり、その知見は複雑な光順化のメカニズムの解明に貢献するものであると考え

る.

そこで本論文では、光合成および乾物生産に対する青色光の作用に関する 2 つの研究を行った。1 つは、赤色光への低光強度の青色光の付加が植物の乾物生産を促進するという現象に焦点を当て、その乾物生産促進をもたらす要因を明らかにするための研究である。もう 1 つは、「青色光が光合成の強光・弱光順化の機構に関与している」という仮説に関して、青色光強度と光順化応答の程度との関係について検討し、青色光に対する植物の応答の生理的意義の一端を明らかにすることを試みた研究である。

2. 本論文の構成

本論文は 4 章からなり，第 1 章は緒言，第 4 章は結語である．第 2 章では，赤色光への青色光の付加による乾物生産促進の要因を調べた．赤色光および赤青混合光照射下で育成したイネを用いて，個葉の光合成特性レベル（第 2 節）および個体成長レベル（第 3 節）の 2 つのレベルで解析を行った．第 3 章では，「青色光は光合成の強光・弱光順化に関与する」という仮説の検証として，ハウレンソウの光順化応答における青色光強度の作用について調べた．総 PPFD は同じで青色光強度の異なる照射光下でハウレンソウを育成し，個葉レベルの光順化応答（第 2 節）と個体レベルの光順化応答（第 3 節）について解析した．最終章である第 4 章では，本論文を総括し，今後の展望について述べた．なお，既往の研究については，第 1 章では簡潔に触れるにとどめ，詳細はそれぞれの章の序論において記述することとした．

第 2 章

赤色光への青色光の付加がイネの乾物生産に及ぼす影響

1. 序論

LED は、蛍光灯に比較して、寿命が長く、衝撃に強く、軽量かつ省スペースであるなど、人工光利用型の植物生産施設の光源に適した特長を有する (Bula et al. 1991) . 特に赤色 LED には、他の波長の LED と比較して安価であることのみならず、光合成に有効な波長域における発光効率が白色蛍光灯よりも高いこと、さらに射出波長帯が光合成色素である chlorophyll (Chl) の吸収ピークに近いことなどの利点がある。これらのことから、植物工場や宇宙ステーションなどの人工光利用型植物生産施設における赤色 LED の利用を想定した栽培試験が行われてきた。そして、赤色 LED のみを光源として植物を栽培することが可能であることが、レタス (Bula et al. 1991), トウガラシ, キュウリ (Schuerger and Brown 1994) において実証された。しかし、赤色 LED のみを用いて栽培した植物の個体あるいは地上部乾物重が、白色蛍光灯やメタルハライドランプなどの白色光源を用いて栽培した植物のそれより著しく小さく、およそ 2-6 割となることも明らかとなった (Brown et al. 1995, Goins et al. 1997, Yorio et al. 2001) . Brown et al. (1995) は、植物の発達や形態形成には赤色光だけでなく青色光や遠赤色光が顕著な影響を及ぼすことを考慮して、多数の赤色 LED に若干の青色光蛍光灯または遠赤色 LED を組み合わせて照射する試験を行った。その結果、赤色 LED に青色蛍光灯を付加した下で成育したトウガラシの個体乾物重は、メタルハライドランプ照射下での乾物重には及ばないものの、赤色 LED のみの照射光下で成育したトウガラシの乾物重より著しく大きく、約 1.5 倍となった。照射光の青色光比率は 1% 程度であったことから、低強度であっても照射光中に青色光が含まれていることが乾物生産を促進することが明らかとなった。さらに、コムギ (Goins et al. 1997) , ホウレンソウ, ダイコン, レタス (Yorio et al. 2001) においても、赤色 LED 照射光に青

色光を 1-10% の比率で付加して栽培した個体の乾物重が、赤色 LED 単独照射下で栽培した個体の乾物重の 1.4-2.7 倍となることが観察された。これらの報告は、赤色 LED に若干の青色光を付加することが、植物の乾物生産を高める上で有効であることを示すとともに、青色光が多くの植物種において乾物生産に関わる因子に何らかの重要な作用を示すことを示唆している。

青色光には他の波長よりも気孔をより開口させる作用がある (Sharkey and Raschke 1981, Karlsson 1986) 。 Goins et al. (1997) は、赤色光に青色光を付加した条件下において、コムギ個葉の光合成速度と気孔コンダクタンスの増加を観察しており、これらの増加が個体の乾物生産の促進に関わっていると推察している。他方、Yorio et al. (2001) は、レタスにおいては、赤色光に青色光を付加した条件下で乾物重および気孔コンダクタンスは増加するものの、光合成速度は増加しないことを報告している。このように、赤色光への青色光の付加による乾物生産促進は、必ずしも気孔コンダクタンスの増加によってもたらされた光合成速度の増加で説明できるものではない。また、植物を育成する際の青色光強度は、光合成に関わる酵素やタンパク質の量 (Leong and Anderson 1984a, López-Juez and Hughes 1995) , および個体の葉面の展開 (Britz and Sager 1990) などにも影響を及ぼすと報告されている。しかし、これらの生化学的特性や形態的特性の変化が、個体の乾物生産促進にどのように関わるのかについては明らかにされていない。

そこで本章では、赤色光に低強度の青色光を付加して長期間照射することによる乾物生産の促進に関わる要因を明らかにすることを目的とした。イネを、赤色光または赤青混合光 (赤色光と青色光の PFD 比は 4 : 1) 照射下で約 1 ヶ月間成育させた。そして、まず最上位完全展開葉の光合成特性を、ガス交換測定と生化学分析によって調べた (第 2 節) 。次に、成長解析および葉身への N 分配に関する調査を行った (第 3 節) 。なお実験材料としてイネを選

扱った理由は、種々の環境変化 (光強度, 温度, CO₂ 濃度など) に対して、個葉光合成レベルや個体成長レベルでどのように応答して成育するかについて、多くの知見が蓄積されている (for a review, see Makino 2003) ためである。

2. 赤色光および赤青混合光照射下で育成したイネ葉の光合成特性

2.1 はじめに

植物の乾物の大部分は光合成産物に由来する。本節ではまず、赤色光への青色光の付加による乾物生産促進に深く関わっていると予想される葉の光合成に着目した。

これまでに、長期的な青色光照射が光合成の生化学的特性に影響を及ぼすことを報告した研究がいくつかある。青色蛍光灯照射下で育成した植物葉では、赤色蛍光灯照射下で育成した葉と比較して、Chl *a/b* 比が高く (for a review, see Senger and Bauer 1987) , 光化学系 II の集光アンテナタンパク質である light-harvesting Chl *a/b*-binding protein of photosystem II (LHCII) の Chl 量あたりの量 (Leong and Anderson 1984a) または全タンパク質量あたりの量 (Eskins et al. 1991) が多く、Chl 量あたりの電子伝達活性が高く (Leong and Anderson 1984a) , 葉面積あたりの ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco, EC 4.1.1.39) 活性が高い (Eskins et al. 1991) 。しかし、このような長期間の青色光照射による光合成の生化学的特性の変化が、赤色光に青色光を付加して長期間照射した場合の光合成ガス交換特性の変化を説明できるものであるかは不明である。

そこで本節では、赤色光への青色光の付加が単葉の光合成特性に及ぼす影響について調べた。まず、白色光下、適温 (27°C) , 通常大気 CO₂ 分圧 (*p*Ca) 下 (36 Pa) において、育成環境とほぼ同じ PPFD 下および飽和光下での光合成速度を測定した。次に、C₃ 光合成モデル (Farquhar et al. 1980, Farquhar and von Caemmerer 1982, Sharkey 1985a) に基づいた光合成速度の測定により、光合成を規定する能力のうち CO₂ 固定能力と RuBP 再生産能力を

生体内レベルで評価した。また、光合成を規定する能力に関わる生化学的因子として、Rubisco 量、Cyt *f* 量、Chl 量、LHCII 量を定量し、赤色光単独照射イネと赤青混合光照射イネの間の光合成速度の差が、生化学的因子量の差で説明できるものであるかについて調べた。C₃ 光合成モデルについては本章 2.2 で詳細に説明する。

さらに、光合成速度と、光合成に関連する生化学的因子量が、葉身 N 量とどのような関係にあるかにも着目した。C₃ 植物葉の光合成速度は葉面積あたりの N 量に大きく依存する (for a review, see Evans 1989)。これは、葉身に含まれる N の約 80% が光合成を行う場である葉緑体に局在し (Makino and Osmond 1991b)、その多くが光合成関連タンパク質として機能していることを反映している (Evans and Seemann 1989)。さらに、いくつかの研究によれば、植物は環境変化に対して、葉身 N 量を変化させるのみならず、光合成関連因子間の N 分配をも変化させて応答すると報告されている (Seemann et al. 1987, Terashima and Evans 1988, Hikosaka and Terashima 1996)。これらのことをふまえて、赤色光に青色光を付加して長期間照射することにより生じた光合成速度の差が、葉身 N 量の差によるのか、あるいは光合成関連因子間の N 分配の差によるのかを評価した。そして最後に、得られた結果に基づいて、実際の成育環境の光質下における光合成速度に関する考察を行った。

2.2 C₃ 光合成モデル

長期的な青色光照射が個葉の光合成特性に及ぼす影響を評価するためには、光合成特性がどのような因子によって規定されているかを把握する必要がある。Farquhar et al. (1980) および Farquhar and von Caemmerer (1982) によって提唱された C₃ 光合成モデルと、それに関連する多くの理論的、実証的研究により、C₃ 植物葉の光合成を規定する因子が明らかにされてきた。

このモデルは、Rubisco の酵素的性質 (kinetics) に基づいて構築されている。このモデルの概念は次の通りである。至適温度、光飽和条件下での個葉の光合成速度は、低 CO₂ 分圧下では大気から葉緑体ストロマまでの CO₂ の拡散と Rubisco の CO₂ 固定速度によって、また高 CO₂ 分圧下では光合成電子伝達速度によって決定される RuBP 再生産速度によって、それぞれ律速される。なお、このモデルの提唱後に、RuBP 再生産速度は、電子伝達速度あるいは光合成最終産物である sucrose (Suc) ・ starch 生産に伴う無機リン酸 (以後、Pi) の再生産速度のいずれかによって律速される、と改良されている (Sharkey 1985a)。また弱光下での光合成は、光量子の吸収率と量子収率、すなわち集光反応を含めた電子伝達速度によって律速される (Sage 1990, Hikosaka and Terashima 1995, Evans 1996)。以上をまとめると、個葉の光合成は、1) Chl 等の光合成色素により光エネルギーを捕捉する集光能力、2) 光合成電子伝達系によって光エネルギーから ATP, NADPH を合成する電子伝達能力、3) 大気から葉緑体ストロマまでの CO₂ 拡散を含めた Rubisco の CO₂ 固定能力、4) Suc ・ starch 生産に伴う Pi 再生産能力、の 4 つの能力によって規定されることになる。

次に、具体的な数式について簡潔に示す。Rubisco の CO₂ 固定速度、電子伝達速度、Pi 再生産速度によって律速される光合成速度 A_c , A_j , A_p は、そ

れぞれ,

$$A_c = \frac{(C - \Gamma_*) \cdot V_{c \max}}{C + K_c \cdot \left(1 + \frac{O}{K_o}\right)} - R_d \quad (1)$$

$$A_j = \frac{(C - \Gamma_*) \cdot J}{4C + 8\Gamma_*} - R_d \quad (2)$$

$$A_p = 3T_p - R_d \quad (3)$$

と表される (Farquhar et al. 1980, Farquhar and von Caemmerer 1982) . ここで, $V_{c \max}$ は Rubisco の最大 carboxylation 速度, K_c と K_o はそれぞれ Rubisco の CO_2 と O_2 に対する Michaelis-Menten 定数, Γ_* はミトコンドリア呼吸速度を無視したときの光合成速度の CO_2 補償点, C と O はそれぞれ葉緑体ストロマの CO_2 と O_2 濃度, J は電子伝達速度, T_p は Pi 再生産速度, R_d は明期のミトコンドリア呼吸速度である. さらに J は,

$$J = \frac{\phi \cdot I + J_{\max} - \sqrt{(\phi \cdot I + J_{\max})^2 - 4\theta \cdot \phi \cdot I \cdot J_{\max}}}{2\theta} \quad (4)$$

と表される (von Caemmerer 2000) . ここで, ϕ は PPFD-電子伝達速度曲線の初期勾配, I は入射 PPFD, J_{\max} は最大電子伝達速度, θ は PPFD-電子伝達速度曲線の凸度である. 式 (1) - (4) 中の ϕ , J_{\max} , $V_{c \max}$, T_p が, それぞれ集光能力, 電子伝達能力, Rubisco の CO_2 固定能力, Pi 再生産能力を反映するパラメータである. このモデルの生化学的な概念図を Fig. 1 に, また式 (1) - (4) に基づいた光合成速度の葉内 CO_2 分圧および PPFD 依存性の概念図を Fig. 2 に示す.

これまでの検証実験により，短期的な環境変化 (PPFD, CO₂ 分圧, 温度など) に対する光合成速度の応答がこのモデルによって説明できることが多くの C₃ 植物で確かめられており (例えば, von Caemmerer and Farquhar 1981, 1984, Evans 1986, Makino et al. 1988 など), 現在ではこのモデルの妥当性が広く認められている. このモデルに基づいた解析を行うことにより, 長期的な青色光照射が, 光合成を規定するどの能力に影響を及ぼすのかについて明確にすることができる.

本研究では, このモデルを利用して解析を行った Makino et al. (1994) の研究を参考にして, 光合成を規定する能力を生体内レベルで評価した. すなわち, 飽和光下において, 葉内 CO₂ 分圧 (*p*Ci) 20 Pa および 60 Pa 以上の条件下で光合成速度を測定し, それぞれ生体内における CO₂ 固定能力および RuBP 再生産能力として評価した. さらに, 光合成を規定する能力の指標となる生化学的因子を定量した. 集光能力を担う色素およびタンパク質として Chl (Gabrielsen 1948, Hikosaka and Terashima 1995) および LHCII (Evans 1988, Hidema et al. 1992) を, 電子伝達の律速に関わるタンパク質の 1 つとして cytochrome (Cyt) *f* (Evans 1987, Price et al. 1998, Sudo et al. 2003) を, CO₂ 固定の鍵酵素として Rubisco (Evans 1983, Makino et al. 1983b, von Caemmerer and Quick 2000) をそれぞれ定量した. なお Pi 再生産能力に関しては, 低 O₂ 分圧などを伴う著しい高 CO₂ 分圧下 (Sharkey 1985b, Sharkey et al. 1986) や急激な気温低下 (Labate and Leegood 1988) などの極端な環境下を除き, この能力によって光合成が律速される局面は稀である (Socias et al. 1993, Makino et al. 1994). このことから, 赤色光に青色光を付加して長期間照射することによる乾物生産向上に Pi 再生産能力の変化が関わっている可能性は低いと考えられたので, 本研究ではこの能力の指標となる生化学的因子についての測定は行わなかった.

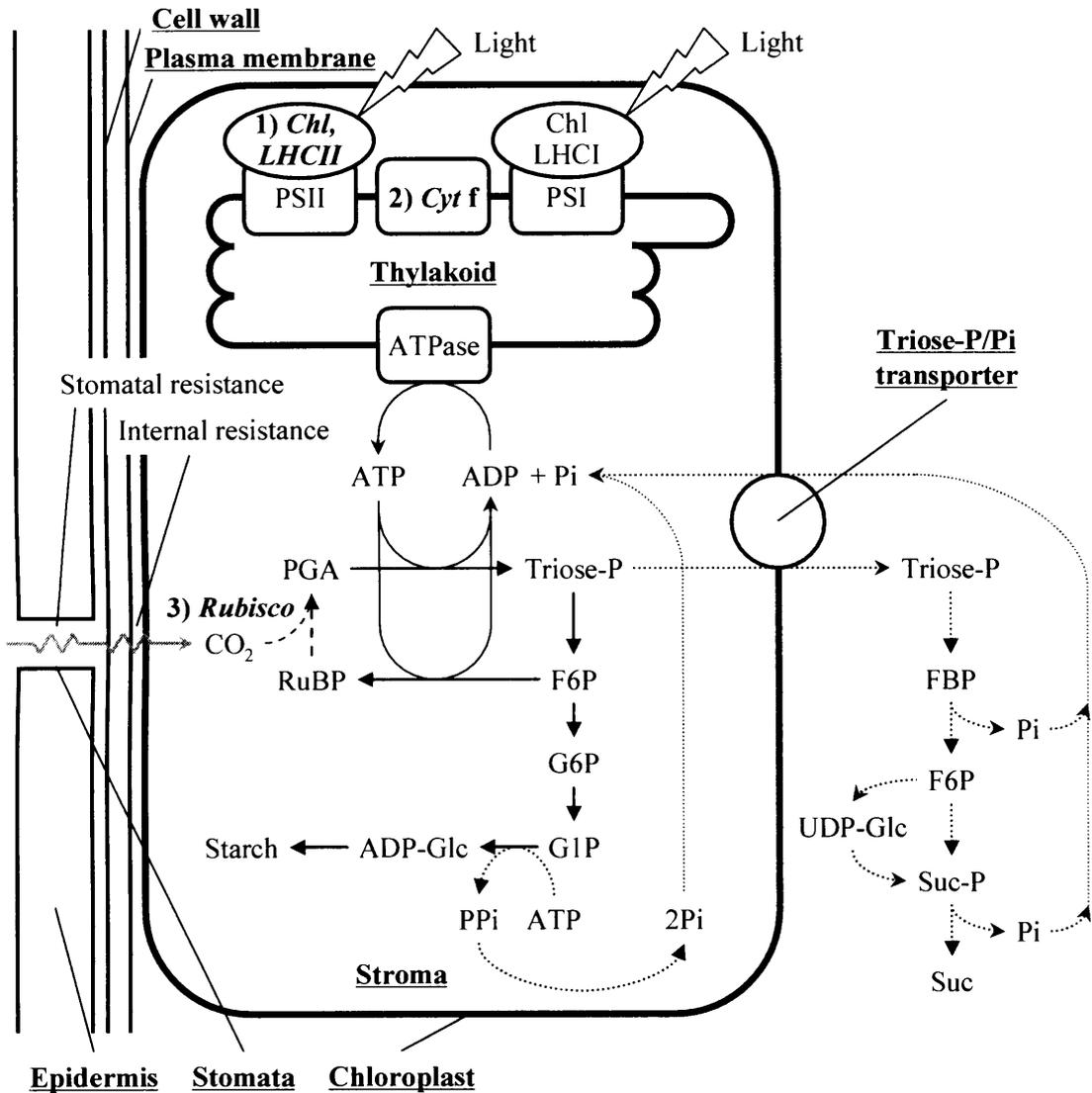


Fig. 1 Schematic diagram of four biochemical processes limiting photosynthesis of C_3 leaves, based on a model developed by Farquhar et al. (1980) and Sharkey (1985a). Solid, dashed, and dotted arrows represent processes limited by electron transport, RuBP carboxylation, and Pi regeneration, respectively. In the present study, Chl and LHCII (1), Cyt *f* (2), and Rubisco (3) were determined as key components of the capacities for light harvesting, electron transport, and RuBP carboxylation, respectively. ADP: adenosine-5'-diphosphate; F6P: Fru-6-phosphate; FBP: Fru-1,6-bisphosphate; G1P: Glc-1-phosphate; G6P: Glc-6-phosphate; LHCI: light-harvesting Chl *a/b*-binding protein of PSI; PGA: 3-phosphoglyceric acid; Ppi: pyrophosphate; PSI: photosystem I; PSII: photosystem II.

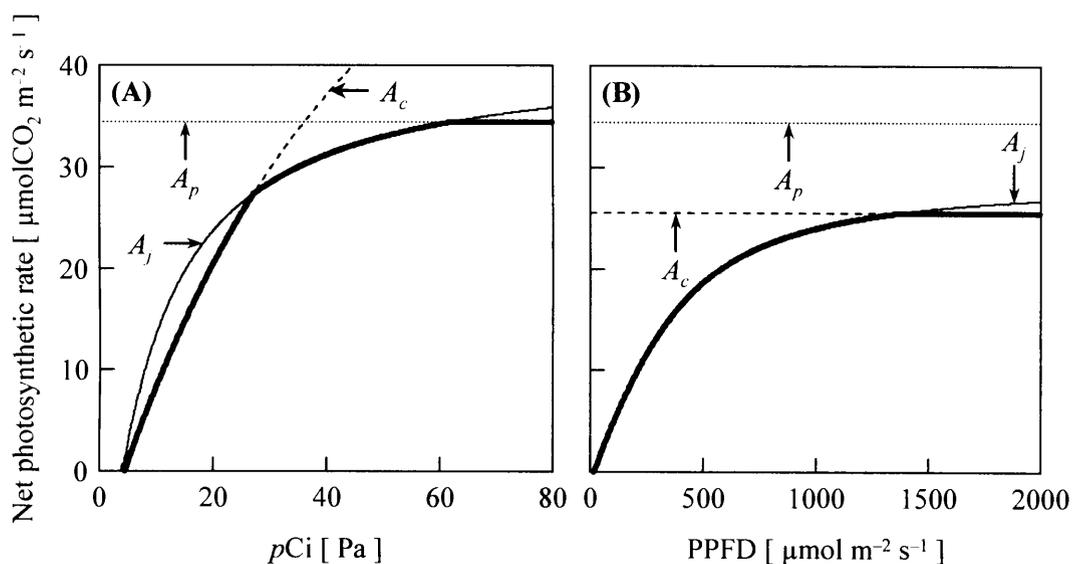


Fig. 2 Modeled rates of photosynthesis based on the model of C_3 photosynthesis. (A) Net photosynthetic rate under a saturating light condition as a function of pCi . (B) Net photosynthetic rate under a normal atmospheric CO_2 condition. Solid, dashed and dotted lines represent electron transport-limited (A_j), RuBP carboxylation-limited (A_c) and Pi regeneration-limited (A_p) rates of photosynthesis, respectively. Bold line represents the minimum rate that is the actual rate of net photosynthesis. Under light-limiting conditions, photosynthesis is limited by A_j . Under light-saturating conditions, photosynthesis is limited by A_c at low pCi , and A_j and/or A_p at high pCi . Net photosynthetic rates were calculated using equations (1) - (4) (see the text) with model parameters taken from von Caemmerer (2000).

2.2 材料および方法

2.2.1 供試植物および育成条件

供試植物にはイネ (*Oryza sativa* L. 品種: ササニシキ) を用いた. 種子をシャーレ中で東京都水道水 (以後, 水道水) に浸漬し, そのシャーレを気温 30°C, 連続暗期の恒温器内に 36-48 h 静置し吸水, 発芽させた. ポリプロピレン製容器 (L: 190 mm × W: 330 mm × H: 230 mm) に, 2 mol L⁻¹ HCl を用いて pH を 5.3 ± 0.1 に調整した水道水を満たし, 木枠付きサランネット (L: 180 mm × W: 300 mm) を浮かべた. 発芽した種子をサランネット上に播種し, 人工気象室内で 21 日間育苗した. 人工気象室は白色蛍光灯 (FLR110H·EX-N/A-H, 東芝ライテック (株) 製) および家庭用空調機 (SAP-V22B, 三洋電機 (株) 製) を備えている. 人工気象室内は PPFD: 320 μmol m⁻² s⁻¹, 明暗周期: 明期 16 h / 暗期 8 h, 気温: 明期 25 ± 2°C / 暗期 20 ± 2°C に調節した.

播種後 21 日目に成育の揃った個体 (葉齢: 3.6-3.9, 草丈: 約 12 cm, 第 4 葉の葉身長: 約 6 cm) を 36-40 個体選抜した. 蓋の中心部に円状の穴 (φ: 20 mm) を開けた内容積約 500 mL のポリエチレン製円柱褐色ボトル (φ: 75 mm × H: 150 mm) に, 1 ボトルあたり 2 個体ずつを移植した. 初の上部約 1 cm の位置にウレタン材を巻き, 植物体がボトルの穴の位置でウレタン材によって支持されるようにした. 移植日から, LED パネル (LHP0364-040, 岩崎電気 (株) 製) を備えたインキュベータ (MIR-553, 三洋電機 (株) 製, 栽培床面積約 0.25 m²) 内で水耕法で栽培した. LED パネル (L: 300 mm × W: 300 mm × H: 110 mm) は, ピーク波長 650 nm の赤色 LED 1,296 個とピーク波長 470 nm の青色 LED 648 個からなる.

播種後から光質処理を開始した. 光質処理区は, 赤色光のみを照射する対照区の R 区と, 赤青混合光を照射する RB 区 (赤色光と青色光の PFD 比は

4 : 1) の計 2 処理区とした．各光質処理区の分光 PFD を Fig. 3 に示す．赤色光および青色光 PFD は，定電流電源装置（岩崎電気（株）製）を用いて，各色 LED に独立に供給する電流によって調節した．総 PFD は両光質処理区ともに $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした．インキュベータ内のその他の環境要素は，明暗周期：明期 12 h / 暗期 12 h，気温：明期 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ / 暗期 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ，相対湿度：明期 $75 \pm 10\%$ / 暗期 90% 以上に調節した．PPFD は光源下約 10 cm で調節し，その位置に植物体最上面が位置するように，植物の成育に合わせてボトルを載せた棚の位置を下げた．また全個体の処理期間中の積算受光量を均一にする目的で，1 日 1 回ボトルの位置を入れ替えた．Fig. 4 にインキュベータ内の環境計測の概要を，Fig. 5 にインキュベータ内部の写真を示す．気温と相対湿度は熱電対（銅-コンスタンタン）および温湿度センサプローブ（THP-B4T，神栄（株）製）を用いて測定した．温湿度センサプローブは温湿度変換器（THT-B121，神栄（株）製）に接続した．熱電対および温湿度変換器の出力値は測定・制御モジュール（CR10，米国 Campbell Scientific 社製）によって記録した．インキュベータ内に設置した超音波加湿器（ML-200S，森田電工（株）製）により，明期の相対湿度目標値を 75% とするオンオフ制御を行った．流量 30 L min^{-1} のエアポンプを用いて，外気をインキュベータ内に供給した．

水耕液は， 2 mol L^{-1} HCl で $\text{pH } 5.3 \pm 0.1$ に調整した水温 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ の水道水を用いて調製した．水耕液の組成は Mae and Ohira (1981) にしたがった．標準濃度の水耕液の組成を Table 1 に示す．水耕液の濃度は植物体の成育にあわせて段階的に調製した．播種後 21 日目および 28 日目の水耕液は標準濃度の $1/3$ ，35 日目は $1/2$ ，42 日目は $2/3$ ，49 日目以降は標準濃度とした．播種後 42 日目以降は，水耕液の N 濃度を標準濃度の $1/4$ 倍，1 倍および 4 倍（播種後 49 日目の N 濃度はそれぞれ 0.5 ， 2.0 および 8.0 mmol L^{-1} ）とする N

処理を行った。

サンプルには、播種後 56 日目以降の最上位完全展開葉 (第 8, 9 葉) を用いた。一般にイネ葉身の光合成速度や葉身に含まれる光合成関連タンパク質量および N 量は、出葉後徐々に増加し、葉身の完全展開時とほぼ同時にピークを迎え、老化とともに減少する (Makino et al. 1983b, 1984, Hidema et al. 1991)。葉齢の差に起因する個体間の光合成速度、光合成関連タンパク質量および N 量の差を低減するため、サンプリング時の葉齢がほぼ一定となるよう、各個体において葉齢がおよそ 8.0-8.3 のときに第 8 葉を、また葉齢がおよそ 9.0-9.3 のときに第 9 葉をサンプリングした。Chl, Rubisco, LHCII, および葉身 N の定量のためのサンプルは、葉身を葉鞘から切り離した後、すみやかに新鮮重と葉面積を測定しポリエチレン製サンプリングバッグに入れ、定量に供するまで -80°C で凍結保存した。Cyt *f* 定量用のサンプルは、葉身を葉鞘から切り離した後、すみやかに新鮮重と葉面積を測定し、生葉を定量に供した。葉面積の測定には自動面積計 (AAM-9, 林電工 (株) 製) を用いた。

2.2.2 光環境条件

PPFD の測定には光量子センサ (LI-190SA, LI-250, 米国 LI-COR 社製) を用いた。分光 PFD は、スペクトロメータ (MSR-7000, (株) オプトリサーチ製) を用いて測定した 1 nm ごとの分光放射束より求めた。

分光 PFD と、Gardner and Graceffo (1982) の式にもとづいた式 (1) (Hanyu et al. 1996) から、可逆性フィトクロム (phy) 光平衡 ($P_{\text{FR}} / P_{\text{TOTAL}}$) の値を算出した。 $P_{\text{FR}} / P_{\text{TOTAL}}$ は、光可逆性を示す全 phy (P_{TOTAL}) 中に占める活性型 phy (P_{FR}) の割合である。

$$P_{FR} / P_{TOTAL} = \left(1 + \frac{\sum_{300}^{800} E_{\lambda i} \cdot \sigma_{FR\lambda i}}{\sum_{300}^{800} E_{\lambda i} \cdot \sigma_{R\lambda i}} \right)^{-1} \quad (5)$$

ここで、 $E_{\lambda i}$ は波長 i における光量子束密度、 $\sigma_{FR\lambda i}$ および $\sigma_{R\lambda i}$ はそれぞれ P_{FR} および P_R の波長 i における光変換断面積 (photoconversion cross-section) である。光変換断面積は、ライムギの精製 phy を用いて求められた 2 nm ごとの値 (Sager et al. 1988) を用いた。

算出された P_{FR} / P_{TOTAL} 値は、R 区で 0.89, RB 区で 0.88 と、光質処理区によらずほぼ同じであった。このことから、光質処理区間において、可逆性 phy の作用の差異は無視できると考えられる。

2.2.3 光合成速度測定

ガス交換速度の測定は、気温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の恒温室内において、開放系の携帯用光合成蒸散速度測定装置 (LI-6400, 米国 LI-COR 社製, 以後、光合成測定装置) を用いて行った。チャンバには細葉用チャンバ (6400-11, 米国 LI-COR 社製) を用いた。光源には、チャンバ上面に固定された 35 W 白色ハロゲンランプ (JR12V35WKW/3GZ4, フェニックス電機 (株) 製) を用いた。葉面における PPFd の不均一性の程度を低減させるため、ハロゲンランプと葉面との間に半透明のポリエチレンシートを置いた。光合成測定装置へ供給する空気の露点温度は $15\text{-}17^\circ\text{C}$ とした。

ガス交換速度の測定条件は、1) PPFd $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $p\text{Ca}$ 36 Pa, 2) 光飽和, $p\text{Ca}$ 36 Pa, 3) 光飽和, $p\text{Ci}$ 20 Pa, 4) 光飽和, $p\text{Ci}$ 60 Pa 以上, の 4 つである。各条件下において、光合成が定常状態に達するまで放置し (15-30 min), 定常状態におけるガス交換パラメータを記録した。この光合成測定装置は、ガ

ス交換パラメータの計算に von Caemmerer and Farquhar (1981) の式を用いている。いずれの条件においても、葉温は $27.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、飽差は $1.1 \pm 0.1 \text{ kPa}$ に調節した。 $p\text{Ci}$ を一定とする制御は、 $p\text{Ci}$ をモニタリングしながら $p\text{Ca}$ を手動で調整することにより行った。光飽和となる PPF_D は、予備実験の結果から $1,600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ とした。測定光の PPF_D の調節は、ハロゲンランプと葉面との間に寒冷紗を挟むことにより行った。

2.2.4 生化学分析

凍結保存しておいたサンプルを、新鮮重の 10 倍量 (1 g に対して 10 mL) の磨碎 buffer で、氷上に置いた乳鉢と乳棒を用いて磨碎し、これを粗抽出液とした。磨碎 buffer は、5% (v/v) glycerol と、プロテアーゼ阻害剤として 2 mmol L^{-1} Na-iodoacetate (米国 Aldrich 社製)、還元剤として 0.8% (v/v) 2-mercaptoethanol (2-ME, ナカライテスク (株) 製) を含む、 50 mmol L^{-1} Naphosphate buffer (pH 7.0) である。以下、この粗抽出液の一定量を分取し、Chl, Rubisco, LHCII および葉身 N の定量を行った。

Chl 定量では、まず粗抽出液 100 μL を褐色試験管に取り秤量し、0.5 mL 水、2.4 mL acetone を加えよく攪拌した。それを氷中に 30 min 放置した後、 $1,800 \times g$, 4°C , 15 min の遠心を行い、その遠心上清の 645 nm および 663 nm における吸光度を測定した。それらの吸光度から Arnon (1949) の計算式を用いて Chl *a* および Chl *b* の量を算出し、Chl 量 (Chl *a* と Chl *b* の総量) と Chl *a/b* 比を求めた。吸光度の測定には、以後特に断りのない場合、ダブルビーム分光光度計 (V-530, 日本分光 (株) 製) を用いた。

Rubisco の定量は、sodium dodecylsulfate-polyacrylamide 電気泳動 (SDS-PAGE), coomassie brilliant blue (CBB) 染色後、Rubisco の large subunit (LSU) と small subunit (SSU) の各バンドを切り出し、その色素を formamide で抽出

し比色定量する Makino et al. (1986) の方法を用いた。粗抽出液 495 μL に、終濃度 0.1% (v/v) となるように 10% (v/v) Triton X-100 を加え、よく攪拌しチラコイド膜に結合した Rubisco を可溶化した (Makino and Osmond 1991a) 。15,000 \times g, 4°C, 5 min の遠心後、上清を 180 μL 分取し、終濃度で 1.2% (w/v) lithium dodecylsulfate (LDS) , 2.4% (v/v) 2-ME になるように、15% (w/v) LDS と 2-ME を加えた。攪拌後、沸騰水浴により 100°C, 90 s の LDS 化を行い、これを Rubisco 定量用のサンプルとした。LDS 化したサンプルは電気泳動を行うまで -20°C で凍結保存した。電気泳動はミニスラブ型電気泳動装置 (ミニプロティアン3セル, 日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ (株) 製) を用いて行った。濃縮ゲルおよび分離ゲルのアクリルアミド濃度は、それぞれ 3% (w/v) と 12.5% (w/v) とし、その他、泳動 buffer などの組成は Laemmli (1970) の方法にしたがって調製した。電気泳動時の電流は定電流 (ゲル1枚につき、濃縮ゲル 10 mA, 分離ゲル 15 mA) とした。泳動後のゲルは、0.25% (w/v) CBB R-250, 50% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid 溶液中で 2 h 染色後、20% (v/v) methanol, 70% (v/v) acetic acid 溶液中で一夜脱色した。脱色後のゲルから、Rubisco の LSU と SSU を切り出し、2 mL formamide (ナカライテスク (株) 製) で CBB R-250 を抽出した。抽出は、暗所、50°C, 5 h 振とうしながら行い、その後 595 nm における吸光度を測定した。標準タンパク質には、Makino et al. (1983a) の方法を一部改良した Ishida et al. (1997) の方法によって精製したトマト葉 Rubisco を用いた。Rubisco 態窒素量は、Rubisco 量をタンパク質係数 6.25 (Makino et al. 1983b) で除すことにより求めた。

LHCII の定量は、Rubisco 定量と同様に、SDS-PAGE, CBB 染色後、LHCII のバンドを切り出し、その色素を formamide で抽出し比色定量した。粗抽出液 100 μL を分取し、Chl 量を測定した。次に残りの粗抽出液のうち約 2 mL を 4 枚重ねのガーゼでろ過し、そのろ液を 1,800 \times g, 4°C で flash して

starch を取り除いた後, $1800 \times g$, 4°C , 3 min の遠心を行い沈殿画分を集めた. その沈殿画分に懸濁 buffer を加え, $1,800 \times g$, 4°C , 3 min の遠心を行いその上清を捨てることで沈殿画分を洗浄した. 懸濁 buffer は, 5% (v/v) glycerol を含む 50 mmol L^{-1} Tris/HCl buffer (pH 7.2) である. 洗浄操作を 2 回繰り返して, チラコイド膜を含む不溶性の画分を得た. この不溶性画分を, $150 \mu\text{L}$ の懸濁 buffer で懸濁した. この懸濁液から $20 \mu\text{L}$ を分取し, 懸濁液中の Chl 量を定量した. Chl 定量は, 分取した懸濁液に $380 \mu\text{L}$ の水と 1.6 mL の acetone を加え, 以降は上述の手順にしたがった. 残りの懸濁液から $120 \mu\text{L}$ 分取し, 終濃度で 2.5% (w/v) となるように $25 \mu\text{L}$ の 15% (w/v) LDS を加えた. $15,000 \times g$, 4°C , 5 min の遠心後, 上清を $60 \mu\text{L}$ 分取し, 終濃度で 2% (v/v) 2-ME になるように $1.2 \mu\text{L}$ の 2-ME を加えた. 攪拌後, 沸騰水浴により 100°C , 90 s の LDS 化を行い, これを LHCII 定量用のサンプルとした. LDS 化したサンプルは電気泳動を行うまで -20°C で凍結保存した. SDS-PAGE, CBB 染色, 脱色は Rubisco 定量と同様の手順で行った. LHCII タンパク質のサブユニットのバンドは, LHCII のポリクローナル抗体を一次抗体として, イムノブロット法により確認した. 抗 LHCII 抗体を含む血清は, イネ葉精製 LHCII によって免疫されたウサギから Hidema et al. (1992) の方法によって得られた. イムノブロット法は, ブロット膜に PVDF 膜を用いたことを除き, Towbin et al. (1979) の方法を一部改良した Ishida et al. (1997) の方法にしたがった. 確認されたバンドは 4 つであり, そのうちメジャーであった 2 つのポリペプチドを LHCII として定量した. 分子量マーカ (03-064, テフコ (株) 製, および P7002S, 米国 BioLabs 社製) を用いて推定されたそれらの分子量は, 27 および 25 kDa であった. これらの分子量は, 既往の報告における LHCII タンパク質のサブユニットの分子量とほぼ一致した (for a review, see Jansson 1994). LHCII 定量用のサンプルを泳動後染色・脱色した

ゲルからそれら 2 つのバンドを切り出し、2 mL formamide (ナカライテスク (株) 製) で CBB R-250 を抽出した。抽出は、暗所、50°C、5 h 振とうしながら行い、その後 595 nm における吸光度を測定した。標準タンパク質には、ウシ血清アルブミン (BSA, 米国 Sigma 社製) を用いた。粗抽出液の Chl 量と不溶性画分懸濁液の Chl 量からチラコイド膜の回収率を求め、葉身の LHCII 量を算出した。

葉身 N の定量は、Kjeldahl 分解後、Nessler 試薬を用いて比色定量する方法により行った。粗抽出液 100 μ L をスピッツ管に取り秤量した。これに 100 μ L の 60% H_2SO_4 (精密分析用) を加え、Kjeldahl 分解 (140-260°C まで段階的に温度を上げ、温度を上げる前には、一旦室温まで放冷し、分解促進剤である H_2O_2 を 2 滴添加した) した。分解後、水で 5 mL とし、1,800 \times g, 15 min の遠心を行い、その上清 0.5 mL を Nessler 法に供した。上清 0.5 mL に 50 μ L の 2.5 mol L^{-1} NaOH, 100 μ L の 10% (w/v) Na, K-tetrate 溶液, 4.25 mL の水, および 100 μ L の Nessler 試薬を加え、よく攪拌後 420 nm における吸光度を測定した。Nessler 試薬は、10% (w/v) HgI_2 と 4.5% (w/v) NaI を含む 5 mol L^{-1} NaOH 溶液である。標準窒素には NH_4Cl 溶液を用い、サンプルと同様に Kjeldahl 分解後、Nessler 試薬で発色させ、その吸光度から標準曲線を作成した。

Cyt *f* の定量は、Evans and Terashima (1987) の酸化還元型吸光度差スペクトル法を一部改良した Ohashi et al. (1998) の方法にしたがった。生葉を新鮮重の 10 倍量 (1 g に対して 10 mL) の磨砕 buffer で、氷上に置いた乳鉢と乳棒で磨砕し、これを粗抽出液とした。磨砕 buffer は、5% (v/v) glycerol と、還元剤として 2 mmol L^{-1} dithiothreitol (DTT) を含む、50 mmol L^{-1} Na-phosphate buffer (pH 7.0) である。粗抽出液 100 μ L を分取し、Chl 量を測定した。次に残りの粗抽出液のうち約 2 mL を 4 枚重ねのガーゼでろ過し、そのろ液を

1,800 × g, 4°C で flash して starch を取り除いた後, 1,800 × g, 4°C, 3 min の遠心を行ってチラコイド膜を含む不溶性の画分を得た. この不溶性画分を, 10 mmol L⁻¹ NaCl, 5 mmol L⁻¹ MgCl₂, 2 mmol L⁻¹ EDTA-2Na, 100 mmol L⁻¹ sorbitol を含む 200 μL の 50 mmol L⁻¹ MES/NaOH buffer (pH 6.5) で懸濁した. この懸濁液から 20 μL を分取し, 懸濁液中の Chl 量を定量した. Chl 定量は, 分取した懸濁液に 380 μL の水と 1.6 mL の acetone を加え, 以下上述の手順にしたがった. 残りの懸濁液に, 終濃度で約 250 mgChl L⁻¹ となるように 50 mmol L⁻¹ MES/NaOH buffer (pH 6.5) を加えた. この約 250 mgChl L⁻¹ の懸濁液 200 μL に終濃度で 1% (v/v) となるように 10% (v/v) Triton X-100 を加えて, Cyt *f* を可溶化させた. そして 15,000 × g, 4°C, 5 min の遠心を行い, 上清画分を用いて, 酸化還元型吸光度差スペクトル法により Cyt *f* の定量を行った. すなわち, 上清画分を 100 μL ずつ 2 個のキュベット (超マイクロブラックマスキセル) に分注し, ダブルビーム分光光度計 (UV-1600, (株) 島津製作所製) の対照側, 試料側ホルダに入れ, フルスケール 0.03 で 530-570 nm の基線となる差スペクトルを取得した. 次に対照側キュベットに 2.5 μL の 50 mmol L⁻¹ K₃Fe(CN)₆ を, 試料側キュベットに 2.5 μL の 50 mmol L⁻¹ C₆H₄(OH)₂ をそれぞれ加えて攪拌し, 酸化還元型吸光度差スペクトルを測定した. そして, 540 nm で基線を差し引いた吸光度差 (Δ540 nm) から, 光路長 1 cm, 濃度 1 mmol L⁻¹ あたりの差吸光係数 20 (Bendall et al., 1971) を用いて Cyt *f* 量を求めた. 粗抽出液の Chl 量と不溶性画分懸濁液の Chl 量からチラコイド膜の回収率を求め, 葉身の Cyt *f* 量を算出した.

2.2.5 統計処理

光質処理区の平均値間の有意差検定は *t* 検定により有意水準 5% で行った. 一次の線形回帰方程式の回帰係数および決定係数は最小二乗法により求めた.

光質処理区の回帰方程式の y 切片間の有意差検定は共分散分析 (ANCOVA) により有意水準 5% で行った。統計処理には統計解析ソフトウェア (JMP Ver. 6.0.0, 米国 SAS 社製) および表計算ソフトウェア (Microsoft Office Excel 2003, 米国 Microsoft 社製) を用いた。

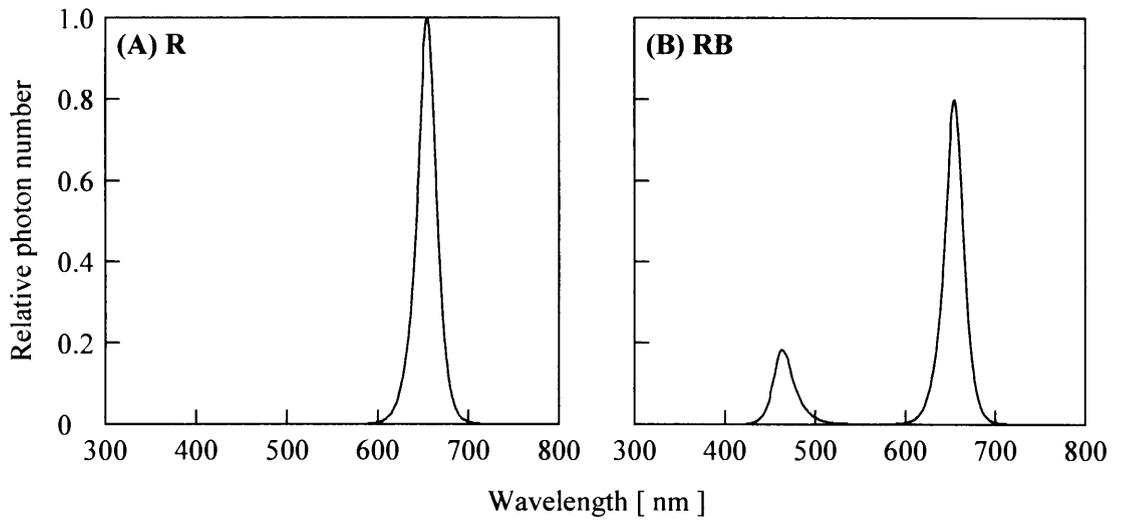


Fig. 3 Relative spectral photon-number distributions of treatments R (A) and RB (B). Light was provided from red and blue LEDs. The number of photons was counted for every 1 nm.

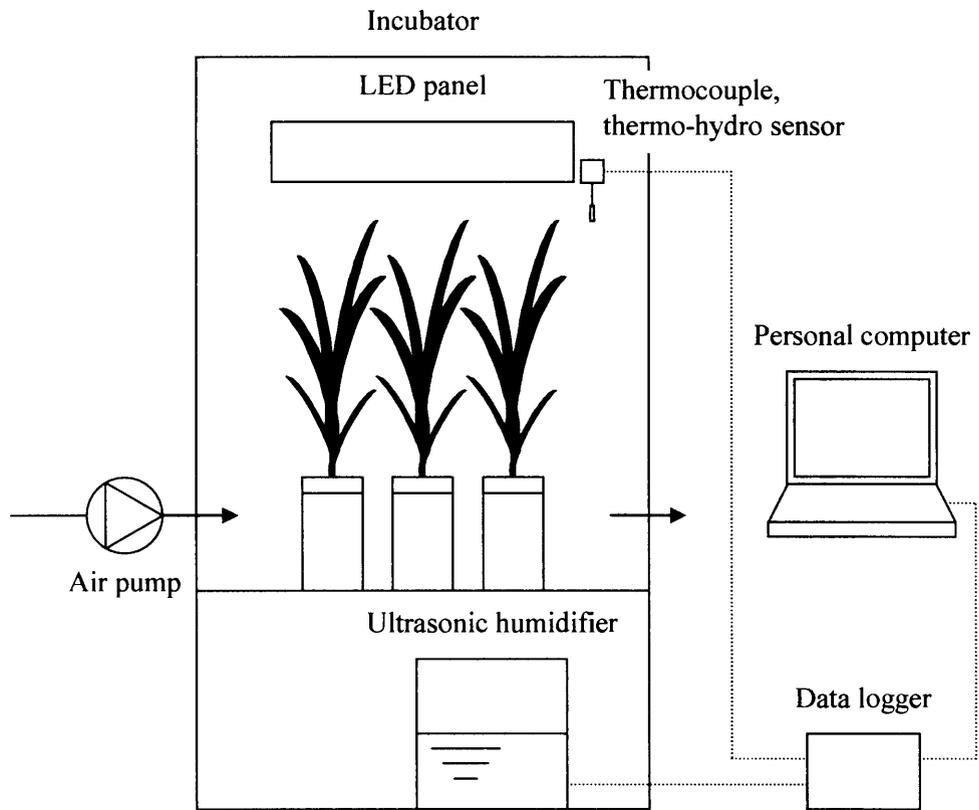


Fig. 4 Schematic diagram of the cultivation apparatus used.

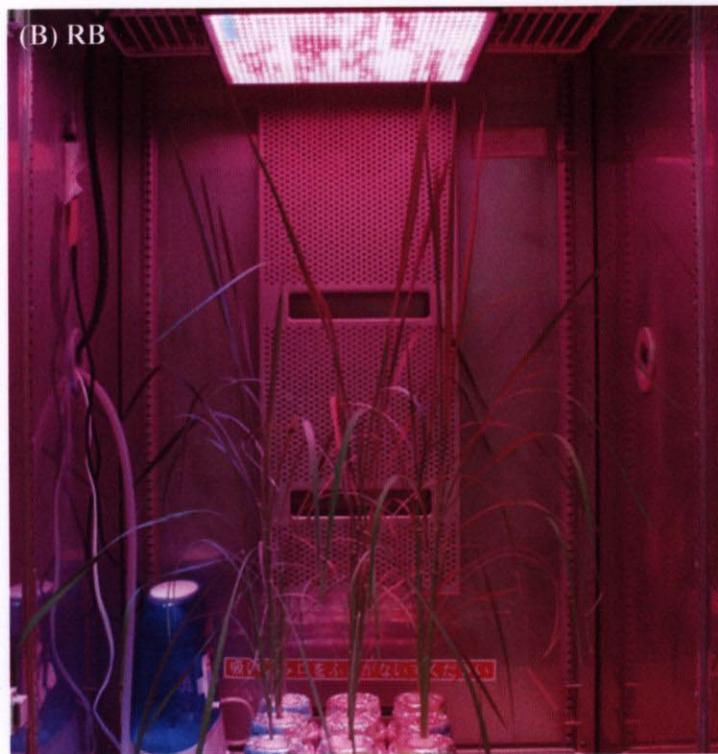


Fig. 5 Picture images of the incubators for treatments R (A) and RB (B) containing 56-d old rice plants.

Table 1 Elements, compounds used for the hydroponic solution and element concentrations at the standard strength for rice.

	Element	Compound	Element concentration [mmol L ⁻¹]
Major	N	NH ₄ NO ₃	2.0
	P	NaH ₂ PO ₄	6.0 × 10 ⁻¹
	K	K ₂ SO ₄	6.0 × 10 ⁻¹
	Mg	MgCl ₂	6.0 × 10 ⁻¹
	S	K ₂ SO ₄	3.0 × 10 ⁻¹
	Ca	CaCl ₂	3.0 × 10 ⁻¹
Minor	B	H ₃ BO ₃	5.0 × 10 ⁻²
	Fe	Fe-EDTA	4.5 × 10 ⁻²
	Mn	MnSO ₄	9.0 × 10 ⁻³
	Cu	CuSO ₄	3.0 × 10 ⁻⁴
	Zn	ZnSO ₄	7.0 × 10 ⁻⁴
	Mo	Na ₂ MoO ₄	1.0 × 10 ⁻⁴

2.3 結果

2.3.1 光合成特性

まず、成育環境の PPFD とほぼ同じ PPFD の弱光下 ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) および飽和光下 ($1,600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) における葉面積あたりの純光合成速度を測定した。測定は白色光下、通常の $p\text{Ca}$ (36 Pa) 下で行った。なお、白色光下で測定される光合成速度は、成育環境の光質下における光合成速度とは異なるが、長期的な光質の影響は白色光下での光合成に反映されると考えられる。成育環境とほぼ同じ PPFD 下での純光合成速度は、いずれの N 処理区においても RB 区が R 区のおよそ 1.5-1.6 倍と有意に高かった (Fig. 6A)。また、飽和光下での純光合成速度、すなわち光合成能力も、いずれの N 処理区でも RB 区が R 区のおよそ 1.8-1.9 倍と有意に高かった (Fig. 6B)。さらに RB 区では、葉身の面積あたりの N 量も R 区より有意に多かった (Fig. 6C)。

次に、光合成速度と葉身 N 量との関係について調べるため、全ての N 処理区の個体の弱光下および飽和光下の純光合成速度を、葉身 N 量に対してプロットした。弱光下での純光合成速度は、各光質処理区において葉身 N 量との間に高い正の相関があった (Fig. 7A)。ANCOVA により回帰直線における傾きおよび y 切片の有意性を検定したところ、各光質処理区の間で回帰直線の傾きおよび y 切片に有意な差は認められなかった。すなわち、両光質処理区のプロットは同一の直線に回帰された。飽和光下での純光合成速度においても、各光質処理区で葉身 N 量との間に高い正の相関が認められた (Fig. 7B)。ANCOVA の結果、両光質処理区間の回帰直線の y 切片には有意な差が認められたものの、その差はわずかであった。これらの結果は、RB 区における弱光下および飽和光下での光合成速度の増加が、おもに葉身 N 量の増加で説明できることを示している。

気孔コンダクタンスと葉身 N 量との関係を調べたところ、飽和光下および弱光下いずれの PPFD 下においても、気孔コンダクタンスは葉身 N 量の多い個体ほど高くなる傾向にあった (Fig. 8A, B) . また pCi は、いずれの PPFD 下においても葉身 N 量によらずほぼ一定であり、光質処理区間に有意な差は認められなかった (Fig. 8C, D) . このことは、RB 区の高い光合成速度が、気孔コンダクタンスの増加に伴う pCi の増加によってもたらされたものではないことを示している.

次に、 C_3 光合成モデル (Farquhar et al. 1980, Farquhar and von Caemmerer 1982, Sharkey 1985a) に基づき、生体内における CO_2 固定能力および RuBP 再生産能力の指標として、 pCi 20 Pa 下および 60 Pa 以上の条件下での純光合成速度 (A_{20} および $A_{>60}$) をそれぞれ測定した. A_{20} と $A_{>60}$ はいずれも RB 区の方が R 区より有意に高く、2.0 mmol L⁻¹ の N 処理区 の A_{20} と $A_{>60}$ は R 区ではそれぞれ 2.99 ± 0.741 と $9.5 \pm 1.81 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, RB 区ではそれぞれ 6.77 ± 0.969 と $12.3 \pm 1.27 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ であった. このような RB 区における高い A_{20} , $A_{>60}$ は葉身 N 量の増加に伴っていた (Fig. 9) . この結果から、RB 区の生体内における CO_2 固定能力および RuBP 再生産能力は、R 区と比較して、葉身 N 量が増加したことに伴って向上したものと考えられた.

2.3.2 光合成関連タンパク質量

赤色光への青色光の付加が光合成関連タンパク質量と光合成関連タンパク質間における N 分配に及ぼす影響を評価した. Rubisco 量, Cyt *f* 量, Chl 量および LHCII 量は、いずれも RB 区において R 区より有意に多かった (Table 2) . Chl *a/b* 比には、R 区 ($3.20 \pm 0.028 \text{ mol mol}^{-1}$) と RB 区 ($3.26 \pm 0.029 \text{ mol mol}^{-1}$) との間に有意な差は認められなかった. 光合成関連タンパク

質量と葉身 N 量との関係について調べたところ、RB 区におけるそれらのタンパク質量の増加は、光合成速度の増加と同様に、おもに葉身 N 量の増加によるものであった (Fig. 10) . Rubisco, Chl および LHCII においては、両光質処理区間の回帰直線の y 切片に有意差が認められた。このことは、これらのタンパク質への N 分配が光質処理区間で異なる可能性を示唆する。しかし、光質処理区間で同量の葉身 N 量を有する個体数が少なく、両光質処理区間でプロットの重なる範囲が狭かった。このことから、RB 区における光合成関連タンパク質量の増加が、単純に葉身 N 量の増加のみで説明できるのか、あるいはそれに加えて光合成関連タンパク質間における N 分配の変化も起こっているのかについては、本研究のデータからは明確にはならなかった。

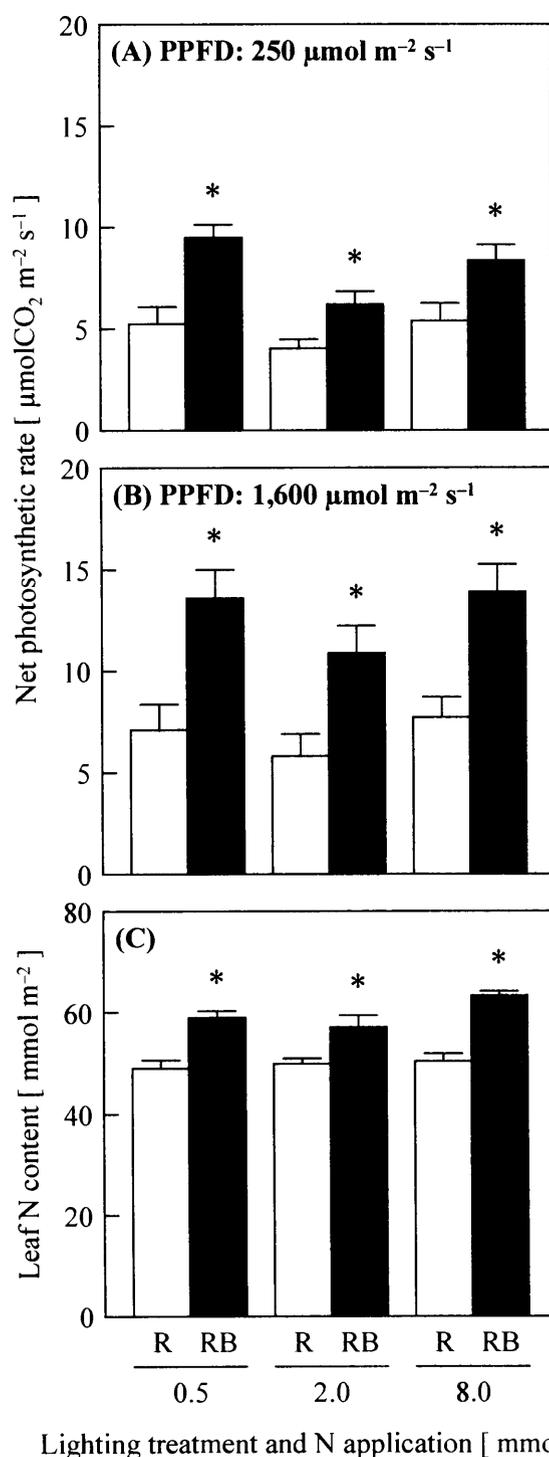


Fig. 6 Net photosynthetic rate at a PPFD of 250 (A) or 1,600 (B) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and leaf N content (C) per unit leaf area in rice leaves. Plants were grown hydroponically under R or RB at a N concentration of 0.5, 2.0 or 8.0 mmol L^{-1} . Gas-exchange measurements were made at a $p\text{Ca}$ of 36 Pa, a leaf temperature of 27°C, and a leaf-to-air VPD of 1.1 ± 0.1 kPa. Light for measurements was provided from a white halogen lamp. Vertical bars represent standard errors of the means ($n = 6-12$). Means with an asterisk (*) are significantly different by t test ($P < 0.05$).

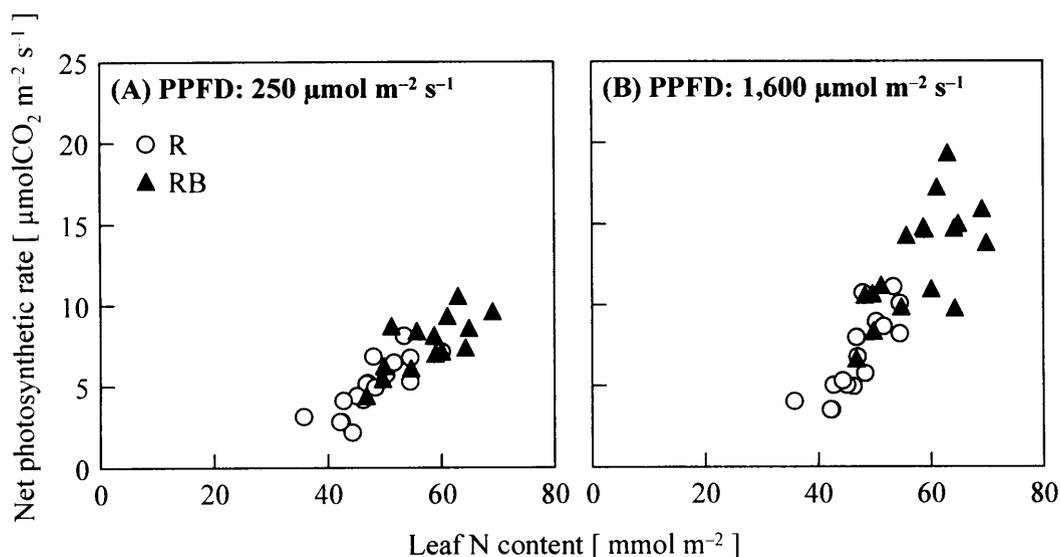


Fig. 7 Net photosynthetic rate at a PPFD of 250 (A) or 1,600 (B) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ versus leaf N content per unit leaf area in rice leaves. Plants were grown hydroponically under R (open circle) or RB (closed triangle) at a N concentration of 0.5, 2.0 or 8.0 mmol L^{-1} . Measurements were made at a $p\text{Ca}$ of 36 Pa, a leaf temperature of 27°C , and a leaf-to-air VPD of 1.1 ± 0.1 kPa. Light for measurements was provided from a white halogen lamp. For (A), $y = 0.238x - 6.27$, $r^2 = 0.739$ (R and RB). For (B), $y = 0.413x - 12.7$, $r^2 = 0.663$ (R); $y = 0.310x - 5.37$, $r^2 = 0.444$ (RB). Separate regression equations were given for R and RB where the slopes and intercepts were significantly different by F test in ANCOVA ($P < 0.05$); otherwise a single regression equation was given.

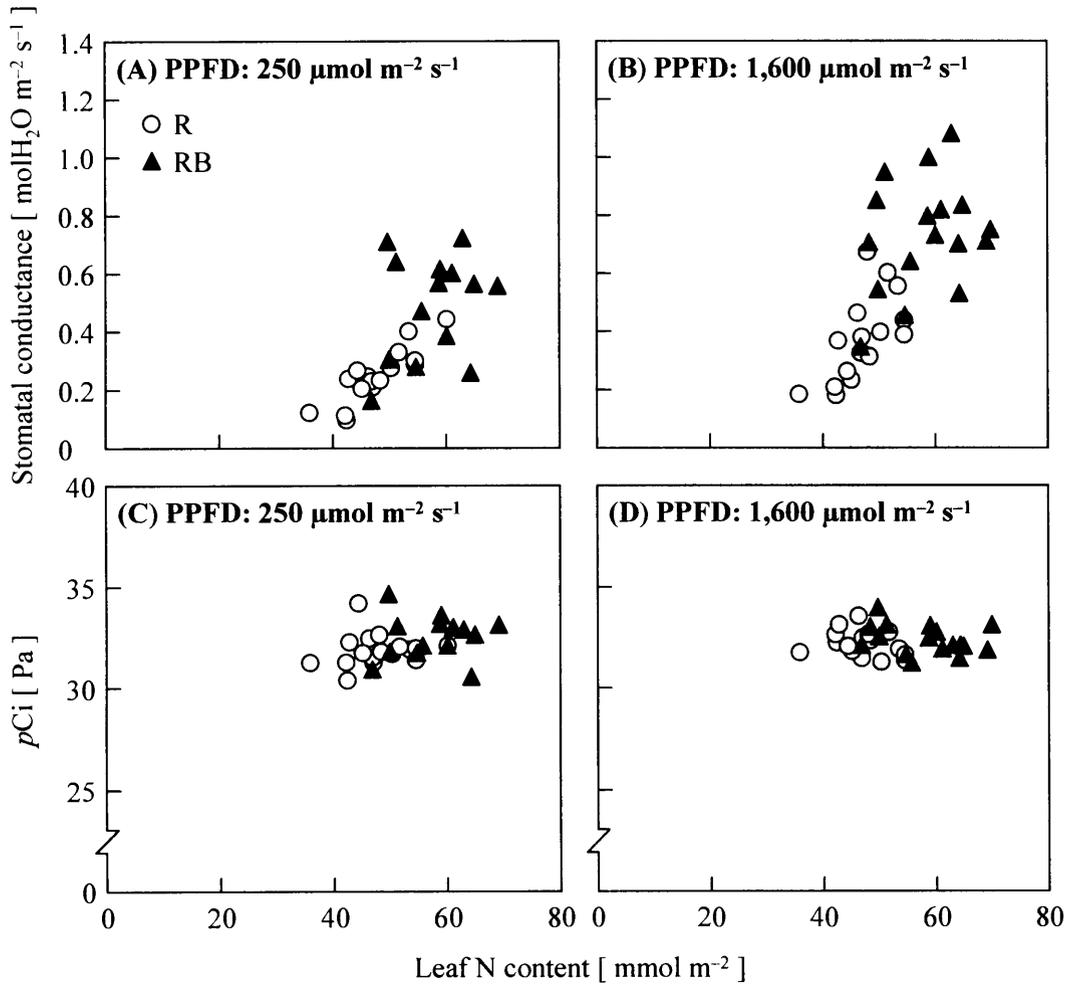


Fig. 8 Stomatal conductance (A, B) and p_{Ci} (C, D) at a PPFD of 250 (A, C) or 1,600 (B, D) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ versus leaf N content per unit leaf area in rice leaves. Measurements were made at a p_{Ca} of 36 Pa, a leaf temperature of 27°C, and a leaf-to-air VPD of 1.1 ± 0.1 kPa. Light for measurements was provided from a white halogen lamp.

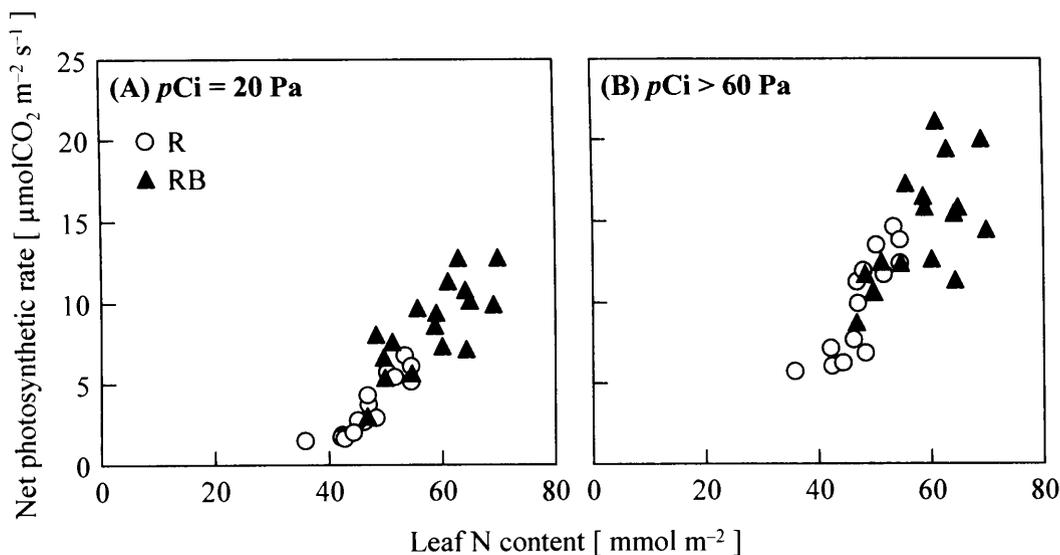


Fig. 9 Net photosynthetic rate at a $p\text{Ci}$ of 20 Pa (A) or above 60 Pa (B) versus leaf N content per unit leaf area in rice leaves. Measurements were made at a PPFD of $1,600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a leaf temperature of 27°C , and a leaf-to-air VPD of $1.1 \pm 0.1 \text{ kPa}$. Light for measurements was provided from a white halogen lamp. For (A), $y = 0.323x - 11.4$, $r^2 = 0.659$ (R); $y = 0.275x - 7.48$, $r^2 = 0.562$ (RB). For (B), $y = 0.398x - 8.91$, $r^2 = 0.659$ (R and RB). Separate regression equations were given for R and RB where the slopes and intercepts were significantly different by F test in ANCOVA ($P < 0.05$); otherwise a single regression equation was given.

Table 2 Amounts of Rubisco, Cyt *f*, Chl and LHCII per unit leaf area in leaves of rice plants grown hydroponically at a N concentration of 2.0 mmol L⁻¹.

Treatment	Rubisco ^z [g m ⁻²]	Cyt <i>f</i> ^z [μmol m ⁻²]	Chl ^z [mmol m ⁻²]	LHCII ^z [g m ⁻²]
R	0.71 ± 0.076	0.37 ± 0.026	0.311 ± 0.0083	0.197 ± 0.0112
RB	1.00 ± 0.079 *	0.52 ± 0.027 *	0.350 ± 0.0084 *	0.266 ± 0.0164 *

^z Means ± standard errors of the means (*n* = 6-12). Means in each column with an asterisk (*) are significantly different by *t* test (*P* < 0.05).

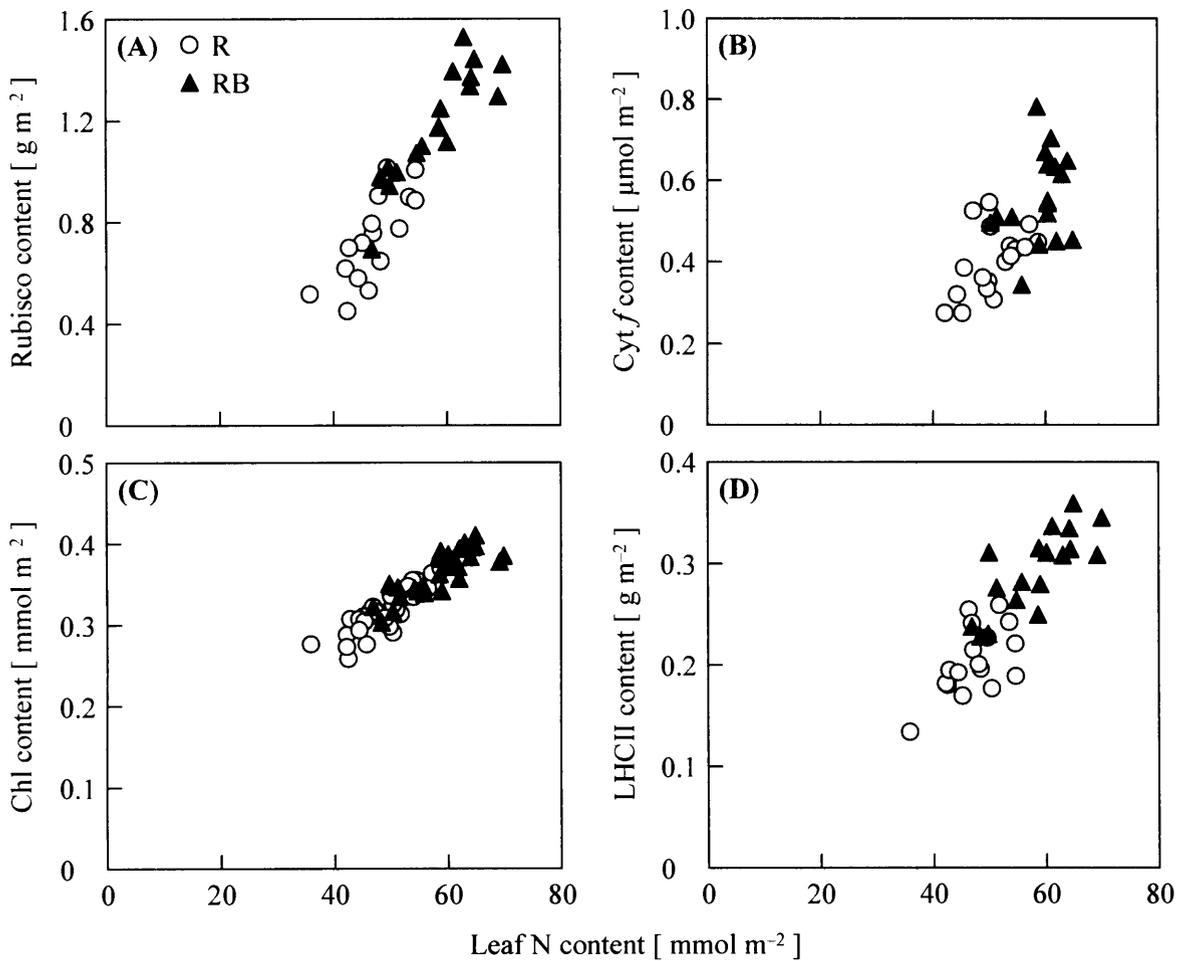


Fig. 10 Rubisco (A), Cyt *f* (B), Chl (C) and LHCII (D) contents versus leaf N content per unit leaf area in rice leaves. For (A), $y = 0.0269x - 0.535$, $r^2 = 0.602$ (R); $y = 0.0271x - 0.406$, $r^2 = 0.786$ (RB). For (B), $y = 0.0136x - 0.269$, $r^2 = 0.446$ (R and RB). For (C), $y = 0.00458x + 0.0916$, $r^2 = 0.747$ (R); $y = 0.00385x + 0.140$, $r^2 = 0.690$ (RB). For (D), $y = 0.00396x + 0.0161$, $r^2 = 0.345$ (R); $y = 0.00442x - 0.0349$, $r^2 = 0.602$ (RB). Separate regression equations were given for R and RB where the slopes and intercepts were significantly different by *F* test in ANCOVA ($P < 0.05$); otherwise a single regression equation was given.

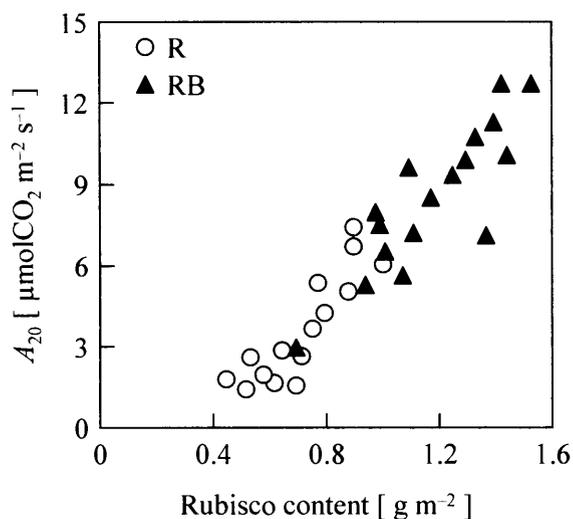


Fig. 11 Net photosynthetic rate at a p_{Ci} of 20 Pa (A_{20}) versus Rubisco content per unit leaf area in rice leaves. Measurements were made at a PPFD of $1,600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a leaf temperature of 27°C , and a leaf-to-air VPD of $1.1 \pm 0.1 \text{ kPa}$. Light for measurements was provided from a white halogen lamp. $y = 10.5x - 3.77$, $r^2 = 0.882$ (R and RB). Separate regression equations were given for R and RB where the slopes and intercepts were significantly different by F test in ANCOVA ($P < 0.05$); otherwise a single regression equation was given.

2.4 考察

RB 区では，葉身 N 量の増加に伴って，R 区よりも通常 pCa 下における飽和光下の光合成速度が高かった (Fig. 6A, 8B) . RB 区における飽和光下での光合成速度の増加に関わる因子として，まず大気から葉内細胞間隙までの CO_2 拡散について見てみると，飽和光下における気孔コンダクタンスは RB 区の方が高かったが (Fig. 8A) ， pCi は光質処理区によらず全ての個体でほぼ同じ値であった (Fig. 8C) . このことから，RB 区の飽和光下での光合成速度の増加は，大気から葉内細胞間隙までの CO_2 拡散の促進に起因するものではないといえる．次に，光合成を規定する能力のうち， CO_2 固定能力と RuBP 再生産能力について考える． CO_2 固定能力の指標である A_{20} と，RuBP 再生産能力の指標である $A_{>60}$ は，いずれも葉身 N 量の増加に伴って RB 区で高かった (Fig. 9A, B) . また RB 区では，Rubisco 量や，RuBP 再生産の律速に関わる因子の 1 つである Cyt f 量を含め，測定した光合成関連タンパク質量のいずれも葉身 N 量の増加に伴って増加していた (Fig. 10) . これらのことから，RB 区における飽和光下での光合成速度の増加をもたらした要因は，葉身 N 量の増加に伴って光合成関連タンパク質量が増加し，その結果 CO_2 固定能力と RuBP 再生産能力が，それらの間のバランスを維持したまま向上したことにありと考えられる．

A_{20} に影響を及ぼす因子には，Rubisco 量以外に，Rubisco の比活性と活性化率がある．また，葉内細胞間隙から Rubisco サイトまでの CO_2 拡散に関わる内部コンダクタンス (von Caemmerer and Evans 1991, Loreto et al. 1992) が無視できない場合には， A_{20} は内部コンダクタンスにも影響を受ける．そこで，光質処理区間の A_{20} の差に対するこれらの因子の影響を推定するため， A_{20} を Rubisco 量に対してプロットしたところ， A_{20} は光質処理区によらず

Rubisco 量と高い正の相関にあった (Fig. 11) . このことは、光質処理区間の A_{20} の差がおもに Rubisco 量の差で説明できること、すなわち Rubisco 比活性と活性化率および内部コンダクタンスの差は A_{20} の差をもたらすほどではないことを示している. したがって、RB 区の A_{20} の増加は、おもに葉身 N 量の増加に伴う Rubisco 量の増加に起因するものであるといえる.

弱光下における光合成速度も、飽和光下における光合成速度と同様に、葉身 N 量の増加に伴って RB 区で増加していた (Fig. 7A) . 一般に、測定時の PPFD が低下するにしたがって、光合成速度と葉 N 量の回帰直線の傾きが減少することが知られている (Hirose and Werger 1987) . この傾向は、弱光下での光合成速度が必ずしも葉 N 量に依存するわけではないことを示している (Hirose and Werger 1987, Makino et al. 1997c) . しかしながら、Makino et al. (1997b, 1997c) のイネのデータでは、PPFD $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で測定した光合成速度と葉身 N 量との関係において、低葉身 N 量の領域 ($60\text{-}130 \text{ mmol m}^{-2}$ 程度) には明確な正の相関が認められている. 本研究では、R 区と RB 区の全ての個体の葉身 N 量が $40\text{-}80 \text{ mmol m}^{-2}$ の範囲内にあった (Fig. 7) . このように、葉身 N 量が両光質処理区ともに少なかったことが、RB 区の葉身 N 量の増加に伴う弱光下の光合成速度の増加をもたらしたのかもしれない.

本研究では、光合成速度の測定はすべて白色ハロゲン光照射下で行っており、実際の成育環境の光質下における測定は行わなかった. R 区と RB 区における実際の成育環境下での光合成速度は、白色光下で測定した値と異なる可能性が考えられる. 光合成測定時の照射光の光質が異なることによって最も大きな影響を受ける因子として、気孔コンダクタンスが挙げられる. 白色光下では、成育環境とほぼ同じ PPFD $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ における気孔コンダクタンスは RB 区の方が R 区より高かった (Fig. 8A) . 青色光は気孔の開口を促進するので、実際の成育環境下における R 区と RB 区の気孔コンダクタンスの差

は、白色光下での測定時の差よりも大きくなると考えられる。C₃ 光合成モデルによれば、弱光下の光合成を律速する A_j は葉緑体内の CO₂ 濃度が上昇するにしたがって飽和型に増加するので (式 (2), Fig. 2A 参照), 気孔コンダクタンスの増加に伴う p_{Ci} の増加は弱光下での光合成速度をある程度増加させるものと推察される。このことから、実際の成育環境下において光合成速度を測定した場合も、光合成速度は RB 区の方が R 区よりも高く、さらにその差は白色光下で観察された差以上となるのではないかと推察される。

以上より、赤青混合光照射下で成育したイネは、赤色光単独照射下で成育したイネに比較して、飽和光下および成育環境とほぼ同じ PPFD の弱光下のいずれでも高い光合成速度を示すことがわかった。また赤青混合光を照射したイネでは、CO₂ 固定能力と RuBP 再生産能力が向上していた。このような光合成速度および光合成を律速する能力の向上は、おもに葉身 N 量の増加と、それに伴う光合成関連タンパク質の増加によるものであった。また実際の成育環境の光質下における光合成速度も、赤青混合光照射下で高かったであろうと推察された。

3. 赤色光および赤青混合光照射下におけるイネの成長

3.1 はじめに

前節において、赤青混合光照射下で成育したイネ葉は、赤色光単独の照射光下で成育した葉よりも高い光合成速度を示すことがわかった。この個葉の光合成速度の増加は、おもに葉身 N 量の増加、およびそれに伴う光合成関連タンパク質量の増加によるものであった。このような葉面積あたりの光合成速度の増加が、赤色光に青色光を付加することによる乾物生産促進に関わっている可能性がある。

一方で、既往の研究により、個体の成長速度は単葉の光合成速度のみで必ずしも説明できるものではないことが示されてきた (Stitt and Schulze 1994, Lawlor 1995, Poorter and Nagel 2000)。一般に個体の成長速度は個体乾物重あたりの乾物生産速度、すなわち RGR (Relative Growth Rate, 相対成長速度) として表される (Stitt and Schulze 1994)。RGR は、次の 2 つのパラメータの積として表すことができる。

$$\text{RGR} = \text{NAR} \times \text{LAR} \quad (6)$$

NAR (Net Assimilation Rate, 純同化速度) は、1 日から数日間で積算した個体全体での純光合成速度 (明期の光合成と明期および暗期の呼吸を含む) を、時間あたり、個体の総葉面積あたりで表したものである。このことから明らかのように、NAR は成育中のある一時点において測定した単葉の光合成速度を必ずしも反映するものではない。LAR (Leaf Area Ratio, 葉面積比) は、個体乾物重に対する総葉面積の比率である。赤色光に青色光を付加して長期間照射す

ることによる成長速度の増加をもたらす要因を明らかにするためには、個葉の光合成速度だけでなく、NAR と LAR についても調べる必要がある。

LAR はさらに以下の 2 つのパラメータの積として表される。

$$\text{LAR} = \text{LWR} \times \text{SLA} \quad (7)$$

LWR (Leaf Weight Ratio, 葉重比) は個体乾物重中に占める葉身乾物重の割合であり、SLA (Specific Leaf Area, 比葉面積) は葉身乾物重あたりの総葉面積である。このように、植物が葉身にどれだけバイオマスを投資したか、またそのバイオマスを使ってどれだけ葉面を展開したかについても、乾物生産に影響を及ぼす因子として調査する必要がある。

また、長期的な光強度、温度、CO₂ 濃度などの環境変化に対するイネの応答を調べた研究では、イネは個体レベルで葉身への N 投資率を変えることによって、個体全体の光合成効率を調節していると指摘されている (Makino et al. 1997a, 1997b, Nakano et al. 1997, Ohashi et al. 2000)。

そこで本節では、赤色光および赤青混合光照射下で成育したイネの成長解析と葉身への N 分配に関する調査を行った。また、異なる葉位の N 量、Rubisco 量および Chl 量についても調べた。これらの結果から、赤色光への青色光の付加による乾物生産促進に関わる個体レベルでの要因について考察した。

3.2 材料および方法

3.2.1 供試植物，成育条件および光環境条件

供試植物にはイネ (*Oryza sativa* L. 品種: 日本晴, ササニシキ) を用いた。成育条件, 光質処理区, 栽培装置および光環境測定については, 本章 2.2.1 および 2.2.2 と同様とした。光質処理中の総 PPFD は両光質処理区ともに $380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした。総 PPFD が本章第 2 節と異なるのは, LED の劣化によるものである。両光質処理区ともに, 総 PPFD $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と $380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ との間に顕著な成育の差異は観察されず, この範囲の総 PPFD の差は無視できるものと考えられた。水耕液の無機 N 濃度は標準濃度 (播種後 49 日目に 2mmol L^{-1} , Table 1 参照) とした。

3.2.2 成長解析および窒素定量

播種後 21 日目から 7 日目ごとに, 明期開始後約 6 h 後にサンプリングを行った。植物個体を葉身, 葉鞘, 根にわけ, 新鮮重および総葉面積を測定した後 80°C で 3-7 日間乾燥させ, 乾物重を測定した。いずれの光質処理区においても, 試験期間を通して茎の発達は認められなかった。

移植後 35 日目と 56 日目における器官別乾物重および総葉面積の測定値を用いて, 個体の成長解析を行った。RGR, NAR, LAR, LWR および SLA は, 以下のように定義される (Radford 1967)。

$$\text{RGR} = \frac{dW}{dt} \cdot \frac{1}{W} \quad (8)$$

$$\text{NAR} = \frac{dW}{dt} \cdot \frac{1}{A} \quad (9)$$

$$\text{LAR} = \frac{A}{W} \quad (10)$$

$$\text{LWR} = \frac{L}{W} \quad (11)$$

$$\text{SLA} = \frac{A}{L} \quad (12)$$

ここで、 W は個体乾物重、 A は総葉面積、 L は葉身乾物重、 t は時間である。実際には、 W 、 A 、 L が時間の経過とともに指数関数的に増加するという仮定をおき、次の式より求めた (Peterson and Neofotis 2004)。

$$\text{RGR} = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1} \quad (13)$$

$$\text{NAR} = \frac{W_2 - W_1}{t_2 - t_1} \cdot \frac{\ln A_2 - \ln A_1}{A_2 - A_1} \quad (14)$$

$$\text{LAR} = \frac{A_2 - A_1}{\ln A_2 - \ln A_1} \cdot \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{W_2 - W_1} \quad (15)$$

$$\text{LWR} = \frac{L_2 - L_1}{\ln L_2 - \ln L_1} \cdot \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{W_2 - W_1} \quad (16)$$

$$\text{LAR} = \frac{A_2 - A_1}{\ln A_2 - \ln A_1} \cdot \frac{\ln L_2 - \ln L_1}{L_2 - L_1} \quad (17)$$

ここで、 W_1 および W_2 、 A_1 および A_2 、 L_1 および L_2 は、それぞれ時刻 t_1 および t_2 における個体乾物重、総葉面積、葉身乾物重である。

器官別 N 定量のため、各器官の乾物サンプルを卓上型ボールミル (MM301,

独国 Retsch GmbH 社製) を用いて微粉碎し, 約 10 mg をスピッツ管に秤量した. これに 100 μL の 60% H_2SO_4 (精密分析用) を加え, 本章 2. 2. 4 に記述した方法と同様に, Kjeldahl 分解後, Nessler 法によりサンプル中の N を定量した. ただし, Kjeldahl 分解, 遠心後の上清を, 葉身では 100 μL , 葉鞘および根では 150 μL 分取し, それに 1% H_2SO_4 (精密分析用) を加え 500 μL とし, Nessler 法に供した.

3. 2. 3 生化学分析

各個体において葉齢が 8.0-8.3 の時 (播種後 56-63 日目) に, 主稈第 6-8 葉の葉身を葉位別にサンプリングし, 本章 2. 2. 3 に記述した方法で葉身 N, Rubisco および Chl を定量した.

3. 2. 4 統計処理

光質処理区の有意差検定は t 検定により有意水準 5% で行った. 統計処理には統計解析ソフトウェア (JMP Ver. 6.0.0, 米国 SAS 社製) を用いた.

3.3 結果

3.3.1 成育

ササニシキおよび日本晴の、光質処理開始日（播種後 21 日目）以降の個体乾物重および総葉面積の経時変化を Fig. 12 に示す。播種後 35 日目までは、ササニシキおよび日本晴ともに、個体乾物重と総葉面積には光質処理区間に有意な差は認められなかった。播種後 42 日目以降は、ササニシキでは RB 区の個体乾物重と総葉面積が、また日本晴では RB 区の総葉面積が、それぞれ R 区より有意に増加した。日本晴の個体乾物重は、播種後 42 日目および 49 日目のいずれにおいても光質処理区間に有意な差は認められなかったものの、RB 区の方が R 区よりも大きい傾向にあった。光質処理最終日（播種後 56 日目）の RB 区の個体乾物重は、R 区のそれと比較して、ササニシキでは 20%、日本晴では 33% それぞれ大きかった。また RB 区の総葉面積は、ササニシキでは R 区より 30%、日本晴では R 区より 35% ぞれぞれ大きかった。播種後 56 日目の器官への乾物分配を Table 3 に示す。ササニシキ、日本晴ともに、根への乾物分配の割合は RB 区において有意に高く、葉鞘への割合は RB 区において著しく低かった。葉身への乾物分配の割合は、ササニシキにおいては有意差はないものの、両品種ともに RB 区の方が高い傾向にあった。分けつは品種および光質処理区によらず播種後 56 日目までには発生しなかった。RB 区の葉齢は両品種ともに播種後 56 日目において 8.2-8.3 であり、R 区の 7.8-7.9 よりも大きい傾向にあった。播種後 56 日目の草丈は、ササニシキでは R 区 (64.4 ± 0.88 cm) と RB 区 (64.5 ± 0.90 cm) の間に有意な差はなく、日本晴では R 区 (69.8 ± 0.55) の方が RB 区 (67.2 ± 0.92) より有意に大きかった。

3.3.2 成長解析

播種後 35 日目と 56 日目の測定値を用いて個体の成長解析を行った。この期間において成長解析を行ったのは、光質処理による個体乾物重と総葉面積の差が播種後 35 日目以降観察され、56 日目に品種によらず RB 区において有意に大きくなったためである。RGR はササニシキと日本晴のいずれにおいても、RB 区の方が R 区より有意に高かった (Fig. 13A)。RB 区における高い RGR には、両品種ともに高い NAR が寄与していた (Fig. 13B)。しかし、この NAR には、ササニシキでは光質処理区間に有意な差が認められたのに対して、日本晴では有意な差は認められなかった。またササニシキにおいては LAR も RB 区で高く、RGR の向上に貢献していた (Fig. 13C)。この LAR の増加は、LWR と SLA のいずれも増加したことによるものであった (Fig. 13D, E)。これらの結果は、RB 区のササニシキが、R 区と比較してより広く薄い葉身を展開していたことを示している。他方、日本晴では、ササニシキで観察されたような形態的な応答は観察されなかった。LWR は RB 区の方が R 区よりも有意に高かったものの、SLA は R 区の方が RB 区よりも大きい傾向にあった (Fig. 13D, E)。このことは、RB 区の日本晴が R 区よりも厚い葉を形成する傾向にあったことを示している。

3.3.3 窒素分配

Fig. 14 に、個体あたりの N 集積量、葉身の葉面積あたりの N 量、および葉身の乾物重あたりの N 量を示す。個体あたりの N 集積量は、ササニシキと日本晴のいずれにおいても、RB 区の方が R 区より有意に多かった (Fig. 14A)。葉身への N 分配の割合は、RB 区のササニシキ ($65.4 \pm 1.09\%$)、日本晴 ($66.1 \pm 0.37\%$) とともに、R 区のササニシキ ($59.1 \pm 2.02\%$)、日本晴 ($60.0 \pm 1.21\%$) よりも有意に高かった。個体の全葉身で平均した葉面積あたりの N

量は、ササニシキでは統計的に有意な差はないものの、両品種ともに RB 区の方が R 区よりも多い傾向にあった (Fig. 14B) . ササニシキにおいて、RB 区の葉面積あたりの N 量の増加は、葉身乾物重あたりの N 量の増加によるものであり (Fig. 14C) , 葉面積あたりの乾物重 (SLA の逆数) はむしろ RB 区で減少していた (R 区: $19.5 \pm 0.33 \text{ g m}^{-2}$, RB 区: $18.4 \pm 0.31 \text{ g m}^{-2}$) . 他方、日本晴における RB 区の葉面積あたりの N 量の増加は、葉身乾物重あたりの N 量の増加 (Fig. 14C) と、葉面積あたりの乾物重がわずかな増加 (R 区: $19.7 \pm 0.34 \text{ g m}^{-2}$, RB 区: $20.5 \pm 0.47 \text{ g m}^{-2}$) の両者によるものであった.

3.3.4 葉位別の窒素量, Rubisco 量および Chl 量

Fig. 15 に、ササニシキ第 8 葉, および日本晴第 8, 7, 6 葉の葉面積あたりの N 量, Rubisco 量, Chl 量を示す. 播種後 56 日目において、RB 区では第 8 葉が最上位完全展開葉であったが、R 区ではその数日後に第 8 葉が完全展開した. そこで R 区では播種後 56 日目から 63 日目の間にサンプリングを行った. ササニシキ第 8 葉の葉身 N 量, Rubisco 量および Chl 量は RB 区の方が R 区よりも有意に多かった (Fig. 15) . 日本晴の各葉位におけるこれらの量はいずれも RB 区の方が R 区よりも有意に多かった (Fig. 15) .

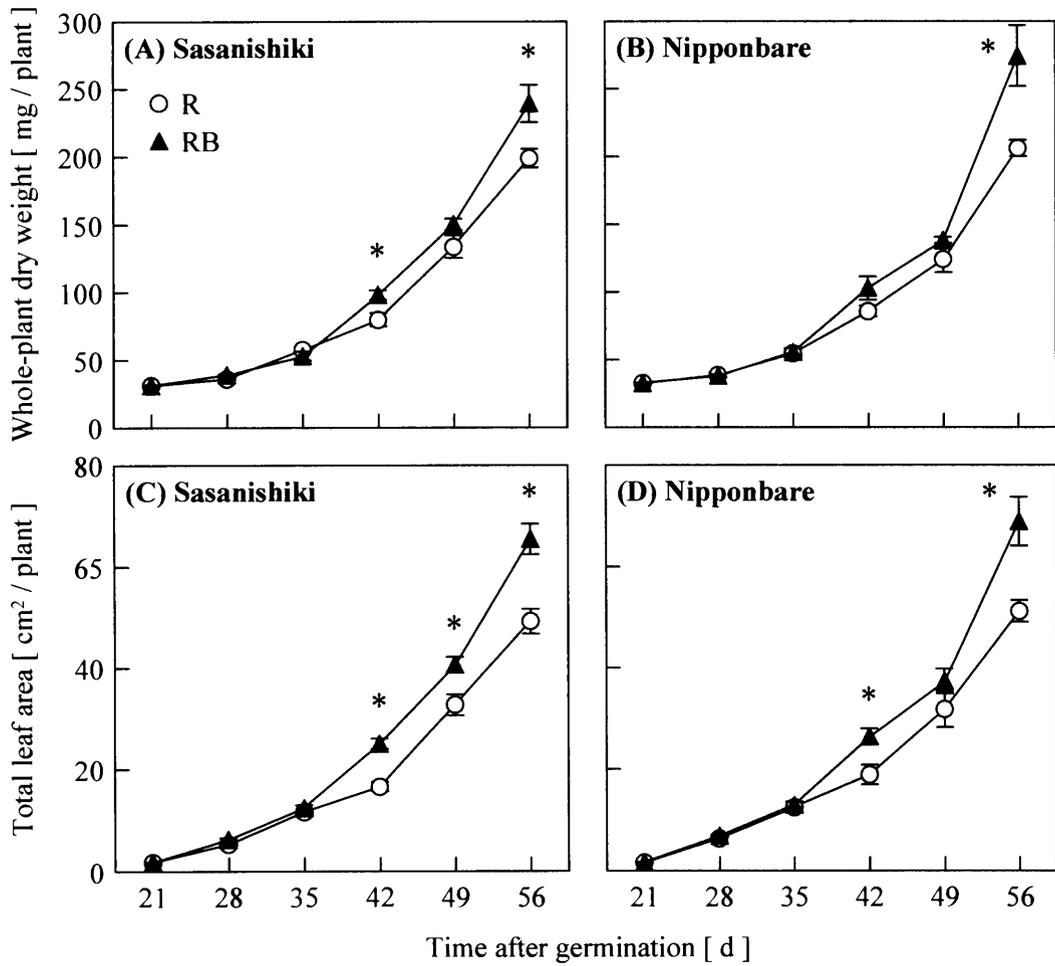


Fig. 12 Time courses of whole-plant dry weight (A, B) and total leaf area (C, D) of two cultivars (Sasanishiki: A, C; Nipponbare: B, D) of rice plants. Plants were grown hydroponically under R (open circle) or RB (closed triangle) from 21 d after germination. Vertical bars represent standard error of the means ($n = 4$). Means with an asterisk (*) are significantly different by t test for each day ($P < 0.05$).

Table 3 Ratio of dry matter allocated to each organ at final harvest (56 d after germination).

Cultivar	Treatment	Dry matter allocation [%]		
		Leaf blade ^z	Leaf sheath ^z	Root ^z
Sasanishiki	R	48.6 ± 1.03	40.0 ± 0.67 *	11.5 ± 0.50
	RB	51.0 ± 0.83	36.1 ± 0.83	12.9 ± 0.17 *
Nipponbare	R	51.0 ± 0.32	38.7 ± 0.30 *	10.3 ± 0.26
	RB	52.3 ± 0.43 *	35.0 ± 0.30	12.7 ± 0.25 *

^z Means ± standard errors of the means ($n = 4$). Within each cultivar, means in each column with an asterisk (*) are significantly different by t test ($P < 0.05$).

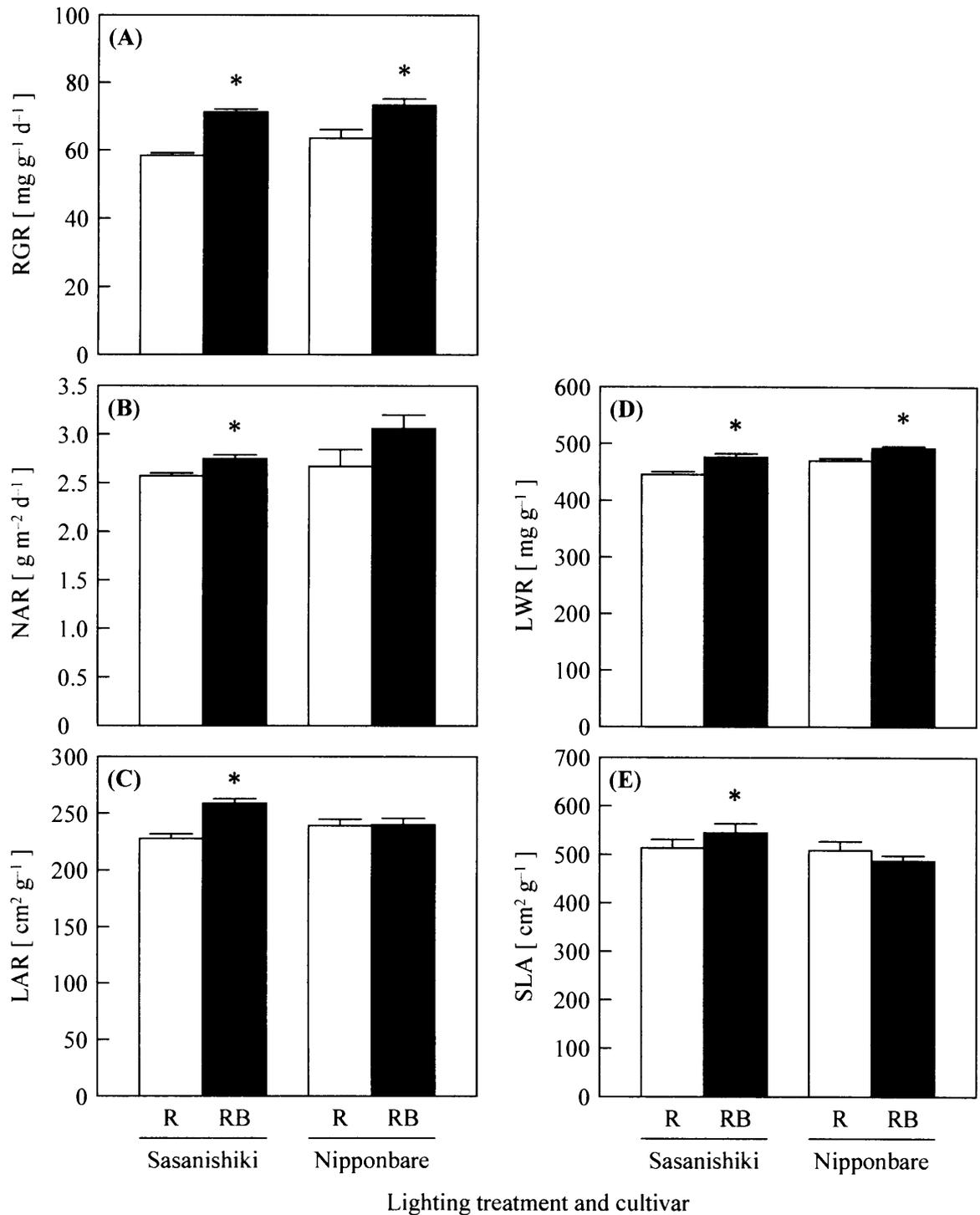


Fig. 13 Relative growth rate (RGR; A), net assimilation rate (NAR; B), leaf area ratio (LAR; C), leaf weight ratio (LWR; D) and specific leaf area (SLA; E) of two cultivars (Sasanishiki and Nipponbare) of rice plants between 35 and 56 d after germination. Plants were grown hydroponically under R or RB from 21 d after germination. Vertical bars represent standard errors of the means ($n = 4$). Within each cultivar, means with an asterisk (*) are significantly different by t test ($P < 0.05$).

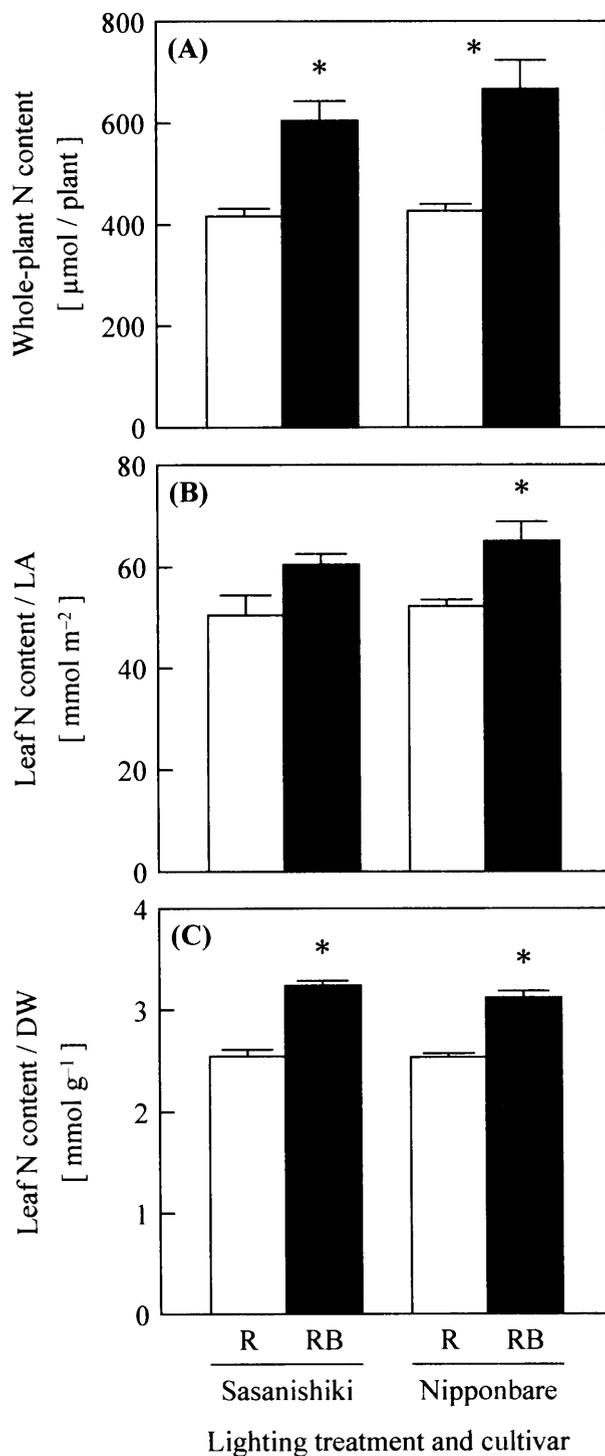


Fig. 14 Whole-plant N content (A), leaf N content per unit leaf area (LA) (B) and leaf N content per unit dry weight (DW) (C) of two cultivars (Sasanishiki and Nipponbare) of rice plants at final harvest. Plants were grown hydroponically under R or RB from 21 to 56 d after germination. Vertical bars represent standard errors of the means ($n = 4$). Within each cultivar, means with an asterisk (*) are significantly different by t test ($P < 0.05$).

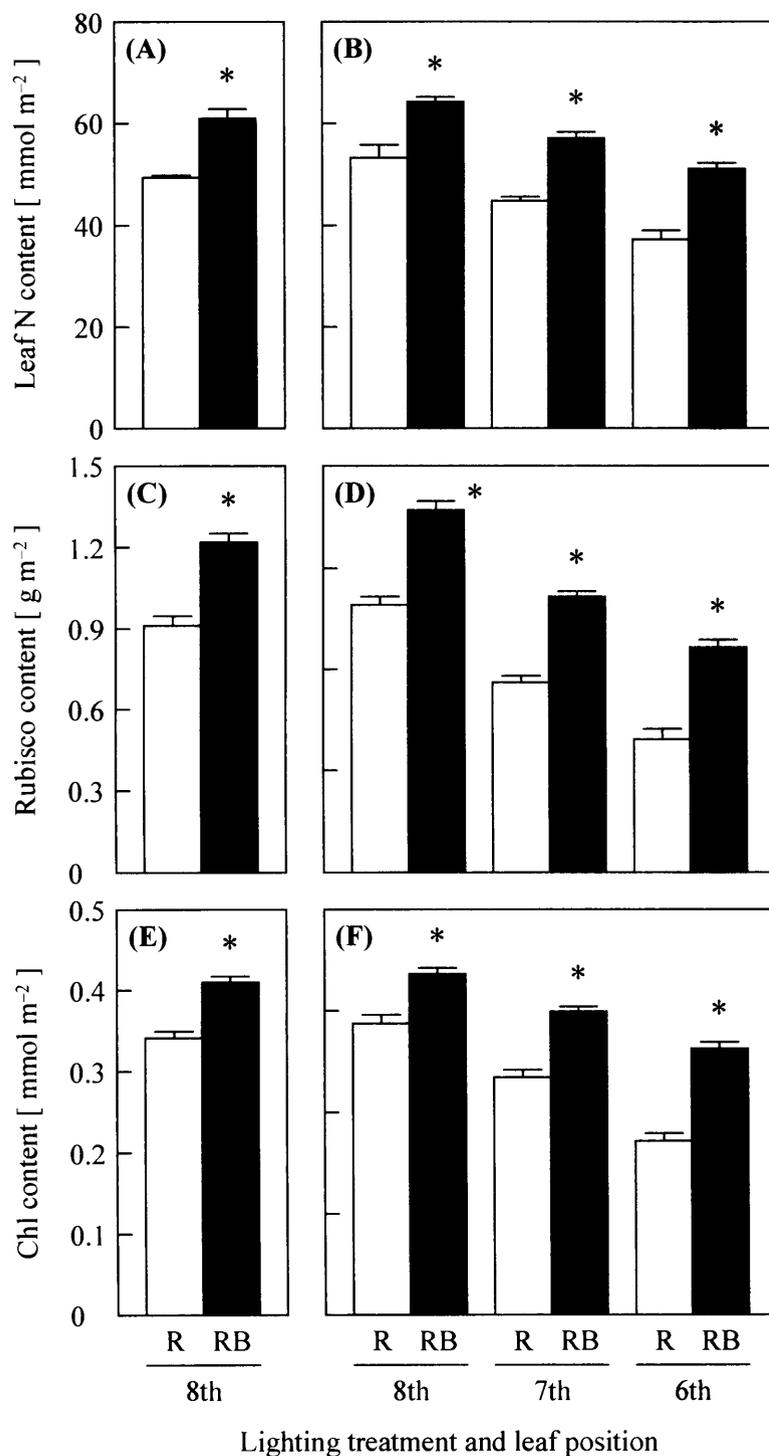


Fig. 15 Leaf N (A, B), Rubisco (C, D) and Chl (E, F) contents per unit leaf area in rice leaves at different positions on the main culms. Plants (Sasanishiki (A, C, E) and Nipponbare (B, D, E)) were grown hydroponically under R or RB from 21 d after germination. Leaves were numbered from primary leaf after cotyledon. The 8th leaves were the youngest and fully expanded. Vertical bars represent standard errors of the means ($n = 6$). Within each cultivar, means with an asterisk (*) are significantly different by t test ($P < 0.05$).

3.4 考察

RB 区における RGR の向上と個体乾物重の増加には、NAR の向上が寄与していた (Fig. 13B) . NAR の向上は、個体の光合成速度の増加または呼吸速度の減少、あるいはその両者によってもたらされる。RB 区では、ササニシキ、日本晴ともに、個体レベルにおける葉面積あたりの葉身 N 量が多かった (Fig. 14B) . 日本晴を用いて葉位別の調査を行ったところ、個体レベルにおける葉面積あたりの葉身 N 量の増加に伴い、どの葉位においても葉面積あたりの葉身 N 量が多く、また同時に葉面積あたりの Rubisco 量や Chl 量も多かった (Fig. 15B, D, F) . またササニシキでは最上位完全展開葉のみしか調べていないものの、日本晴と同様の傾向が認められた (Fig. 15A, C, E) . これらの結果は、いずれの品種においても、RB 区の葉面積あたりの光合成速度が、R 区よりも高かったことを示唆している。暗呼吸速度については、本研究では調査は行わなかった。シラカバ組織培養苗では、暗呼吸速度は明期中の照射光の光質に影響を受けないことが報告されている (Sæbø et al. 1995) . また、一般にイネ葉身の呼吸速度はおよそ $1-2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ である (例えば Sato and Kim 1980, Makino et al. 1988 など) . この値は、成育環境とほぼ同様の PPF (250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下での純光合成速度に比べても低い (Fig. 6 参照) . このことから、仮に光質処理区間の呼吸速度の間にある程度の差があったとしても、光合成速度の差を覆すほどのものではないと推察される。このことから、RB 区の高い NAR は、光合成速度の増加によるものであることが強く示唆される。

RB 区における葉面積あたりの葉身 N 量の増加は、個体全体の N 集積量の増加と、葉身の乾物重あたりの N 量の増加によるものであった。このことから、赤色光に青色光を付加することで、N の吸収あるいは還元が促進され、そのことが結果的に葉面積あたりの葉身 N 量の増加をもたらしたのではない

かと推察される。一般に、青色光照射によって気孔の開口の促進 (Sharkey and Raschke 1981, Karlsson 1986) や硝酸還元酵素 (nitrate reductase, NR) 活性の増大 (Sasakawa and Yamamoto 1979, Ohashi et al. 2006) が起こることが知られており、これらの現象が N の吸収や還元促進に繋がった可能性が考えられる。

ササニシキでは、LAR の増加も RB 区における RGR の増加に貢献していた (Fig. 13C) 。この RB 区における葉身のより大きな展開は、葉身へのバイオマス投資率の増加 (Fig. 13D) と、バイオマスあたりの葉面積の拡大 (Fig. 13E) に起因していた。このような形態的な応答も、個体の光合成の増加に関わっていたと考えられる。しかし日本晴においては、青色光によって葉身へのバイオマス投資率が高くなる応答は認められたものの、薄く広い葉面の展開といった応答は観察されなかった (Fig. 13C) 。Schuerger et al. (1997) は、トウガラシを用いて、照射光中の青色光強度が高いほど葉肉細胞の大きさが向軸方向に増加し、それに伴って葉の厚さも増加することを報告している。また、青色光成分を全く含まない照射光下において SLA が増加するという応答が、ダイズ (Britz and Sager 1990) やトウガラシ (Brown et al. 1995) において認められている。このことから、光質が葉の発達に及ぼす影響は、植物種間や品種間によって異なるものと考えられる。これまでに、葉の厚さなどの形態形成を制御する青色光受容体は見つかっていない。青色光受容体 *cry1*, *cry2*, *phot1* を欠損したシロイヌナズナ突然変異体は、光強度に応じて葉の厚さを変えることができる (Weston et al. 2000) ことから、これらの青色光受容体は葉の厚さの制御には関わっていないものと考えられる。

Makino et al. (1997b) と Ohashi et al. (2000) は、葉身への N 投資率を高めることが、個体レベルでの光合成を高める上で重要な応答であると指摘している。本研究では、いずれの品種においても、RB 区の方が R 区よりも葉身へより N を投資する応答を示していた。このような応答も個体の光合成や乾物

生産を向上させることに貢献していたといえる。

以上より、赤色光に青色光を付加して長期間照射したイネにおいて、赤色光単独照射よりも乾物生産が促進することが示された。これにはおもに NAR の向上が寄与していた。青色光の付加による NAR の向上は、ササニシキと日本晴でその向上の程度は異なっていたものの、いずれの品種においても起こっていた。NAR の増加は個体レベルの葉面積あたりの N 量の増加を伴っており、葉身 N 量の増加は Rubisco 量および Chl 量の増加を伴っていた。またササニシキでは、葉身を薄く広く展開する応答も乾物生産向上に寄与していた。他方日本晴ではそのような形態的な変化は認められなかった。さらに、両品種ともに RB 区において葉身への N 投資率が増加しており、このことも乾物生産促進に関わる因子の 1 つであった。

4. 結論

本章では、赤色光に低強度の青色光を付加して長期間照射することによる乾物生産促進をもたらす要因を明らかにするため、イネを材料として、個葉の光合成特性（第 2 節）および個体成長（第 3 節）について調べた。

個葉の光合成特性の解析の結果、赤色光に青色光を付加して照射すると、赤色光単独照射に比較して、イネ葉身の N 量が増加し、それに伴って白色光下での光合成速度が増加した。これは、葉身 N 量の増加とともに、光合成関連タンパク質量も増加したことによるものであると考えられた。また実際の成育環境の光質下における光合成速度も、RB 区の方が高かったであろうと推察された。

個体成長の解析の結果、赤色光への青色光の付加によるイネの乾物生産促進には、NAR の向上が大きく寄与することが明らかとなった。またササニシキでは、青色光の付加による個体レベルでの葉面の拡大も乾物生産向上に寄与していた。日本晴ではそのような形態的な応答は認められなかった。このように、乾物生産促進に対する形態的特性の寄与は、イネの品種によって異なることがわかった。さらに、青色光の付加により、個体レベルにおいて葉身への N 投資率が増加した。このことも乾物生産促進に寄与する要因の 1 つであった。

第 2 節において、実際の成育環境下における単葉の光合成速度は、赤色光に青色光を付加した条件下において高かったであろうと考察したが、そのような葉面積あたりの光合成速度の増加と個体の乾物生産の促進との因果関係については第 2 節では述べなかった。第 3 節において、赤色光への青色光の付加による乾物生産の促進に NAR の増加が貢献していたことから、個葉の光合成速度の増加は、個体の乾物生産促進に貢献したといえる。

第 3 章

ホウレンソウの光順化応答における青色光の作用

1. 序論

長期的に青色光を照射して成育させた植物と、赤色光を照射して成育させた植物との間には、その光合成特性や形態にいくつかの特徴的な差異が観察される。青色光照射下で成育した植物葉では、赤色光照射に比較して、白色光の強光下で測定した光合成速度が高い (*Atriplex triangularis*: Leong and Anderson 1984a, スズラン・オオムギ・トウモロコシ: Bukhov et al. 1995, シラカバ組織培養苗: Sæbø et al. 1995)。また、青色光照射下で成育した植物葉において、Chl *a/b* 比が高く (Lichtenthaler et al. 1980, Leong and Anderson 1984a, Eskins et al. 1989, López-Juez and Hughes 1995), Cyt *f* 量 (Leong and Anderson 1984a, López-Juez and Hughes 1995) および Rubisco 量 (Eskins et al. 1991, López-Juez and Hughes 1995) が多いことも報告されている。さらに解剖学的には、青色光照射下で成育した葉の方が、赤色光照射下で成育した葉よりも、葉肉細胞や葉の厚さが厚く (Schuerger et al. 1997), 葉面積あたりの葉乾物重が大きい (Britz and Sager 1990, Brown et al. 1995, Hanyu and Shoji 2000a, 2000b, Dougher and Bugbee 2001) ことも知られている。青色光照射下で成育した葉において観察されるこれらの特徴は、白色強光下で成育した植物葉の特徴に類似しており、赤色光照射下で成育した植物葉の特徴は白色弱光下で成育した葉のそれに類似している。このことから、青色光が光順化を誘導するシグナルとして作用するのではないかという仮説が提唱されている (Senger and Bauer 1987, Anderson et al. 1995)。一般に光順化応答とは、植物が成育環境の光強度に応じてガス交換特性、光合成の生化学的特性、形態的特性、光阻害に対する耐性などを変化させる応答のことを指す (for reviews, see Boardman 1977, Björkman 1981, Anderson 1986)。光順化応答は、成育環境の光強度下において光エネルギーを効率よく光合成や成長に利用するための積極的な応答であると考えられている

(for reviews, see Evans 1989, Terashima and Hikosaka 1995) .

これまでの研究の多くは、着色蛍光灯に光学フィルタを組み合わせたものを光源に用いていた。そのため、植物が照射光中に含まれる青色光の有無を感知するのか、あるいは青色光強度を感知するのかについては明確になっていない。

そこで本章では、青色光強度と光順化応答との関係を明らかにすることを目的とした。供試植物にハウレンソウを用いて、PPFD は同じ ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で青色光 PFD の異なる (0, 30, 100 または $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 赤青混合光照射光下で約 1 ヶ月間成育させた。照射光の光源には、前章と同様に青色と赤色 LED を用いた。この光源を用いることにより、青色光 PFD と総 PPFD を独立に調節することが可能である。このような条件下で成育させたハウレンソウの、個葉レベルの光順化に関わる特性 (第 2 節) および個体レベルの光順化に関わる特性 (第 3 節) について調べた。そして、低青色光強度に対する植物の応答と、弱光に順化した植物で観察される応答との類似性を評価基準として、光順化における青色光の作用について検討した。なお実験材料としてハウレンソウを選択した理由は、予備実験により、本研究で設定した栽培光の PPFD ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 付近の低 PPFD の範囲でも光順化応答が明瞭に観察されたためである。

2. 青色光強度とハウレンソウの個葉レベルにおける光順化応答との関係

2.1 はじめに

既往の研究において、青色光が影響を及ぼすとされる光順化応答はおもに個葉の光合成特性や形態に関するものである。そこで本節ではまず、青色光強度と個葉レベルでの光順化応答との関係を調べた。

一般に、弱光に順化した植物葉（弱光順化葉）では、強光に順化した植物葉（強光順化葉）に比較して、葉面積あたりの N 量が少なく、それに伴って強光下での光合成速度が低い (Hirose and Werger 1987, Walters and Field 1987, Sims and Pearcy 1989, Makino et al. 1997b) 。弱光順化葉において葉面積あたりの N 量が少ないことは、おもに葉面積あたりの乾物重が小さいことに起因する (Sims and Pearcy 1994, Evans 1996, Niinemets 1997, Evans and Poorter 2001) 。葉面積あたりの乾物重は葉の厚さの指標とされている。すなわち、弱光下では葉を薄くし、その分葉面をより広く展開する。このように、植物は強光に対しては葉面積あたりの光合成速度を高めようとし、弱光に対しては受光量を高めようとする応答を示す。

また葉緑体の特性として、弱光順化葉では、強光順化葉に比較して、相対的に集光反応に関わるタンパク質量が多く、光合成電子伝達に関わるタンパク質量が少ない (Leong and Anderson 1984b, 1984c, Evans 1987, Terashima and Evans 1988, De la Torre and Burkey 1990a, 1990b) 。すなわち、植物は光強度に応じて光合成系タンパク質間の N 分配を変化させる。この応答は、弱光下での光合成を律速する集光反応 (第 2 章 2.1 および Fig. 1, 2 参照) に対してより多くの N を投資することで、弱光下における光合成の効率を高めようとする応答であると解釈されている。なお CO₂ 固定能力の指標である Rubisco

への N 分配には，弱光植物と強光植物との間にほとんど差は認められない (Makino et al. 1997b, Hikosaka 2005, Miyake et al. 2005) .

以上をふまえ本節では，異なる青色光強度下で成育したホウレンソウ葉において，飽和光下での光合成速度，葉面積あたりの N 量，葉の厚さ，および集光因子と電子伝達系因子間の N 分配 (Table 4) を比較することで，個葉レベルでの光順化応答における青色光の作用を評価することとした。

Table 4 Representative acclimation responses of higher plants to growth irradiance at the single-leaf level.

Trait	Low irradiance	High irradiance
Light-saturated rate of photosynthesis ^z	Decrease	Increase
Leaf N content per unit leaf area ^z	Decrease	Increase
Leaf thickness ^y	Decrease	Increase
N allocation to light-harvesting components ^x	Increase	Decrease
N allocation to electron-transport components ^x	Decrease	Increase

^z *Alocasia macrorrhiza* (Sims and Pearcy 1989), *Colocasia esculenta* (Sims and Pearcy 1989), *Solidago altissima* (Hirose and Werger 1987), *Piper auritum* (Walters and Field 1987), *Piper hispidum* (Walters and Field 1987), rice (Makino et al. 1997b).

^y *Alocasia macrorrhiza* (Sims and Pearcy 1994), *Alocasia odora* (Noguchi et al. 1996), spinach (Terashima and Evans 1988, Noguchi et al. 1996).

^x Barley (De la Torre and Burkey 1990a, 1990b), pea (Leong and Anderson 1984b, 1984c, Evans 1987), rice (Makino et al. 1997b), spinach (Terashima and Evans 1988).

2.2 材料および方法

2.2.1 供試植物および育成条件

供試植物にはホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L. 品種: メガトン) を用いた。ポリプロピレン製容器 (L: 190 mm × W: 330 mm × H: 100 mm) 中のパーミキュライトに播種し, 三波長型白色蛍光灯 (FPL55EX-L, 岩崎電気 (株) 製) を備えたインキュベータ (MIR-553, 三洋電機 (株) 製) 内で 7 日間育苗した。インキュベータ内は PPFD: $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 明暗周期: 明期 12 h / 暗期 12 h, 気温: 明期 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ / 暗期 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ に調節した。1 日 1 回約 500 mL の水道水を灌水した。播種後 7 日目に成育の揃った個体 (草丈: 約 5 cm, 子葉長: 約 3 cm) を 18-24 個体選抜した。蓋の中心部に円状の穴 (ϕ : 20 mm) を開けた内容積約 500 mL のポリエチレン製円柱褐色ボトル (ϕ : 75 mm × H: 150 mm) に, 1 ボトルあたり 1 個体ずつを移植した。背軸の子葉の下部約 1 cm の位置にウレタン材を巻き, 植物体がボトルの穴の位置でウレタン材によって支持されるようにした。移植日から, 三波長型白色蛍光灯または LED パネル (岩崎電気 (株) 製) を備えたインキュベータ内で水耕法で栽培した。LED パネルは, 青色 LED の個数が 1,296 個である以外は, 第 2 章で用いたものと同様である。

播種後 7 日目から光処理を開始した。光処理区は, PPFD の異なる白色光を照射する対照区と, 総 PPFD は同じで青色光 PFD の異なる赤青混合光を照射する青色光処理区を設けた。対照区は, $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色光を照射する WL 区と, $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色光を照射する WH 区の計 2 処理区とした。また青色光処理区は, 青色光 / 赤色光 PFD を $0 / 300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とする B0 区, $30 / 270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とする B30 区, $100 / 200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とする B100 区, および $150 / 150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とする B150 区の計 4 処理区と

した．総 PPF_D はすべての青色光処理区で $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ である．各光処理区の分光 PFD を Fig. 17 に示す．なお，白色蛍光灯の 400-500 nm の青色光比率はおよそ 11% であり，WL 区および WH 区の青色光 PFD はそれぞれ 10 および $33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった．その他のインキュベータ内の環境要素は明暗周期：明期 12 h / 暗期 12 h，気温：明期 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ / 暗期 $15 \pm 1^\circ\text{C}$ に調節した．PPFD は光源下約 10 cm にて調節し，常にその位置に植物体最上面が位置するように，植物の成育に合わせてボトルを載せた棚の位置を下げた．また全個体の処理期間中の積算受光量を均一にする目的で，1 日 1 回ボトルの位置を入れ替えた．Fig. 16 に青色光処理区のインキュベータ内部の写真を示す．インキュベータ内の気温および相対湿度の測定は第 2 章 2. 2. 1 と同様の方法で行った．相対湿度の制御は行わなかった．流量 30 L min^{-1} のエアポンプを用いて，外気をインキュベータ内に供給した．

水耕液は， $2 \text{ mol L}^{-1} \text{HCl}$ で $\text{pH } 6.0 \pm 0.1$ に調整した水温 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ の水道水を用いて調製した．水耕液の組成は，N 濃度を 8 mmol L^{-1} ($6 \text{ mmol L}^{-1} \text{NaNO}_3$ および $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{NO}_3$) とした以外は，Makino et al. (1988) にしたがった．標準濃度の水耕液の組成を Table 5 に示す．水耕液の濃度は，植物体の成育にあわせて段階的に調製した．移植日の水耕液は標準濃度の 1/2，移植後 5 日目以降は標準濃度とした．

サンプルには，播種後 32 日目以降の最上位完全展開葉（第 2，3 葉）を用いた．葉齢の差に起因する個体間の光合成速度，光合成系タンパク質量および N 量の差を低減させるため，各個体において対象とする葉の長さが 10-15 cm 程度のときにサンプリングした．LHCII および葉身 N の定量的ためのサンプルは，葉を葉柄から切り離した後，すみやかに新鮮重と葉面積を測定しポリエチレン製サンプリングバッグに入れ，定量に供するまで -80°C で凍結保存した．Cyt *f* 定量用のサンプルは，葉を葉柄から切り離した後，すみやかに新鮮

重と葉面積を測定し、生葉を定量に供した。葉面積の測定には自動面積計 (AAM-9, 林電工 (株) 製) を用いた。

2.2.2 光環境条件

PPFD の測定には光量子センサ (LI-190SA, LI-250, 米国 LI-COR 社製) を用いた。分光 PFD は、スペクトロメータ (HR-2000, 米国 Ocean Optics 製) を用いて測定した 0.4-0.5 nm ごとの分光放射束より算出した (Fig. 17)。

第 2 章 2.2.2 と同様の方法で算出した P_{FR} / P_{TOTAL} の値は、WL 区および WH 区で 0.85, B0 区で 0.89, B30 区で 0.88, B100 区で 0.88, B150 区で 0.87 であり、光質処理区によらずほぼ同じであった。このことから、光質処理区間において、可逆性 phy の作用の差異は無視できると考えられる。

2.2.3 光合成速度測定

ガス交換速度の測定は第 2 章 2.2.3 と同様の光合成測定装置を用いて行った。測定は、PPFD: $1,800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 外気 CO_2 分圧: 36 Pa, 葉温: $25.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$, 飽差: $1.1 \pm 0.1 \text{ kPa}$ の条件下で行った。

2.2.4 生化学分析

凍結保存しておいたサンプルを、新鮮重の 9 倍量 (1 g に対して 9 mL) の磨碎 buffer で、氷上に置いた乳鉢と乳棒を用いて磨碎し、これを粗抽出液とした。磨碎 buffer は第 2 章 2.2.4 に記述したものと同様である。以下、この粗抽出液の一定量を分取し、第 2 章 2.2.4 に記述した方法と同様の方法で、葉身 N, Cyt *f* および LHCII を定量した。

2.2.5 統計処理

対照区の平均値間の有意差検定は t 検定により，また青色光処理区の平均値間の有意差検定は Tukey の HSD 検定により，いずれも有意水準 5% で行った．統計処理には統計解析ソフトウェア (JMP Ver. 6.0.0, 米国 SAS 社製) を用いた．

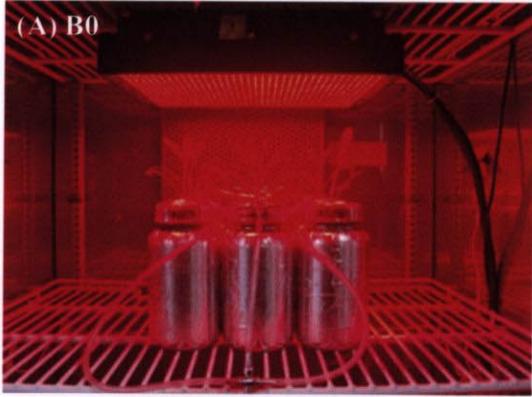


Fig. 16 Picture images of the incubators for treatments B0 (A), B30 (B), B100 (C) and B150 (D) containing 17-d-old spinach plants.

Table 5 Elements, compounds used for the hydroponic solution and element concentrations at the standard strength for spinach.

	Element	Compound	Element concentration [mmol L ⁻¹]
Major	N	NH ₄ NO ₃	2.0
		NaNO ₃	6.0
	P	KH ₂ PO ₄	8.0 × 10 ⁻¹
	K	KH ₂ PO ₄	8.0 × 10 ⁻¹
	Mg	MgSO ₄	5.0 × 10 ⁻¹
	S	MgSO ₄	5.0 × 10 ⁻¹
	Ca	CaCl ₂	6.0 × 10 ⁻¹
Minor	B	H ₃ BO ₃	5.0 × 10 ⁻²
	Fe	Fe-EDTA	5.0 × 10 ⁻²
	Mn	MnSO ₄	9.0 × 10 ⁻³
	Cu	CuSO ₄	3.0 × 10 ⁻⁴
	Zn	ZnSO ₄	7.0 × 10 ⁻⁴
	Mo	Na ₂ MoO ₄	1.0 × 10 ⁻⁴

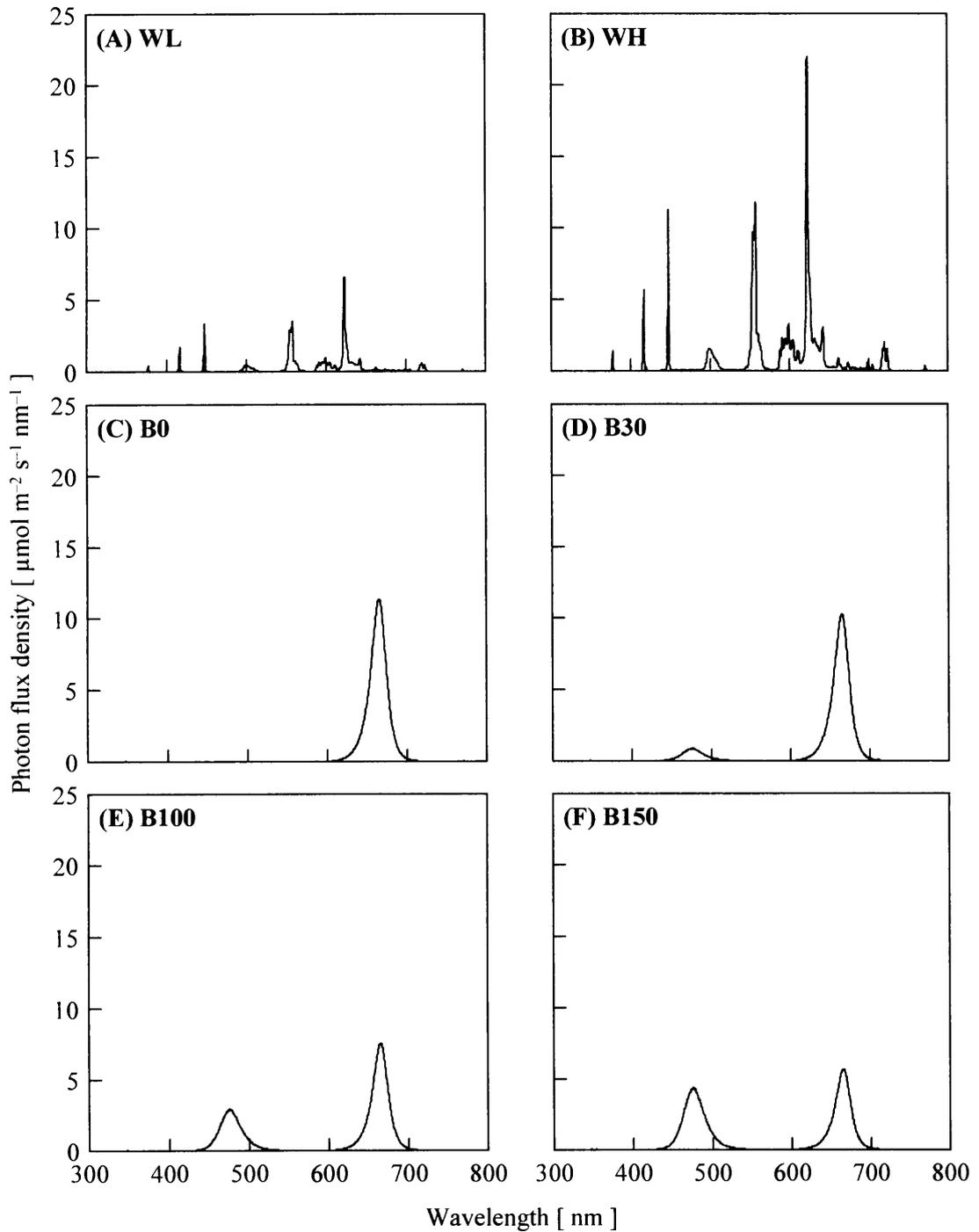


Fig. 17 Spectral PFD distributions of white-light control and blue-light treatments. White light was provided from white fluorescent lamps at PFDs of 90 (WL, A) and 300 (WH, B) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and mixtures of blue and red light were provided from blue and red LEDs at blue/red PFDs of 0/300 (B0, C), 30/270 (B30, D), 100/200 (B100, E) and 150/150 (B150, F) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. PFD per unit wavelength was measured for every 0.4-0.5 nm.

2.3 結果および考察

白色光の飽和光下で測定した光合成速度は、対照区では WL 区の方が WH 区よりも著しく低く、およそ 1/2 であった (Fig. 18A) . また、光合成速度と同様に、WL 区では葉面積あたりの N 量も著しく減少した (Fig. 18C) . 青色光処理区においては、飽和光下における光合成速度は B100 区から B0 区と青色光強度が低下するにつれて低下した (Fig. 18B) . B100 区の葉の光合成速度は、B150 区の葉のそれとほぼ同じであった . 葉面積あたりの N 量も、光合成速度と同様に、青色光強度が $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以下の範囲で、青色光強度が低いほど低下する傾向にあった (Fig. 18D) . B150 区の葉面積あたりの N 量の値は、B100 区の値よりわずかに少なかった . このように、青色光が $0-100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の範囲においては、低青色光強度下で成育した植物ほど、飽和光下での光合成速度や葉面積あたりの N 量の点で弱光植物に類似した .

葉面積あたりの N 量を、葉面積あたりの葉乾物重と、葉乾物重あたりの N 量にわけて、さらに比較を行った . 対照区では、葉面積あたりの葉乾物重は WL 区が WH 区のおよそ 1/2 と著しく小さかったが、葉乾物重あたりの N 量は WL 区でわずかに増加する傾向にあった (Fig. 19A, C) . このことは、弱光順化における葉面積あたりの N 量の減少は、おもに葉厚の減少という形態的な変化で説明できることを示している . 他方、青色光強度に依存した葉面積あたりの N 量の変化は、葉厚の変化と必ずしも相関していなかった (Fig. 19B) . B0 区の葉面積あたりの N 量は B30 区のそれより約 35% 減少したが、それには葉面積あたりの葉乾物重の減少 (約 20%) と葉乾物重あたりの N 量の減少 (約 15%) のいずれもが寄与していた (Fig. 19B, C) . また B30 区と B100 区および B150 区の葉面積あたりの N 量の差 (Fig. 18D) は、おもに葉乾物重あたりの N 量の差に起因するものであった (Fig. 19D) . このよ

うに、青色光強度に依存した葉面積あたりの葉乾物重の変化は、葉面積あたりの N 量の変化にわずかに寄与していたものの、その寄与の程度は光順化において観察される寄与の程度と比較して著しく小さかった。このことは、Fig. 18B, D で認められた青色光強度 $0-100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の範囲における光合成速度や葉面積あたりの N 量の変化が、光順化応答とはみなせないことを意味している。

次に、集光因子と電子伝達系因子間の N 分配について調べた。電子伝達を律速する因子の 1 つである Cyt *f* と、集光反応に関わる代表的な因子である LHCII を定量し、それらの量の比率を電子伝達系因子と集光因子間の N 分配の指標とした。対照区では、Cyt *f* / LHCII 比は WL 区の方が WH 区よりも有意に低く、WL 区では相対的に集光因子により多くの N を分配することが確認された (Fig. 20A)。異なる青色光強度下で成育した植物においては、Cyt *f* / LHCII 比は B100 区から B0 区まで青色光強度が低下するにしたがってほぼ線形に低下した (Fig. 20B)。B100 区と B150 区との間には有意な差は認められなかった。このように、 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以下の範囲においては、青色光強度が低いほど Cyt *f* / LHCII 比が弱光植物に近づく傾向にあった。このことから、青色光が光順化の際の集光因子と電子伝達系因子間の N 分配変化に関与している可能性が示唆された。

以上より、低強度の青色光 (本研究の条件下では $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以下) が、光順化において葉緑体内のタンパク質量を調節し、葉緑体の性質を改変させる応答に関わっている可能性が示唆された。他方、青色光は、光順化の際の葉の厚さの変化には関わっていないものと考えられた。既往の研究によって、葉緑体レベルでの光順化と、葉の形態レベルでの光順化は異なるメカニズムによって制御されている可能性が示唆されている (Murchie and Horton 1998, Weston et al. 2000, Yano and Terashima 2001)。青色光強度は、弱光に対する葉緑体レベ

ルの光順化のみに関与しているのかもしれない。

これまでに、青色光以外にも、光順化のメカニズムに関与している可能性のある因子の存在が示唆されている。光合成電子伝達系の酸化還元状態 (redox state) は、光強度に対する光合成能力や非光化学的消光 (non-photochemical quenching) の調節に関わっていると示唆されている (Gray et al. 1997, Huner et al. 1998) 。また、植物は葉に含まれる糖濃度をモニタすることで、その葉が置かれている光環境を認識している可能性も示唆されている (Ono et al. 2001, Terashima et al. 2005) 。さらに、シロザにおいては、下位葉から上位葉へ光強度に関する情報を伝達するために、光合成産物をシグナル伝達物質として利用している可能性も提唱されている (Yano and Terashima 2001) 。今後は、これらの因子と青色光との相互作用について調べる必要がある。

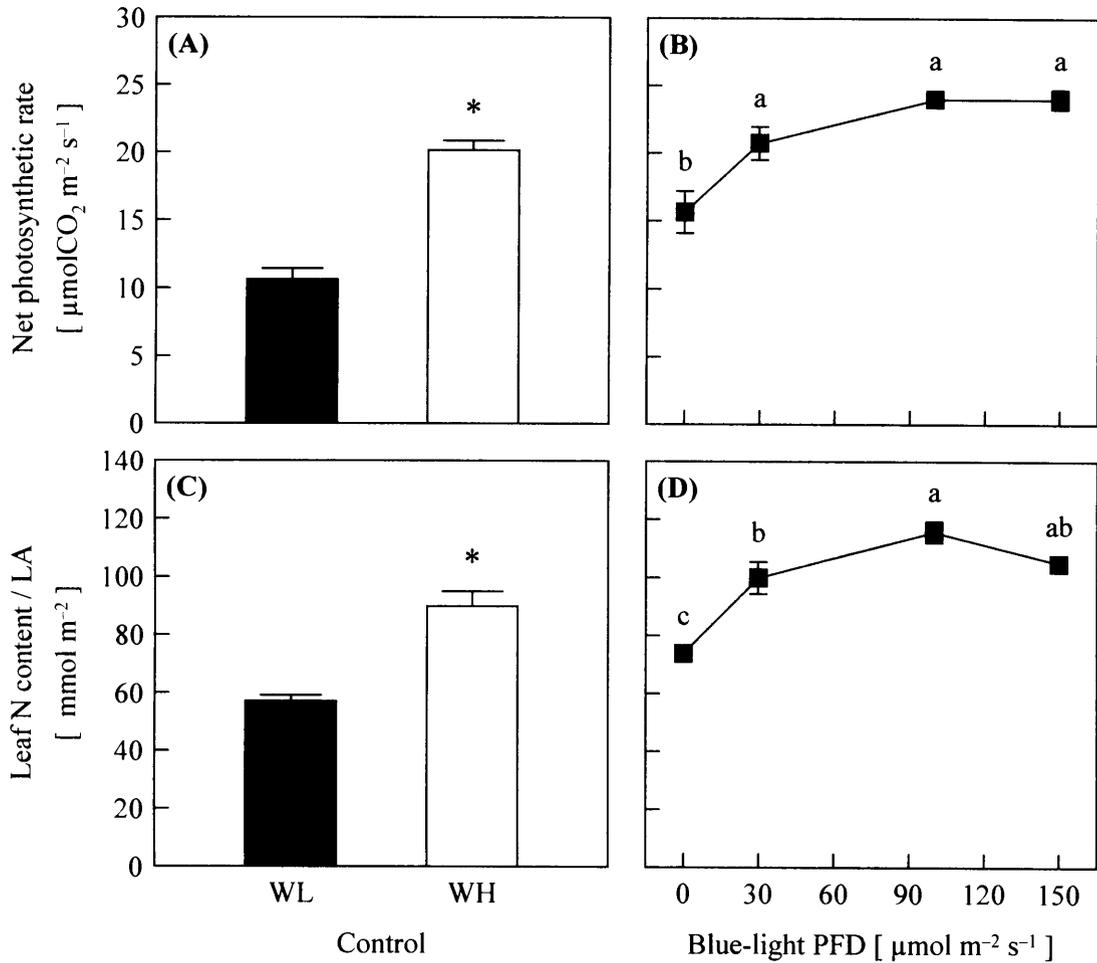


Fig. 18 Light-saturated rate of photosynthesis (A, B) and leaf N content per unit leaf area (LA) (C, D) in spinach leaves grown under WL or WH (A, C) and under B0, B30, B100 or B150 (B, D). Gas-exchange measurements were made at a PPFD of $1,800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a $p\text{Ca}$ of 36 Pa, a leaf temperature of $25 \text{ }^\circ\text{C}$, and a leaf-to-air VPD of $1.1 \pm 0.1 \text{ kPa}$. Light for measurements were provided from a white halogen lamp. Vertical bars represent standard errors of the means ($n = 4-6$). Means with an asterisk (*) and with different letters are significantly different by t test and by Tukey's HSD test, respectively ($P < 0.05$). For treatment codes, see Fig. 17.

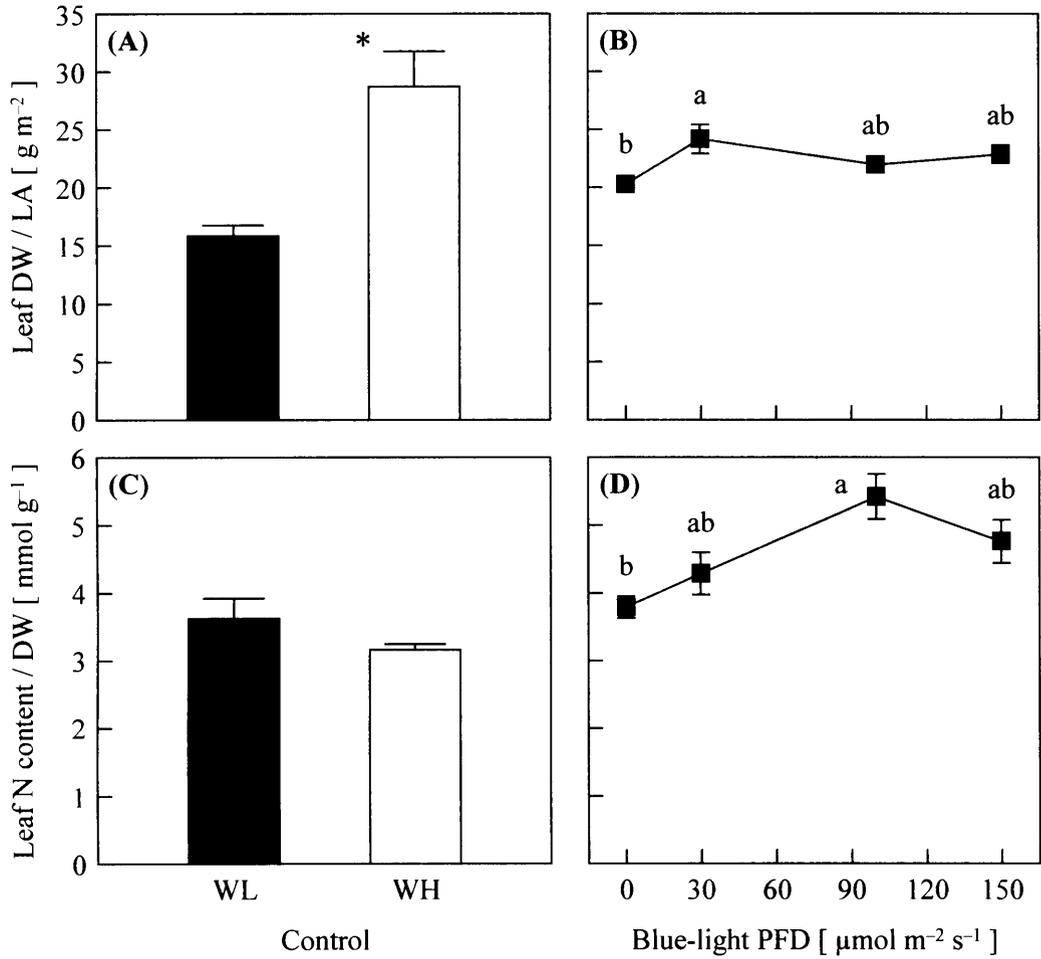


Fig. 19 Leaf dry weight (DW) per unit leaf area (LA) (A, B) and leaf N content per unit DW (C, D) in spinach leaves grown under WL or WH (A, C) and under B0, B30, B100 or B150 (B, D). Vertical bars represent standard errors of the means ($n = 4-12$). Means with an asterisk (*) and with different letters are significantly different by t test and by Tukey's HSD test, respectively ($P < 0.05$). For treatment codes, see Fig. 17.

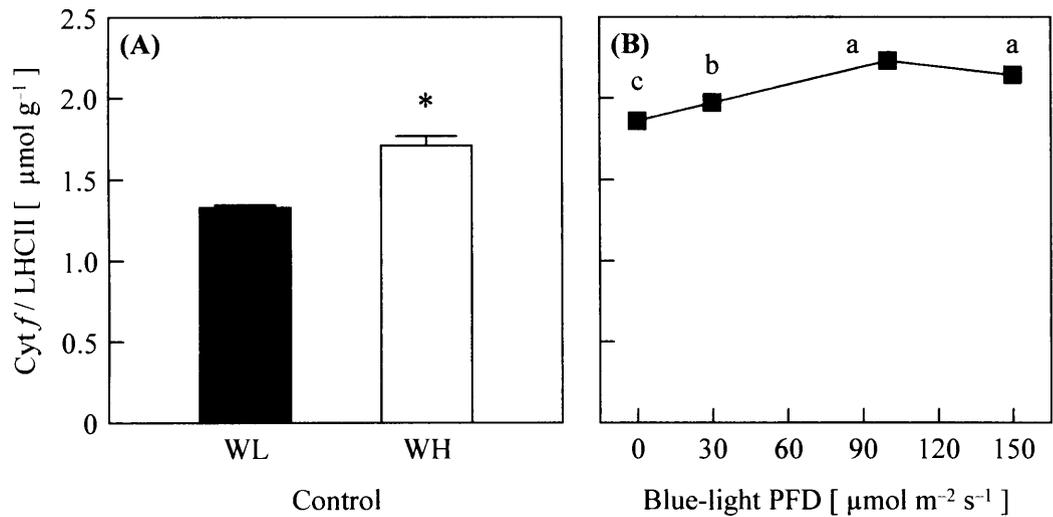


Fig. 20 The ratio of Cyt *f* content to LHCII content in spinach leaves grown under WL or WH (A) and under B0, B30, B100 or B150 (B). Vertical bars represent standard errors of the means ($n = 3-4$). Means with an asterisk (*) and with different letters are significantly different by *t* test and by Tukey's HSD test, respectively ($P < 0.05$). For treatment codes, see Fig. 17.

3. 青色光強度とハウレンソウの個体レベルにおける光順化応答との関係

3.1 はじめに

前節では、青色光強度と個葉レベルでの光順化応答との関係を調べた。その結果、低強度の青色光が光順化における集光因子と電子伝達系因子間の N 分配の変化に関わる可能性が示唆された。

一方、植物は弱光下において、個体全体で葉面積を拡大するなどの応答を示すことが知られている (Crookston et al. 1975, Inada and Nishiyama 1987, Makino et al. 1997b) 。 Makino et al. (1997b) は、弱光下におけるイネの成長を調べた結果から、イネは長期的な弱光に対して、個葉の光合成特性を変化させて応答するというよりも、むしろ個体レベルにおいて葉面を拡大させるなど形態を変化させることで、個体の成長速度を高く維持していると指摘した。このような弱光下における葉面積の拡大は、多くの植物種において観察されている (for a review, see Björkman 1981) 。 このことから、イネ以外の高等植物においても、葉面積の拡大を含む個体レベルにおける応答が、光順化応答として重要であると考えられる。そこで本節では、青色光強度が個体レベルの光順化応答に及ぼす影響について調べた。

一般に、弱光に順化した植物では、強光に順化した植物と比較して LAR が高い (Walters et al. 1993, Sims and Pearcy 1994, Makino et al. 1997b) 。 また弱光植物では、個体全体の N のうち、葉に投資される N の割合が高い傾向にある (Makino et al. 1997b) 。 これは、光合成器官である葉により多くの N を投資することで、個体全体の光合成効率をわずかでも高めようとする応答であると考えられている。さらに弱光植物では、葉の非体構成炭水化物 (TNC) 量が著しく少ない (Noguchi et al. 1996, Makino et al. 1997b, Poorter et al. 2006) 。 こ

れは、弱光下では光合成産物を集積せず、効率よく成長に利用していることを反映したものであると解釈されている (Makino et al. 1997b) .

以上をふまえ本節では、異なる青色光強度下で成育したハウレンソウの LAR, 葉への N 投資率, および葉の TNC 量 (Table 6) を比較することで、個体レベルでの光順化応答における青色光の作用を評価することとした.

Table 6 Representative acclimation responses of higher plants to growth irradiance at the whole-plant level.

Trait	Low irradiance	High irradiance
Leaf area ratio ^z	Increase	Decrease
N investment in leaves ^y	Increase	Decrease
Amounts of photosynthates in leaves ^x	Decrease	Increase

^z *Alocasia macrorrhiza* (Sims and Pearcy 1994), *Betula alleghaniensis* (Walters et al. 1993), *Betula papyrifera* (Walters et al. 1993), *Ostrya virginiana* (Walters et al. 1993), rice (Makino et al. 1997b).

^y Rice (Makino et al. 1997b).

^x Rice (Makino et al. 1997b), spinach (Noguchi et al. 1996).

3.2 材料および方法

3.2.1 供試植物，成育条件および光環境条件

供試植物にはホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L. 品種: メガトン) を用いた。成育条件，処理区，栽培装置および光環境測定については本章 2.2.1 および 2.2.2 と同様とした。

3.2.2 成育調査および窒素定量

播種後 32 日目の明期終了時にサンプリングを行った。植物個体を葉，葉柄と茎，根にわけ，新鮮重および総葉面積測定後 80°C で 3-7 日間乾燥させ，乾物重を測定した。LAR は第 2 章 3.2.2 の式 (10) より算出した。各器官の乾物サンプルを卓上型ボールミル (MM301, 独国 Retsch GmbH 社製) を用いて微粉碎した。以下，この粉碎した乾物サンプルの一定量を分取し，還元態 N，硝酸態 N，TNC の定量を行った。還元態 N の定量は，第 2 章 3.2.2 と同様の方法で行った。

硝酸態 N の定量は Cataldo et al. (1975) の方法にしたがった。粉碎した乾物サンプルを 10 mg 程度試験管に秤量し，2.5 mL の 80% (v/v) ethanol 溶液を加えて 80°C，12 min 加熱し，NO₃⁻ を含む低分子画分を抽出した。1,500 × g，5 min の遠心を行い，上清をリム付き濃縮試験管に移し，試験管濃縮機 (TC-8F, タイテック (株) 製) で ethanol を蒸発させた。さらに，残渣画分に新たに 2.5 mL の 80% (v/v) ethanol を加えて 80°C 熱抽出操作を行った。この操作を 4 回繰り返した。ethanol を蒸発させた後，蒸留水を加え 500 μL とし，1,500 × g，4°C，15 min の遠心を行った。この上清を低分子画分抽出液とした。低分子画分抽出液を，葉および根では 5 倍に，葉柄と茎では 25 倍に水で希釈し，25 μL を試験管に分取した。これに 100 μL の 5% (w/v)

salicylic acid の濃硫酸溶液を加え、室温で 20 min 静置した。その後、2.5 mL の 2 mol L^{-1} NaOH を添加し攪拌した。さらに 20 min 静置し、試料温度が室温に下がった後、410 nm における吸光度を測定した。標準曲線はイオンクロマトグラフ用硝酸性窒素標準液 (和光純薬工業 (株) 製) を用いて作成した。

3.2.3 炭水化物定量

可溶性糖 (glucose (Glc), fructose (Fru) および Suc) の定量は, Murchie et al. (1999) の方法を参考にして行った。上述の低分子画分抽出液を 1-10 倍程度に希釈した後 100 μL 分取し, それに 5 mmol L^{-1} MgCl_2 , 0.5 mmol L^{-1} DTT, 1 mmol L^{-1} ATP (オリエンタル酵母工業 (株) 製), 0.8 mmol L^{-1} NADP^+ (オリエンタル酵母工業 (株) 製), 2 kU L^{-1} hexokinase (EC 2.7.1.1, from yeast overproducer, スイス Roche Diagnostics 社製), 20 kU L^{-1} Glc-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49, Grade II from yeast, スイス Roche Diagnostics 社製) を含む 1.0 mL の 50 mL HEPES/NaOH buffer (pH 7.5) を加えた。25°C, 5 min 反応させた後, ダブルビーム分光光度計 (UV-1600, (株) 島津製作所製) を用いて 340 nm の吸光度を測定し, NADPH の光路長 1 cm あたり, 濃度 1 mmol L^{-1} あたりの吸光係数 6.22 を用いて Glc 量を算出した。次に, この溶液に終濃度で 2 kU L^{-1} となるように phosphoglucose isomerase (EC 5.3.1.9, from yeast, スイス Roche Diagnostics 社製) を加え, 25°C, 20 min 反応させた後, 340 nm の吸光度を測定し, Fru 量を算出した。さらに, この溶液に終濃度で 40 kU L^{-1} となるように invertase (EC 3.2.1.26, from baker's yeast, 米国 Sigma-Aldrich 社製) を加え, 25°C, 20 min 反応させた後, 340 nm の吸光度を測定し, Suc 量を算出した。invertase 以外の, 硫安沈殿の状態で購入した各酵素は, $15,000 \times \text{g}$, 4°C, 5 min の遠心を行い, 上清を除いてから使用した。ブランクは, 低分子画分抽出液の代わりに水を用いたものとした。

starch の定量は Nakano et al. (1995) の方法にしたがった。上述の 80% (v/v) ethanol 溶液に不溶性の残渣画分を一夜乾燥させた後、1.5 mL の 0.5 mol L⁻¹ KOH を加え、40°C、4.5 h インキュベートして starch を抽出した。その抽出液に 100 μL の 21% (w/v) MES 溶液を加えた後、その pH を 0.5 mol L⁻¹ HClO₄ 溶液 (約 1.5 mL) で 5 付近に調整した。それを氷上で 10 min 放置後、1,800 × g、4°C、5 min の遠心を行い、KClO₄ を沈殿させた。遠心上清から一定量を分取し、starch 濃度が 54 mg L⁻¹ 以内となるように 100 mmol L⁻¹ Na-acetate buffer (pH 4.8) で希釈し 1.4 mL とした。これに 1.4 mL の amyloglucosidase (EC 3.2.1.3, from *Rhizopus* sp., 米国 Sigma-Aldrich 社製) の 100 mmol L⁻¹ Na-acetate buffer (pH 4.8) 溶液 (20 kU L⁻¹) を加え、40°C、4.5 h、starch を加水分解した。amyloglucosidase はあらかじめ脱塩用自然落下型カラム (PD-10, スウェーデン GE Healthcare 社製) で脱塩してから使用した。加水分解終了後のサンプルを 100°C、7 min 加熱し酵素を失活させた。それを 1,800 × g、5 min 遠心し、その上清の Glc を Somogyi-Nelson 法 (Somogyi 1952) により比色定量した。まず 0.7 mL の遠心上清を試験管に分取し、氷中で十分冷却した後、0.7 mL のアルカリ性銅試薬を加え、アルミホイルで蓋をしてから正確に 10 min 加熱した。それを氷水中で急冷し、室温まで戻した後、0.7 mL のヒ素モリブデン酸試薬を加えよく攪拌し、15 min 以上放置してから 500 nm における吸光度を測定した。ブランクには、amyloglucosidase 溶液と水を、サンプルと同様に加熱、遠心した上清を用いた。標準曲線は既知濃度の Glc 溶液をサンプルと同時に発色させて作成した。starch 量は Glc 量に 0.9 を乗じて算出した。

3.2.4 統計処理

対照区の平均値間の有意差検定は *t* 検定により、また青色光処理区の平均

値間の有意差検定は Tukey の HSD 検定により，いずれも有意水準 5% で行った．統計処理には統計解析ソフトウェア (JMP Ver. 6.0.0, 米国 SAS 社製) を用いた．

3.3 結果および考察

播種後 32 日目の個体乾物重および総葉面積を Fig. 21 に示す。対照区では、個体乾物重および総葉面積ともに、WL 区が WH 区よりも著しく小さかった。青色光処理区では、個体乾物重と総葉面積のいずれにおいても、B0 区がその他の 3 区に比較して著しく小さく、1/2 程度であった。B30 区、B100 区および B150 区の間では、個体乾物重と総葉面積ともに、B100 区でわずかに大きい傾向にあったものの、有意な差はなかった。播種後 32 日目の個体乾物重と総葉面積から求めた LAR は、対照区では WL 区において WH 区よりも有意に高かった (Fig. 22A)。しかし、青色光処理区では、LAR は処理区間に有意な差は認められなかった (Fig. 22B)。この結果は、ハウレンソウの弱光順化における葉面の拡大という応答に、青色光が関与していないことを示している。

対照区の個体あたりの還元態 N 集積量は WL 区の方が WH 区よりも有意に少なく (Fig. 23A)、個体あたりの硝酸態 N 集積量も WL 区の方が少ない傾向にあった (Fig. 23C)。青色光処理区では、個体あたりの還元態 N 集積量は B0 区が他の 3 区よりも有意に少なかった (Fig. 23B)。個体あたりの硝酸態 N 集積量は、B0 区、B150 区、B30 区、B100 区の順に少なかった (Fig. 23D)。このように、個体全体の N 集積量に対して、青色光強度、特に青色光成分の有無が影響を及ぼす傾向にあった。他方、個体全体の還元態 Nのうち葉に投資される還元態 N の割合は、対照区では WL 区の方が WH 区よりわずかに高かった (Fig. 24A)。しかし、青色光処理区では、葉に投資される還元態 N の割合は処理区間には有意な差は認められなかった (Fig. 24B)。このように、弱光順化における葉への N 投資の増加という応答に、青色光が関与することを示唆する傾向は観察されなかった。

Fig. 25 に、葉の乾物重あたりの TNC 量を示す。TNC は、Glc, Fru, Suc および starch の総量である。対照区と青色光処理を含む全ての処理区において、TNC の 80% 以上が starch 由来であった。対照区では、TNC 量は WL 区の方が WH 区よりも顕著に少なかった。他方、青色光処理区においては、TNC 量は B0 区で最も多く、青色光強度が 0 から $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と高くなるにしたがって減少する傾向にあった。B100 区と B150 区との間には有意な差は認められなかった。このように、葉の乾物重あたりの TNC 量においても、弱光植物と低青色光強度下で成育した植物との間に類似点は認められなかった。

以上のように、個体レベルの光順化応答として、LAR、葉身への N 投資および葉の TNC 量について調査したものの、いずれの項目においても弱光に順化した植物と低青色光強度下で成育した植物との間に類似性は認められなかった。このように、本研究で調べた範囲では、青色光が個体レベルの光順化応答に関与することを示すデータは得られなかった。

異なる青色光強度下において、ハウレンソウはどのような成長を営んでいたのだろうか。個体の乾物生産は、青色光を全く含まない照射光下において著しく抑制された (Fig. 21)。この結果は、赤色光単独照射下で成育したイネの乾物重が、赤色光に青色光を付加した照射光下よりも有意に低下する結果と同様の傾向である (第 2 章 Fig. 12)。イネの場合、赤色光単独照射下における乾物生産の減少は、おもに葉面積あたりの光合成速度の減少と、LAR の低下に起因していた。しかし、青色光成分を含まない照射光下におけるハウレンソウの個体乾物重の減少は、イネの場合と同様の原因で説明がつくものではなかった。白色光下で測定した、成育環境 PPFD ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下におけるハウレンソウ葉の純光合成速度は、イネ (Fig. 6) とは異なり、青色光処理区間に有意な差が認められなかった (B0 区: $6.88 \pm 0.459 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, B30

区: $6.79 \pm 0.256 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, B100 区: $7.41 \pm 0.258 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, B150 区: $7.60 \pm 0.350 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) . また, 処理最終日のみの測定値ではあるが, ホウレンソウの LAR にも青色光処理区間に差は認められなかった (Fig. 22) . 青色光成分を含まない照射光下においてホウレンソウの乾物生産が抑制される要因については, 現時点では不明である. 植物の成長は, 光合成によってどれだけ炭素を獲得したかという点だけでなく, 獲得した炭素をいかに効率よく成長に利用したかという点にも影響を受ける (Schulze et al. 1991, Stitt and Schulze 1994) ことから, 光合成産物の成長への利用効率の低下などが関係しているのかもしれない.

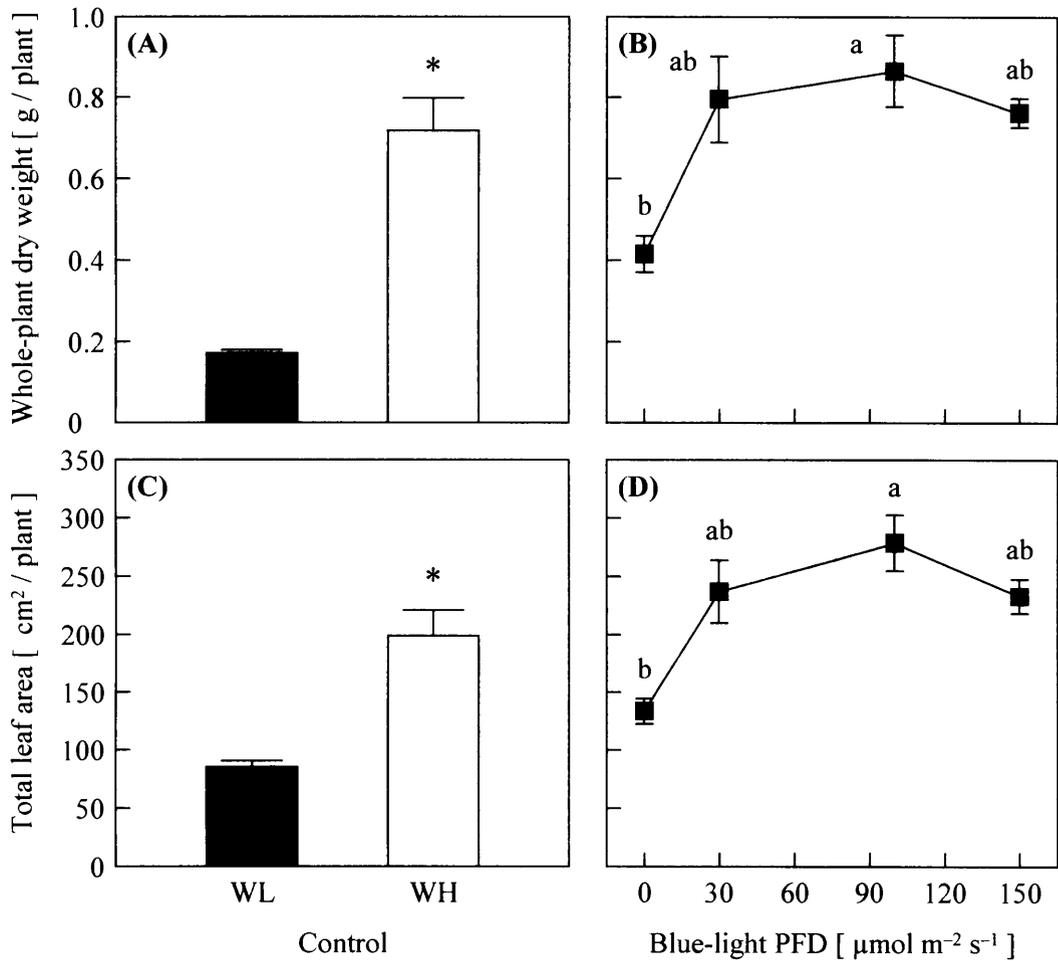


Fig. 21 Whole-plant dry weight (A, B) and total leaf area (C, D) of spinach plants grown under WL or WH (A, C) and under B0, B30, B100 or B150 (B, D) at final harvest (32 d after germination). Vertical bars represent standard errors of the means ($n = 3-4$). Means with an asterisk (*) and with different letters are significantly different by *t* test and by Tukey's HSD test, respectively ($P < 0.05$). For treatment codes, see Fig. 17.

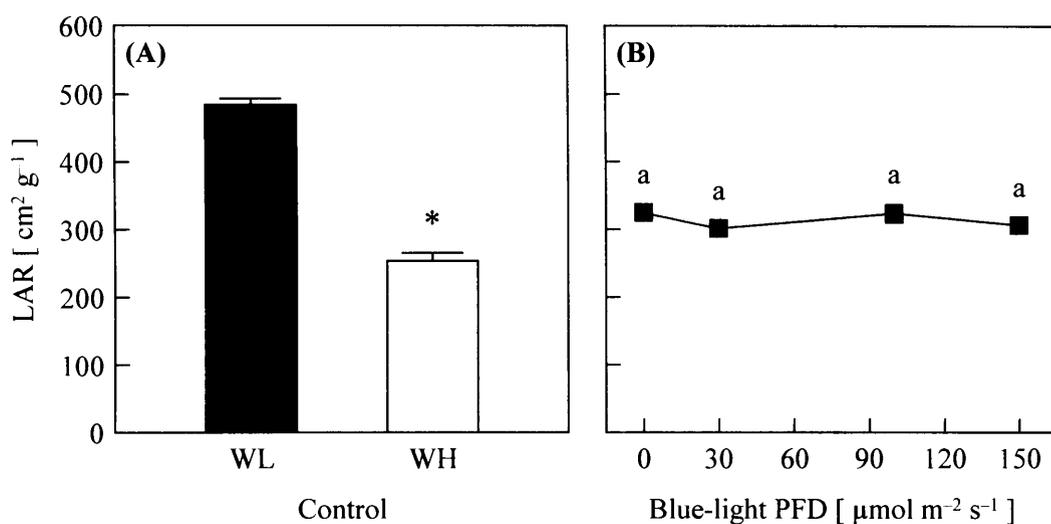


Fig. 22 Leaf area ratio (LAR) of spinach plants grown under WL or WH (A) and under B0, B30, B100 or B150 (B) at final harvest (32 d after germination). Vertical bars represent standard errors of the means ($n = 3-4$). Means with an asterisk (*) and with different letters are significantly different by t test and by Tukey's HSD test, respectively ($P < 0.05$). For treatment codes, see Fig. 17.

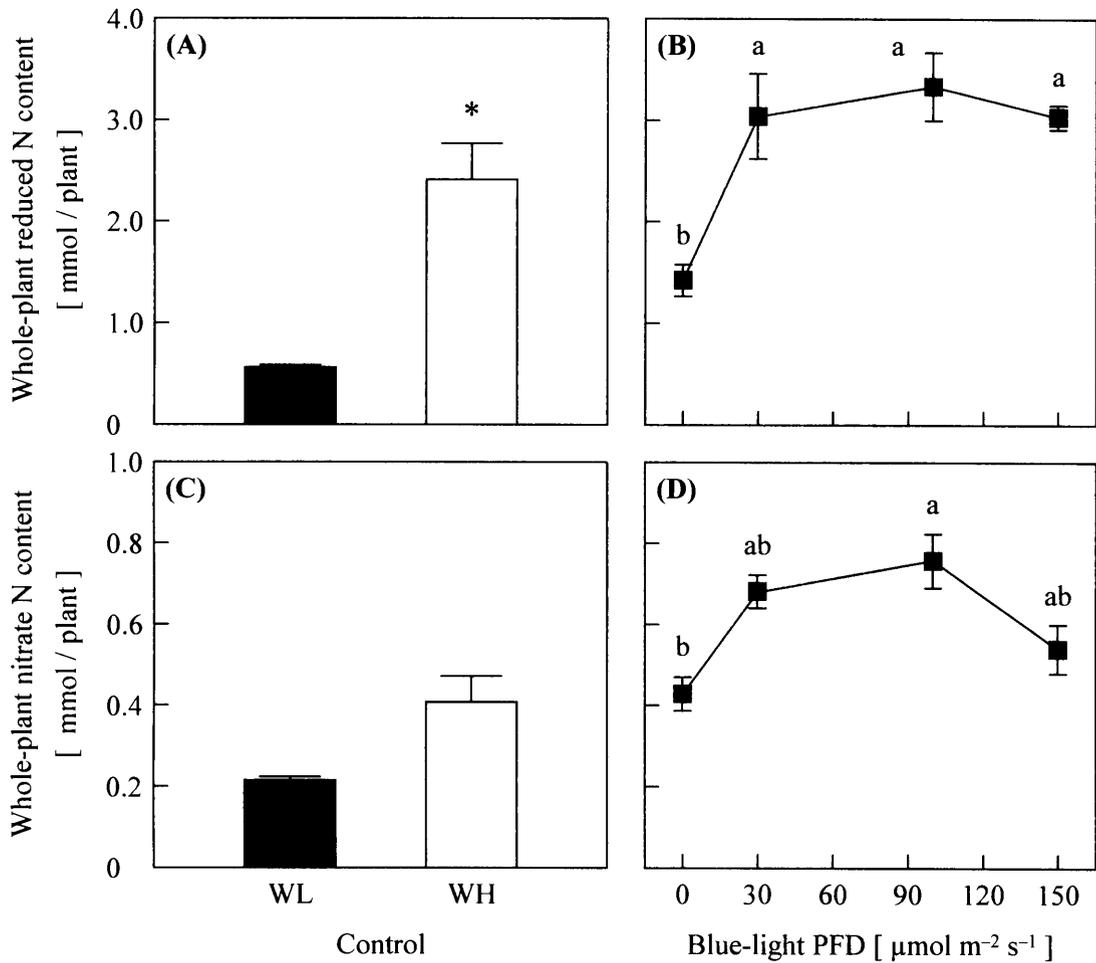


Fig. 23 Whole-plant reduced N (A, B) and nitrate N (C, D) contents of spinach plants grown under WL or WH (A, C) and under B0, B30, B100 or B150 (B, D) at final harvest (32 d after germination). Vertical bars represent standard errors of the means ($n = 3-4$). Means with an asterisk (*) and with different letters are significantly different by *t* test and by Tukey's HSD test, respectively ($P < 0.05$). For treatment codes, see Fig. 17.

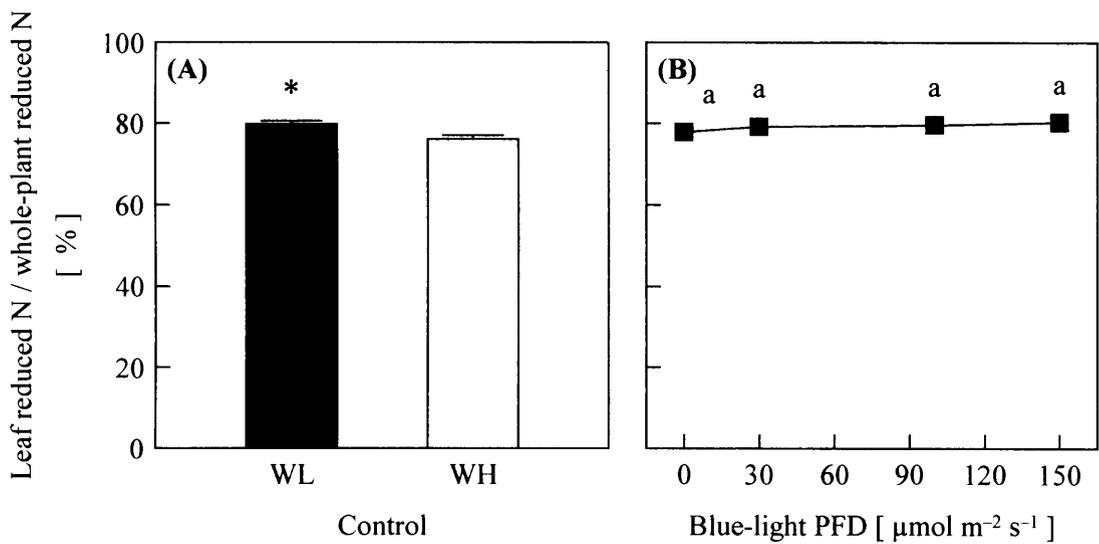


Fig. 24 The ratio of leaf reduced N content to whole-plant reduced N content of spinach plants grown under WL or WH (A) and under B0, B30, B100 or B150 (B) at final harvest (32 d after germination). Vertical bars represent standard errors of the means ($n = 3-4$). Means with an asterisk (*) and with different letters are significantly different by t test and by Tukey's HSD test, respectively ($P < 0.05$). For treatment codes, see Fig. 17.

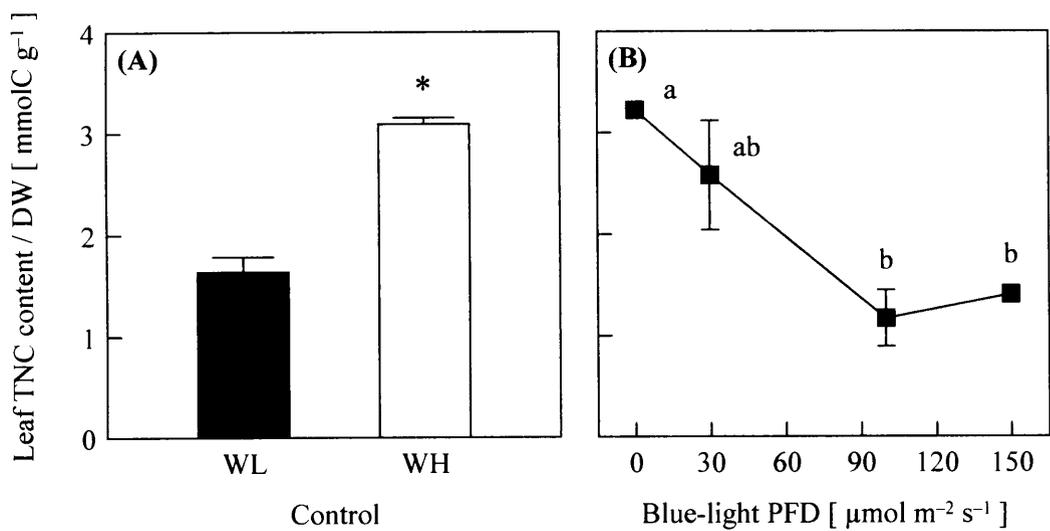


Fig. 25 Leaf total non-structural carbohydrate (TNC) content per unit leaf dry weight (DW) in spinach plants grown under WL or WH (A) and under B0, B30, B100 or B150 (B) at final harvest (32 d after germination). TNC is the sum of glucose, fructose, sucrose and starch. Vertical bars represent standard errors of the means ($n = 3-4$). Means with an asterisk (*) and with different letters are significantly different by t test and by Tukey's HSD test, respectively ($P < 0.05$). For treatment codes, see Fig. 17.

4. 結論

本章では、「青色光が、植物の光順化応答を誘導するシグナルとしての作用を有する」という仮説の検証を目的に、低青色光強度下で成育した植物の特徴と弱光に順化した植物の特徴との類似性を評価基準として、ハウレンソウの個葉レベル（第 2 節）および個体レベル（第 3 節）の光順化応答について調べた。

個葉レベルの光順化応答について調べた結果、低強度の青色光が、光順化における集光因子と電子伝達系因子間の N 分配の調節に関与する可能性が示唆された。光順化における葉の厚さの変化に対しては、青色光の関与は認められなかった。

個体レベルの光順化応答について調べた結果、光順化の際の葉面の展開、葉への N 投資、葉の炭水化物プールサイズの変化に対して、青色光が関わっていることを示すデータは得られなかった。

弱光下において、葉面積あたりの光合成速度の低下を補償し個体の光合成や乾物生産を高く維持することに対しては、集光に関わる因子への N 分配を増加させて光合成特性を改変するよりも、SLA や LAR を高めることで受光量を増やす方が、その寄与が著しく大きい (Makino et al. 1997b, Evans and Poorter 2001)。すなわち、集光因子と電子伝達系因子間の N 分配の変化は、成育環境の光強度に応じて光合成の効率を向上させる上で必ずしも重要な応答とはいえない。このことから、個葉から個体レベルまでの光順化応答を総合的に捉えた場合には、青色光が光順化に対して示す作用は大きくはないといえる。「青色光が光順化応答を誘導するシグナルとして働く」という仮説が、葉緑体タンパク質量の調節による葉緑体の性質の改変という、一部の光順化応答にのみ適用できるものであることを示した点において、本研究は意義あるものと考え

える.

第 4 章

結語

1. 本論文の総括

人工光利用型の植物生産施設では、栽培光の青色光強度は光源に依存する。長期的な青色光照射が植物の光合成や成長に及ぼす影響に関する知見は、そのような施設において、エネルギーを効率的に利用するための適切な光源や照明法の選択・開発に貢献し得るものである。

他方、屋外の自然環境下でも、青色光強度は季節や時刻によって変化する。また群落上部と下部との間でも青色光強度は著しく異なる。植物が時空間的に変動する光環境を認識し、その光環境に順応する上で、青色光強度などの波長組成の情報をどのように利用しているかについて知ることは植物生理学的に興味深い。

本論文は、光合成および乾物生産に対する青色光の作用に関する研究として、赤色光への低光強度の青色光の付加によるイネの乾物生産促進をもたらす要因の解析と、ハウレンソウの光順化応答における青色光の作用の検討を行ったものである。第 2 章では、赤色光への青色光の付加はイネの光合成特性や形態、個体の N 集積量などを変化させ、それらが個体の乾物生産促進に関わっていることを示した。この結果は、植物生産のための人工光源として赤色 LED に青色光光源を組み合わせる使用することの有効性に、生理学的観点からの根拠を与えるものとして価値あるものといえる。また第 3 章では、ハウレンソウにおいて、個体レベルの光順化応答には青色光は関与しないと考えられるものの、光順化の際の葉緑体タンパク質量の調節には比較的低強度の範囲の青色光が関わる可能性を示した。このように光順化において青色光が作用する応答や作用を有する光強度を既往の研究よりも限定して示したことは、光順化における青色光の作用を解明する上で意義深いものとする。以上のように本論文は、人工環境下における植物生産の効率向上および自然環境下における

植物の環境応答の理解の両者に寄与する，光合成や乾物生産の青色光応答に関する基礎的知見を提供した。

Fig. 26 に，長期的な青色光照射が光合成や乾物生産に関わる因子に及ぼす影響と因子間の関係に関する簡潔なモデルの模式図を示す。実線で囲まれた項目は本研究によって見出された青色光応答であり，破線で囲まれた項目は既往の研究によって観察された青色光応答である。星号を付した項目は本研究において特定の植物種または品種においてのみ観察された応答である。矢印は直接的に影響を及ぼすと推察される関係を示しており，矢印の向きが影響を受ける側を指す。この図からわかるように，青色光は光合成や乾物生産に関わる因子に直接的にも間接的にも影響を及ぼし，それらの相互作用が乾物生産への影響として表れるものと考えられる。この図で示した因果関係は，現時点では大部分が推測に基づいている。青色光が光合成や乾物生産に及ぼす影響を包括的に理解するためには，特に応答間の因果関係に焦点を当てて研究を進める必要がある。さらにそれらの青色光応答が自然条件下においてどのような生理的意義を有するのかについて，本研究で検討した光順化応答以外の観点からも検討する必要がある。また，人工照明を用いた効率的な植物生産のためには，観察された青色光応答に基づいて植物種・成育ステージごとに最適な照明法を策定するなどの，具体的な技術開発を目指した応用研究も求められる。

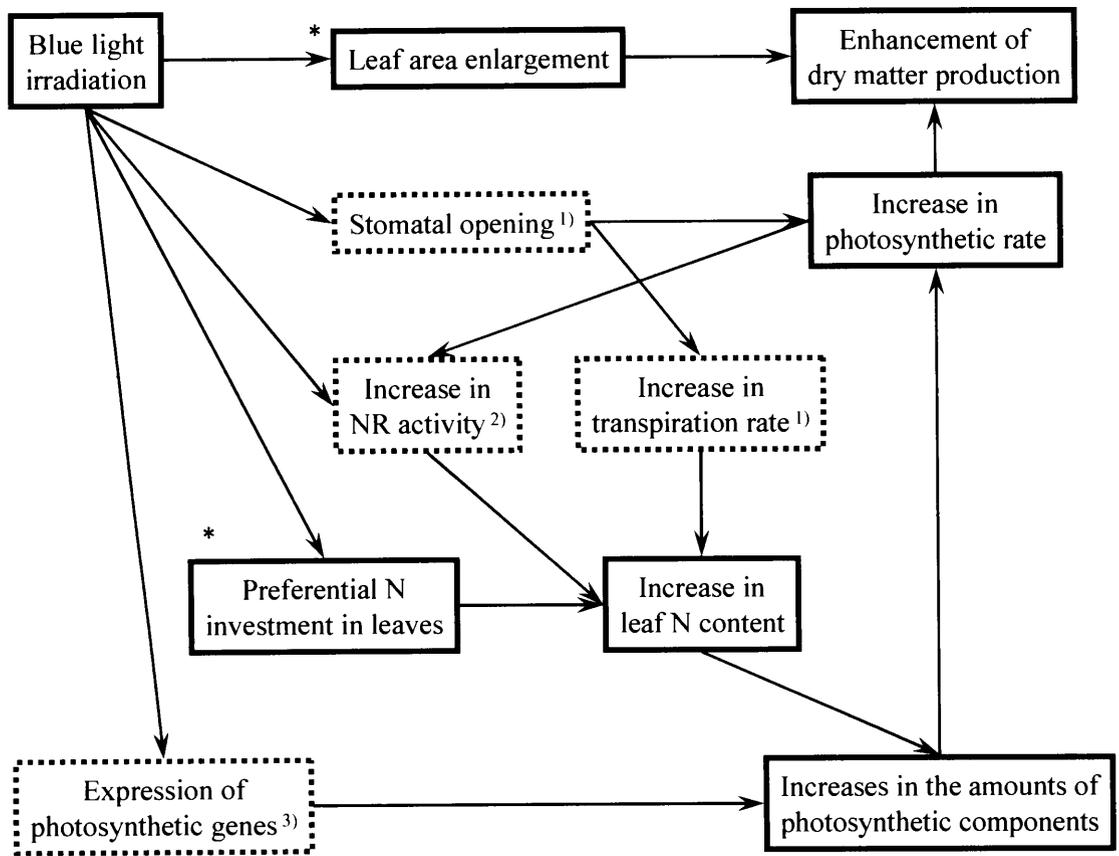


Fig. 26 A model of the actions of blue light on physiological and morphological factors directly or indirectly related to dry matter production of a whole plant. Factors in solid-lined boxes are phenomena found in the present study and those in broken-lined boxes are observations in published literatures. Arrows indicate expected direct effects. Factors with an asterisk (*) are responses observed in certain species or cultivars. 1) Sharkey and Raschke (1981), Karlsson (1986). 2) Sasakawa and Yamamoto (1979), Ohashi et al. (2006). 3) Sawbridge et al. (1994), Thum et al. (2001).

2. 今後の展開

イネおよびホウレンソウのいずれにおいても、赤色光に低強度の青色光を付加して長期的に照射することにより、赤色光のみの照射に比較して、白色光下で測定した光合成速度が増大することが明らかとなった。しかし、実際の成育環境下における光合成速度の測定は本研究では行わなかった。長期的な青色光照射による光合成能力の増加は実際の成育環境下における光合成速度にも反映されるものと推察されるが、この点は赤色光および赤青混合光照射下における光合成速度の実測によって実証する必要がある。

また、赤色光への青色光の付加により、イネおよびホウレンソウのいずれにおいても、個体あたりの N 集積量および葉の乾物重あたりの N 量が有意に増加した。このことは、低強度の青色光に植物の N 吸収あるいは還元を促進する作用のある可能性を示唆している。青色光による N 吸収や還元の促進をもたらす原因として、気孔開口の促進に伴う蒸散量の増加や、N 代謝に関わる NR などの活性増加などが考えられる。今後これらの点に着目して、青色光の生理的作用を追究する必要がある。蒸散量の増加による N 吸収の増加が起こっているか否かを調べるためには、成育環境の光質下における蒸散速度測定および ^{15}N 標識を用いた $^{15}\text{NH}_4^+$ 、 $^{15}\text{NO}_3^-$ 吸収速度測定を行う必要があると考えられる。他方、NR 活性の増加に関しては、すでに短期的な青色光照射が試験管レベルでの NR 活性に及ぼす影響などが調べられており、短期的には青色光が NR 活性を高めることが示されている (Ohashi et al. 2006)。今後は、このような短期的な NR 活性の増加が、長期的な青色光照射による N 還元の増加をもたらしているか否かについても検証する必要がある。

青色光応答の生理的意義に関して、光順化応答との関連を検討した結果、低強度の範囲の青色光が光順化の際の葉緑体タンパク質量の調節に関与する可

能性が示唆された。今後は、異なる青色光強度下で成育した葉から単離した葉緑体を用いて分析を行うことにより、葉緑体タンパク質量についてより詳細な比較が可能となるであろう。また、青色光が Cyt *f* および LHCII をコードする遺伝子の転写や翻訳等のプロセスに及ぼす影響について調べることで、光順化における青色光の作用の分子メカニズムの解明に近づくことができると考えられる。その他には、青色光と、青色光以外に光順化のメカニズムに関わっているとされる光合成電子伝達系の redox state や糖濃度などの因子が、光順化に関わるシグナルとしてどのように役割分担しているかなども興味深い研究課題である。

本研究では、赤青混合光中の青色光強度を調節することで青色光の作用を調べた。このような条件下において見出された青色光の作用と自然環境下における青色光の作用とは異なる可能性が考えられる。例えば、青色光が、紫外線、緑色光、遠赤色光などの他の波長成分と複合的に作用する可能性が挙げられる。今後は、太陽光を基準として任意の波長組成を作出することができる LED 擬似太陽光光源システム (Fujiwara and Sawada 2006) などを利用して、自然条件下における青色光の作用について検討することも重要であろう。

要約

第 1 章 緒論

青色光は、高等植物の光形態形成のみならず、乾物生産にも顕著な影響を及ぼす。しかし、異なる青色光強度下で成育した植物の乾物生産の差をもたらす要因は明確になっていない。人工光利用型の植物生産施設では、栽培光の青色光強度は光源に依存する。そのため、長期的な青色光照射が光合成などの乾物生産に関わる因子に及ぼす影響を明らかにすることは、限定されたエネルギー下における効率的な植物生産のための、適切な光源や照明法の選択・開発につながるものと考えられる。本論文ではまず、赤色光への低強度の青色光の付加が植物の乾物生産を促進するという現象に着目し、乾物生産促進に関わる要因を明らかにすることを目的とした。

自然光においても、青色光強度は季節や時刻によって異なり、また植物群落の上部と下部の間でも著しい差がある。植物は青色光強度を感知することで、時空間的に変動する周囲の光環境を認識し、その光環境に順応している可能性がある。そこで次に、「青色光が光強度への順化応答に関与する」という仮説を検証し、青色光応答の生理的意義の一端を解明することを試みた。

第 2 章 赤色光への青色光の付加がイネの乾物生産に及ぼす影響

植物工場や宇宙ステーションにおける作物栽培の光源として、赤色 LED の利用が検討されてきた。その中で、赤色 LED の照射光に若干の青色光（総 PPFD の 1-10% 程度）を付加すると、赤色 LED 単独照射に比べて個体乾物重が著しく増加することが見出された。短期的な青色光照射は気孔の開口を促進するが、長期的な青色光照射による乾物生産の促進は、気孔開口の促進に起因する光合成速度の増加のみで説明できるものではない。そこで、この乾物生

産の促進をもたらす要因を、個葉の光合成特性レベルと個体成長レベルにおいて調べた。供試植物にはイネを用いた。LED を栽培光源として、赤色光のみ (R 区) または赤青混合光 (RB 区, 赤色光と青色光の PFD 比は 4:1) を照射して約 1 ヶ月間水耕栽培した。

まず個葉の光合成特性を調べた。供試品種にササニシキを用いて、総 PPFD $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で育成した。最上位完全展開葉の光合成速度を白色光下で測定した。成育環境とほぼ同じ PPFD ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下の純光合成速度は RB 区の方が R 区より高かった。また飽和光 ($1,600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下の純光合成速度 (光合成能力) も RB 区において高かった。これらの RB 区における光合成速度の増加は、葉身の葉面積あたり N 量の増加に伴っていた。葉身に含まれる N の約 80% は葉緑体に局在し、その多くが光合成関連タンパク質などとして機能することが知られている。光合成関連タンパク質として、 CO_2 固定の鍵酵素である Rubisco, 光合成電子伝達の律速因子の 1 つである Cyt *f*, 集光反応を担う Chl および LHCII の量を調べたところ、それらはいずれも葉身 N 量の増加に伴って RB 区で増加していた。このような葉身 N 量の増加に伴う光合成関連タンパク質量の増加が、RB 区の弱光下および飽和光下における光合成速度の増加をもたらしたものと考えられる。また実際の成育環境の光質下における光合成速度も RB 区の方が高かったであろうと推察される。

個体の乾物生産は、個葉の光合成速度に加えて、個体レベルでどれだけ葉面を広く展開するかという点にも大きく影響を受ける。また、イネは光合成器官である葉身への N 投資率を変えることにより、成育環境下における個体の光合成効率を調節すると報告されている。そこで次に個体の成長解析と葉身への N 投資率を調べた。供試品種にササニシキと日本晴を用いて、総 PPFD $380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で育成した。播種後 56 日目の個体乾物重と総葉面積は、いずれの品種でも R 区に比べて RB 区で増加した。播種後 35 日目と 56 日目

の測定値を用いて成長解析を行ったところ、RGR は両品種ともにRB区で増加した。この RGR の増加は、日本晴では有意差はないものの、NAR の増加が寄与していた。また RB 区では全葉身で平均した葉面積あたり N 量が多く、最上位完全展開葉を含む上位 3 葉の葉位別の葉身 N 量、Rubisco 量、Chl 量は、いずれの葉位でも RB 区で増加していた。このことから、RB 区における葉身の光合成速度の増加は個体全体で起こったものと考えられる。ササニシキでは RB 区での LAR の増加も RGR の向上に寄与していたが、日本晴ではそのような応答は認められなかった。播種後 56 日目の個体あたりの N 集積量は両品種ともに RB 区の方が R 区より多く、そのうち葉身に投資される N の割合も RB 区の方が高かった。このような葉身への N 投資率の増加も乾物生産向上に貢献したものと見える。

以上より、赤色光に青色光を付加して長期間照射したイネでは、赤色光単独照射に比べて、葉身 N 量の増加に伴って個葉の光合成速度が増加することがわかった。また、青色光の付加による乾物生産促進には NAR の増加が大きく貢献していた。ササニシキでは葉面の拡大も乾物生産促進に寄与していた。個葉光合成と個体成長の結果を併せて考えると、青色光の付加による乾物生産促進の要因が NAR であったことから、個葉の光合成速度の増加が乾物生産促進に貢献したといえる。

第 3 章 ホウレンソウの光順化応答における青色光の作用

青色光照射下で成育した植物は、赤色光照射に比べて Chl *a/b* 比が高く、葉が厚いなど、強光に順化した植物で観察されるいくつかの特徴を示すことが知られている。このことから、青色光が強光や弱光に対する光順化応答を誘導するという仮説が提唱されている。ここで光順化応答とは、成育環境の光強度下において光エネルギーを効率よく光合成や成長に利用するために植物が示す応

答のことを指す。既往の研究では、植物が照射光に含まれる青色光の有無を感知するのか、あるいは青色光の強度を感知するのかは不明であった。そこで、低青色光強度下で成育した植物の特徴と弱光に順化した植物の特徴との類似性を評価基準として、光順化における青色光の作用を検討した。解析は、個葉レベルの応答と個体レベルの応答について行った。供試植物には予備実験で光順化応答が明瞭に観察されたハウレンソウ（品種：メガトン）を用いた。青色および赤色 LED を用いて、青色光/赤色光 PFD を 0/300, 30/270, 100/200, 150/150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした照射下で約 1 ヶ月間水耕栽培した。

まず個葉レベルの光順化応答を調べた。一般に弱光順化葉では、強光順化葉に比べて、飽和光下での光合成速度が低く葉面積あたり N 量が少ない。これはおもに葉が薄いことに起因する。光質処理したハウレンソウ葉では、成育時の青色光強度の低下に伴う光合成速度と葉面積あたり N 量の減少が認められた。しかし、葉の厚さの指標である葉面積あたり乾物重には青色光強度の影響はほとんど認められなかった。また一般に弱光順化葉では、相対的に集光反応に関わる因子への N 分配の割合が高く、光合成電子伝達に関わる因子への N 分配の割合が低いことも認められる。そこで光質処理区間で、集光因子と電子伝達系因子間の N 分配の指標として Cyt *f*/LHCII 比を比較した。Cyt *f*/LHCII 比は青色光強度が 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ より低くなるにつれて次第に低下し、弱光順化葉の Cyt *f*/LHCII 比に近づく傾向が認められた。

次に個体レベルの光順化応答を調べた。一般に弱光植物においては、強光植物に比べて、LAR の増加、葉への N 投資率の増加、葉の炭水化物プールサイズの減少といった特徴が観察される。しかし、LAR と葉への N 投資率は成育時の青色光強度に影響を受けなかった。さらに、葉の乾物重あたり非体構成炭水化物量は、青色光強度の低下とともに増加する傾向にあった。このように、個体レベルの光順化応答においては、低青色光強度下で成育した植物と

弱光植物との間に類似性は認められなかった。

以上より、ハウレンソウにおいて、低強度の青色光が光順化の際の集光因子と電子伝達系因子間の N 分配の調節に関与する可能性が示唆された。他方、葉の厚さや個体レベルの性質の光順化に関しては、本研究で調べた限り、青色光の関与を示すデータは得られなかった。

第 4 章 結語

赤色光への低強度の青色光の付加が光合成特性や形態、個体の N 集積量などを変化させ、それらが個体の乾物生産促進に関わっていることをイネを用いて実験的に示し、植物生産のための人工光源として赤色 LED に青色光光源を組み合わせることの有効性に生理学的な根拠を与えた。またハウレンソウにおいて、低強度の範囲の青色光が光順化の際の葉緑体タンパク質量の調節に関わっている可能性を指摘し、光順化における青色光の作用の全容解明に資する知見を提供した。

以上のように、本論文により、人工環境下における植物生産の効率向上および自然環境下における植物の環境応答の理解の両者に寄与する、光合成および乾物生産の青色光応答に関する基礎的知見が得られた。

引用文献

- Anderson, J.M.** (1986) Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annual Review of Plant Physiology* **37**: 93–136.
- Anderson, J.M., Chow, W.S. and Park, Y.I.** (1995) The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynthesis Research* **46**: 129–139.
- Arnon, D.I.** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* **24**: 1–15.
- Bendall, D.S., Davenport, H.E. and Hill, R.** (1971) Cytochrome components in chloroplasts of the higher plants. *Methods in Enzymology* **23**: 327–344.
- Björkman, O.** (1981) Responses to different quantum flux densities. In *Physiological Plant Ecology I. Responses to the Physical Environment*. Edited by Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. and Ziegler, H. pp. 57–107. Springer-Verlag, Berlin.
- Boardman, N.K.** (1977) Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Review of Plant Physiology* **28**: 355–377.
- Briggs, W.R. and Huala, E.** (1999) Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**: 33–62.
- Britz, S.J. and Sager, J.C.** (1990) Photomorphogenesis and photoassimilation in soybean and sorghum grown under broad spectrum or blue-deficient light sources. *Plant Physiology* **94**: 448–454.
- Brown, C.S., Schuerger, A.C. and Sager, J.C.** (1995) Growth and photomorphogenesis of pepper plants under red light-emitting diodes with supplemental blue or far-red lighting. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **120**: 808–813.

- Bukhov, N.G., Drozdova, I.S. and Bonder, V.V.** (1995) Light response curves of photosynthesis in leaves of sun-type and shade-type plants grown in blue or red light. *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology* **30**: 39–41.
- Bula, R.W., Morrow, R.C., Tibbets, T.W., Barta, D.J., Ignatius, R.W. and Martin, T.S.** (1991) Light-emitting diodes as a radiation source for plants. *HortScience* **26**: 203–205.
- Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E. and Youngs, V.** (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **6**: 71–80.
- Christie, J.M. and Briggs, W.R.** (2001) Blue light sensing in higher plants. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 11457–11460.
- Crookston, R.K., Treharne, K.J., Ludford, P. and Ozbun, J.L.** (1975) Response of beans to shading. *Crop Science* **15**: 412–416.
- De la Torre, W.R. and Burkey, K.O.** (1990a) Acclimation of barley to changes in light intensity: chlorophyll organization. *Photosynthesis Research* **24**: 117–125.
- De la Torre, W.R. and Burkey, K.O.** (1990b) Acclimation of barley to changes in light intensity: photosynthetic electron transport activity and components. *Photosynthesis Research* **24**: 127–136.
- Dougher, T.A.O. and Bugbee, B.** (2001) Differences in the response of wheat, soybean and lettuce to reduced blue radiation. *Photochemistry and Photobiology* **73**: 199–207.
- Eskins, K., Westhoff, P. and Beremand, P.D.** (1989) Light quality and irradiance level interaction in the control of expression of light-harvesting complex of photosystem II. Pigments, pigment-proteins, and mRNA accumulation. *Plant Physiology* **91**: 163–169.

- Eskins, K., Jiang, C.Z. and Shibles, R.** (1991) Light-quality and irradiance effects on pigments, light-harvesting proteins and Rubisco activity in a chlorophyll- and light-harvesting-deficient soybean mutant. *Physiologia Plantarum* **83**: 47–53.
- Evans, J.R.** (1983) Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology* **72**: 297–302.
- Evans, J.R.** (1986) The relationship between carbon-dioxide-limited photosynthetic rate and ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase content in two nuclear-cytoplasm substitution lines of wheat, and the coordination of ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylation and electron-transport capacity. *Planta* **167**: 351–358.
- Evans, J.R.** (1987) The relationship between electron transport components and photosynthetic capacity in pea leaves grown at different irradiances. *Australian Journal of Plant Physiology* **14**: 157–170.
- Evans, J.R.** (1988) Acclimation by the thylakoid membranes to growth irradiance and the partitioning of nitrogen between soluble and thylakoid proteins. *Australian Journal of Plant Physiology* **15**: 93–106.
- Evans, J.R.** (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plant. *Oecologia* **78**: 9–19.
- Evans, J.R.** (1996) Developmental constraints on photosynthesis: Effects of light and nutrition. In *Advances in Photosynthesis vol. 5: Photosynthesis and the Environment*. Edited by Baker, N.R. pp. 281–304. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Evans, J.R. and Poorter, H.** (2001) Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant, Cell and Environment* **24**: 755–767.
- Evans, J.R. and Seemann, J.R.** (1989) The allocation of protein nitrogen in the pho-

tosynthetic apparatus: Costs, consequences, and control. In *Plant Biology Vol. 8: Photosynthesis*. Edited by Briggs, W.R. pp. 183–205. Alan R. Liss, Inc., New York.

Evans, J.R. and Terashima, I. (1987) Effects of nitrogen nutrition on electron transport components and photosynthesis in spinach. *Australian Journal of Plant Physiology* **14**: 59–68.

Farquhar, G.D. and von Caemmerer, S. (1982) Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. In *Physiological Plant Ecology II: Water Relations and Carbon Assimilation*. Edited by Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. and Ziegler, H. pp. 549–587. Springer-Verlag, Berlin.

Farquhar, G.D., von Caemmerer, S. and Berry, J.A. (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* **149**: 78–90.

Fujiwara, K. and Sawada, T. (2006) Design and development of an LED-artificial sunlight source system prototype capable of controlling relative spectral power distribution. *Journal of Light and Visual Environment* **30**: 170–176.

Gabrielsen, E.K. (1948) Effects of different chlorophyll concentrations on photosynthesis in foliage leaves. *Physiologia Plantarum* **1**: 5–37.

Gardner, G. and Graceffo, M.A. (1982) The use of a computerized spectroradiometer to predict phytochrome photo-equilibria under polychromatic irradiation. *Photochemistry and Photobiology* **36**: 349–354.

Gautier, H., Varlet-Grancher, C. and Baudry, N. (1997) Effects of blue light on the vertical colonization of space by white clover and their consequences for dry matter distribution. *Annals of Botany* **80**: 665–671.

Gray, G.R., Chauvin, L.-P. Sarhan, F. and Huner, N.P.H. (1997) Cold acclimation and freezing tolerance. A complex interaction of light and temperature. *Plant*

Physiology **114**: 467–474.

Goins, G.D., Yorio, N.C., Sanwo, M.M. and Brown, C.S. (1997) Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under red light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental blue lighting. *Journal of Experimental Botany* **48**: 1407–1413.

Hanyu, H. and Shoji, K. (2000a) Effects of blue light and red light on kidney bean plants grown under combined radiation from narrow-band light sources. *Environment Control in Biology* **38**: 13–24.

Hanyu, H. and Shoji, K. (2000b) Combined effects of blue light and supplemental far-red light and effects of increasing red light with constant far-red light on growth of kidney bean mixtures of narrow-band light sources. (Japanese text with English abstract and captions) *Environment Control in Biology* **38**: 25–32.

Hanyu, H., Shoji, K. and Ji, S.-B. (1996) Evaluation of light quality variation through supplement of far-red light and the difference in the effects on growth of a pole-type and a bush-type kidney bean. (Japanese text with English abstract and captions) *Environment Control in Biology* **34**: 267–275.

Hidema, J., Makino, A., Mae, T. and Ojima, K. (1991) Photosynthetic characteristics of rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. *Plant Physiology* **97**: 1287–1293.

Hidema, J., Makino, A., Kurita, Y., Mae, T. and Ojima, K. (1992) Changes in the leaves of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll *a/b* protein of PS II in rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. *Plant and Cell Physiology* **33**: 1209–1214.

Hikosaka, K. (2005) Nitrogen partitioning in the photosynthetic apparatus of *Plantago asiatica* leaves grown under different temperature and light conditions:

similarities and differences between temperature and light acclimation. *Plant and Cell Physiology* **46**: 1283–1290.

Hikosaka, K. and Terashima, I. (1995) A model of the acclimation of photosynthesis in the leaves of C₃ plants to sun and shade with respect to nitrogen use. *Plant, Cell and Environment* **18**: 605–618.

Hikosaka, K. and Terashima, I. (1996) Nitrogen partitioning among photosynthetic components and its consequence in sun and shade plants. *Functional Ecology* **10**: 335–343.

Hirose, T. and Werger, J.A. (1987) Nitrogen use efficiency in instantaneous and daily photosynthesis of leaves in the canopy of a *Solidago altissima* stand. *Physiologia Plantarum* **70**: 215–222.

Huner, N.P.H., Öquist, G. and Sarhan, F. (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science* **3**: 224–230.

Imaizumi, T., Tran, H.G., Swartz, T.E., Briggs, W.R. and Kay, S.A. (2003) FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **426**: 302–306.

Inada, K. (1976) Action spectra for photosynthesis in higher plants. *Plant and Cell Physiology* **17**: 355–365.

Inada, K. and Nishiyama, F. (1987) Growth responses of sun and shade plants in simulated vegetation shade and neutral shade. *Japanese Journal of Crop Science* **56**: 99–108.

Ishida, H., Nishimori, Y., Sugisawa, M., Makino, A. and Mae, T. (1997) The large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16-kDa polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. *Plant and Cell Physiology* **38**: 471–479.

- Jansson, S.** (1994) The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1184**: 1–19.
- Kasahara, M., Kagawa, T., Oikawa, K., Suetsugu, N., Miyao, M. and Wada, M.** (2002) Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* **420**: 829–832.
- Karlsson, P.E.** (1986) Blue light regulation of stomata in wheat seedlings. I. Influence of red background illumination and initial conductance level. *Physiologia Plantarum* **66**: 202–206.
- Labate, C.A. and Leegood, R.C.** (1988) Limitation of photosynthesis by changes in temperature. Factors affecting the response of carbon-dioxide assimilation to temperature in barley leaves. *Planta* **173**: 519–527.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lawlor, D.W.** (1995) Photosynthesis, productivity and environment. *Journal of Experimental Botany* **46**: 1449–1461.
- Leong, T.-Y. and Anderson, J.M.** (1984a) Effect of light quality on the composition and function of thylakoid membranes in *Atriplex triangularis*. *Biochimica et Biophysica Acta* **766**: 533–541.
- Leong, T.-Y. and Anderson, J.M.** (1984b) Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. I. Study on the distribution of chlorophyll-protein complexes. *Photosynthesis Research* **5**: 105–115.
- Leong, T.-Y. and Anderson, J.M.** (1984c) Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. II. Regulation of electron transport capacities, electron carriers, coupling factor (CF₁) activity and rates of photosynthesis. *Photosynthesis Research* **5**: 117–128.

- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C. and Rahmsdorf, U.** (1980) The importance of blue light for the development of sun-type chloroplast. In *The Blue Light Syndrome*. Edited by Senger, H. pp. 485–494. Springer-Verlag, Berlin.
- Lin, C.** (2000) Plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* **5**: 337–342.
- Liscum, E., Hodgson, D.W. and Campbell, T.J.** (2003) Blue light signaling through the cryptochromes and phototropins. So that's what the blues is all about. *Plant Physiology* **133**: 1429–1436.
- Loreto, F., Harley, P.C., Di Marco, G. and Sharkey, T.D.** (1992) Estimation of mesophyll conductance to CO₂ flux by three different methods. *Plant Physiology* **98**: 1437–1443.
- López-Juez, E. and Hughes, M.J.G.** (1995) Effect of blue light and red light on the control of chloroplast acclimation of light-grown pea leaves to increased fluence rates. *Photochemistry and Photobiology* **61**: 106–111.
- Mae, T. and Ohira, K.** (1981) The remobilization of nitrogen related to leaf growth and senescence in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology* **22**: 1067–1074.
- Makino, A.** (2003) Rubisco and nitrogen relationships in rice: Leaf photosynthesis and plant growth. *Soil Science and Plant Nutrition* **49**: 319–327.
- Makino, A. and Osmond, B.** (1991a) Solubilization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from the membrane fraction of pea leaves. *Photosynthesis Research* **29**: 79–85.
- Makino, A. and Osmond, B.** (1991b) Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. *Plant Physiology* **96**: 355–362.
- Makino, A., Mae, T. and Ohira, K.** (1983a) Purification and storage of ribulose-1,5-

- bisphosphate carboxylase from rice leaves. *Plant and Cell Physiology* **24**: 1169–1173.
- Makino, A., Mae, T. and Ohira, K.** (1983b) Photosynthesis and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves. Changes in photosynthesis and enzymes involved in carbon assimilation from leaf development through senescence. *Plant Physiology* **73**: 1002–1007.
- Makino, A., Mae, T. and Ohira, K.** (1984) Relation between nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves from emergence through senescence. *Plant and Cell Physiology* **25**: 429–437.
- Makino, A., Mae, T. and Ohira, K.** (1986) Colorimetric measurement of protein stained with coomassie brilliant blue R on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis by eluting with formamide. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**: 1911–1912.
- Makino, A., Mae, T. and Ohira, K.** (1988) Differences between wheat and rice in the enzymic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the relationship to photosynthetic gas exchange. *Planta* **174**: 30–38.
- Makino, A., Nakano, H. and Mae, T.** (1994) Responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, cytochrome *f*, and sucrose synthesis enzymes in rice leaves to leaf nitrogen and their relationships to photosynthesis. *Plant Physiology* **105**: 173–179.
- Makino, A., Harada, M., Sato, T., Nakano, H. and Mae, T.** (1997a) Growth and N allocation in rice plants under CO₂ enrichment. *Plant Physiology* **115**: 199–203.
- Makino, A., Sato, T., Nakano, H. and Mae, T.** (1997b) Leaf photosynthesis, plant growth and nitrogen allocation in rice under different irradiances. *Planta* **203**: 390–398.

- Makino, A., Shimada, T., Takumi, S., Kaneko, K., Matsuoka, M., Shimamoto, K., Nakano, H., Miyao-Tokutomi, M, Mae, T. and Yamamoto, N.** (1997c) Does decrease in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by antisense *rbcS* lead to a high N-use efficiency of photosynthesis under conditions of saturating CO₂ and light in rice plants? *Plant Physiology* **114**: 483–491.
- Matsuda, R., Ohashi-Kaneko, K., Fujiwara, K., Goto, E. and Kurata, K.** (2004) Photosynthetic characteristics of rice leaves grown under red light with or without supplemental blue light. *Plant and Cell Physiology* **45**: 1870–1874.
- McCree, K.J.** (1972) The action spectrum, absorbance and quantum yield of photosynthesis in crop species. *Agricultural Meteorology* **9**: 191–216.
- Miyake, C., Horiguchi, S., Makino, A., Shinzaki, Y., Yamamoto, H. and Tomizawa, K.-I.** (2005) Effects of light intensity on cyclic electron flow around PSI and its relationship to non-photochemical quenching of Chl fluorescence in tobacco leaves. *Plant and Cell Physiology* **46**: 1819–1830.
- Murchie, E.H. and Horton, P.** (1998) Contrasting patterns of photosynthetic acclimation to the light environment are dependent on the differential expression of the responses to altered irradiance and spectral quality. *Plant, Cell and Environment* **21**: 139–148.
- Murchie, E.H., Sarrobert, C., Contard, P., Betsche, T., Foyer, C.H. and Galtier, N.** (1999) Overexpression of sucrose-phosphate synthase in tomato plants grown with CO₂ enrichment leads to decreased foliar carbohydrate accumulation relative to untransformed controls. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 251–260.
- Nakano, H., Makino, A. and Mae, T.** (1995) Effects of panicle removal on the photosynthetic characteristics of the flag leaf of rice plants during the ripening stage. *Plant and Cell Physiology* **36**: 653–659.

- Nakano, H., Makino, A. and Mae, T.** (1997) The effect of elevated partial pressures of CO₂ on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant Physiology* **115**: 191–198.
- Niinemets, Ü.** (1997) Role of foliar nitrogen in light harvesting and shade tolerance of four temperate deciduous woody species. *Functional Ecology* **11**: 518–531.
- Noguchi, K., Sonoike, K. and Terashima, I.** (1996) Acclimation of respiratory properties of leaves of *Spinacia oleracea* L., a sun species, and of *Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don., a shade species, to changes in growth irradiance. *Plant and Cell Physiology* **37**: 377–384.
- Ohashi, K., Makino, A. and Mae, T.** (1998) Gas exchange characteristics in rice leaves grown under the conditions of physiologically low temperature and irradiance. *Plant and Cell Physiology* **39**: 1384–1387.
- Ohashi, K., Makino, A. and Mae, T.** (2000) Growth and carbon utilization in rice plants under conditions of physiologically low temperature and irradiance. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**: 99–107.
- Ohashi, K.K., Goji, K., Matsuda, R., Fujiwara, K. and Kurata, K.** (2006) Effects of blue light supplementation to red light on nitrate reductase activity in leaves of rice seedlings. *Acta Horticulturae* **711**: 351–355.
- Ohashi-Kaneko, K., Matsuda, R., Goto, E., Fujiwara, K. and Kurata, K.** (2006) Growth of rice plants under red light with or without supplemental blue light. *Soil Science and Plant Nutrition* **52**: 444–452.
- Ono, K., Nishi, Y., Watanabe, A. and Terashima, I.** (2001) Possible mechanisms of adaptive leaf senescence. *Plant Biology* **3**: 234–243.
- Peterson, A.G. and Neofotis, P.G.** (2004) A hierarchical analysis of the interactive effects of elevated CO₂ and water availability on the nitrogen transpiration pro-

- ductivities of velvet mesquite seedlings. *Oecologia* **141**: 629–640.
- Poorter, H. and Nagel, O.** (2000) The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**: 595–607.
- Poorter, H., Pepin, S., Rijkers, T., de Jong, Y., Evans, J.R. and Körner, C.** (2006) Construction costs, chemical composition and payback time of high- and low-irradiance leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**: 355–371.
- Price, G.D., von Caemmerer, S., Evans, J.R., Siebke, K., Anderson, J.M. and Badger, M.R.** (1998) Photosynthesis is strongly reduced by antisense suppression of chloroplastic cytochrome *bf* complex in transgenic tobacco. *Australian Journal of Plant Physiology* **25**: 445–452.
- Radford, P.J.** (1967) Growth analysis formulae – their use and abuse. *Crop Science* **7**: 171–175.
- Sæbø, A., Krekling, T. and Appelgen, M.** (1995) Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **41**: 177–185.
- Sage, R.F.** (1990) A model describing the regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, electron transport, and triose phosphate use in response to light intensity and CO₂ in C₃ plants. *Plant Physiology* **94**: 1728–1734.
- Sager, J.C., Smith, W.O., Edwards, J.L. and Cyr, K.L.** (1988) Photosynthetic efficiency and phytochrome photoequilibria determination using spectral data. *Transactions of the ASAE* **31**: 1882–1889.
- Sasakawa, H. and Yamamoto, Y.** (1979) Effects of red, far red, and blue light on enhancement of nitrate reductase activity and on nitrate uptake in etiolated rice seedlings. *Plant Physiology* **63**: 1098–1101.

- Sato, K. and Kim, J.M.** (1980) Relationships between environmental conditions and production and consumption activities of individual leaves in the population of rice plant in a paddy field. I. Changes in photosynthesis and dark respiration of individual leaves under field conditions. *Japanese Journal of Crop Science* (Japanese text with English abstract and captions) **49**: 243–250.
- Sawbridge, T.I., López-Juez, E., Knight, M.R. and Jenkins, G.I.** (1994) A blue-light photoreceptor mediates the fluence-rate-dependent expression of genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in light-grown *Phaseolus vulgaris* primary leaves. *Planta* **192**: 1–8.
- Schuerger, A.C. and Brown, C.S.** (1994) Spectral quality may be used to alter plant disease development in CELSS. *Advances in Space Research* **14**: 395–398.
- Schuerger, A.C., Brown, C.S. and Stryjewski, E.C.** (1997) Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) grown under red light-emitting diodes supplemented with blue or far-red light. *Annals of Botany* **79**: 273–282.
- Schulze, W., Stitt, M., Schulze, E.-D., Neuhaus, H.E. and Fichtner, K.** (1991) A quantification of the significance of assimilatory starch for growth of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Plant Physiology* **95**: 890–895.
- Seemann, J.R., Sharkey, T.D., Wang, J.L. and Osmond, C.B.** (1987) Environmental effects on photosynthesis, nitrogen-use efficiency, and metabolite pools in leaves of sun and shade plants. *Plant Physiology* **84**: 796–802.
- Senger, H. and Bauer, B.** (1987) The influence of light quality on adaptation and function of the photosynthetic apparatus. *Photochemistry and Photobiology* **45**: 939–946.
- Sharkey, T.D.** (1985a) Photosynthesis in intact leaves of C₃ plants: Physics, physiology and rate limitations. *Botanical Review* **51**: 53–105.

- Sharkey, T.D.** (1985b) O₂-insensitive photosynthesis in C₃ plants. Its occurrence and a possible explanation. *Plant Physiology* **78**: 71–75.
- Sharkey, T.D. and Raschke, K.** (1981) Effect of light quality on stomatal opening in leaves of *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiology* **68**: 1170–1174.
- Sharkey, T.D., Seemann, J.R. and Berry, J.A.** (1986) Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to changing partial pressure of O₂ and light in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* **81**: 788–791.
- Sims, D.A. and Pearcy, R.W.** (1989) Photosynthetic characteristics of a tropical forest understory herb, *Alocasia macrorrhiza*, and a related crop species, *Colocasia esculenta* grown in contrasting light environments. *Oecologia* **79**: 53–59.
- Sims, D.A. and Pearcy, R.W.** (1994) Scaling sun and shade photosynthetic acclimation of *Alocasia macrorrhiza* to whole-plant performance – I. Carbon balance and allocation at different daily photon flux densities. *Plant, Cell and Environment* **17**: 881–887.
- Smith, H.** (1982) Light quality, photoperception, and plant strategy. *Annual Review of Plant Physiology* **33**: 481–518.
- Socias, F.X., Medrano, H. and Sharkey, T.D.** (1993) Feedback limitation of photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* L. grown in elevated CO₂. *Plant, Cell and Environment* **16**: 81–86.
- Somogyi, M.** (1952) Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* **195**: 19–23.
- Stitt, M. and Schulze, D.** (1994) Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth? An exercise in molecular ecophysiology. *Plant, Cell and Environment* **17**: 465–487.
- Sudo, E., Makino, A. and Mae, T.** (2003) Differences between rice and wheat in

- ribulose-1,5-bisphosphate regeneration capacity per unit of leaf-N content. *Plant, Cell and Environment* **26**: 255–263.
- Takemiya, A., Inoue, S.-I., Doi, M., Kinoshita, T. and Shimazaki, K.-I.** (2005) Phototropin promote plant growth in response to blue light in low light environments. *The Plant Cell* **17**: 1120–1127.
- Terashima, I. and Evans, J.R.** (1988) Effects of light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in spinach. *Plant and Cell Physiology* **29**: 143–155.
- Terashima, I. and Hikosaka, K.** (1995) Comparative ecophysiology of leaf and canopy photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* **18**: 1111–1128.
- Terashima, I., Araya, T., Miyazawa, S.-I., Sone, K. and Yano, S.** (2005) Construction and maintenance of the optimal photosynthetic systems of the leaf, herbaceous plant and tree: an eco-developmental treatise. *Annals of Botany* **95**: 507–519.
- Thum, K.E., Kim, M., Christopher, D.A. and Mullet, J.E.** (2001) Cryptochrome 1, cryptochrome 2, and phytochrome A co-activate the chloroplast *psbD* blue light-responsive promoter. *The Plant Cell* **13**: 2747–2760.
- Tibbitts, T.W., Morgan, D.C. and Warrington, I.J.** (1983) Growth of lettuce, spinach, mustard, and wheat plants under 4 combinations of high-pressure sodium, metal halide, and tungsten halogen lamps at equal PPFD. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **108**: 622–630.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **76**: 4350–4354.

- von Caemmerer, S.** (2000) Biochemical Models of Leaf Photosynthesis. p. 165. CSIRO Publishing, Collingwood.
- von Caemmerer, S. and Evans, J.R.** (1991) Determination of the average partial pressure of CO₂ in chloroplasts from leaves of several C₃ plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **18**: 287–305.
- von Caemmerer, S. and Farquhar, G.D.** (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**: 376–387.
- von Caemmerer, S. and Farquhar, G.D.** (1984) Effects of partial defoliation, changes of irradiance during growth, short-term water stress and growth at enhanced p(CO₂) on the photosynthetic capacity of leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **160**: 320–329.
- von Caemmerer, S. and Quick, W.P.** (2000) Rubisco: Physiology in vivo. In *Advances in Photosynthesis vol. 9: Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Edited by Leegood, R.C., Sharkey, T.D. and von Caemmerer, S. pp. 85–113. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Walters, M.B. and Field, C.B.** (1987) Photosynthetic light acclimation in two rain-forest *Piper* species with different ecological amplitudes. *Oecologia* **72**: 449–456.
- Walters, M.B., Kruger, E.L. and Reich, P.B.** (1993) Growth, biomass distribution and CO₂ exchange of northern hardwood seedlings in low and high light: Relationships with successional status and shade tolerance. *Oecologia* **94**: 7–16.
- Weston, E., Thorogood, K., Vinti, G. and López-Juez, E.** (2000) Light quantity controls leaf-cell and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* wild type and blue-light-perception mutants. *Planta* **211**: 807–815.

- Yano, S. and Terashima, I.** (2001) Separate localization of light signal perception for sun and shade type chloroplast and palisade tissue differentiation in *Chenopodium album*. *Plant and Cell Physiology* **42**: 1303–1310.
- Yorio, N.C., Goins, G.D., Kagie, H.R., Wheeler, R.M. and Sager, J.C.** (2001) Improving spinach, radish, and lettuce growth under red light-emitting diodes (LEDs) with blue light supplementation. *HortScience* **36**: 380–383.
- Zeiger, E., Field, C. and Mooney, H.A.** (1981) Stomatal opening at dawn: possible roles of the blue light response in nature. In *Plants and the Daylight Spectrum*. Edited by Smith, H. pp. 391–408. Academic Press, London.

参考図書

植物の環境応答 生存戦略とその分子機構. 細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 11. p. 211. 渡邊昭・篠崎一雄・寺島一郎監修, 秀潤社.

植物の光センシング 光情報の受容とシグナル伝達. 細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 16. p. 192. 和田正光・徳富哲・長谷あきら・長谷部光泰監修, 秀潤社.

植物栄養実験法. p. 488. 植物栄養実験法編集委員会編, 博友社.

新版 生物環境調節ハンドブック. p. 585. 日本生物環境調節学会編, 養賢堂.

謝辞

本論文を取りまとめるにあたっては、多くの方々にご指導、ご教示、ご支援、ご協力を賜った。

指導教員の東京大学大学院農学生命科学研究科教授 蔵田憲次先生 (生物環境工学研究室) には、本研究の遂行に当たり始終貴重なご指導、ご鞭撻を賜った。心より厚く御礼申し上げます。同研究科教授 米山忠克先生 (植物栄養・肥科学研究室)、同教授 大政謙次先生 (生物環境情報工学研究室)、同教授 大下誠一先生 (生物プロセス工学研究室) ならびに同助教授 富士原和宏先生 (生物環境工学研究室) には、本論文の審査を快くお引き受け頂くとともに、多くの有益なご教示、ご助言を頂戴した。富士原先生には、研究室セミナー等の際にも多くの有益なご教示、ご助言を頂戴した。米山先生、大政先生、大下先生、富士原先生に深く御礼申し上げます。

同研究科助手 大橋 (兼子) 敬子先生 (生物環境工学研究室) には、本研究に取り組む契機を与えて頂き、また細部にわたる懇切丁寧なご指導、ご教示を頂戴した。本研究の達成はまさしく大橋先生のご指導があつてこそと存ずる。満腔の謝意を表したい。

千葉大学園芸学部教授 後藤英司先生 (環境調節工学研究室) には、本研究へのご理解と多大なるご教示、ご助言を頂戴した。深く御礼申し上げます。東北大学大学院農学研究科助手 石田宏幸先生 (植物栄養生理学研究室) には、Rubisco 精製法とイムノプロット法に関してご教示、ご協力頂くとともに、抗 LHCII 血清をご提供頂いた。深く御礼申し上げます。東北大学大学院農学研究科教授 前忠彦先生、同助教授 牧野周先生 (植物栄養生理学研究室) ならびに東京大学大学院理学系研究科教授 寺島一郎先生 (植物生態学研究室) には、学会等の際に有益なご教示、ご助言を頂戴した。厚く御礼申し上げます。

筆者の在籍した生物環境工学研究室の研究員，学生諸兄姉には，研究遂行に際し多大なるご協力，ご助言を頂いた．特に高瀬将映氏には，議論の中で有益なご意見を頂いた．深甚の謝意を表す．また同研究室秘書 古金優子氏ならびに吉井友子氏には，筆者が研究に専念できるよう温かいご支援，ご配慮を頂いた．心より感謝申し上げます．

最後に，私事ながら，筆者が何不自由なく学業に専念できるよう支援してくれた両親と，常に温かく励ましてくれた祖父母と妹に対し，謝意を表する次第である．

平成 19 年 3 月

松田 怜