



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物の強酸性土壌に対する適応機構の解析
Author(s)	渡部, 敏裕
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第4821号
Issue Date	1999-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3151502
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32786
Type	doctoral thesis
File Information	4821.pdf



植物の強酸性土壌に対する適応機構の 解析

農芸化学専攻 博士後期課程
渡部敏裕

目次

第1章 緒論	1
第1節 世界における酸性土壌の分布および特性	1
第2節 アルミニウムが植物に与える影響	3
I. アルミニウム毒性とは	3
(1) アルミニウムイオン種によるアルミニウム毒性の差異	3
(2) アルミニウムが養分吸収に与える影響	6
(3) 根のアルミニウム吸収および分布	10
(4) 植物に対するアルミニウムの有益性	14
II. 植物のアルミニウム耐性機構	15
(1) 根圏への有機酸の放出によるアルミニウム毒性の軽減化	15
(2) ムシラーゲとアルミニウム毒性の関係	15
(3) アルミニウムストレスが誘導するタンパク質	18
(4) 根圏のpH変化能とアルミニウム耐性の関係	21
(5) 根におけるアルミニウムの集積とアルミニウム耐性の関係	21
(6) シンプラストにおけるアルミニウム耐性	22
(7) 根圏のケイ酸イオンとの関係	23
第3節 本研究の目的	24
第2章 強酸性土壌に適応した各種植物の生育に対するアルミニウムおよびpHの影響	27
第1節 生育と養分含有率に対するアルミニウムの影響	28
第2節 生育と養分含有率に対するpHの影響	34
第3節 養分が共存しない条件下でのアルミニウムの影響	37
第4節 メラストーマ切断根のリン吸収に与えるアルミニウム前処理の影響	43
第5節 考察	45
第6節 要約	49
第3章 強酸性土壌に適応した植物-メラストーマ-におけるアルミニウムとカルシウムの相互作用	51
第1節 生育とアルミニウム吸収におけるアルミニウムとカルシウムの相互作用	52
第2節 根の機能および構造におけるアルミニウムとカルシウムの相互作用	58
第3節 考察	65
第4節 要約	69
第4章 強酸性土壌に適応した植物におけるアルミニウムと窒素源の相互作用	70
第1節 異なる窒素源とアルミニウムが生育と養分吸収に与える影響	71

第2節	NH_4NO_3 を窒素源として与えた場合の根圏 pH 変化能	80
第3節	考察	82
第4節	要約	87
第5章	アルミニウム集積植物-メラストーマ-におけるアルミニウム集積の 生理的意義と吸収特性	88
第1節	メラストーマ体内におけるアルミニウムの分配と存在形態の解析	89
第2節	メラストーマのアルミニウム吸収機構の解析	101
第3節	考察	107
第4節	要約	112
第6章	総合考察	114
第1節	酸性土壤に適応した植物の生育特性	114
第2節	アルミニウムによる生育促進機構の解析	118
第7章	要約	126
謝辞		130
引用文献		131

第1章 緒論

第1節 世界における酸性土壌の分布および特性

世界の人口は60億に達しつつあり、その増加率は低下しているものの、年間8,000万人の割合で増大し続け、予測によれば2050年には94億人に達するという(Brown, 1998)。この増加分を賄うには毎年2,600万トンの穀物を増産し続けなくてはならない(Brown, 1998)。食糧増産のためには耕地面積の拡大と作物の生産性の増加が必要である。単位面積当たりの収量は化学肥料の投入量の増大、多収品種の導入、灌漑の拡大、農薬による病虫害、雑草の駆除等によって、1950年から1990年までは年間2.1%という大きな伸びを示してきた。しかし、1990年から1995年までの間の伸びはわずか年間1%程度であり、頭打ちになりつつある(Brown, 1998)。これは、上記のような資材や技術の投入に限界が近づいていることを意味する。また、このような農業自身の危機に加えて、人間活動がもたらす地球の温暖化、大規模な森林破壊、大気と水の汚染などの問題も食糧危機の一因となりうる。この状況を打破するための一つの可能性として、これまで作物生産ができなかった、あるいは生産性が悪かった問題土壌における収量を上げることが期待される。そのためには、土壌を作物の生育に適した状態に矯正すること、および土壌から受けるストレスに対する作物の耐性を強化することが必要となる。

世界には植物の生育を制限する様々な土壌が存在する。そのなかで、作物の生産上、最も重要な土壌の一つに酸性土壌がある。現在、全世界の非氷結地の約30%に相当する、およそ39億5,000万haの土地が $\text{pH}(\text{H}_2\text{O})$ が5.5以下の、いわゆる酸性土壌であると言われている(von Uexküll and Mutert, 1995; Fig. 1-1)。このうち、強酸性土壌と言われるもののほとんどは熱帯・亜熱帯地方(フェラルソル、アクリソル)か、あるいは農業利用の難しい寒冷な地方(ポ

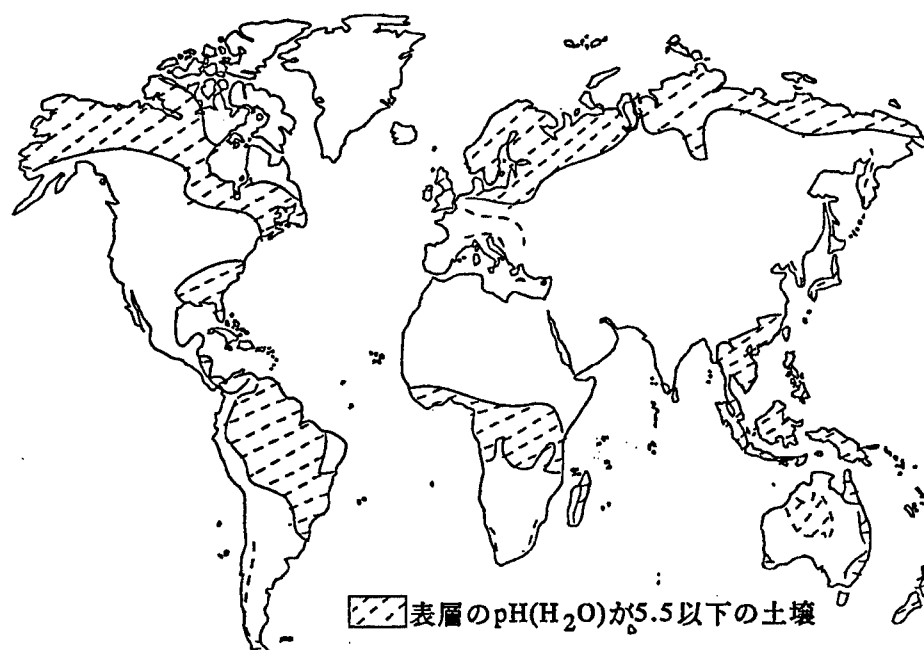


Fig. 1-1 世界の酸性土壌の分布 (von Uexküll and Mutert, 1995より引用)

ドソル、酸性ヒストソル) や乾燥・半乾燥地帯 (アレノソル) に分布している (岡川, 1984)。東南アジアにおいては、低湿地に分布する酸性硫酸塩土壌と泥炭土壌がこの地域における農地開発の潜在力を大きく規定していると考えられている (久馬, 1984)。

酸性土壌における植物の生育阻害要因としては (1) 低 pH 自身による障害、(2) 酸性化によって土壌中の溶解度が高まる Al や Mn などの過剰害、(3) 酸性土壌が生成する環境条件および酸性条件そのものによってその土壌中における存在量が減少、またはその植物に対する可給度が低下する P や Ca、Mg、K などの塩基の不足、(4) Zn、Cu、B、Mo などの微量元素の欠乏、および、(5) 土壌の酸性化による土壌微生物活性の変化があげられる (但野と安藤, 1984)。極端に強い酸性土壌では低 pH そのものによる生育阻害も考えられるが、通常は土壌中の Al イオンの影響が直接的、あるいは間接的に植物の生育を制限する主な要因である。

このような酸性土壌を農業に有効に利用するためには、炭酸カルシウム等で pH 矯正を行い、P、塩基、微量元素などの不足する養分を投入し、それらを

維持管理することにより、収量の増大が見込まれる。しかし、日本のように集約的な農業ではこのような土壌改良による増産は可能かもしれないが、発展途上国や大面積の農地を扱っている場合、コスト面あるいは技術面において困難な点は多い。このため、耐酸性、特に Al 耐性の強い種あるいは品種の導入が重要な役割を担うことになる。そこで、次節では植物に対する Al 毒性および Al 耐性機構に関する研究の最近の動向について説明する。

第2節 アルミニウムが植物に与える影響

I. アルミニウム毒性とは

金属 Al は比重が小さく、錆びても外観を損なわず、匂いや味がほとんどしないことから様々な分野で利用されている。しかしながら、生物学上における Al はその毒性が大きな研究課題となっている。ヒトにおける Al 毒性が原因となる疾患としては、リン酸および Ca の吸収阻害による骨軟化症、 β -アミロイドタンパクの凝集、アセチルコリン活性抑制、あるいは脳の脂質過酸化等が一因であると考えられるアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症などである（福島, 1998）。

一方、Al が植物の生育に与える影響についても様々な報告がある。通常の植物は Al を地上部へと移行させることはほとんどなく、多くの場合、Al による根の障害が個体全体の生育の低下を引き起こすことになる。しかしながら、根の生育に与える Al の影響は非常に複雑であり、生育阻害の主要因が何であるかについては未だ結論が得られていない。以下では植物における Al 毒性に関する最近の研究の動向を項目別に説明する。

(1) アルミニウムイオン種による Al 毒性の差異

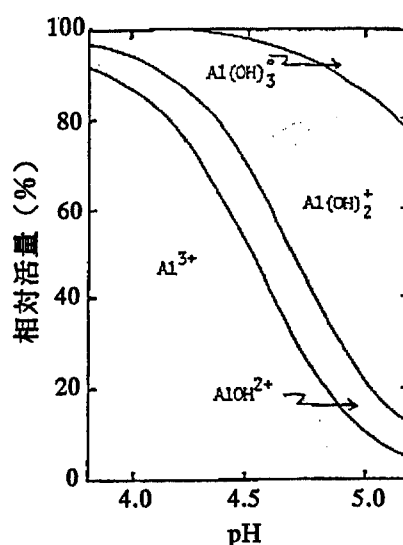


Fig. 1-2 pHの変化と単核Alイオンの相対活量の関係
(Tanaka, Tadano et al. (1987)より引用)

溶液中のAlはpHあるいは共存するイオンにより様々な形態をとり、植物に対する毒性もまた様々である。OH以外のAlリガンドが存在しない場合、pHの変化に伴って溶液中の単核Alの形態はFig. 1-2に示すように変化する。pH4.5以下では、 Al^{3+} が主形態だが、pHが上昇すると Al^{3+} の割合は低下し、塩基性Alイオン($\text{Al}(\text{OH})_2^+$ および $\text{Al}(\text{OH})_3$)の割合が増え、さらにpHが上昇すると $\text{Al}(\text{OH})_3$ （ギブサイト）として沈殿する。さらに溶液のpHが上昇しアルカリ性になると $\text{Al}(\text{OH})_3$ は $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ として溶解する。これら単核イオンに加えて、pH4.5から5.0の範囲では、 Al_{13} ポリマー（ $[\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}]^{7+}$ ）のような重合塩基性Alイオンも多く生成する。

では、どのようなAlイオン種が最も毒性が強いのであろうか？植物の生育が著しく阻害されるのはpH(H₂O)が4.5以下の土壌であるため、一般にpH4.5以下の水溶液中で最も優勢である Al^{3+} が植物にとって最も毒性が高いと考えられており、ほとんどの実験で Al^{3+} の植物に対する影響が調査されている。Tanaka, Tadano et al. (1987)はオオムギの根の生長に与える様々な単核Alイオン種の影響を調査し、根の生長に対して最も毒性の高い単核Alイオン種は Al^{3+} であることを示し、さらに、 Al^{3+} の濃度よりも活量が植物におけるAl毒性にとって重要であることを報告した。一方、双子葉植物を用いた実験で、 Al^{3+} よりも $\text{Al}(\text{OH})_2^+$

や $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ のほうが毒性が強いことが示唆した報告があるが (Alva et al., 1986; Kinraide and Parker, 1990)、この現象はこれらの種において Al^{3+} 自身の毒性が低いのではなく、 Al^{3+} が主体となるような低 pH 条件で、 H^+ が Al^{3+} の毒性を軽減し、見かけの Al^{3+} 毒性が低下したためと理解されている (Kinraide, 1991, 1993; Staß and Horst, 1995)。また、いくつかの報告では Al_{13} ポリマーが植物にとって毒性が強いことが示されている (Kinraide, 1991; Parker et al., 1989; Wagatsuma and Ezoe, 1985; Wagatsuma and Kaneko, 1987)。 Al_{13} ポリマーが実際の土壌系でどれほど植物にとって有毒であるかは未だ解明されていないが、NMR 技術により、酸性森林土壌における Al_{13} ポリマーの存在が示されている (Hunter and Ross, 1991)。アルカリ側で優勢になる $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ はこれまでその毒性が報告されたことはほとんどないが、細胞内の pH は約 7.4 とアルカリ側にあるため、最近になって研究が盛んになり始めたシンプラストにおける Al の生理毒性を論じるには重要なイオン種となるだろう。

実際の酸性土壌溶液中では Al のみが溶けているわけではなく様々な無機イオン、有機イオンが存在する。これらと錯体を形成することにより Al 毒性が軽減されることがわかっている。例えば、無機イオンとしてはフッ素イオンと配位結合した Al-F 錯体 (Tanaka, Tadano et al., 1987; Stevens et al., 1997) および硫酸イオンと配位した形態である Al-SO₄ 錯体 (Tanaka, Tadano et al., 1987; Kinraide and Parker, 1987) の毒性が他の単核 Al イオンと比較して低いことが報告されている。Alva et al. (1991) により、Al 毒性の低い Al-SO₄ 錯体は外殻錯体であることが示唆されているが、このような錯体が実際の土壌、特に酸性硫酸塩土壌のような硫酸イオンに富む土壌中で形成されているかどうかは不明である。また、土壌中には腐植酸、フルボ酸、あるいは低分子有機酸等が存在し、これらと錯体を形成することも Al 毒性の軽減に大きく貢献するが、この点に関しては第2節-II で詳しく述べる。また、このように錯体を形成しなくても、溶液中のイオン強度が上昇すると Al イオンの活量が低下するため、その毒性は低下し、さらに後述するように Ca、Mg、あるいは Si の添加は活量低下効果以上の Al 毒

性軽減効果を持つことが報告されている。

(2) アルミニウムが養分吸収に与える影響

Table 1-1 水耕実験における各種植物の元素含有率に与えるAl処理の影響

植物種	部位	Al処理濃度	元素	Al無添加と比較した含有率変化	備考	文献
トウモロコシ	地上部、根部	2.5 mg L ⁻¹	Ca、Mg	低下	感受性品種のほうが低下程度大 2.5 mg L ⁻¹ Al以上では低下	Clark, 1977
	地上部、根部	2.5 mg L ⁻¹	K、P	耐性品種：上昇 感受性品種：低下		
トウモロコシ	地上部、根部	0.1 mM	Mg	低下		Grimme and Lindhauer, 1989
ソルガム	地上部、根部	0.4 mg L ⁻¹	P	有意差無し		Tan and Keltjens, 1990
		1.6 mg L ⁻¹	P	上昇		
ダイズ	地上部	148 μM	Ca	低下		Noble and Sumner, 1988
リクトウ	地上部、根部	3 mg L ⁻¹	P	cult. Cica：上昇 cult. Colombia 1：低下	10 mg L ⁻¹ Al以上では低下	Howeler and Cadavid, 1976
	地上部、根部	3-10 mg L ⁻¹	Ca	cult. Cica：上昇 cult. Colombia 1：低下	20 mg L ⁻¹ Al以上では低下	
リクトウ	地上部、根部	35-140 μM	P、Ca	地上部：低下 根部：上昇		Jan and Pettersson, 1993
			K	低下		
			Mg	低下		
コムギ	地上部、根部	0.2 mM	P	地上部：上昇 根部：低下	Pのみ統計処理していない	Malkanhiyet al., 1995a
			K	地上部：低下 根部：有意差無し		
			Ca	地上部：有意差無し 根部：低下		
			Mg	低下		
オオムギ	地上部、根部	0.2 mM	P	上昇	Pのみ統計処理していない	Malkanhiyet al., 1995a
			K	地上部：低下 根部：有意差無し		
			Ca	低下		
			Mg	地上部：有意差無し 根部：低下		
トウガラシ	地上部、根部	0.2 mM	P	上昇	Pのみ統計処理していない	Malkanhiyet al., 1995a
			K	有意差無し		
			Ca	低下		
			Mg	地上部：有意差無し 根部：低下		
ササゲ	地上部、根部	0.2 mM	P	上昇	Pのみ統計処理していない	Malkanhiyet al., 1995a
			K	有意差無し		
			Ca、Mg	地上部：低下 根部：有意差無し		
ユーカリ	地上部、根部	37 μM	Ca、Mg	低下		Huang and Bachelard, 1993
ラジアタマツ	地上部、根部	37 μM	Ca、Mg	低下		Huang and Bachelard, 1993
ラジアタマツ	根部	16.7 μM	Ca	低下		Truman et al., 1986

根が受ける様々な Al の影響は結果的には全て根の養分吸収と関わりうるものである。まずここでは現象面としての Al と養分吸収の関係、および Al が養分吸収に対して直接的に与える影響について述べることにする。第1節で述べたように、一般に酸性土壌では塩基性カチオンと P が不足しているが、水耕実験において、これらの元素の植物体内での含有率に与える Al 処理の影響についても多くの植物種で報告されている。その代表的な例を Table 1-1 に示す。

ここに示されるように、Ca と Mg 含有率は、あらゆる種において、ほぼ一貫して地上部、根部ともに Al 処理による低下が確認されている。P、K 含有率についても Al 処理によって低下することが報告されているが、こちらは Ca や Mg のように一貫してはおらず、処理間差無し、あるいは Al 処理による上昇も多く報告されている。

P は Al と結合することにより難溶性のリン酸アルミニウム沈殿を形成するため、根圏および根中におけるこの沈殿の形成が P の吸収阻害と移行阻害を引き起こす可能性がある。Naidoo et al. (1978) は X 線マイクロアナライザー (XMA) による分析により、インゲンの根冠細胞の外側に Al と P が共沈していることを示唆するデータを示した。同様に、McCormic and Borden (1974) はモリブデンがリン酸アルミニウムと結合することにより、電子密度を上昇させ、電子顕微鏡で可視化できることを利用して、オオムギの根のアポプラストにリン酸アルミニウムの沈殿が存在していることを示した。しかし、XMA を用いた分析で Ishikawa et al. (1996) はエンドウとイネで、Huett and Menary (1980) はキャベツ、レタス、およびキクユグラスで、Delhaize et al. (1993a) はコムギで、その根において Al と P の分布の関係に強い相関がみられないことを示した。また、ソルガムの Al 毒性症状は根の形態、地上部—根部比、あるいは P 代謝において P 欠乏症状とは異なるものであり (Tan and Keltjens, 1990)、Al 毒性の本質が P 欠乏ではないことを示唆した。これらの結果から判断すると、Al が P 吸収に与える影響は直接的なものではなく、後述するような Al による根細胞の変化がもたらす間接的な影響が主体であるのかもしれない。

コムギの根毛細胞の低親和性の K チャンネルが Al によって阻害されることがパッチクランプを用いた実験で明らかになっているが (Gassmann and Schroeder, 1994)、高親和性の K チャンネルに与える Al の影響は不明である。さらに、Table 1-1 に示すように個体レベルでは Al による一致した K 吸収阻害はみられず、むしろ含有率が上昇することも観察されている。K 含有率が Al により低下した種 (品種) は Al により上昇あるいは変化のなかった種 (品種) より

も Al 耐性が弱い傾向があるが (Clark, 1977; Malkanthi et al., 1995a)、これは Al による直接的な K 吸収阻害が原因であるというよりも、むしろ Al による根の構造破壊が引き起こした K の漏出が大きく影響していると可能性がある (Wagatsuma et al., 1995)。

一方、多くの種で Al による含有率低下のみられた Ca と Mg に関しては、その吸収機構に与える Al の影響について同様の結果が得られている。コムギ根端の Ca 吸収を Ca^{2+} 選択性振動微小電極で (Huang et al., 1992ab)、ライグラス根の Mg 吸収を培養液の分析により (Rengel and Robinson, 1989a) 調査したところ、いずれも Al により吸収の $V_{\max}$ は変化しないが、 K_m は上昇するという結果が得られた。この結果は Ca あるいは Mg 吸収に対し、Al が拮抗阻害を引き起こしていることを示す。さらに、Ca 吸収に関しては、そのチャンネルに対する影響が多く調べられている。Ding et al. (1993) がタマネギ鱗茎から得た内表皮細胞の Ca-選択性カチオンチャンネル活性をパッチクランプで測定したところ、可逆的な活性阻害が認められた。彼らの実験は pH4.5 で行われているため、主に Al^{3+} が Ca チャンネルを阻害したと考えられる (Fig. 1-2)。一方、Piñeros and Tester (1993) もまた、コムギ根から得た原形質膜に富むミクロソーム膜画分を組み込んだ人工脂質二重層の Ca チャンネル活性に与える Al の影響をボルテージクランプを用いて調査し、同様の結果を得ているが、彼らの実験は pH4.9 で行われているため、主に $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ が Ca チャンネルを阻害したと考えられる (Fig. 1-2)。ではどちらの Al イオン種のほうがチャンネル活性の阻害効果が大きいのであろうか？ Rengel and Elliott (1992) は発芽してすぐのアマランサスの幼植物体から得たプロトプラストの $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 吸収に対する Al の影響を異なる pH で調査したところ、pH5.5 よりも pH4.5 のほうが Al の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 吸収の阻害効果が大きかった。この結果から、生育におよぼす影響と同様に、Ca チャンネル阻害に対しても Al^{3+} のほうが $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ よりも効果が大きいと考えられる。また、彼らは各種チャンネルブロッカーと Al の影響の相互比較も行っている。その結果、Ca チャンネルブロッカーである bepridil と verapamil は双方とも同程度に ^{45}Ca 吸収を阻

害し、この状態で Al を加えると bepridil の場合はさらに ^{45}Ca 吸収が阻害されたが、verapamil では影響がなかったことから、Al と verapamil が Ca チャンネルに結合する部位が同一であることが示唆された。

Al 耐性を異にする品種間、あるいは系統間において、インタクト根の Ca あるいは Mg 吸収阻害の程度と Al による生育の阻害の程度の間に相関がみられることが報告されている (Ca: Huang et al., 1992ab, 1995; Ryan and Kochian, 1993, Mg: Rengel and Robinson, 1989a)。特に Ca 欠乏は細胞壁や原形質膜の不安定化だけではなく、細胞内のセカンドメッセンジャーとしての Ca^{2+} イオンの働きにも混乱を引き起こすため、細胞の正常な代謝が著しく損なわれる。Al によって Ca 吸収を阻害されたコムギの Al 感受性品種 Scout 66 の根では、根の Ca レベルを維持するため地上部への Ca 移行率が下がることも報告されており (Huang et al., 1995)、地上部に与える Al の影響に Ca 欠乏が関わっていることが予想される。Rengel et al. (1995) は Al 毒性の影響を最も強く受ける根端は、まだ液胞等の細胞オルガネラの容量が小さく、細胞内に貯蔵される Ca^{2+} 量が少ないため、Al による Ca 吸収阻害の影響を最も強く受ける可能性があるかと推定した。また、Al による生育阻害が培地への Ca の添加によって軽減されるということが数多く報告されている (Shen et al., 1993; Hecht-Bushholz and Schuster, 1987; Rengel, 1992)。

これらの結果をもとに、Al による植物の生育阻害の第一の要因は Al による Ca 吸収阻害であるとする意見がある。しかしながら、このことに対し反論する報告も多く存在する。Ryan et al. (1994) はコムギの幼植物の根の伸長が Ca 吸収が阻害されないような濃度の Al によっても阻害されることを示し、Kinraide et al. (1994) は Al 毒性の軽減効果についても Ca^{2+} が特異的なわけではなく、 Mg^{2+} や Sr^{2+} とその効果は変わらないことを示した。さらに、Ryan et al. (1997) は Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 、あるいは Na^+ 添加による Al 毒性軽減現象には、これらのイオンによる Ca 吸収阻害が伴われること、つまりカチオン添加による Al 毒性の軽減は、Al が引き起こした Ca 吸収阻害の軽減によるものではないことを示した。Reid et al.

(1995) は 0.1mM の Al および La は同程度にシャジクモの輪生体細胞の生長を阻害したが、このときの Ca 吸収阻害は La で Al よりも約 2 倍大きいことを認め、また Ca 欠乏症が確認されるのに Ca 欠乏処理開始から 8 時間以上かかったのに対し、Al 毒性症状が確認されるのには Al 添加処理開始から 2.5 時間以内であったことを示した。さらに、Al 耐性を異にするコムギ品種間において、Al による根の原形質膜小胞 Ca チャンネル阻害の程度に差がみられないことも報告されている (Sasaki et al., 1994; Huang et al., 1995)。これらの結果は Ca 吸収阻害が Al 毒性の初期の、あるいは第一の要因ではないことを支持するものである。しかし、多くの植物種において、長期間の Al 処理は Ca 含有率を低下させ、Ca 欠乏に類似した症状を引き起こすことから (Rengel, 1992)、Al 毒性全体において、Ca 吸収阻害がその中核の一つを担っていることは十分考えられる。

(3) 根のアルミニウム吸収および分布

Al 処理後、植物が Al 毒性症状を示すのに要する時間は一般に 1~2 時間以内である (Ikeda and Tadano, 1993; Kochian, 1995)。この Al 毒性の初期段階がアポプラストとシンプラストのどちらであるかを見極めるために Al の吸収とその局在について多くの実験が行われている。Al 吸収が 2 段階で起こることがコムギの切断根 (Archambault et al., 1996, Zhang and Taylor, 1989)、キャベツ、レタス、およびキクユグラスの切断根 (Huett and Menary, 1979)、ならびにタバコの培養細胞 (Vitorello and Haug, 1996) で確認されている。すなわち、第一段階として初期の急速な、時間に対して非直線的な段階 (<30 分) が起こる。これはアポプラストへの Al の流入、そしてそこでの負電荷部位への吸着が主体と推定される。しかしながら、Zhang and Taylor (1990) は細胞壁における非交換的な、代謝に依存した Al の集積、つまり構造的に組み込まれていると予想される集積も確認している。アポプラストの Al が 1mM HCl で 1 時間洗浄しても約 30% しか除去することができないことに、この非交換的な Al が関わっているのかもしれない (Blamey et al., 1993a)。第二段階として、ゆっくりとした、時間に対し

て直線的な Al 吸収が起こる。これは主としてシンプラストへの流入を示すものではないかと考えられている。この Al 吸収は脱共役剤である DNP によって増大することから、非代謝的なものとみなされている (Huett and Menary, 1979)。これらの Al 吸収に関する解釈は主として根中の Al をクエン酸による洗浄等の手段を用いて分画した結果により推測されたものであるが、分画法によってはシンプラストへの吸収量を過大評価していると疑問視する研究者もいる (Rengel and Reid, 1997)。一方、微細部位の高感度な Al 検出を可能とする secondary ion mass spectrometry を用いてダイズ根端の Al 吸収を実測した結果、処理後 30 分以内にシンプラストに Al が侵入していることが認められている (Lazof et al., 1994)。同様に、Rengel and Reid (1997) は物理的に細胞壁を取り去ることにより、Al 処理後直後から、ごく少量ながらシンプラストへの Al の流入が起こっていることを報告している。

原形質膜をいかにして Al が透過するかについてわかっていることはほとんどない。Kochian (1995) は強酸性土壌で Al イオンの主体となる Al^{3+} が Al の輸送形態の主体であるとするなら、 Al^{3+} は他のイオンのチャンネルを通して、あるいはエンドサイトシスによって取り込まれるのではないかと推定している。低 pH 条件で膜の透過性が上昇することも Al の取り込みと関わっている可能性がある (Vitorello and Huag, 1996)。

Al は細胞内において核 (Aniol, 1984; Matsumoto et al., 1976a; Tice et al., 1992)、ミトコンドリア (Aniol, 1984; de Lima and Copeland, 1994)、あるいはタンパク質 (Aniol, 1984) と結合することにより細胞内の代謝に異常を引き起こす。このことは細胞分裂の減少の原因となり (Horst and Klotz, 1990)、根の伸長阻害という形で現れる。細胞内タンパクに与える Al の影響の中で重要なものの一つとしてカルモジュリン (CaM) との結合があげられる。カルモジュリンは Ca^{2+} と結合することにより立体構造を変化させ、様々な酵素等のタンパクを活性化させる。Al イオンは Ca^{2+} と同様に CaM と結合することができるが、Al が結合した場合の立体構造の変化は Ca の場合とは異なるため、CaM としての役割を果たすこ

とはできない (Larkin, 1987)。この CaM と Al の結合の親和性は Ca の場合よりも 2.5–10 倍高いと考えられており (Siegel and Huag, 1983)、細胞内で低濃度の Al が様々な酵素活性の低下を引き起こすことが予想される。

上記のようなシンプラストだけではなく、アポプラストにおいても Al は多くの影響をおよぼすことが知られている。ここで取り上げるアポプラストには細胞壁だけではなく、原形質膜も含まれるものとする。Al は能動的養分吸収のエネルギー源である原形質膜 H^+ -ATPase を阻害し (Matsumoto et al., 1992)、以前に述べたように Ca チャンネルや K チャンネルを阻害する。また、Al がリン脂質や (Matsumoto et al., 1992)、膜タンパク (Cardwell, 1989) と結合することは膜の透過性を変える原因となるかも知れない (Chen et al., 1991; Ishikawa and Wagatsuma, 1998; Zhao et al., 1987)。Al によって膜のリン脂質の組成が変わることや (Zhang et al., 1997) リン脂質が過酸化されること (Cakmak and Horst, 1991; Yamamoto et al., 1996) も膜機能の異常を引き起こす原因となるであろう。

Al が細胞壁に与える影響に関して、Al ストレスがアポプラストにカロースや (Schreiner et al., 1994; Messiaen et al., 1995) リグニン (Sasaki et al., 1996, 1997a) の沈積を引き起こすこと、あるいは、細胞壁を構成する多糖の組成を変えることが報告されている (Le Van et al., 1994)。カロースの合成は Al によって特異的に引き起こされるものではないが (Schaeffer and Walton, 1990)、Al による障害の程度とその合成量に強い相関があり、視覚的な判別が可能であるため、その程度を知る indicator として広く利用されている。リグニンのアポプラストにおける沈積は、細胞骨格を強固にするため、結果として細胞伸長を阻害する一因になると考えられている。また、根の伸長域の皮層細胞の微小管、あるいは微小繊維の合成が Al によって異常となり、根の伸長方向に対して垂直な方向へのミクロフィブリルの合成ができなくなった皮層細胞が肥大し、根に構造的な破壊を与えるということも報告されている (Sasaki et al., 1997ab; Blancaflor et al., 1998)。細胞壁に対する直接的な Al の影響としては、ペクチン様物質、細胞壁中の酵素、エクステンシンおよびキシログルカンのカルボキシル基との結合が

有力視されている (Horst, 1995)。ペクチン様物質のカルボキシル基は根の細胞壁の CEC の主な構成要素であるが、Blamey et al. (1993b) および Blamey and Dowling (1995) は Al がペクチン様物質と結合することによりアポプラストにおける水と養分の移動が阻害されることを示唆した。Gunsé et al. (1997) は Al はトウモロコシの Al 感受性品種の根の水伝導率 (Lpr) を下げるが、この低下は根の皮層細胞自身の水伝導率 (Lpc) の変化とは直接関わっていないため、細胞壁成分に与える Al の影響が根の水伝導率の低下に関連しているのではないかと考察した。また、Al によりドンナン・フリースペースの Ca と Mg の量は減少し (Rengel and Robinson, 1989b; Reid et al., 1995)、その減少割合と実際の吸収量低下の間には、正の相関が存在すると報告されている (Keltjens, 1995)。Blamey et al. (1997) は Al がペクチン酸 Ca と結合するときに、交換的に Ca を放出し、その比率は $\text{Ca} : \text{Al} = 1.5 : 1$ であることを報告している。一方で、根の CEC あるいは Al 吸着能と Al 耐性の間に有意な相関が認められないことも報告されている (Blamey et al., 1992; Rengel and Robinson, 1989a; Ishikawa and Wagatsuma, 1998)。

これまで述べてきたように、Al は細胞のアポプラストおよびシンプラストに対して様々な影響をおよぼすと考えられているが、ほとんどの植物種は高濃度の Al を含む培地で生育しても地上部に集積する Al の含有率は数百 mg kg^{-1} 程度であるため (e.g. Horst and Göppel, 1986)、生育に与える Al の直接的な影響は根細胞に限定されていると考えて良い。しかし、酸性土壤に自生する植物の中には Al 集積植物と呼ばれる地上部に Al を多く集積する種が存在する。Chenery (1948a, 1949) は Kew 王立植物園で栽培している数千種の植物の葉の Al 含量を調査し、葉に $1,000 \text{ mg kg}^{-1}$ 以上の Al を集積することを Al 集積植物の判定基準として分類したところ、双子葉植物では調査した 2,859 種のうち 1,779 種が、単子葉および裸子植物では 269 種のうち 33 種が、隠花植物では 1,401 種のうち 615 種が Al 集積植物であったことを報告した。特に、木本種では葉に $10,000 \text{ mg kg}^{-1}$ を超える Al を集積する種も少なくなく、これらの種は Al 非集積植物とは異なる、独自の Al 吸収機構を持っていることが予想される。しかしながら、これまでに

Al 集積植物の Al 吸収機構については全く報告がなく、未知のままである。また、Al 集積植物は多量の Al を葉に集積しても障害症状を示さないため、体内に何らかの Al 不活性化機構を備えていることが考えられており、それに関するいくつかの報告もあるが、この件については後述する。

(4) 植物に対するアルミニウムの有益性

これまでは植物に対する Al の毒性の面を中心に述べてきたが、適量の Al の添加が植物の生育を促進することも多く報告されている。Al によって生育促進を受ける植物種として、よく知られているものにチャがある。Konishi et al.

(1985) はチャの生育に与える Al の影響を調査し、チャを 0.8 mM の P を含む培養液で 112 日間生育させた場合、1.6 mM の Al 添加により乾物重が約 4 倍に増加することを報告した。さらに、この生育の増加は P 含有率の上昇を伴うものであったことから、Al による生育促進機構に P 栄養が関わっていることが示唆された。同様に、セラード地域の酸性土壌に生育する *Miconia albicans* も Al 添加によって養分吸収能が著しく上昇し、生育が良好になることが報告されている

(Haridasan, 1988)。チャおよび *Miconia albicans* は Al 集積植物であるため、地上部の生育に対しても Al が何らかの生理的な効果を持っていることが予想される。しかし、Matsumoto et al. (1976b) は圃場で栽培したチャの古葉の Al 含有率は $30,000 \text{ mg kg}^{-1}$ に達するが、若葉では 600 mg kg^{-1} 程度であり、水耕実験で 100 日間、1 mM の Al 処理をしても若葉では 300 mg kg^{-1} に達しないことから、Al はチャの根の伸長において何らかの生理的な作用を果たした後、老廃物として葉に徐々に集積されているのではないかと推定している。

このような Al による生育促進現象は、Al 集積植物に限られたものではなく、ユーカリ (Mullette, 1975; Huang and Bachelard, 1993)、ラジアタマツ (Huang and Bachelard, 1993)、あるいはリクトウ (Howeler and Cadavid, 1976) のような Al 非集積植物でも広く観察されている。Al による生育促進の要因として、一般的に支持されていることは、Kinraide (1993) や Llugany et al. (1995) の示す、Al

が低 pH 条件で H^+ 障害を軽減しているという説である。しかし、Malkanthi et al. (1995a) の行った実験では、ササゲの生育は pH5.5 よりも 3.8 のほうが良好であり、pH3.8 で Al を添加することによって、さらに生育が促進されたため、 H^+ 障害の軽減が Al による生育促進の主因となった可能性は低い。また、Al による生育促進現象がしばしば観察される酸性土壌に適応した植物の低 pH 耐性が弱いとは考えられない。このようなことから、 H^+ 障害の軽減のみで Al の生育促進効果を説明することは不可能であり、詳細は未だ解明されていない。

II. 植物のアルミニウム耐性機構

植物の Al 耐性は種間および品種間で大きく異なる（但野, 1993; 我妻, 1988）。比較が容易であるため、遺伝子実験技術が進歩した最近の Al 耐性研究の多くは、品種間あるいは突然変異株間の比較を行っている。しかしながら、Al 耐性は品種間差よりも種間差のほうがはるかに大きく、Al 耐性の本質を知るためには種間差も無視できない。植物の Al 耐性機構は大別して二つに分けられる。まず、根細胞に近づけない能力と、もう一つは侵入してきた Al に耐える能力である。また、根の全ての部位が同じように Al の影響を受けるわけではなく、主に Al 耐性を左右しているのは先端から 2-3mm までの根端部位であり（Ryan et al., 1993）、この部位における Al 耐性がその植物の Al 耐性のかなりの部分を決定していると考えられている。

(1) 根圏への有機酸の放出によるアルミニウム毒性の軽減化

現在、植物の Al 耐性に関する研究で最も有力視されているのが、根からの有機酸の放出である。早くも 1960 年代から 1970 年初頭には有機酸、土壌有機物の抽出液、あるいは EDTA を Al を含む培地に添加すると植物の生育および養分吸収阻害が改善され、また、キレート化した Al は植物に吸収されにくいことが明らかにされていた（Johanson and Jackson, 1964; Bartlett and Riego, 1972）。Hue et al. (1986) は Al を添加したワタの根の生育に対する様々な有機酸の効果を調査し、その軽減効果から有機酸と Al の結合安定度定数を推定した。その結

果、実際のキレート安定度定数と推定値がほぼ一致したことから、Al キレートが強固であるほど、植物に対する Al の毒性が低下することが示された。すなわち、通常、植物が合成する有機酸の中では、クエン酸が最も Al 毒性軽減能が強い。しかし、これらの研究が行われた時点では、根からの有機酸放出と Al 耐性の関係を調査した報告はまだなかった。

1988 年に Ojima and Ohira は Al 耐性を持つニンジン培養細胞系統が非選抜系統よりも根圏により多くのクエン酸を放出することを示した。しかし、彼らはこの系統の選抜を pH が高く、リン酸アルミニウム沈殿が生じている条件で行っているため、この有機酸の放出は Al に対する反応ではなく、P 欠乏に対する反応であると結論を出した (Koyama et al., 1988)。初めて明白に Al 耐性品種における Al 誘導性の有機酸放出量増加を示したのは Miyasaka et al. (1991) の行った実験である。彼らはサヤインゲンの Al 耐性品種 Dade と Al 感受性品種 Romano を 0 および $148 \mu\text{M}$ Al を含む培養液で 8 日間栽培し、培養液への有機酸放出量を比較した。その結果、Dade は Al 添加をした場合、無添加と比べて約 70 倍も多いクエン酸を放出し、また、この量は Romano の Al 添加時における放出量より約 10 倍も多かった。この報告の後、同様の結果が多くの植物種において報告されている。Delhaize et al. はほぼ同一の遺伝子構成を持ち、Al 耐性遺伝子座 (*Alt1*) に encode されている Al 耐性を異にするコムギ系統の Al 耐性を比較したところ、Al 耐性系統の根端表皮の Al 含有率が感受性系統のものの約 1/5-1/10 であることを認め (Delhaize et al., 1993a)、これは Al 耐性系統のほうが感受性系統よりも 5-10 倍のリンゴ酸を根端部位から放出するためであると推定した (Delhaize et al., 1993b)。Ryan et al. (1995) は同様のコムギ系統を用いた実験からこのリンゴ酸の放出はアニオンチャンネルを通して行われており、随伴カチオンは K^+ ではないかと推定した。このリンゴ酸放出の促進は Al^{3+} および $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ によって引き起こされるが、 La^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Al_{13} ポリマーあるいは P 欠では引き起こされなかった (Delhaize et al., 1993b; Ryan et al., 1995)。この他に Al 誘導性の有機酸放出量増加はトウモロコシのクエン酸およびリンゴ酸 (Pellet et al.,

1995)、*Cassia tora* のクエン酸(Ma et al., 1997ab)、ソバのシュウ酸(Ma et al., 1997c, 1998; Zheng et al., 1998ab)、およびニンジンのクエン酸(Zheng et al., 1998b)等で報告されている。Zheng et al. (1998b) は、5 作物種、8 品種の Al 耐性と有機酸放出能の関係を調査した。その結果、最も Al 耐性の強かったソバと、それに次ぐ耐性を持つニンジンは、Al 処理下で高レベルのシュウ酸とクエン酸をそれぞれ持続的に放出したが、その他の Al 耐性中程度あるいは弱の作物種では、有機酸の放出量が少ない、あるいは持続性がないことを示し、高い Al 耐性には高レベルかつ持続的な有機酸の放出が関係していることを示唆した。de la Funte et al. (1997) は、有機酸放出能の高い植物の Al 耐性が強いというこれらの実験結果をふまえ、citrate synthase を過剰発現させたタバコおよびパパイヤの遺伝子組換え体を作成し、これらが Al 耐性を獲得したことを示した。これらの植物では根中のクエン酸量および根圏へ放出されるクエン酸量が上昇し、根の Al 集積量は減少した。この報告では Al 耐性の獲得が根中の有機酸濃度の上昇によるのか、放出される有機酸量の上昇によるのかは明らかにされていないが、今後、様々な植物種に対する応用を期待させるものであった。一方、有機酸放出量と Al 耐性の間に相関のある品種間等において、根中の有機酸量と Al 耐性の間に有意な相関が無いことが多くの実験で報告されている (de Andrade et al., 1997; Pellet et al., 1995; Foy et al., 1990; Delhaize et al., 1993b)。また、Al により有機酸放出が促進される品種において、有機酸合成に関わる PEPC や NAD-malate-dehydrogenase 活性が Al 処理によって上昇することもなかった (Ryan et al., 1995; de Andrade et al., 1997)。このような結果から、Al による有機酸放出の促進にはアニオンチャンネル活性が関わっている可能性も大きく (Zheng et al., 1998a)、今後、この分野における研究も盛んになるものと思われる。

このような根からの有機酸放出による Al 耐性機構に関して、いくつかの未解明な問題がある。まず第一に、実際に培養液中に放出されている有機酸の濃度が、植物の Al の毒性を低下させるには不十分であるという点である。この問題に対する答えとして、有機酸放出の主要部位は Al 毒性の影響を最も強く受け

る根端であるため (Ryan et al., 1993)、この部分のアポプラスト中、あるいは下記で詳しく述べるムシラーゲ中で有機酸が濃縮されることにより、Al の毒性が軽減されていることが予想されている。

第二の問題点は、植物の Al 耐性と有機酸放出能の関係を調査した実験のほとんどは水耕実験におけるものであり、実際の土壌系でどれだけ寄与できるかは明らかにされていないことである。土壌中には様々な微生物が存在するため、それらによる分解の影響が予想される。Jones et al. (1996) は pH 等が異なる 4 種の土壌中でのリンゴ酸分解速度を調査したところ、全ての土壌で、その半減期は約 1.7 時間と非常に短いことを示した。彼らは、実際の酸性土壌での有機酸放出による Al 毒性あるいは P 欠乏回避機構は、微生物活性の高い表層土では、微生物による急速な分解のため、その効率が著しく低下すると予想している。今後、より自然条件に近い土壌系における有機酸放出能と Al 耐性の間の関係を調査することが重要になるであろう。

(2) ムシラーゲとアルミニウム毒性の関係

ムシラーゲは主に根冠細胞中のゴルジ装置によって作られた分泌小胞が細胞外に放出され集積した粘性多糖である。この粘性多糖はポリガラクトuron酸を多く含み、このカルボキシル基が Al と結合するのではないかと考えられている。ムシラーゲ自身の Al 結合力は弱い (Ostatek-Boczynski et al., 1995)、拡散しにくいいため、根端で高濃度の状態を保つことが可能である。さらに、有機酸等の根圏放出物の濃縮場所としての役割も非常に大きいと考えられている。Horst et al. (1982) は *Vigna unguiculata* の根端 5mm のムシラーゲに含まれる Al の量はその部位の全 Al 量の 50% に達することを示した。さらに、Al 処理の前にムシラーゲを除去すると、根組織への Al の侵入量が増加し、Al 耐性が弱くなったと報告した。この結果はムシラーゲが Al 耐性に大きく関わっていることを支持する。

(3) アルミニウムストレスが誘導するタンパク質

Al ストレスによって様々なタンパク質、あるいは遺伝子が誘導されることが報告されている。これらのタンパク質（遺伝子転写産物）には Al 耐性に関わっているようなものもあれば、Al 毒性の一因と思われるものもある。

Al ストレスによって誘導される遺伝子についていくつかの報告があるが、これらのほとんどは Al ストレスに特異的ではなく、P 欠乏、他の金属ストレス、低 Ca ストレスなどでも引き起こされるものであった (Ezaki et al., 1995; Snowden and Gardner, 1993; Richards et al., 1994; Snowden et al., 1995)。これらの遺伝子にはシステインに富む、メタロチオネイン様タンパク質をコードしているものがあるが、メタロチオネインは Al と結合せず、体内での無毒化には寄与できないことがわかっている (Putterill and Gardner, 1988)。一方、コムギにおいて Al ストレスによって誘導された *wali 4* 遺伝子の転写産物は、リグニン生合成におけるキーエンザイムであるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) と高い相同性があった (Snowden and Gardner, 1993; Varner and Lin, 1990)。Al によるこの遺伝子の誘導は、根の細胞の生長阻害の一因となる細胞壁のリグニン沈積を Al が引き起こすことと関連していると考えられる (Sasaki et al., 1996, 1997a)。同様に、Hamel et al. (1998) はコムギ根端から Al に制御されたいくつかの cDNA を単離し調査したところ、これらの遺伝子は外傷あるいは病原によって誘導される細胞壁の強化に関わる酵素と相同性が高く、これらの酵素の発現量増加が Al 排除に貢献する可能性があることを推察した。しかしながら、この細胞壁の強化は細胞の生長を妨げる一因ともなり、また、Al 耐性を異にする 2 品種が同程度に根の生長を阻害されるようなそれぞれの Al 濃度において、各遺伝子の発現量に差がないことから、むしろこれらの遺伝子は Al 耐性よりも Al 毒性に、すなわち細胞の生長が妨げられることによる根の伸長阻害に関わっている可能性が高いとも述べている。Cruz-Ortega et al. (1997) は Al 処理したコムギ Al 感受性品種の根において 1, 3- β -グルカナーゼをコードする遺伝子が誘導されることを示した。先に述べたように、Al 処理によってカロース (1, 3- β -グルカンポリ

マー) 合成が促進されるが、このカロースの代謝回転に 1, 3- β -グルカナーゼが関わっているのではないかという見方もある (Hamel et al., 1998)。

Al ストレスによって誘導されるタンパクについても様々な報告がなされている。Aniol (1984) は低濃度の Al で前処理することにより、コムギの Al 耐性が強化され、タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドでこの耐性の発現は抑制された。さらに、半致死濃度の Al とともに ^{14}C バリンと ^3H チミジンを与えると、これらの根中への取り込みが顕著に促進されたため、何らかのタンパク合成が Al 耐性の獲得に関わっている可能性が示唆された。Basu et al. (1994a) は Al 処理をしたコムギ根のミクロソーム膜タンパクを SDS-PAGE で調査したところ、Al 耐性品種において 51kD のタンパクが誘導されることを認め、耐性品種における Al 排除機構と関わっているのではないかと推察した。さらに彼らは根から分泌されるタンパク質と Al 耐性の関係についても調査している。Al 耐性コムギ品種の Atlas 66 と Maringa では、50-75 μM の Al 処理後 72 時間で根の分泌液の SDS-PAGE においていくつかの新たなバンドが現れたが、Al 感受性品種の Roblin と Katepwa では同様に 100 μM まで Al 処理しても泳動パターンに変化はなかった (Basu et al., 1994b)。また、この分泌液を限外ろ過で 10kD 以上とそれ以下に分けたところ、10kD 以上の画分の単位タンパク量当たりの Al の量は Al 感受性品種よりも Al 耐性品種で 2 倍多く、プロテアーゼによる分解でその約 70% の Al が放出されたことから、何らかの Al 結合タンパクが根圏に放出されていることが示唆された (Basu et al., 1994b)。また、彼らは Al 耐性品種 Maringa と Al 感受性品種 Katepwa を三回戻し交配することにより、耐性が一つの優勢遺伝子によって制御されていると推定される耐性を持つ同質系統 (Alikat) を得た (Basu et al., 1997)。この Alikat の半数倍加体と Katepwa の半数倍加体の交配により得られた Al 耐性を持つ F_2 plant は、いくつかの低分子ポリペプチドを根圏に分泌し、そのうち一つのポリペプチド (23kD) は Al 結合能を持っていることが示された (Basu et al., 1997)。彼らの行った、根圏への Al 結合能を持つポリペプチドに関する報告は、有機酸の分泌と同様に Al 排除と深く関わる可能性が

強いが、ポリペプチドは有機酸と比較して分子量が非常に大きいため、その分子量に見合った Al 結合能がなければ、たとえ植物に対して遺伝子導入を行ったとしても効果はそれほど期待できない。

(4) 根圏の pH 変化能とアルミニウム耐性の関係

酸性条件における Al は pH の上昇とともに沈殿し無毒となるため、以前から植物の Al 耐性と根圏の pH 変化能に関して広く研究がなされてきた (Foy et al., 1978)。しかし、多くの報告において Al 耐性と根圏の pH 変化の間の明白な関係は示されていない (Wagatsuma and Yamasaku, 1985; Miyasaka et al., 1989; Foy et al., 1972; Clark, 1977)。これらの報告における実験のほとんどでは、培養液の pH を調節し、一定にした条件で生育に対する Al の影響が調査されている。一方、Al 耐性を異にするコムギ品種を供試して pH を調節しない条件でそれらの生育におよぼす Al の影響を調査したところ、培地の pH 低下と Al による生育阻害の間に正の相関がみられた (Foy et al., 1965; Mugwira and Elgawhary, 1979)。また、Degenhardt et al. (1998) は *Arabidopsis thaliana* の変異株である *alr-104* の根端付近の pH 上昇が根の Al 吸収量を減少させ、Al 耐性を増進させることを示した。さらに、培養液に緩衝液を用いると Al 耐性が弱くなった。これらの結果から、根圏の pH 上昇は Al 耐性戦略の一つとして有効であることは明らかである。

(5) 根におけるアルミニウムの集積とアルミニウム耐性の関係

品種間における根の Al 集積量の違いは、Al 耐性に関わっていると考えられており、Al 耐性のスクリーニングにも応用されている (Polle et al., 1978)。このことは種間にもある程度当てはまる。但野と田中 (1985) は 2ppm Al を含む培養液で 10 日間培養した植物の根先端 2mm の横断面における Al の分布を XMA により調査した。その結果、Al 耐性種であるイネでは Al は表皮にのみ認められ、皮層、内皮、および中心柱では確認されなかった。一方、Al 感受性種であるオオムギでは、表皮の Al 集積量はイネよりも多く、さらに皮層中央および内皮にも Al は高濃度で確認された。しかしながら、やはり中心注では Al は確認されな

かった。この結果はイネでは表皮が、オオムギでは内皮が Al の移行を妨げる障壁になっていることを示唆する。では、構造的には何が Al をブロックしているのでしょうか。カスパリー帯は細胞壁の二次壁の一種であり、スベリンなどの疎水性の物質でできており、イオンのアポプラスティックな移動を妨げる（唐原, 1994, Zimmermann and Steudle, 1998）。以前はカスパリー帯は内皮にのみ存在すると考えられていたが、現在は多くの被子植物で表皮と皮層の間にも存在することがわかっている（Peterson, 1988）。おそらく、このカスパリー帯が Al の移動を妨げている障壁となっていると考えられる。事実、イネと同様に根の表皮でのみ Al が認められたトウモロコシでは（Rasmussen, 1968）、表皮と皮層の間にカスパリー帯が確認されている（Peterson, 1988）。これらの結果をふまえると、根の Al 集積性、さらには Al 耐性と表皮下のカスパリー帯の存在の間に相関がある可能性がある。

根の細胞に毒性の強い Al イオン種を近づけない能力、すなわち Al 排除能には、このような構造的な違いの他に、前述した根からの有機酸の放出能が大きく関与していると考えられている。しかし、有機酸の放出能はコムギ等の限られた種の品種間では Al 耐性と対応しているが（Delhaize et al., 1993b）、種間での対応は認められていない（石川ら, 1998）。このため、植物種間の Al 耐性および Al 排除能の違いを決定している要因は、有機酸以外であると予想される。この有機酸以外の要因が、根細胞の構造的なものであるのか、それともその他の要因によるものなのか、今後解明すべき課題である。

(6) シンプラストにおけるアルミニウム耐性

先に述べたように、Al は処理後 30 分以内にシンプラストに到達する（Lazof et al., 1994）。シンプラスト内での Al は様々なオルガネラ等と結合し、代謝を阻害する可能性がある。それを防ぐ戦略の一つとして、液胞への Al の隔離が考えられている。Kasai et al. (1992, 1993) は 20 および 50 μ M Al で 1 日処理したオオムギ根の液胞膜画分の PPI-および ATP 依存型 H^+ pump の活性が Al 無処理の

ものと比べて上昇し、この上昇が Al 処理によるアブシジン酸 (ABA) の上昇と大きく関わっていると考察した。この液胞膜 H^+ pump の活性上昇は、培地から流入してくる H^+ や Al を液胞中に隔離する機構と関連しているのかも知れない。実際、Al 添加処理によって根の細胞中で液胞化が進むことが報告されている (Ikeda and Tadano, 1993; Marienfeld et al., 1995)。

もう一つの Al 毒性を軽減する戦略として、Al を体内でキレートさせるという手段が考えられる (Marschner, 1991)。Webb (1953) は Al 集積植物であるモクマオウの一種の心材にコハク酸アルミニウムの塊状沈積物が存在することを報告し、Al 集積植物が体内で高濃度の Al を沈殿形態あるいはキレート形態にすることで無毒化していることを示唆した。同じく Al 集積能の高いアジサイはその花において Al と delphinidin 3-glucoside と 3-caffeoylquinic acid が複合体を形成していることが推定されている (Takeda et al., 1985ab)。ここ数年は他核 NMR 技術によって、チャでは Al-カテキンキレートが (Nagata et al., 1992, 1993)。アジサイでは Al-クエン酸キレートが (Ma et al., 1997d)、ソバでは Al-シュウ酸キレートが (Ma et al., 1997c)、それぞれの葉に存在する Al の主形態であると報告されている。キレートした Al は植物に対する生理毒性が低下することは先に述べたとおりであるので、これらの植物は Al をキレートさせることによりその毒性を回避していると考えられる。一方で、Al 非集積植物の根における有機酸含有率と Al 耐性の間に相関がみられなかったことから (de Andrade et al., 1997; Pellet et al., 1995; Foy et al., 1990; Delhaize et al., 1993b)、体内での有機酸による Al 毒性の軽減は主に Al 集積植物で行われているものと思われる。

(7) 根圏のケイ酸イオンとの関係

ケイ素 (Si) による Al 毒性の軽減効果を最初に明らかにしたのは動物学における研究であった。動物において Al は神経毒を持ち、アルツハイマー型痴呆症のような様々な疾患の要因ではないかと考えられているが、ラットの餌に Si を添加することにより Al 吸収が抑制されることが明らかとなり、Al による魚の

えら機能障害も、溶液に Si を添加することで Al 吸収が減少し、改善されることが示された (Birchall, 1992)。これらの結果を受けて、ここ数年の間に植物における Al と Si の関係を調査した研究も多くの植物種に関して報告されている (テオシント ; Barcelo et al., 1993、ソルガム ; Hodson and Sangster, 1993、ダイズ ; Baylis et al., 1994、オオムギ ; Hammond et al., 1995、トウモロコシ ; Ma et al., 1997e)。これらの報告はいずれも培地への Si 添加が植物に対する Al 毒性を軽減する能力を持つことを示すものであった。Al を含む培地に Si を添加すると、根の Al 含有率は Si 無添加処理のものと比べて低下した (Barcelo et al., 1993; Hammond et al., 1995)。さらに、Al によって引き起こされた Ca 吸収の低下も、Si の添加で回復した (Hammond et al., 1995)。これらの Al 毒性の軽減は溶液中あるいは根の内部で Si が Al と複合体を形成し、Al を無毒化したためと説明されている。例えば、Si は Al と表皮で共沈することで、皮層への Al の浸入を防ぎ (Hodson and Sangster, 1993)、溶液中の Al^{3+} 濃度は Si 添加処理により低下することが報告されている (Ma et al., 1997e)。一方、Cocker et al. (1998) はコムギを用いた実験で、Si は Al 毒性を軽減したが、Si は培養液中の毒性を持つ Al イオン種を減少させることも根の Al 吸収を減少させることもなかったと報告した。また、Al 処理下で培地にクエン酸を添加すると Al 処理によって誘導されたコムギ根からのリンゴ酸の放出量が低下したが、Si 添加では影響されなかったことから、有機酸 (この実験ではクエン酸) による Al 毒性の軽減効果と Si による Al 毒性の軽減効果は本質的に違う、つまり、植物体内での軽減効果が主体ではないかと考察した。もしそうであるなら、ケイ酸吸収特性と Al 耐性の間に何らかの関係があるかも知れない。

第3節 本研究の目的

前節で述べたように、酸性土壌は植物の生育を大きく制限する Al イオンを多く含む。さらに熱帯、亜熱帯の酸性土壌は酸性が強く、貧栄養であるものが

多く、植物の生育条件としては相当厳しい。しかし、強酸性土壌においても様々な種の植物が旺盛に自生している。これらの種は一般の作物と比較して Al 耐性および養分獲得能がはるかに優れていると考えられる。また、酸性土壌に適応した植物の中には多くの Al 集積植物が存在する。先に述べたように、一般に Al 集積植物とは地上部に $1,000 \text{ mg kg}^{-1}$ 以上の Al を集積する植物のことを指し (Chenery, 1948a)、多くが木本植物である (Cuenca et al., 1990; Geoghegan and Sprent, 1996; Golley et al., 1980ab; Haridasan, 1982; Osaki et al., 1995, 1998)。特に熱帯の Al 集積植物種には葉に $10,000 \text{ mg kg}^{-1}$ 以上の Al を集積するものも少なくなく、Al 過剰に対する独自の適応機構を持つことが予想されている。

これらの酸性土壌に適応した植物種の Al 耐性機構に関する生理的な研究はこれまでほとんどなされることはなかったが、ごく最近になって、いくつか報告され始めている。Osawa et al. (1997) は熱帯、亜熱帯に広く生育するマメ科の木本種である *Paraserianthes falcataria* と *Acacia mangium* の根圏へのクエン酸放出が Al 処理によって誘導されていることを示した。また、Li et al. (1997) は熱帯の有効態リン酸の極めて少ない酸性土壌に生育する *Stylosanthes* 種および *Brachiaria* 種が、リン酸欠乏下において根圏にフィターゼあるいは酸性フォスファターゼを多量に分泌することを示し、これがリン酸獲得に貢献している可能性を考察した。また、Al が生育に対して有益な効果をもたらすということが酸性土壌に生育する種を用いた実験でしばしば報告されている (第2節-I(4)参照)。Al 集積植物に関する研究も先に述べた Ma et al. (1997cd, 1998) の報告をはじめとして、最近注目されている分野である。しかしながら、植物と Al の関係を調査した研究全体では、酸性土壌に生育する植物の耐酸性機構に関する情報は未だ少なく、ほとんどは未解明のままである。

そこで本論文では、強酸性土壌に適応した各種植物の Al あるいはその他の酸性土壌における生育制限要因に対する栄養生理的特性を一般の作物と比較することにより解明し、これらの植物の酸性土壌適応機構の解明を試みた。まず第2章では、強酸性土壌適応植物の生育と養分吸収に対する Al 添加の影響を調

査した。第3章では、その吸収に関して拮抗的な関係があると考えられている Al と Ca の相互作用が強酸性土壌適応植物に与える影響を調査し、Al が Ca の代替性を持つかどうかにも検討した。また、強酸性土壌では一般に硝酸化成作用が抑制されるため、アンモニウム態窒素 ($\text{NH}_4\text{-N}$) が主な有効態窒素源となる。そこで、第4章では強酸性土壌適応植物の $\text{NH}_4\text{-N}$ に対する適応性を調査した。最後の第5章では Al 吸収能の高い *Melastoma malabathricum* の Al 吸収・集積特性を解析し、Al 集積植物の Al 過剰に対する適応機構について検討した。

第2章 強酸性土壌に適応した各種植物の生育に 対するアルミニウムおよびpHの影響

第1章でも述べたように、酸性土壌において植物の生育を制限する主要因は土壌の酸性化によって溶出するアルミニウム (Al) イオンの影響であり、土壌溶液の pH が 4.5 以下になると、可溶性 Al の主な形態は植物にとって最も有害な形態とみなされている Al^{3+} となる。一方、通常の作物が生育できないような強酸性土壌でも旺盛に自生する植物種は数多く存在し (Cuenca et al., 1990; Geoghegan and Sprent, 1996; Golley et al., 1980ab; Haridasan, 1982; Osaki et al., 1995; 1998)、Al に対する何らかの適応戦略を獲得していると思われる。しかしながらこれらの種の Al 適応機構についてはほとんど明らかとなっていない。また、酸性土壌では H^+ 過剰も植物の生育を阻害する要因であるが、一般作物を用いた実験で H^+ 毒性は Al 毒性と相互作用することが示唆されている (Kinraide, 1993; Llugany et al., 1995; Staß and Horst, 1995)。そこで、本章では酸性土壌、特に強酸性土壌に適応した各種植物と、一般の作物種の生育に対する Al と低 pH の影響の比較、解析を行った。

第1節 生育と養分含有率に対するアルミニウムの影響

実験方法

育苗

温室で、メラストーマ (*Melastoma malabathricum* L.)、メラルーカ (*Melaleuca cajuputi* Powell)、*A. mangium* (*Acacia mangium* Willd.)、ロイカイナ (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit)、アジサイ (*Hydrangea macrophylla* (Thunb. ex Murr.) Ser.)、クランベリー (*Vaccinium macrocarpon* Ait. var. Howes)、ルジグラス (*Brachiaria ruziziensis* Germ. & Evrard)、*I. barbatum* (*Ischaemum barbatum* Retz.)、*S. guianensis* (*Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.)、オオイタドリ (*Polygonum sachalinense* Fr. Schmidt)、ソバ (*Fagopyrum esculentum* Moench.)、イネ (*Oryza sativa* L. var. Michikogane)、およびオオムギ (*Hordeum vulgare* L. var. Kitamihadaka および Manriki)を育苗した。供試した各種植物に関する説明を Table 2-1 に示した。

Table 2-1 実験に供試した植物の特性

メラストーマ(<i>Melastoma</i>)	熱帯および亜熱帯の泥炭土壌、酸性土壌に広く繁殖する木本植物。
メラルーカ(<i>Melaleuca</i>)	熱帯アジアからオーストラリアに分布、枝葉からとれるカユプテ油は香料や鎮痛剤として広く利用される。泥炭土壌、酸性硫酸塩土壌、および貧栄養土壌に適応。
<i>A. mangium</i>	成長速度が速く、熱帯の植林に利用されているマメ科の木本植物。貧栄養、酸性土壌に強い。木材として利用される。
ロイカイナ(<i>Leucaena</i>)	亜熱帯地域などで植えられ、繁殖が旺盛なマメ科木本植物。乾燥させた葉は肥料や飼料にも使われる。
アジサイ(<i>Hydrangea</i>)	Al集積植物として知られ、Alによって花が青色化する。
クランベリー(<i>Cranberry</i>)	耐酸性は強く、実は食用。
ルジグラス(<i>Ruzigrass</i>)	イネ科の熱帯牧草。貧栄養に強く、成長速度が早い。
<i>I. barbatum</i>	イネ科の雑草。熱帯の酸性硫酸塩土壌等に生育。
<i>S. guianensis</i>	マメ科の熱帯牧草。
オオイタドリ(<i>Polygonum</i>)	北海道の酸性土壌で旺盛に生育。
ソバ(<i>Buckwheat</i>)	耐酸性は中程度。若干のAl集積性を持つ。
イネ(<i>Rice</i>)	耐酸性は強い。Al排除能に優れる。
オオムギ(<i>Barley</i>)	典型的なAl感受性種。

発芽と育苗はアジサイとイネ以外は種子を 1%次亜塩素酸ナトリウムで 10 分間表面殺菌後、脱塩水でよく洗浄し、パーライトまたは水ごけに播種し、処理開始に適するまでときどき培養液を与えながら育苗した。アジサイは北海道

大学附属植物園にて採取した新芽をバーミキュライトに挿し木し、発根した個体を実験に用いた。イネは同様に種子を殺菌後、培養液を満たしたバットに浮かせたサランネット上に播種し、育苗した。各幼植物が水耕に適する大きさになった後、標準培養液（Table 2-2, pH5.0）を入れた 56L 水槽に移植し地上部の高さが約 10～15cm になるまで前培養を行った。

Table 2-2 Standard composition of culture solution.

Elements	Concentration (mg element L ⁻¹)	Reagent
Major element		
N	30	NH ₄ NO ₃
P	10	NaH ₂ PO ₄
K	30	K ₂ SO ₄ (15mg L ⁻¹ -K) KCl (15mg L ⁻¹ -K)
Ca	50	CaCl ₂ •2H ₂ O
Mg	20	MgSO ₄ •7H ₂ O
Minor element		
Fe	2	FeSO ₄ •7H ₂ O
Mn	0.5	MnSO ₄ •4H ₂ O
B	0.5	H ₃ BO ₃
Zn	0.2	ZnSO ₄ •7H ₂ O
Cu	0.01	CuSO ₄ •5H ₂ O
Mo	0.005	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O

Al 処理

各処理それぞれ 8 個体ずつ（アジサイと *A. mangium* は 6 個体）を自動 pH 調節装置付き 360L 水槽に移植し、処理を開始した。培養液は継続的に通気し、さらにポンプ（Iwaki Magnet Pump; 8 L min⁻¹）によって攪拌した。処理は Al 無添加区、3 mg L⁻¹ Al（低 Al 区）、および 15 mg L⁻¹ Al（高 Al 区）の 3 処理を設定した。これらの処理培養液は P と Al を除いた標準培養液に適当量の Al₂(SO₄)₃ と NaH₂PO₄を加え、溶存する Al イオン濃度が所定のものとなり、かつ処理区間で溶存 P 濃度（0.6～1.0mg L⁻¹）と pH（4.0±0.1、NaOH と H₂SO₄を加え調節）が等しくなるように長期間（2 週間）かけて調節し、平衡化させたものである（田中ら, 1981）。培養液は随時、その組成要素を測定し、不足分を補った。各植物をそれぞれの生長速度にあわせて 2～4 週間処理した後、根を十分に脱塩水で洗浄し、根、茎、および葉（若葉、古葉）に分けた。各試料を 80℃で通風乾燥

した後、乾物重を測定し、粉砕した。

化学分析

窒素はセミマイクロケルダール法で分析した。その他の元素分析を行うため、約 500mg の粉砕試料を秤量し、混酸 ($\text{HNO}_3:\text{HClO}_4:\text{H}_2\text{SO}_4=5:2:1$) にて湿式灰化した。湿式灰化後、P はバナドモリブデン酸イエロー法により、K と Na は炎光度法により、Ca、Mg、Cu、Zn、Mn、Fe、および Al は原子吸光法により、それぞれ測定した。

結果

生育

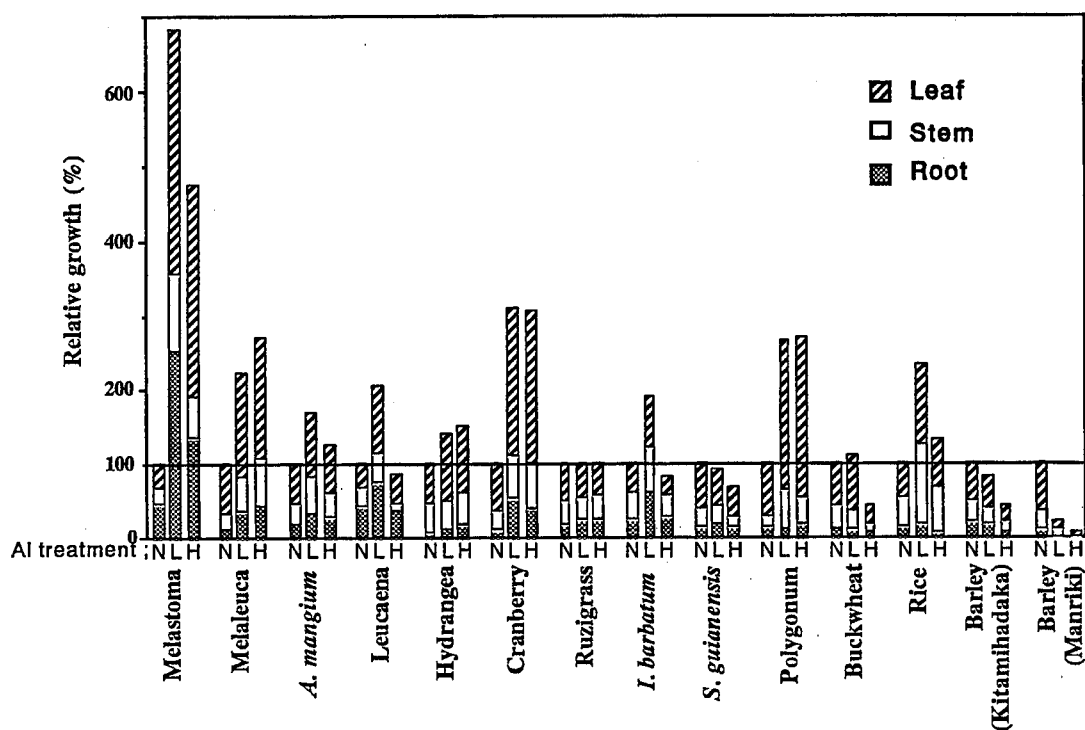


Fig. 2-1 Relative growth (growth rate in Al treatment/growth rate in non Al treatment) in Al treatment. N; no Al, L; 3mg L⁻¹ Al, H; 15mg L⁻¹ Al.

処理期間の生長量を N 処理に対する相対生長量として Fig. 2-1 に示した。
メラストーマ、メラルーカ、*A. mangium*、アジサイ、クランベリー、オオイタ

Melastoma malabathricum



non Al 15mg L⁻¹ Al

Melaleuca cajuputi



non Al 3mg L⁻¹ Al 15mg L⁻¹ Al

Ischaemum barbatum



non Al 3mg L⁻¹ Al 15mg L⁻¹ Al

Acacia mangium



non Al 3mg L⁻¹ Al 15mg L⁻¹ Al

Stylosanthes guianensis



non Al 3mg L⁻¹ Al 15mg L⁻¹ Al

Oryza sativa L. var. Michikogane



non Al 3mg L⁻¹ Al 15mg L⁻¹ Al

Hordeum vulgare L. var. Manriki



non Al 3mg L⁻¹ Al 15mg L⁻¹ Al

Fig. 2-2 Photograph of plants after the Al treatments.

ドリ、およびイネの生育はAl添加によって促進され、高Al区でもAl無添加区より生育が良好であった。ロイカイナ、*I. barbatum*、*S. guianensis*、およびソバの生育は低Al区では促進されたが、高Al区ではAl無添加区よりも低下した。メラストーマ、メラルーカ、*A. mangium*、および*I. barbatum*の根はAl添加により白色を呈し、健康な状態を示したが、Al無添加区では褐色を呈し、側根の発達も不良であった（Fig. 2-2）。ルジグラスの生育はAl処理の影響をほとんど受けなかったが、処理期間における乾物生産量は非常に大きかった（データは示していない）。オオムギの生育は培地のAl濃度に比例して低下し、その割合はManrikiのほうで大きかった。

元素含有率

Al添加区における多くの植物種の葉のAl含有率は数百 mg kg⁻¹以下であったが、メラストーマ、アジサイ、およびソバのAl含有率は地上部、根部ともに他の種と比べて高かった（Table 2-3）。一方、クランベリーとルジグラスでは、根のAl含有率は10,000 mg kg⁻¹を超え、非常に高かったが、地上部のAl含有率は低かった。

メラストーマ、メラルーカ、*A. mangium*、ロイカイナ、アジサイ、クランベリー、ルジグラス、*I. barbatum*、オオイタドリ、およびイネにおけるN、P、およびK含有率はAl添加によって上昇し、特にメラストーマのP含有率で顕著であった。高Al区でもメラストーマ、メラルーカ、アジサイ、クランベリー、およびオオイタドリは高い生長量を維持したが（Fig. 2-1）、N、P、およびK含有率もまた高い値を維持した。*S. guianensis*、ソバ、およびオオムギのN、P、およびK含有率は各部位でAl添加によって変わらない、あるいは低下した。特にオオムギのManrikiでは、根のK含有率がAl添加により著しく低下した（Table 2-3）。

各部位のCaおよびMg含有率は概してAl添加によって低下する傾向があり、メラストーマ、ロイカイナ、ルジグラス、オオイタドリ、およびソバの若葉の

Ca 含有率は Al 添加により約 1/2 にまで低下した。しかしながら、強酸性土壤に生育する各種植物の葉に Ca 欠乏症状は現れなかった (Fig. 2-2)。一方、メラルーカ、アジサイ、クランベリー、*I. barbatum*、および *S. guianensis* の Ca と Mg 含有率、ルジグラスとオオイタドリの Mg 含有率は Al 添加によってもあまり低下することはなく、むしろ上昇する場合があった。

Table 2-3a Concentrations of Al, N, and P in each organ of plants grown in the Al treatments*.

Species	Organs	Al(mg kg ⁻¹)			N(mg g ⁻¹)			P(mg g ⁻¹)		
		N	L	H	N	L	H	N	L	H
Melastoma	Leaf Young	186	817	1395	12.1	35.0	36.8	0.6	3.4	3.6
	Old	227	605	591	11.1	23.4	20.4	0.4	1.9	1.5
	Root	351	5577	7221	13.5	15.6	13.4	1.5	7.5	4.7
Melaleuca	Leaf Young	48	55	48	38.4	47.1	58.5	2.0	2.9	3.6
	Old	49	179	160	25.2	41.9	49.7	0.9	2.3	2.1
	Root	148	1034	364	17.0	24.4	20.2	0.9	4.1	3.6
<i>A. mangium</i>	Leaf Young	trace	27	26	46.5	46.3	47.9	2.7	2.7	2.5
	Old	45	280	111	39.7	43.7	41.3	1.8	2.0	1.8
	Root	trace	751	343	36.8	38.0	34.0	3.9	4.7	3.2
Leucaena	Leaf Young	trace	35	68	46.6	68.1	63.2	2.2	4.3	4.9
	Old	trace	140	186	31.1	54.7	51.5	1.2	3.0	2.5
	Root	84	1000	2495	18.8	33.9	29.8	1.3	4.6	4.1
Hydrangea	Leaf Young	-	306	597	-	44.2	38.8	-	5.7	3.8
	Old	508	736	761	24.1	35.1	39.3	2.2	4.6	3.8
	Root	10351	7037	12118	16.6	33.2	32.1	2.8	5.2	6.2
Cranberry	Leaf Young	trace	72	75	11.5	28.8	31.0	1.6	2.3	2.3
	Old	trace	218	145	11.6	23.0	24.0	2.3	2.6	2.6
	Root	267	12351	2284	11.3	23.2	25.5	2.8	22.3	10.2
Ruzigrass	Leaf Young	trace	81	60	40.5	46.0	46.2	5.4	10.0	10.9
	Old	trace	98	121	33.6	41.5	40.7	5.6	15.4	16.6
	Root	170	5706	13260	27.0	26.4	26.3	3.6	11.6	14.9
<i>I. barbatum</i>	Leaf Young	trace	165	203	48.0	52.4	51.7	4.3	7.3	6.4
	Old	29	119	395	43.5	51.5	47.9	4.9	9.5	8.0
	Root	24	4054	1253	19.0	18.2	19.2	2.9	10.7	3.7
<i>S. guianensis</i>	Leaf Young	74	61	146	57.4	58.1	59.3	11.4	11.0	7.7
	Old	24	92	216	44.3	44.3	48.5	11.1	10.1	6.8
	Root	180	886	890	30.3	32.7	37.7	8.2	12.5	6.4
Polygonum	Leaf Young	57	120	163	46.3	59.3	55.9	3.3	7.6	5.6
	Old	151	352	285	27.0	42.5	44.3	1.8	9.8	5.1
	Root	412	6499	3213	18.6	25.1	23.8	2.3	11.0	9.0
Buckwheat	Leaf Young	105	216	542	46.1	48.4	50.0	3.7	5.9	4.3
	Old	209	624	1568	36.7	45.8	46.8	2.2	5.4	3.8
	Root	2149	14296	11869	32.7	40.8	30.1	4.0	12.1	12.5
Rice	Leaf Young	trace	trace	44	39.8	50.0	48.6	3.2	6.4	6.1
	Old	trace	trace	63	42.2	47.0	46.4	2.9	6.3	6.2
	Root	215	1512	1577	19.9	29.5	27.7	2.0	9.2	7.9
Barley (Kitamihadaka)	Leaf Young	trace	trace	trace	48.4	48.3	46.1	1.5	3.7	3.7
	Old	trace	107	144	39.3	41.9	34.1	2.6	2.2	2.7
	Root	276	1157	1395	26.2	25.4	23.9	4.4	4.7	4.3
Barley (Manriki)	Leaf	trace	trace	165	51.9	34.9	40.5	4.1	2.2	3.1
	Root	131	2098	4103	27.4	20.4	17.3	2.1	9.9	5.1

*N; no Al, L; 3mg L⁻¹ Al, H; 15mg L⁻¹ Al.

Table 2-3b Concentrations of K, Ca, and Mg in each organ of plants grown in the Al treatments*.

Species	Organs	K(mg g ⁻¹)			Ca(mg g ⁻¹)			Mg(mg g ⁻¹)		
		N	L	H	N	L	H	N	L	H
Melastoma	Leaf Young	16.2	20.9	22.8	20.3	12.1	8.4	4.1	3.8	3.3
	Old	22.1	17.8	23.6	21.3	17.0	19.0	5.3	4.3	3.9
	Root	6.3	39.8	29.1	9.0	3.5	3.3	4.7	3.8	4.4
Melaleuca	Leaf Young	12.1	17.2	14.6	4.1	7.0	7.0	3.8	4.4	4.5
	Old	9.7	18.8	13.6	5.5	9.2	6.1	4.2	4.8	3.8
	Root	6.9	10.7	13.8	3.3	2.5	2.9	1.6	1.3	1.2
<i>A. mangium</i>	Leaf Young	16.8	18.5	20.3	6.6	6.3	4.8	2.7	2.8	2.2
	Old	19.2	19.0	24.6	8.7	11.5	7.5	5.0	3.6	3.2
	Root	24.2	22.6	27.7	6.5	3.8	2.8	2.1	3.0	1.8
Leucaena	Leaf Young	17.1	27.7	23.7	7.7	6.8	3.7	3.1	2.5	2.4
	Old	15.2	28.6	27.8	14.2	15.5	7.8	4.9	5.0	3.3
	Root	16.2	29.8	25.1	2.0	1.5	1.4	1.7	1.3	1.4
Hydrangea	Leaf Young	—	33.3	24.6	—	8.4	8.1	—	2.4	2.4
	Old	19.0	35.1	29.3	8.4	10.2	7.9	2.4	2.6	2.3
	Root	19.3	25.0	21.2	7.6	6.0	5.3	11.2	5.2	7.6
Cranberry	Leaf Young	5.8	7.4	7.3	3.2	4.7	3.9	1.4	1.9	1.8
	Old	7.1	7.7	7.2	5.8	8.7	6.0	1.9	2.4	2.0
	Root	3.3	6.4	4.8	2.8	3.0	1.7	0.9	0.6	0.1
Ruzigrass	Leaf Young	50.1	55.5	61.4	4.2	1.9	2.1	3.4	3.6	3.7
	Old	50.3	58.4	57.7	10.6	5.5	5.3	9.1	9.0	8.4
	Root	30.4	35.7	33.8	1.4	1.8	1.7	5.0	6.6	5.3
<i>I. barbatum</i>	Leaf Young	24.8	29.3	22.9	4.2	7.6	5.5	2.1	3.7	1.8
	Old	19.9	27.8	14.2	9.4	12.7	10.3	4.2	5.0	2.6
	Root	17.8	20.5	17.5	2.9	3.1	2.2	1.6	3.3	2.0
<i>S. guianensis</i>	Leaf Young	34.8	30.6	29.6	21.0	26.5	18.4	3.4	3.8	3.4
	Old	24.3	18.5	17.5	26.1	18.3	27.1	4.0	4.5	4.3
	Root	40.9	46.4	29.9	5.2	4.9	4.6	6.9	4.2	3.3
Polygonum	Leaf Young	67.3	75.9	66.3	6.1	3.4	2.7	3.8	3.5	2.9
	Old	56.4	71.7	68.3	14.3	9.8	9.4	7.4	6.4	6.2
	Root	20.8	39.9	34.9	6.3	3.2	4.3	2.8	2.8	2.2
Buckwheat	Leaf Young	30.3	33.3	34.0	13.9	6.7	5.2	8.7	6.9	6.0
	Old	46.4	47.5	44.7	24.2	15.1	17.2	15.8	12.2	11.9
	Root	22.7	12.9	11.8	4.3	4.4	2.7	7.2	3.8	4.9
Rice	Leaf Young	27.2	30.3	28.8	1.8	1.5	1.3	2.2	1.9	1.5
	Old	20.0	22.1	20.0	3.3	3.3	3.4	1.8	1.9	1.4
	Root	15.6	26.9	25.4	1.4	1.0	1.1	1.7	1.4	0.9
Barley (Kitamihadaka)	Leaf Young	85.1	73.6	81.8	2.9	2.0	0.9	2.0	1.5	1.0
	Old	61.3	59.0	59.8	6.8	5.2	4.2	5.5	3.8	3.2
	Root	24.6	33.6	23.6	4.2	5.0	1.7	1.9	0.9	0.3
Barley (Manriki)	Leaf	41.3	17.6	22.3	6.8	7.9	7.6	6.8	7.1	8.2
	Root	20.7	3.7	2.7	5.6	3.2	7.3	1.7	0.5	1.1

*N; no Al, L; 3mg L⁻¹ Al, H; 15mg L⁻¹ Al.

第2節 生育と養分含有率に対するpHの影響

実験方法

育苗

メラストーマ、メラルーカ、ロイカイナ、ルジグラス、オオイタドリ、*S. guianensis*、*I. barbatum*、ソバ、イネ、およびオオムギ (var. Manriki) を第1節と同様に育苗した。

pH 処理

幼植物体をそれぞれ12個体ずつ標準培養液を入れた15L培養槽に移植した。P濃度は 2mg L^{-1} とした。培養液のpH (3.5、4.0、4.5、5.0、5.5) は毎日測定し、NaOHと H_2SO_4 で調節した。培養液は10日毎に交換した。

各植物体を2週間のpH処理後、3~4個体ずつ3反復で採取した。採取後、第1節と同様に解体し、部位別の乾物重を測定した。

結果

S. guianensis では、pH5.5 から pH4.5 まではpH低下と共に生育は促進され、pH4.5 以下になるとpH低下と共に生育は阻害された (Fig. 2-3)。ロイカイナでは、pH5.5 から pH4.5 までは生育に変化なく、pH4.5 以下になるとpH低下と共に生育は阻害された。オオムギの生育はpHの低下に従って阻害された。他の種ではpH処理の影響はそれほど受けなかった。

NおよびP含有率はpH処理の影響をあまり受けなかった (Table 2-4)。一方、葉あるいは根のK含有率はpH3.5で他のpHよりも低下する傾向があった。同様にCaおよびMg含有率も低pH側で低い傾向があり、特に根において顕著であった。

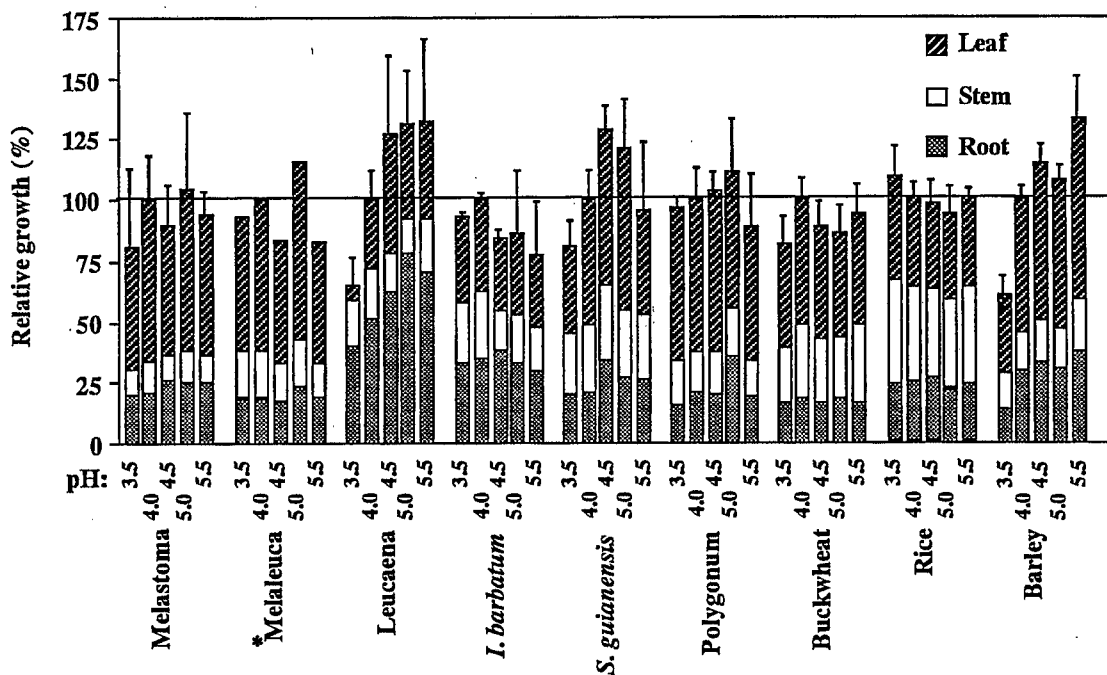


Fig. 2-3 Relative growth (growth rate in pH treatment / growth rate in pH4.0) in the pH treatment. The bars indicate the SE value. * shows no replication.

Table 2-4a Concentrations of N, P, and K in each organs of plants grown in pH treatment.

Species	Organs	N (mg g ⁻¹)					P (mg g ⁻¹)					K (mg g ⁻¹)				
		pH3.5	pH4.0	pH4.5	pH5.0	pH5.5	pH3.5	pH4.0	pH4.5	pH5.0	pH5.5	pH3.5	pH4.0	pH4.5	pH5.0	pH5.5
Melastoma	Leaf	44.9	43.4	42.7	46.6	42.7	2.8	2.7	2.6	2.6	2.4	14.1	20.9	18.9	19.2	19.3
	Root	29.9	25.1	26.4	32.6	28.3	11.2	12.1	11.3	12.2	10.5	42.5	36.7	47.2	49.8	42.2
Melaleuca	Leaf	45.6	47.4	48.5	47.2	47.2	2.1	2.7	2.3	2.2	3.2	14.8	17.5	15.9	17.9	15.3
	Root	23.0	24.1	26.5	23.7	27.8	6.6	3.2	11.2	8.9	9.3	8.8	13.7	14.1	18.6	16.0
Leucaena	Leaf	31.5	44.8	41.6	45.7	39.6	1.2	1.1	2.4	1.1	1.5	21.4	22.7	20.8	23.5	23.0
	Root	22.7	41.6	32.1	31.8	25.5	1.0	0.8	0.9	0.9	0.7	12.5	29.1	32.6	30.0	31.5
I. barbatum	Leaf	47.8	46.4	52.9	47.3	45.5	9.2	10.1	7.0	5.6	5.0	54.5	53.1	53.4	46.4	56.0
	Root	32.2	30.2	32.4	34.2	28.3	11.4	11.2	11.6	6.7	8.4	49.7	41.5	37.3	45.2	49.3
S. guianensis	Leaf	48.2	47.3	50.5	49.9	51.0	4.6	6.8	7.7	6.9	6.8	31.1	31.6	28.9	27.9	30.5
	Root	46.4	56.1	54.0	54.8	54.9	6.3	7.7	6.3	6.8	8.9	68.8	90.6	70.8	71.6	67.5
Polygonum	Leaf	36.1	37.5	39.6	38.2	36.6	8.6	10.0	12.8	10.4	7.4	36.6	42.0	42.2	41.9	36.6
	Root	29.6	25.1	28.9	29.2	24.8	14.6	9.8	14.1	11.1	11.6	20.6	22.1	22.6	22.4	23.3
Buckwheat	Leaf	60.1	60.4	59.8	63.2	60.8	4.7	6.6	3.8	5.1	4.9	39.0	49.1	46.9	49.0	44.8
	Root	40.6	41.5	40.3	42.7	43.2	13.2	8.4	22.2	9.5	8.7	27.1	39.7	24.7	34.3	34.0
Rice	Leaf	47.5	48.7	49.9	49.1	47.3	5.1	7.5	5.4	7.5	9.8	18.5	26.5	23.0	24.8	24.2
	Root	26.9	25.3	25.2	26.5	33.1	6.8	5.8	6.5	6.8	8.8	24.6	19.4	18.7	23.0	28.7
Barley	Leaf	56.6	59.6	58.1	64.4	63.5	3.7	3.6	4.5	4.3	3.9	42.6	49.8	57.9	55.8	56.5
	Root	30.3	38.6	39.3	39.5	41.1	5.0	4.8	4.9	5.5	4.9	22.9	27.3	29.4	38.0	34.4

第2章 強酸性土壤に適応した各種植物の生育に
対するアルミニウムおよびpHの影響

Table 2-4b Concentrations of Ca and Mg in each organs of plants grown in pH treatment.

Species	Organs	Ca (mg g ⁻¹)					Mg (mg g ⁻¹)				
		pH3.5	pH4.0	pH4.5	pH5.0	pH5.5	pH3.5	pH4.0	pH4.5	pH5.0	pH5.5
Melastoma	Leaf	7.7	9.0	7.7	8.9	10.5	4.6	4.5	4.1	4.8	6.3
	Root	1.8	2.0	3.3	2.9	3.5	6.4	7.6	8.4	10.4	9.7
Melaleuca	Leaf	6.4	6.0	6.0	7.0	7.2	7.8	6.7	7.6	7.4	7.7
	Root	1.7	2.1	2.7	2.7	3.3	2.2	1.8	1.7	1.4	2.0
Leucaena	Leaf	12.8	11.5	12.0	16.3	15.6	6.8	4.8	5.3	6.3	6.0
	Root	1.3	1.6	2.6	2.8	2.5	1.0	1.7	1.7	2.2	2.4
<i>I. barbatum</i>	Leaf	2.9	3.5	4.7	3.6	3.7	4.7	4.8	5.3	3.9	3.9
	Root	1.0	1.4	1.8	1.9	2.1	9.0	8.7	9.0	7.7	5.1
<i>S. guianensis</i>	Leaf	17.5	22.4	22.2	21.1	22.8	6.2	5.9	5.8	6.3	5.4
	Root	1.4	2.3	2.2	2.6	2.6	3.3	4.3	4.1	4.9	4.7
Polygonum	Leaf	7.1	6.3	8.6	8.9	7.1	10.0	9.5	10.0	9.1	9.3
	Root	4.7	5.2	6.7	4.8	5.8	5.1	7.0	6.8	7.0	7.2
Buckwheat	Leaf	10.3	8.5	11.8	11.8	16.1	15.4	14.8	15.9	16.3	17.8
	Root	3.8	3.2	4.0	4.1	4.8	3.2	4.3	3.7	6.8	7.0
Rice	Leaf	2.3	2.1	2.3	2.2	2.7	2.6	2.8	2.7	2.7	3.9
	Root	1.0	2.3	1.5	1.9	1.6	2.1	2.3	2.4	2.2	2.4
Barley	Leaf	3.1	4.1	2.8	4.7	4.7	2.5	2.9	2.5	2.9	2.6
	Root	0.7	1.2	1.1	1.2	1.0	0.6	1.0	0.8	0.9	1.0

第3節 養分が共存しない条件下でのアルミニウムの影響

実験1 養分無添加培養液においてAlが生育におよぼす影響

実験方法

育苗

メラストーマ、メラルーカおよびオオムギの種子を第1節と同様に発芽させ、育苗した。

処理

育苗後、標準培養液 ($P=10\text{mg L}^{-1}$) を入れた 56L 培養槽に移植し、2週間培養して十分に養分を吸収させた後、処理を開始した。処理として Al 無添加区、 1.5mg L^{-1} Al 区 (低 Al 区)、 6mg L^{-1} Al 区 (高 Al 区) の3区を設定した。これらの処理培養液には脱塩水を使用し、Al 処理に用いた $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ と pH の調節に用いた NaOH と H_2SO_4 以外は何も添加しなかった。56L の培養槽で1週間の処理した後、6個体ずつ採取し、脱塩水で根をよく洗浄した後、部位別に分け、 80°C で2日以上通風乾燥した。乾燥後、乾物重を測定した。

実験2 根分け実験においてAlが生育におよぼす影響

実験方法

育苗

メラストーマ、メラルーカ、およびオオムギ (var. Manriki) を温室で育苗した。育苗法は第1節に準ずる。

処理

Fig. 2-4 に示すように、1.5L 容のポットの内部をビニール袋を用いて二つに分けて根分け実験を行った。それぞれの植物の根を、ほぼ同量ずつになるように分け、ビニールチューブで固定した。一方の根は標準培養液 (Al は含まず)

に浸し、もう一方の根は養分を加えない+Al 処理液あるいは−Al 処理液に浸した。

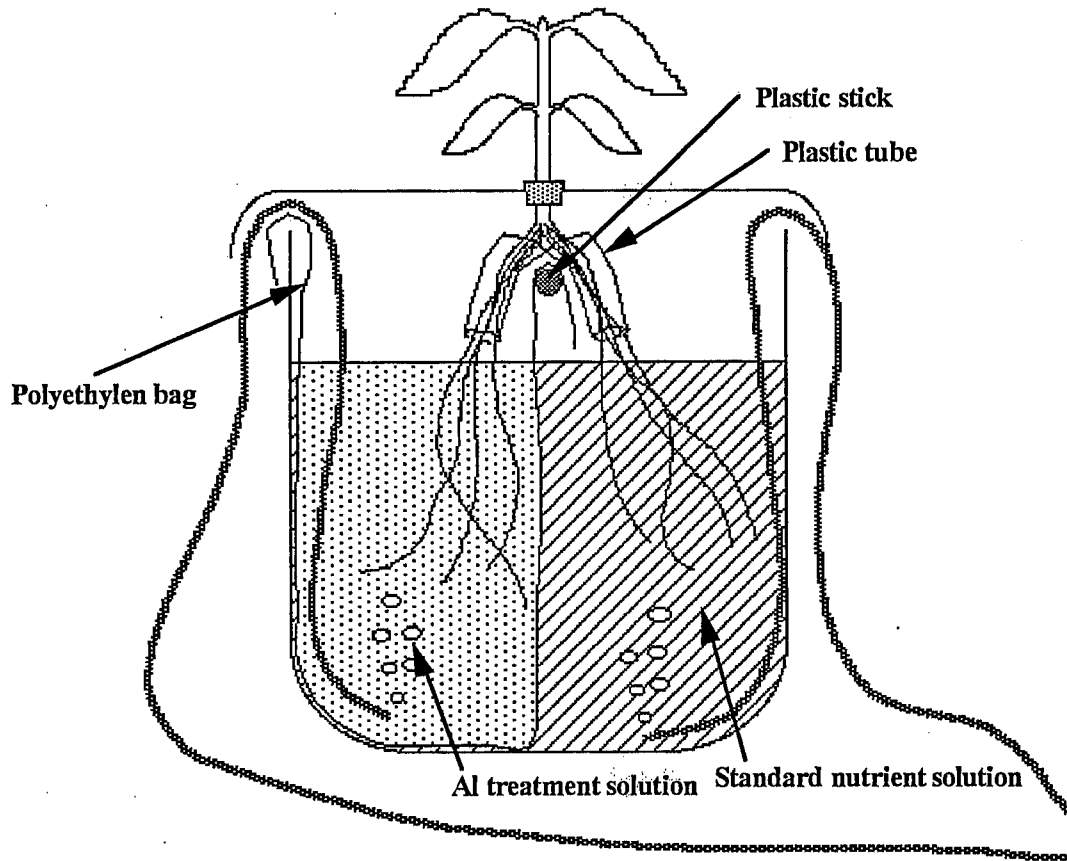


Fig. 2-4 Experimental design of split-root experiment. Left side of pot was filled with Al treatment solution (+Al or −Al) and right side of pot was filled with standard nutrient solution. Each solution was aerated sufficiently. Two or three plants were fixed by sponge.

+Al 処理液は溶存 Al の濃度が 0.6mM となるように脱塩水に $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ のみを添加し、−Al 処理液には脱塩水を用いた。標準培養液、および処理液は NaOH と H_2SO_4 を用いて pH4.0 に調節し、3 日毎に交換した。3 週間の処理後、各植物を採取し、脱塩水で根をよく洗浄した後、部位別に分け、乾燥、粉碎した。実験はメラストーマとメラルーカは 2 個体ずつ、オオムギは 3 個体ずつそれぞれ 3 反復で行った。

結果

実験1 養分無添加培養液においてAlが生育におよぼす影響

生育

養分が培地に存在しない場合でも、その程度には差はあるものの、第1節の実験 (Fig. 2-1) と同様に Al によりメラストーマは生育が促進され、オオムギは阻害された (Fig. 2-5)。一方、メラルーカは培地に養分が存在しない場合、生育は Al によりやや阻害された。また、第1節の実験で、Al 添加により引き起こされていたメラストーマの根の白色化は、今回の実験における Al 添加区では認められなかった。

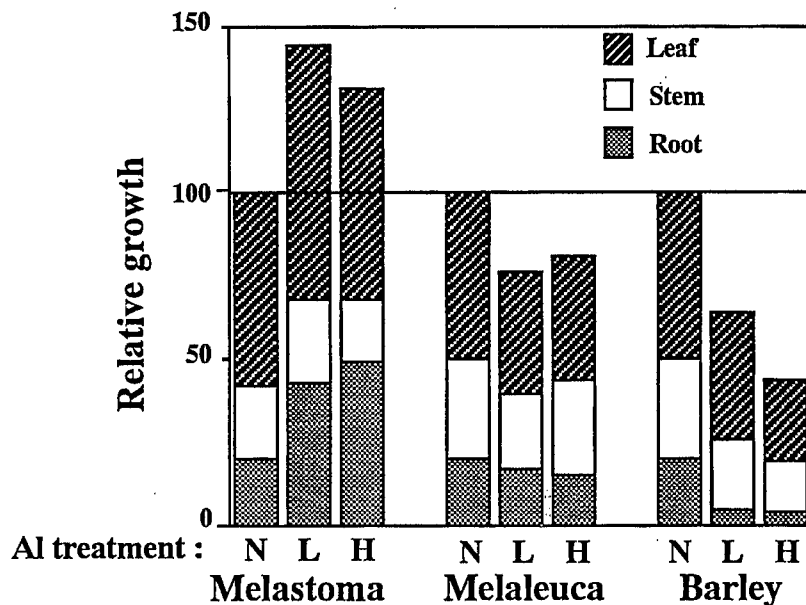


Fig. 2-5 Effect of Al on plant growth in nutrient-free medium. N; no Al, L; 1.5 mg L⁻¹ Al, H; 6 mg L⁻¹ Al.

元素含有率

葉の元素含有率を Table 2-5 に示した。Al 含有率は、メラストーマでは Al 添加により上昇したが、低 Al 区と高 Al 区の差はなかった。メラストーマの Al 無添加区における比較的高い Al 含有率は、第2章-第1節の結果から Al の生育促進効果が確認されたため、育苗時に Al を添加したにことよる。オオムギは P と K 含有率が Al の添加によって低下したが、メラストーマとメラルーカではそ

のような現象はみられなかった。CaとMgに関してはAlの影響はほとんどなかった。

Table 2-5 Concentrations of P, K, Ca, Mg, and Al in the leaves of plants grown in Al treatments*.

Species	Al(mg kg ⁻¹)			P(mg g ⁻¹)			K(mg g ⁻¹)			Ca(mg g ⁻¹)			Mg(mg g ⁻¹)		
	N	L	H	N	L	H	N	L	H	N	L	H	N	L	H
Melastoma	494	1293	1222	2.2	2.1	2.3	12.2	12.4	11.8	8.0	7.8	6.9	4.9	4.6	3.1
Melaleuca	103	183	101	1.7	1.4	1.4	8.8	6.6	10.0	9.4	8.3	9.9	5.4	4.5	6.0
Barley	61	23	58	5.0	3.9	3.6	17.0	12.3	12.8	2.6	2.0	2.7	1.9	1.6	2.1

*N; no Al, L; 1.5mg L⁻¹ Al, H; 6mg L⁻¹ Al.

実験2 根分け実験においてAlが生育におよぼす影響

生育

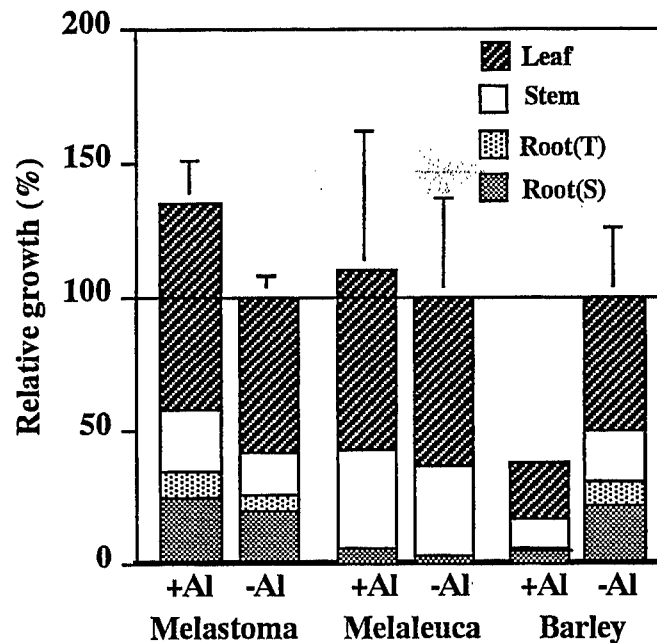


Fig. 2-6 Relative growth in split-root experiment. The error bars indicate the SE values. Root(S) and Root(T) express roots in the side of standard nutrient solution and roots in the side of Al treatment (+Al or -Al) solution, respectively.

処理期間の生長を-Al（対照）区に対する相対値として、Fig. 2-6に示した。根はAl処理側の根（Root(T)）と培養液側の根（Root(S)）のそれぞれの生長量を分けて示した。メラストーマは+Al処理により生育が促進され、それとは逆にオオムギは+Al処理によって生育が低下した。メラルーカの生育はAl処理の影響

響は受けなかった。いずれの植物も培養液側の根と比べて培養液を加えなかった Al 処理側の根の生長量は小さく、特に +Al 区のおオムギと ±Al 区のメラルーカでは、根はほとんど処理期間に生長しなかった。+Al 区のおオムギには、他の実験でみられたのと同様に Al 添加による葉のクロロシスが認められた。メラストーマとメラルーカには処理間に外観的な違いは認められなかった。また、実験 1 と同様に Al 添加によるメラストーマの根の白色化は、今回の実験でも認められなかった。

元素含有率

根部の Al 含有率は 3 植物とも、当然のことながら +Al 処理側の根で高かった (Table 2-6)。培養液側の根の Al 含有率はメラルーカでは +Al 区と -Al 区で差がなかったが、メラストーマとおオムギでは培養液に Al が入っていないにも関わらず、+Al 区でかなり高かった。処理前のおオムギの根の Al 含有率は 142mg kg^{-1} であり、育苗培地からの Al 汚染の可能性は低い。葉の Al 含有率はメラルーカでは Al 処理間で差はなく、メラストーマとおオムギは +Al 区で高かった。しかし、最も高いものでもメラストーマの新葉の $1,000\text{mg kg}^{-1}$ 程度にしかならなかった。

N、P、および K 含有率は、Al 処理間で大差なく、Ca および Mg 含有率はメラストーマとメラルーカでは +Al 処理で低下することはない、メラルーカの Ca 含有率は +Al 処理のほうがむしろ高かった。一方おオムギでは、古葉への処理の影響は小さかったが、他の部位では Ca および Mg 含有率はいずれも +Al 処理で低下した。

第2章 強酸性土壌に適応した各種植物の生育に
対するアルミニウムおよびpHの影響

Table 2-6 Concentrations of Al, N, P, K, Ca, and Mg in each organ of plants grown in split-root experiment.
Values are the mean $\pm$ SE of three replicates. Concentration of Al = 0.6mM

Species		Al (mg kg ⁻¹)		N (mg g ⁻¹)		P (mg g ⁻¹)	
		+Al	-Al	+Al	-Al	+Al	-Al
Melastoma	Young leaf	1055 $\pm$ 261	157 $\pm$ 272	35.0 $\pm$ 3.3	30.0 $\pm$ 8.4	6.0 $\pm$ 2.0	7.9 $\pm$ 1.2
	Old leaf	780 $\pm$ 311	53 $\pm$ 38	34.5 $\pm$ 3.8	36.3 $\pm$ 4.5	5.7 $\pm$ 0.9	5.7 $\pm$ 0.6
	Root(S)*	1387 $\pm$ 398	25 $\pm$ 43	28.0 $\pm$ 2.5	30.9 $\pm$ 2.9	13.4 $\pm$ 0.5	16.2 $\pm$ 2.9
	Root(T)**	6807 $\pm$ 1258	89 $\pm$ 14	21.0 $\pm$ 3.3	25.1 $\pm$ 4.8	7.7 $\pm$ 1.7	8.7 $\pm$ 4.0
Melaleuca	Young leaf	157 $\pm$ 67	223 $\pm$ 152	35.5 $\pm$ 2.4	35.4 $\pm$ 2.5	2.6 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.1
	Old leaf	311 $\pm$ 367	596 $\pm$ 212	24.9 $\pm$ 2.2	24.5 $\pm$ 4.0	2.7 $\pm$ 1.4	2.0 $\pm$ 0.6
	Root(S)	822 $\pm$ 1012	680 $\pm$ 266	21.4 $\pm$ 3.4	23.4 $\pm$ 2.8	4.7 $\pm$ 3.3	3.8 $\pm$ 1.0
	Root(T)	7218 $\pm$ 3442	1398 $\pm$ 844	22.1 $\pm$ 12.8	28.1 $\pm$ 1.0	3.8 $\pm$ 2.5	1.8 $\pm$ 0.3
Barley	Young leaf	603	47	42.9	39.0	4.0	3.3
	Old leaf	635	36	37.5	34.5	4.4	2.2
	Root(S)	2049	391	25.4	21.0	6.5	3.7
	Root(T)	6116	292	16.1	27.7	8.0	4.3

Species		K (mg g ⁻¹)		Ca (mg g ⁻¹)		Mg (mg g ⁻¹)	
		+Al	-Al	+Al	-Al	+Al	-Al
Melastoma	Young leaf	16.5 $\pm$ 0.8	17.4 $\pm$ 1.9	8.1 $\pm$ 0.4	7.3 $\pm$ 0.6	3.3 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.5
	Old leaf	17.1 $\pm$ 0.9	18.6 $\pm$ 3.8	9.0 $\pm$ 0.7	8.9 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.7
	Root(S)	31.4 $\pm$ 5.9	26.2 $\pm$ 12.0	2.1 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.7
	Root(T)	19.7 $\pm$ 0.1	24.4 $\pm$ 7.3	1.9 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 1.3
Melaleuca	Young leaf	16.8 $\pm$ 1.1	12.3 $\pm$ 9.0	5.7 $\pm$ 0.8	4.8 $\pm$ 1.2	2.7 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.4
	Old leaf	10.2 $\pm$ 0.5	10.9 $\pm$ 0.5	9.0 $\pm$ 1.7	6.9 $\pm$ 0.6	4.5 $\pm$ 1.1	4.2 $\pm$ 0.2
	Root(S)	15.7 $\pm$ 5.4	17.9 $\pm$ 2.5	2.8 $\pm$ 1.0	2.2 $\pm$ 1.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
	Root(T)	12.2 $\pm$ 2.2	6.5 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 1.6	1.0 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.3
Barley	Young leaf	37.9	27.9	0.6	2.8	2.0	3.2
	Old leaf	26.0	24.5	8.5	8.0	5.9	6.3
	Root(S)	8.1	8.3	0.4	0.9	0.9	1.6
	Root(T)	3.8	6.9	0.6	0.4	0.4	0.6

*; side of standard nutrient solution

**; side of treatment solution (+Al or -Al)

第4節 メラストーマ切断根のリン吸収能に与えるアルミニウム前 処理の影響

実験方法

育苗

メラストーマの種子を第1節と同様に発芽させ、育苗した。幼植物体を標準培養液 ($P=2\text{mg L}^{-1}$, $\text{pH}4.0$) を入れた 56L 培養槽に移植し、3 か月間生育させた。

Al 前処理

メラストーマの根を先端から 5cm の部位で切断し、脱塩水でよく洗浄した。新鮮重で約 10g の切断根を+Al 溶液 (0.5 mM AlCl_3 , 0.2 mM CaCl_2 , $\text{pH}4.0$) と -Al 溶液 (0.2 mM CaCl_2 , $\text{pH}4.0$) に加え、暗所下、 25°C で 3 時間培養した。溶液は 1 時間ごとに交換した。培養後、切断根を取り出し、脱塩水および 0.2 mM CaCl_2 ($\text{pH}4.0$) でよく洗浄した。

P 吸収速度の測定

Al 前処理をした切断根 (新鮮重で約 150mg) をバイアルに入れ、8mL の試験溶液を入れた。試験溶液の組成は 0、2.0、5.0、および $10\text{ }\mu\text{M}$ の NaH_2PO_4 を含む 0.2 mM CaCl_2 溶液 ($\text{pH}4.0$) であり、代謝阻害剤である CCCP を $10\text{ }\mu\text{M}$ 加えたものと加えないものをそれぞれ設定した。暗所下、 25°C で 1 時間培養した後、溶液を回収した。根は 80°C で通風乾燥した後、乾物重を測定した。溶液中の P 濃度をバナドモリブデン酸ブルー法で測定し、P 吸収量を求めた。

結果

切断根の正味の P 吸収速度を Fig. 2-7A に、CCCP 感受性 P 吸収速度 ($10\text{ }\mu$

M CCCP によって消失した分の P 吸収速度) を Fig. 2-7B にそれぞれ示した。切断根の正味の P 吸収速度は、0.5mM Al 前処理を行ったほうが対照よりも高く、特に低濃度 ($2 \mu\text{M}$ P) における上昇が顕著であった (Fig. 2-7A)。この P 吸収速度の上昇はほとんどが CCCP 感受性であり、根におけるリン酸 Al の形成等の受動的な要因によるものではなかった (Fig. 2-7B)。

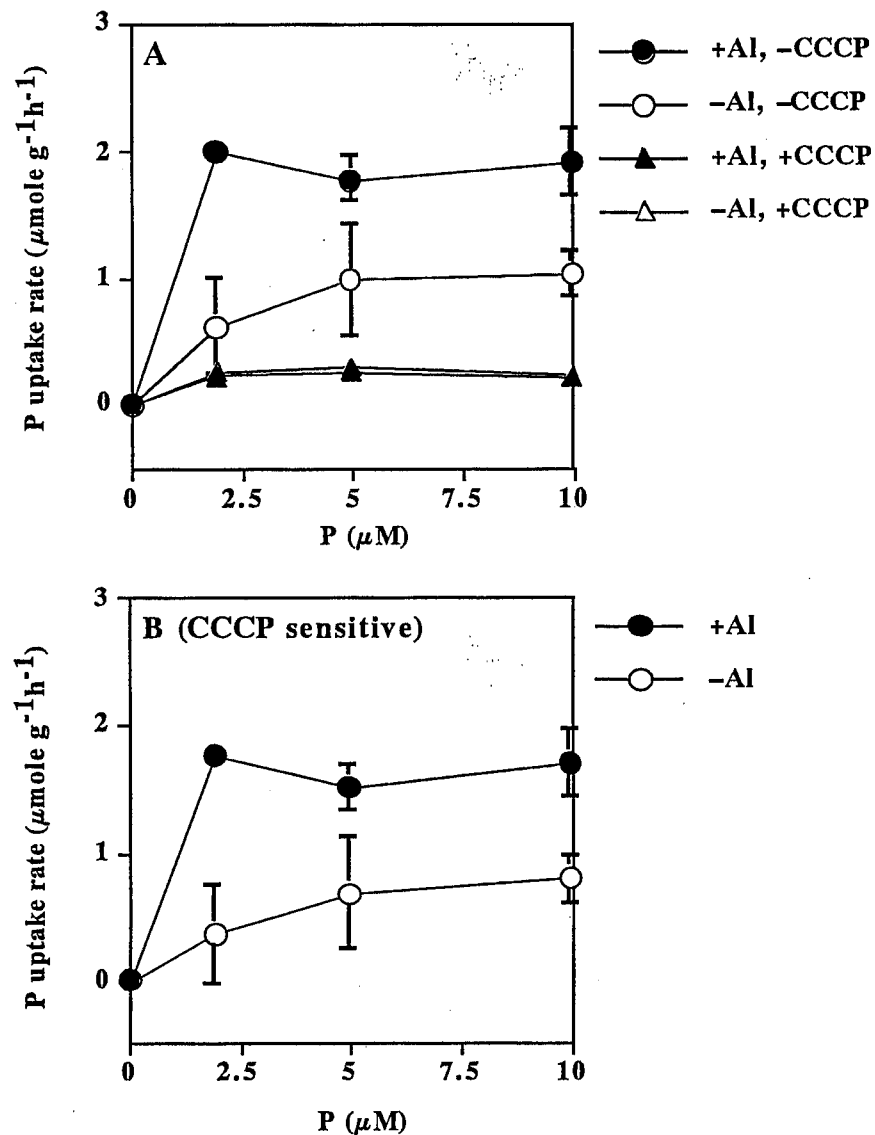


Fig. 2-7 Effect of Al pretreatment on P uptake rate of excised roots of melastoma.
A: net P uptake rate, B: CCCP ($10 \mu\text{M}$) sensitive P uptake rate.

第5節 考察

緒論でも述べたように、酸性土壌での植物の生育を制限する最大の要因は、土壌中に存在する Al イオンの毒性である (Foy et al., 1978; Kochian, 1995)。しかし、強酸性土壌に適応した植物のほとんどは完全培養液下での栽培において、Al 添加によってその生育が促進された (Fig. 2-1)。生育促進が起こった 3 mg L^{-1} という Al 濃度は、オオムギの生育に対して明らかに毒性を示す濃度であり、 15 mg L^{-1} という Al 濃度では、オオムギはほとんど正常に生育できなかった (Fig. 2-1)。

本実験で観察されたような Al による生育の促進は、一般的には Al による低 pH 条件下での H^+ 障害の軽減 (Kinraide, 1993; Llugany et al., 1995)、あるいは P 過剰の抑制のため (Clark, 1977) と考えられているが、強酸性土壌に適応した植物は低 pH による生育低下をほとんど受けなかったことから (Fig. 2-2)、 H^+ 障害の軽減だけでは Al による生育促進の現象を説明することはできない。また、第1節の実験における培地の P 濃度は P 過剰障害を引き起こすほど高くはないため、Al による生育促進は Al 独自の効果によると考えられる。処理後の含有率から判断すると、この生育促進は Al による N、P、および K の吸収促進、特に P 吸収の促進によると推定される (Table 2-3)。

Al 処理による K あるいは P の含有率上昇は、他にも様々な植物種において観察されており (第1章、Table 1-1)、これらには Al による能動的養分吸収の促進 (Malkanthi et al., 1995b) あるいは受動的養分吸収の促進 (Widell et al., 1994) が関わっている可能性が考えられている。今回調査した植物種の中で最も顕著に Al による生育促進を受けた種はメラストーマであった (Fig. 2-1)。Al 無添加の場合のメラストーマの P 含有率は、培養液中に P が充分量含まれているにも関わらず非常に低く、Al 無添加時の生育不良の原因が P 欠乏であることが示唆された。そこで、Al 無添加で生育させたメラストーマの根を 0.5 mM Al で前処理することにより P 吸収能がどのような影響を受けるかを調査したところ、切断

根のP吸収速度はAl前処理により上昇し、特に培地P濃度が低いとき(2 μ M)顕著な上昇を示した(Fig. 2-7A)。このP吸収能の上昇はCCCP感受性であったので、Alは能動的P吸収を活性化していると考えられる(Fig. 2-7B)。メラストーマの自生する土壤は、熱帯、亜熱帯の強酸性土壤であり、土壤溶液中のAlイオン濃度が高いだけでなく、有効態リン酸量が非常に低い(Osaki et al., 1998)。AlによりP吸収が活性化されることは、メラストーマがこのような土壤に生育する上で非常に有効な適応手段であるといえる。

H⁺ポンプが作り出す電気化学的エネルギー勾配は膜を介した各種イオン、アミノ酸、糖などの能動的な輸送の原動力となる。AlによるメラストーマのP吸収能の上昇がH⁺のイオノフォアであるCCCPを添加することによって消失したことは、原形質膜のH⁺ポンプがAlによって活性化されていることを示唆する。原形質膜のH⁺ポンプに対するAlの影響に関して、3 mM Al処理を4日間行ったエンドウの根の原形質膜ATPase活性が無処理のものより高くなったこと(Matsumoto and Yamaya, 1986)、あるいはコムギの根にAl(100 μ M)を添加するとH⁺排除が促進され、transmembrane electrical polarityが増大したこと(Kinraide, 1988, 1993)が報告されている。一方、オオムギの根の原形質膜ATPaseの活性がAlを処理することにより低下することが報告されている(Matsumoto et al., 1992; Sasaki et al., 1995)。今回の実験でオオムギは、2品種ともAl処理により生育は低下し、Manriki品種では葉のN、P、およびK含有率も低下した(Fig. 2-1, Table 2-3)。これらの結果から、H⁺ポンプに与えるAlの直接的、あるいは間接的な影響の種間差が、Alの生育に対する影響の種間差と少なからず関わっていることが予想される。

このようなAlの生育促進効果あるいは阻害効果が養分吸収に与えるAlの外的刺激による影響のみで説明できるかどうかを検討するため、生育に対するAlそのものの影響を調査した。その結果、培地に養分が存在しない条件下でもオオムギの生育はAl添加によって低下した(Figs. 2-5)。このことはAlによるオオムギの生育低下が養分吸収阻害だけで引き起こされているわけではないこ

とを示す。植物に対する Al 毒性の一つとして根の構造破壊が考えられているが（第1章－第2節）、本実験で Al により著しく生育が低下したオオムギの Manriki の根の K 含有率が Al 添加区で非常に低いことは（Table 2-3）、根の原形質膜が Al によって破壊され、 K^+ が漏出したことを示唆する。また、オオムギの根分け実験の結果では、Al を加えていない－Al 処理側の根にも Al は移行し、Ca および Mg 吸収を阻害することも示唆された（Table 2-6）。一方、培地で Al が養分と共存する場合は、メラルーカは Al によって生育が促進されたが（Fig. 2-1）、養分吸収に Al が直接関与しない場合は Al により生育はやや低下（Fig. 2-5）、あるいはほとんど影響は受けなかった（Fig. 2-6）。また、根分け実験ではメラルーカの N、P、および K 含有率はほとんど Al 処理の影響は受けなかった（Table 2-6）。これらの結果から、メラルーカにおける Al の生育促進効果は、Viets (1944) が Ca^{2+} のような多価カチオンが K などの吸収を高めることを報告した、いわゆる「Viets 効果」のような Al の外的刺激による養分吸収の促進によると推定される。このような必須元素とは考えられていないカチオンによる生育促進は Sn、Cr、Ni、V、および Li でも観察され、いずれの元素も地上部への移行量は少ないことから、主に根の細胞への外的刺激が生育促進の原因と考えられている（Wallace, 1989）。

一方、メラストーマは、その程度は第1節の実験と比較して小さいものの、養分吸収に対する Al の外的刺激が無い状態でも、生育は Al により促進されており（Figs. 2-5, 2-6）、体内に吸収された Al が生育に対して独自の、何らかの効果を持っていることが考えられる。一般に地上部に Al を $1,000 \text{ mg kg}^{-1}$ 以上集積する植物は Al 集積植物と呼ばれ、その多くは酸性土壤に生育する植物である（Chenery, 1948a）。本実験で供試した植物のうち、メラストーマ、アジサイ、およびソバが Al 集積植物に相当し、このうちメラストーマは、今回調査した植物種の中で、Al による生育促進が最も顕著であった（Fig. 2-1）。メラストーマの生育に対して Al が持つ有益な効果は、このようなメラストーマの Al 集積特性と深く関わっている可能性がある。

メラストーマのようなAl集積植物の生育に与えるAlの影響に関して、これまでにいくつか報告されている。嫌石灰性植物であり、酸性土壤に生育し、Al集積性を持つ草本種の *Deschampsia flexuosa* の生育はAlによって促進された (Hackett, 1962; Pegtel, 1987)。また、Konishi et al. (1985) は、同じくAl集積植物であるチャもAlによって生育が促進され、その生育促進がP吸収の制御と関連しているのではないかと予想し、Chenery (1955) は少量のAlがチャの葉のクロロシスを改善させることを示した。Haridasan (1988) はメラストーマと同じノボタン科に属する *Miconia albicans* は、培地に十分量の養分が存在しても、体内のAl含有率が低ければ生育が改善されないことを示した。これらの報告からも、Al集積植物の生育に対して、体内に存在するAlが何らかの影響を及ぼしていることが予想される。

Ca、Mg含有率は多くの植物種でほぼ一貫してAlの共存により低下することが他の研究者により報告されている (Table 1-1)。これらのイオン吸収はAlにより拮抗阻害を受けると予想され (Huang et al., 1992ab; Rengel and Robinson, 1989a)、Ca吸収に対してAlはチャンネルブロッカーのような働きをすると考えられている (Ding et al., 1993; Piñeros and Tester, 1993; Rengel and Elliott, 1992)。本実験で供試した強酸性土壤に適応した植物種の中でも、メラストーマ、ロイカイナ、ルジグラス、オオイタドリ、およびソバではこのことが当てはまった (Table 2-3)。しかしながら、多くの種でCaやMg含有率の低下は生育には反映せず、これらの種は低Caあるいは低Mg含有率耐性が強いと考えられる。一方、Alが共存する場合に、メラルーカ、*I. barbatum*、*S. guianensis* ではCaおよびMg含有率の、ルジグラスではMg含有率の低下が起こらなかったことから、これらの種ではCaあるいはMgチャンネルがAlの影響を受けない構造になっている可能性がある。

第6節 要約

- 1) 強酸性土壤に適応した植物種のほとんどは、完全培養液を用いた水耕栽培において、 $3 \text{ mg L}^{-1} \text{ Al}$ によって生育が促進され、 $15 \text{ mg L}^{-1} \text{ Al}$ でもその旺盛な生育を維持、あるいはさらに生育が促進された。一方、オオムギはAl添加によって生育が強く阻害された。
- 2) 観察されたAlによる生育促進は、N、P、およびKの吸収促進によるものと考えられ、特にP吸収の促進が強く関わっていることが示唆された。Alによって最も大きな生育促進を受けた種はメラストーマであり、P含有率の上昇割合も最も大きかった。
- 3) メラストーマの切断根のP吸収能に与えるAlの影響を調査した結果から、AlによるP含有率の上昇は能動的なP吸収の促進によると考えられ、これがAlによる生育促進の主要因であると推定された。
- 4) 酸性土壤では、CaやMgといった塩基が不足している場合が多く、また、AlはCaおよびMg吸収を拮抗的に阻害すると考えられている。強酸性土壤に適応した植物種でも、CaあるいはMg吸収がAlによって阻害されることがいくつかの種で確認されたが、多くの種でこの低下は生育には反映せず、低Caあるいは低Mg含有率耐性が強いことが明らかになった。また、メラルーカ、*I. barbatum*、*S. guianensis*、およびルジグラスでは、CaあるいはMg吸収はAlによる阻害を受けなかった。
- 5) Alによって生育促進を受けた植物種の生育に対して、pH3.5からpH5.5までのpH変化はほとんど影響しなかったことから、Alによる H^+ 毒性の軽減効果のみでAlによる生育促進現象を説明することはできなかった。
- 6) 養分が共存しない条件下でのAlの影響を調査することにより、Al非集積植物におけるAlの生育促進効果は、Alによる原形質膜機能の活性化に起因する養分吸収の促進によるものと推定されたが、Al集積植物におけるAlの生育促進効

果には、Al による養分吸収促進だけではなく、体内に吸収された Al の持つ効果も含まれると考えられた。

第3章 強酸性土壤に適応した植物-メラストーマ-に おけるアルミニウムとカルシウムの相互作用

第2章-第1節の結果から、強酸性土壤に適応した植物の多くはAl耐性が強いだけでなく、むしろAlが培地に存在したほうが生育が良好となることが明らかとなった。この実験で生育促進を最も顕著に受けた植物種はメラストーマであった。メラストーマは養分を含まない培養液においてもAlによって生育が促進された(第2章-第3節)。この培養液には細胞壁および原形質膜の安定化に不可欠であるCaは含まれていない。また、Ca吸収に対し、Alは拮抗的に阻害することが多く報告されており(Rengel and Elliott, 1992; Huang et al., 1992ab, 1993, 1996; Piñeros and Tester, 1993; Sasaki et al., 1994)、植物に対する電気化学的性質の類似性が示唆される。これらのことから、メラストーマでは、根の細胞壁および原形質膜の安定化においてAlがCaと類似した何らかの役割を果たしている、あるいは独自の効果を持っている可能性がある。そこで、本章では強酸性土壤に適応した植物であるメラストーマにおけるAlとCaの相互作用を調査することにより、Caに対するAlの代替の可能性を検討し、さらにAlによる生育促進機構のより一層の解明を試みた。

第1節 生育とアルミニウム吸収におけるアルミニウムとカルシウムの相互作用

実験方法

実験1 高濃度および低濃度 Ca 下での生育におよぼす Al の影響

育苗

温室でメラストーマとオオムギ (var. Manriki) を育苗した。育苗法は第2章-第1節に従う。

処理

地上部の高さが約 10cm に達し、十分に発根した後に自動 pH 調節装置付き 360 L 水耕培養槽に移植し、処理を開始した。処理は溶存 Al 濃度 0、0.5mM (それぞれ 0Al、0.5Al と表記) と Ca 濃度 0.1mM、1.0mM (それぞれ 0.1Ca、1.0Ca と表記) を組み合わせた 4 区、すなわち 0.5Al・1.0Ca 区、0.5Al・0.1Ca 区、0Al・1.0Ca 区、および 0Al・0.1Ca 区とした。これらの処理に用いた培養液の組成は Ca 以外は標準培養液 (Table 2-2) に従い、溶存 P 濃度が 0.6mg L⁻¹、pH が 4.0 となるように第2章-第1節と同様に平衡化させたものである。培養液は随時、その組成要素を測定し、不足分を補った。3 週間の処理後、植物体は根を十分に脱塩水で洗浄し、根、茎、葉に分け、80℃で2日以上通風乾燥した。乾物重測定の後、サンプルを粉碎し、分析に供した。

根長測定

メラストーマの処理後の根長を Newman (1966) の方法で測定し、全根長および比根長 (単位根重当たりの根長) を求めた。

実験2 Ca を完全に欠除させた状態での生育におよぼす Al の影響

実験は溶存 Al 濃度 0、0.5mM と Ca 濃度 0、1.0mM を組み合わせた 4 処理で

行った (0.5Al・1.0Ca 区、0.5Al・0Ca 区、0Al・1.0Ca 区、および 0Al・0Ca 区)。メラストーマの処理期間を 4 週間と 6 週間を設けたこと以外の実験条件と分析方法は実験 1 と同様である。

結果

実験 1 高濃度および低濃度 Ca 下での生育におよぼす Al の影響

生育

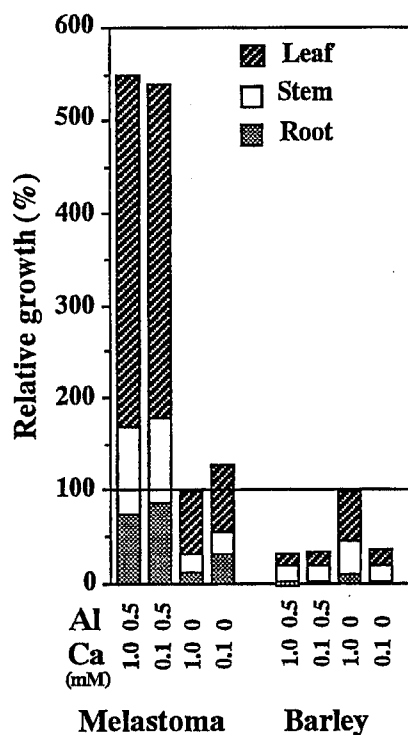


Fig. 3-1 Effect of Al-Ca interaction on relative growth of plants.

処理期間の生長量を、0Al・1.0Ca 区の生長量に対する相対値で示した (Fig. 3-1)。メラストーマの生育は、Ca 処理に左右されることはほとんどなく、Al の添加により促進された。オオムギは 0Al・1.0Ca 区でのみ良好に生育し、0.1Ca および 0.5Al 処理によっていずれも同程度生育が阻害された。

メラストーマの地上部にはいずれの区でも形態的に目立った症状はなかったが、根部では、Al 無添加区で細根が少なかった (Fig. 3-2)。また、0.5Al 処理によって、根は明瞭な白色を示した。オオム

ギでは、0.5Al 処理により葉にクロロシスが生じ、特に下位葉で激しかった。Al 添加区および 0Al・0.1Ca 区のオオムギの根は新根が少なかった。

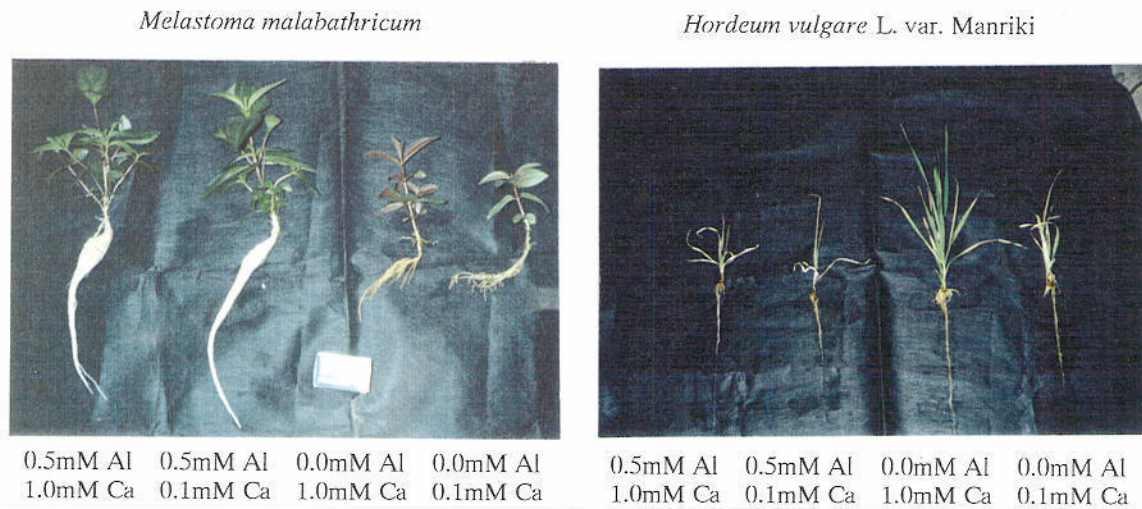


Fig. 3-2 Photograph of plants after the Al and Ca treatments.

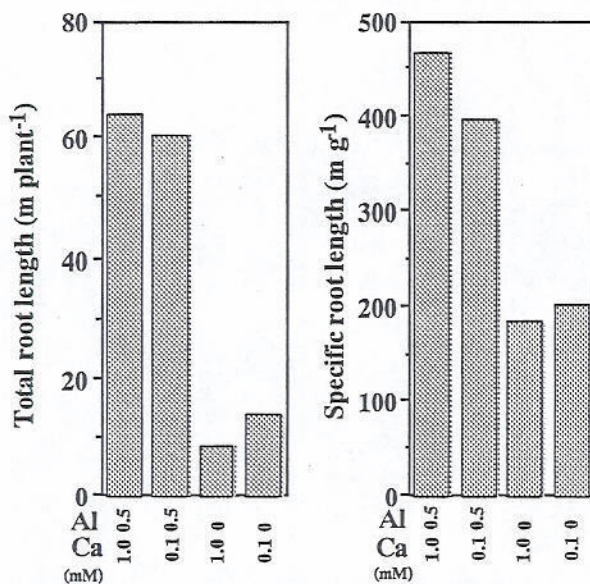


Fig. 3-3 Effect of Al-Ca interaction on total and specific root length of melastoma.

メラストーマの比根長は Ca 処理に関係なく 0.5Al 処理によって標準区 (0Al・1.0Ca 区) の約 2 倍となり、全根長は約 6 倍となった (Fig. 3-3)。

元素含有率

メラストーマの Al 添加区の Al 含有率は非常に高く、若葉でも約 8,000mg kg⁻¹、古葉では 10,000mg kg⁻¹を超え、Al 添加区の Al 含有率に与える Ca 処理の影響はほとんどなかった。オオムギの Al 含有率は、若葉で Al 添加により 500mg kg⁻¹前後に達し、Ca 処理の影響はなかった (Table 3-1)。

処理後の N、P、K 含有率は、両植物ともに Ca 処理の影響はそれほどなかったが、Al 処理によってこれらの含有率は影響を受けた。すなわち、メラスト

ーマでは Al の添加により、N、P、K 含有率はいずれも上昇し、葉の N 含有率では約 1.5 倍、P 含有率では約 2 倍、K 含有率では約 1.5 倍となった。オオムギではこれらの含有率が、ほとんどの場合 Al 添加により低下し、特に根の K 含有率が著しく低下した。根の P 含有率は Al 添加で上昇した。Ca 含有率は当然のことながら、0.1Ca 処理で低い含有率であった。メラストーマでは 0.5Al 処理により地上部で Ca 含有率は上昇し、オオムギでは 0.5Al 処理により根の Ca 含有率が著しく低下した。メラストーマの Mg 含有率は、0.5Al・0.1Ca 区で高く、他の処理区間での差はあまりなかった。オオムギの Mg 含有率は、0.5Al および 0.1Ca 処理によって低下し、その効果は 0.5Al 処理で大きかった。

Table 3-1 Concentrations of Al, N, P, K, Ca, and Mg in each organ of plants grown in the Al and Ca treatment.

Species	Organs		Al (mg kg ⁻¹)				N (mg g ⁻¹)				P (mg g ⁻¹)			
			0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0	0
			Ca (mM)	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0
Melastoma	Leaf	Young	7371	8771	498	175	42.4	41.9	27.9	27.3	3.4	3.3	1.5	1.1
		Old	10326	11480	305	691	43.6	45.1	30.0	32.2	2.4	2.6	1.6	1.0
	Root	Young	19040	16661	846	952	28.7	27.5	27.2	22.4	8.7	8.8	1.7	1.9
		Old	162	152	84	166	26.6	31.6	42.8	35.0	4.1	3.3	5.6	8.1
Barley	Leaf	Young	460	392	trace	trace	48.7	49.3	51.9	50.6	3.7	2.9	4.8	6.2
		Old	162	152	84	166	26.6	31.6	42.8	35.0	4.1	3.3	5.6	8.1
	Root	Young	1505	2319	210	trace	22.7	24.8	32.2	23.5	6.1	5.5	3.4	2.7
		Old	162	152	84	166	26.6	31.6	42.8	35.0	4.1	3.3	5.6	8.1

Species	Organs		K (mg g ⁻¹)				Ca (mg g ⁻¹)				Mg (mg g ⁻¹)			
			0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0	0
			Ca (mM)	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0
Melastoma	Leaf	Young	16.5	15.7	10.9	10.0	4.3	1.4	2.7	0.9	2.3	4.5	2.6	2.5
		Old	18.1	13.9	9.6	9.4	8.0	3.2	6.4	4.5	1.7	2.8	3.3	2.5
	Root	Young	34.5	32.5	10.3	13.1	1.3	0.6	1.4	1.0	2.2	1.9	1.8	2.5
		Old	19.1	17.0	37.2	36.2	1.9	2.5	3.5	2.3	1.4	1.9	3.0	4.5
Barley	Leaf	Young	12.4	12.7	29.6	30.7	8.0	6.5	9.3	5.5	6.2	4.5	6.6	7.5
		Old	3.6	2.4	11.7	7.3	0.8	0.4	2.8	1.4	0.1	0.1	1.0	0.6
	Root	Young	19.1	17.0	37.2	36.2	1.9	2.5	3.5	2.3	1.4	1.9	3.0	4.5
		Old	12.4	12.7	29.6	30.7	8.0	6.5	9.3	5.5	6.2	4.5	6.6	7.5

実験2 Caを完全に欠除させた状態での生育におよぼす Alの影響

生育

実験1ではメラストーマの生育は Ca 処理に関係なく、Al の添加によって生育が促進されたが、実験2では、Ca の共存によって、Al の生育促進効果が顕著に現れた (Fig. 3-4)。4 週間目のメラストーマでは、対照区 (0Al・1.0Ca 区) と比べて 0.5Al・1.0Ca 区では著しい生育促進がみられたが、0.5Al・0Ca 区では生育促進の割合は非常に小さかった。6 週間目には 0.5Al・0Ca 区の生育が全処理区 (0Al・0Ca 区も含めて) の中で最も劣った。

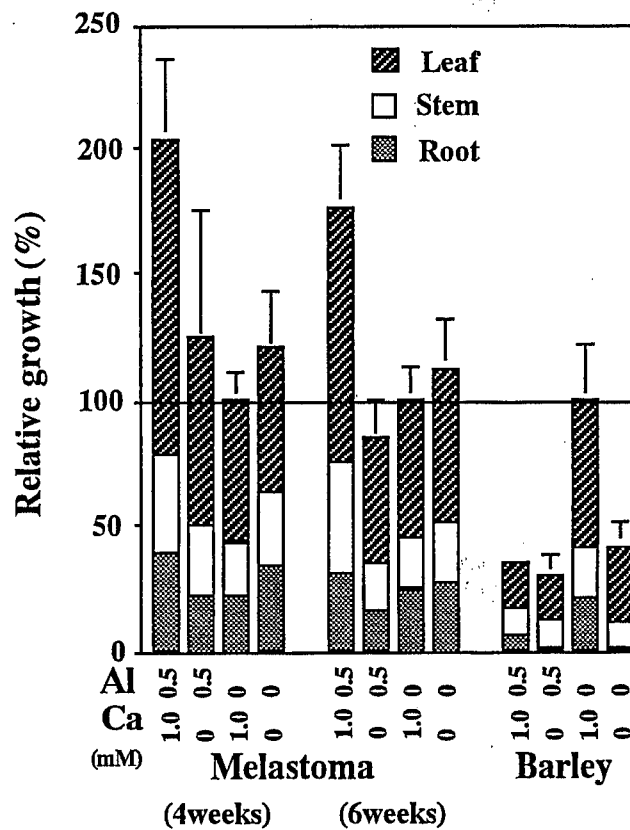


Fig. 3-4 Effect of Al-Ca interaction on relative growth of plants.

処理後 4 週間目のメラストーマの苗に、処理による外見的な障害は観察されなかったが、処理後 5 週間目以降になると、0.5Al・0Ca 区では、若葉は展開後著しく丸まり、黒色の斑点を呈し、場合によっては黄化し、最終的には落葉し、また、根はサンゴ状になった。0Al・0Ca 区では、葉が少し丸まる程度で、0.5Al・0Ca 区と比べて症状は軽かった。オオムギでは、Al 添加による症状は実験 1 と同じであったが、Ca 無添加区では実験 1 ではみられなかった最上位葉(未展開葉)のクロロシスが生じた。このクロロシスの発生以降、新しい葉が発生することはなかった。このような葉のクロロシスに加えて、0Al・0Ca 区では、根は他の 3 処理のものと比べもろく、ネクロシスを起こしていた。

元素含有率

0.5Al・0Ca 区と比べて 0.5Al・1.0Ca 区で Al 含有率が低下することはほとんどなく、むしろメラストーマでは 0.5Al・0Ca 区のほうが Al 含有率が低い傾向が

あった (Table 3-2)。処理後6週間のメラストーマの葉では、未展開な最も若い葉 (youngest leaf) でも Al 含有率は $7,000\text{mg kg}^{-1}$ に達し、最も古い葉 (oldest leaf) との差も小さかった。

処理後の N、P、および K 含有率に対する Ca 処理の影響は実験1と比べて大きく、特にオオムギの Ca 無添加区の P、K 含有率は低い値であった。全部位において、メラストーマの P 含有率は Al 添加区で高く、オオムギの K 含有率は Al 添加区で低かった。

Table 3-2 Concentrations of Al, N, P, K, Ca, and Mg in each organ of plants grown in Al and Ca tr

Species	Organs		Al (mg kg ⁻¹)				N (mg g ⁻¹)				P (mg g ⁻¹)					
			Al	(mM)	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0	0
			Ca	(mM)	1.0	0	1.0	0	1.0	0	1.0	0	1.0	0	1.0	0
Melastoma (4weeks)	Leaf	Young	9326	8337	138	142	40.1	35.5	39.8	37.4	3.0	2.5	2.7	2.6		
		Old	10384	10206	228	151	39.5	39.5	40.3	42.5	2.5	2.2	1.9	1.9		
	Root	14182	15056	721	526	27.4	27.3	38.6	30.9	9.9	7.5	7.8	5.6			
Melastoma (6weeks)	Leaf	Youngest	7227	5702	170	574	39.1	37.9	34.3	33.5	3.6	3.2	2.8	3.0		
		Young	8844	6393	130	21	39.2	38.0	38.7	38.2	2.6	2.5	2.3	2.6		
		Old	11342	9551	82	83	39.5	39.3	39.7	44.2	2.4	2.3	1.8	2.4		
		Oldest	10738	7618	379	445	36.6	34.2	40.8	42.0	2.1	2.1	2.0	2.2		
		Dead		8027				37.0				2.1				
	Root	14882	16203	744	543	24.9	21.9	35.6	25.4	9.8	6.2	7.9	4.6			
Barley	Leaf	Young	71	11	108	33	57.5	46.5	61.3	56.1	6.1	4.5	7.0	3.1		
		Old	290	21	26	420	37.3	44.5	50.1	31.5	7.0	7.3	5.7	3.7		
	Root	2199	3475	226	593	8.1	6.3	11.7	9.7	6.9	8.5	7.0	9.2			

Species	Organs		K (mg g ⁻¹)				Ca (mg g ⁻¹)				Mg (mg g ⁻¹)				
			Al	(mM)	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5	0
	Ca	(mM)	1.0	0	1.0	0	1.0	0	1.0	0	1.0	0	1.0	0	1.0
Melastoma (4weeks)	Leaf	Young	17.9	14.5	16.2	15.4	9.3	1.9	10.8	2.5	2.4	3.7	2.9	6.5	
		Old	19.6	17.6	22.8	18.8	12.6	3.8	14.7	4.8	3.1	2.2	3.8	5.3	
	Root	43.9	45.0	48.5	45.2	3.4	0.8	3.2	1.6	4.8	3.5	6.2	5.8		
Melastoma (6weeks)	Leaf	Youngest	14.1	15.3	13.0	13.0	9.2	0.3	9.3	2.9	2.8	4.5	2.9	7.6	
		Young	15.6	13.6	19.5	14.3	10.2	0.2	14.8	1.9	2.7	4.1	3.0	7.1	
		Old	16.1	11.9	21.7	15.9	11.0	1.2	13.5	1.4	2.4	1.8	4.1	5.9	
		Oldest	15.3	15.3	25.9	19.8	12.0	5.3	13.2	6.5	3.6	1.8	3.5	5.0	
		Dead		13.9				0.6				3.4			
	Root	35.5	28.6	49.1	34.9	2.5	0.3	2.2	0.3	5.1	2.7	4.9	5.0		
Barley	Leaf	Young	41.5	26.5	67.2	31.7	0.5	0.4	3.8	0.1	1.2	1.5	2.5	1.8	
		Old	19.9	16.7	48.9	31.1	6.8	5.8	7.6	4.6	4.7	5.6	4.3	5.8	
	Root	12.3	4.2	34.4	9.2	1.0	0.8	1.5	0.5	0.1	0.2	0.9	0.9		

両植物とも Ca 添加区では Al 添加によって Ca 含有率は低下し、Ca 無添加区における Ca 含有率は古葉を除いた他の部位でいずれも非常に低い値であった。Ca 含有率が 1mg g^{-1} 以下となった部位と、可視的な障害症状を示した部位とは一致していた。Mg 含有率は、0Al・0Ca 区のメラストーマの Mg 含有率が高いこと以外は、いずれの植物も実験1と同じ傾向であった。

第2節 根の機能および構造におけるアルミニウムとカルシウムの 相互作用

実験方法

育苗と処理

処理は溶存 Al 濃度 0、0.5mM と Ca 濃度 0.05、1.0mM を組み合わせた 4 処理（0.5Al・1.0Ca 区、0.5Al・0.05Ca 区、0Al・1.0Ca 区、および 0Al・0.05Ca 区）で行い、3 週間培養した。その他の条件は第1節と同様である。

根の活性の測定

根の活性は TTC (triphenyl tetrazolium chloride) 法 (Lindström and Nyström, 1987) で測定した。3 週間処理した各植物の新根を先端から約 5cm のところで切断し、脱塩水でよく洗浄した。それをさらに 1-2mm の長さに細断し、その 200mg を試験管に入れた。そこに TTC 溶液 (0.6% TTC、0.06M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液 (pH7.0)、0.05% Tween 20) を 6mL 加え、15 分間吸引浸潤させた。その後、20 時間、30°C でインキュベートした後、根を取りだし、6mL の 95% エタノールで 80°C、15 分間抽出した。抽出液を氷中で冷却した後、濾過し、520nm での吸光度を測定した。

根の構造

3 週間処理した各植物の新根を採取し、剃刀で厚さ 100~200 μm の横断切片と縦断切片を作成した。横断切片は根端から 3mm と 5cm の 2 カ所で作成した。0.2% トリパンプブルーで 5 分間染色した後、切片をスライドガラス上に置き、30% グリセロール溶液で封入し、顕微鏡 (Carl Zeiss) で観察した。観察は根の構造、細胞の長さ、およびトリパンプブルーの細胞内への侵入度について行った。原形質膜が正常に機能しているほどトリパンプブルーの細胞内への侵入量は少ないの

で、細胞の viability の指標になる。

メラストーマの根のリグニン含量の測定

メラストーマの根のリグニン含量をデタージェント法 (Van Soest, 1963ab; Shinano et al., 1991) により測定した。デタージェント法によるリグニンの単離方法を以下に簡略化して示す。三角フラスコに入れた 150mg の乾燥試料に 15mL の酸性デタージェント溶液を添加し、アルミホイルでふたをし、100℃下で1時間分解した。酸性デタージェント溶液の組成は 2% cetyl trimethylammonium bromide (CTAB、タンパク分解のため)、0.5M H_2SO_4 からなる。分解後、分解液をガラス濾紙 (GA200、Advantec Toyo) を敷いたグーテルルツボを通して吸引濾過し、濾紙上の残査を 80-90℃の十分量の熱水とアセトンで洗浄した。残査をルツボごと 80℃で一昼夜乾燥させた後、乾燥した残査の上に 72%の H_2SO_4 を滴下し、全体的にしめらせた。1時間毎に 72% H_2SO_4 を補充しながら室温中で3時間放置した後、残査を 80-90℃の熱水で吸引洗浄した。残査をルツボごと 80℃で一昼夜乾燥させた後、秤量した。秤量後、ルツボを 500℃のマッフルで3時間加熱、灰化し、 SiO_2 量を求めた。分解後の残査重から SiO_2 量を差し引いたものがリグニン含量である。なお、酸性デタージェント溶液による分解後の乾燥重と、72% H_2SO_4 による分解後の乾燥重の差がセルロース含量である。

結果

生育

処理後の相対乾物重を Fig. 3-5 に示した。メラストーマでは Al 添加によって生育が促進されたが、その度合いは 0.5Al・1.0Ca 区よりも 0.5Al・0.05Ca 区で小さかった。Al 無添加区における Ca 処理の影響はほとんどなかった。オオムギの生育は Al 添加によって大きく低下した。また、オオムギの 0Al・0.05Ca 区では Ca 欠乏によって 0Al・1.0Ca 区よりも生育は低下したが、Al 添加区では Ca 処理の影響はあまりなかった。

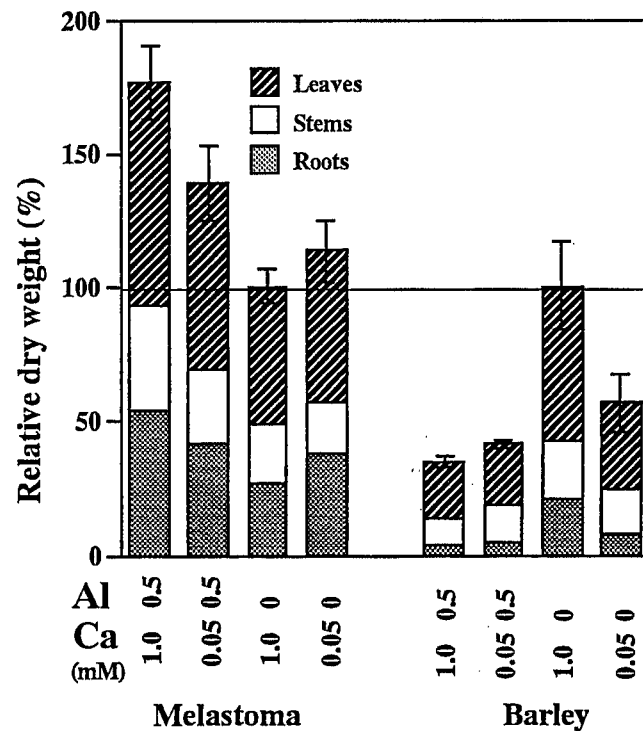


Fig. 3-5 Relative dry weight after the Al-Ca treatment.

元素含有率

メラストーマの各部位の Al 含有率は Al 添加によって大きく上昇し、第 1 節の実験同様、Ca 処理の影響は受けなかった。本実験では、メラストーマの葉の Al 含有率は古葉のほうが成葉および若葉より低かった (Table 3-3)。両植物ともに葉の N および P 含有率は生育とほぼ同様の傾向を示した。メラストーマの各部位の K 含有率は処理の影響をそれほど大きく受けなかったが、オオムギでは 0.5Al 処理および 0.05Ca 処理によって根の K 含有率が著しく低下した。Ca 含有率は第 1 節の実験と同様に 0.05Ca 区で低かった。

第3章 強酸性土壌に適応した植物-メラストーマ-における
アルミニウムとカルシウムの相互作用

Table 3-3 Concentrations of Al, N, P, K, Ca, and Mg in each organ of plants grown in the Al and Ca treatment.

Species	Organs		Al (mg kg ⁻¹)				N (mg g ⁻¹)			
			Al (mM)	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0	0
			Ca (mM)	1.0	0.05	1.0	0.05	1.0	0.05	1.0
Melastoma	Leaf	Young		7557 ±985	6322 ±985	319 ±985	735 ±985	52.4 ±2.4	50.7 ±4.2	47.5 ±3.0
		Mature		7129 ±1464	7869 ±1464	311 ±1464	696 ±1464	57.5 ±5.6	58.3 ±1.2	48.5 ±0.7
		Old		4066 ±1226	3519 ±1226	824 ±1226	646 ±1226	49.3 ±5.5	49.7 ±4.2	41.4 ±2.5
	Root			10497 ±1150	12288 ±1150	785 ±1150	891 ±1150	26.8 ±1.0	28.1 ±0.1	31.4 ±0.5
Barley	Leaf	Young		208 ±19	195 ±19	18 ±19	13 ±19	50.7 ±6.8	43.9 ±7.4	62.1 ±3.2
		Old		420 ±39	370 ±39	69 ±39	24 ±39	12.0 ±0.3	11.8 ±0.7	29.5 ±3.4
	Root			3788	4896	428	114	18.5	21.3	38.6

Species	Organs		P (mg g ⁻¹)				K (mg g ⁻¹)			
			Al (mM)	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0	0
			Ca (mM)	1.0	0.05	1.0	0.05	1.0	0.05	1.0
Melastoma	Leaf	Young		3.7 ±0.5	3.3 ±0.3	2.7 ±0.0	3.1 ±0.3	15.2 ±0.4	16.3 ±0.3	17.6 ±3.0
		Mature		2.7 ±0.5	2.3 ±0.2	2.0 ±0.1	2.5 ±0.1	19.1 ±1.2	17.5 ±1.1	18.2 ±3.4
		Old		2.2 ±0.4	1.5 ±0.1	1.7 ±0.1	2.2 ±0.1	23.0 ±3.4	20.1 ±0.8	20.3 ±1.2
	Root			8.6 ±0.8	7.3 ±1.0	4.0 ±0.2	5.6 ±0.2	37.1 ±0.9	34.5 ±5.3	42.1 ±0.9
Barley	Leaf	Young		5.0 ±0.6	4.3 ±0.5	8.1 ±0.1	4.7 ±0.2	48.0 ±0.1	44.3 ±2.6	70.7 ±0.7
		Old		0.7 ±0.0	0.8 ±0.1	3.3 ±0.1	2.4 ±0.5	38.5 ±1.4	39.7 ±1.1	46.9 ±5.4
	Root			2.7	3.5	5.8	2.8	10.3	7.9	32.9

Species	Organs		Ca (mg g ⁻¹)				Mg (mg g ⁻¹)			
			Al (mM)	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0	0
			Ca (mM)	1.0	0.05	1.0	0.05	1.0	0.05	1.0
Melastoma	Leaf	Young		11.5 ±1.6	9.6 ±0.5	9.0 ±0.3	5.0 ±1.4	3.3 ±0.0	4.3 ±0.3	3.0 ±0.3
		Mature		12.9 ±1.9	9.9 ±0.4	10.0 ±0.7	7.3 ±2.2	3.4 ±0.1	3.5 ±0.5	2.9 ±0.5
		Old		14.6 ±0.9	11.9 ±0.9	11.1 ±0.5	10.5 ±2.0	3.7 ±0.1	3.4 ±0.1	3.1 ±0.9
	Root			2.6 ±0.1	2.1 ±0.0	3.1 ±0.3	1.8 ±0.2	3.2 ±0.5	3.2 ±0.1	5.2 ±0.4
Barley	Leaf	Young		5.5 ±0.8	3.3 ±0.7	3.9 ±0.3	1.7 ±0.4	3.1 ±0.3	3.8 ±0.9	3.8 ±0.9
		Old		16.2 ±0.7	10.8 ±0.4	11.2 ±0.2	7.9 ±1.4	8.7 ±0.4	9.0 ±0.6	9.0 ±0.6
	Root			1.3	0.9	1.7	0.9	1.0	0.8	0.8

根の活性

TTC 法による根の活性の測定は、呼吸系と直接関連のあるコハク酸脱水素酵素の活性を測ることにより、養分や水を吸収するのに必要なエネルギー供給能力を推定するものである。処理後の根の活性は両植物ともに生育と全く同じ傾向を示したが、変動割合はオオムギで大きかった (Fig. 3-6)。

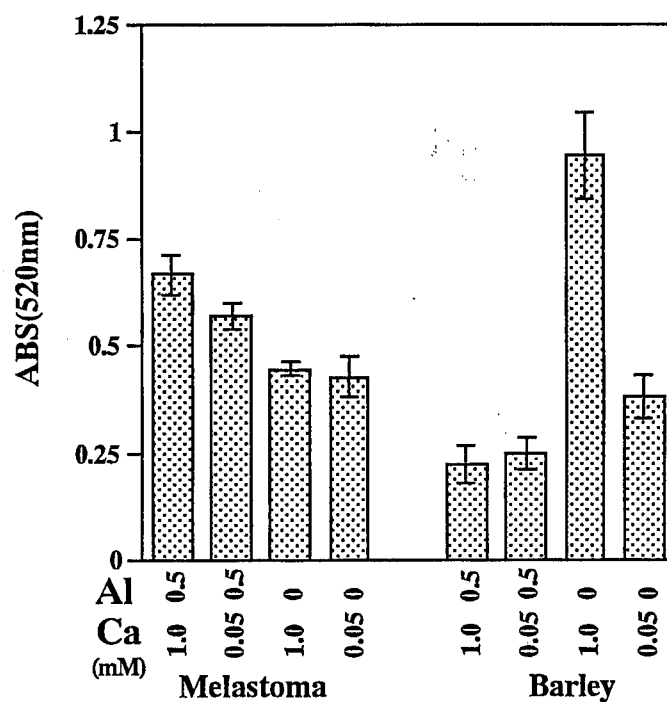


Fig. 3-6 Root activity of plants grown in Al-Ca treatments for 3 weeks determined by TTC methods (Lindström and Nyström, 1987).

根の形態

処理後のメラストーマの根の外観には形態的な Ca 処理の影響はあまりみられなかったが、Al 添加によって白色を呈した (Fig. 3-7a)。オオムギでは 0Al・0.05Ca 区の新根の根端は太く、短くなり、奇形を示した (Fig. 3-7b)。

a



0.5Al•1.0Ca



0.5Al•0.05Ca



0Al•1.0Ca



0Al•0.05Ca

b



0.5Al•1.0Ca



0.5Al•0.05Ca



0Al•1.0Ca



0Al•0.05Ca

Fig. 3-7 Photograph after the Al and Ca treatments. a: melastoma, b: barley.
(Treatment: 3 weeks)

皮層細胞の長さ

メラストーマ根の皮層細胞の長さは先端から 3mm の部分では処理間に差は全くなかったが、先端から 5cm の部分では Al 添加区のほうが Al 無添加区と比較して約 25% 長く、Ca 処理の影響はほとんど無かった (Fig. 3-8)。オオムギの Al 添加区では、皮層細胞の長さは 0Al・1.0Ca 区と比べて根端から 3mm の部分では約 30%、5cm の部分では約 20% 短く、Ca 処理の影響はほとんど無かった。オオムギの 0Al・0.05Ca 区では、先端から 3mm、5cm いずれの点においても皮層細胞の生長は悪く、特に先端から 3mm の部位では 0Al・1.0Ca 区の 1/6 ほどの長さしかなかった。

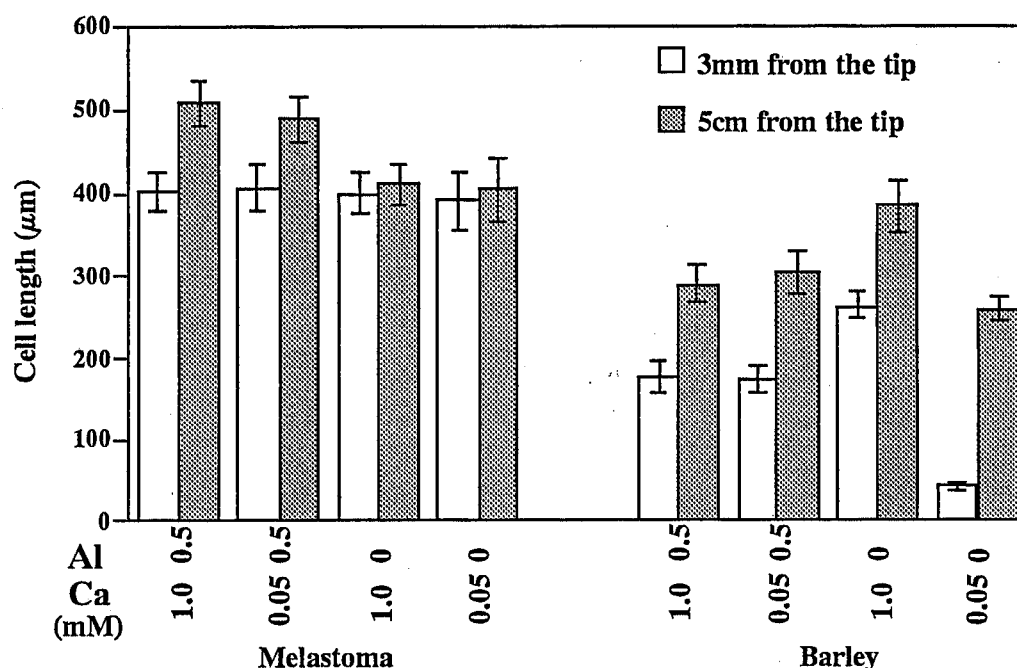
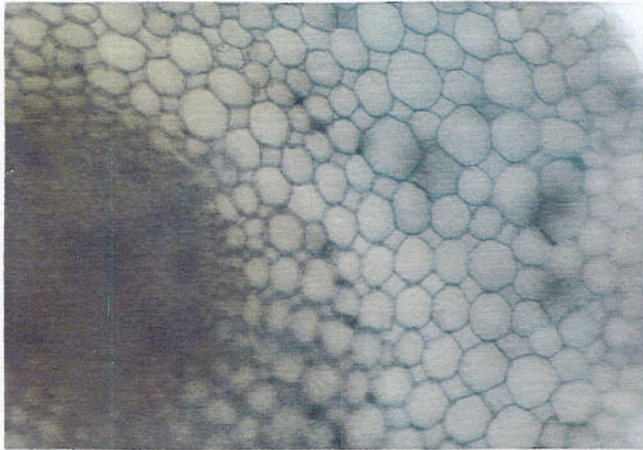


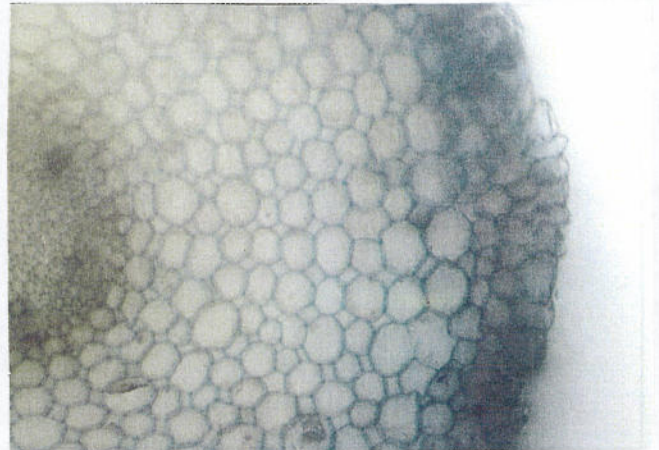
Fig. 3-8 Length of root cortex cells of plants grown in Al-Ca treatments for 3 weeks. Data are means of 10 replications.

原形質膜透過性に与える処理の影響

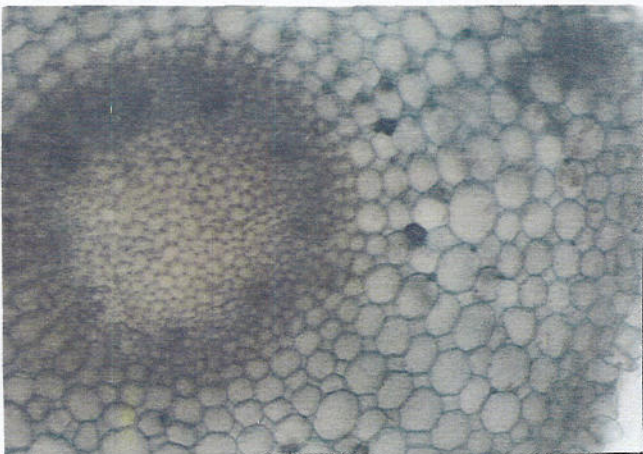
トリパンブルーは原形質膜が正常に機能していれば細胞内に侵入することはない。メラストーマでは全ての処理で細胞の形態に異常はなかったが、0Al・0.05Ca 区のみ、全体的に染色が濃かった (Fig. 3-9a)。オオムギでは Ca 処理に関係なく、Al 添加によって皮層細胞が無くなり、細胞も全体的に濃く染色された (Fig. 3-9b)。また、0Al・0.05Ca 区では、皮層細胞が喪失されるようなこと



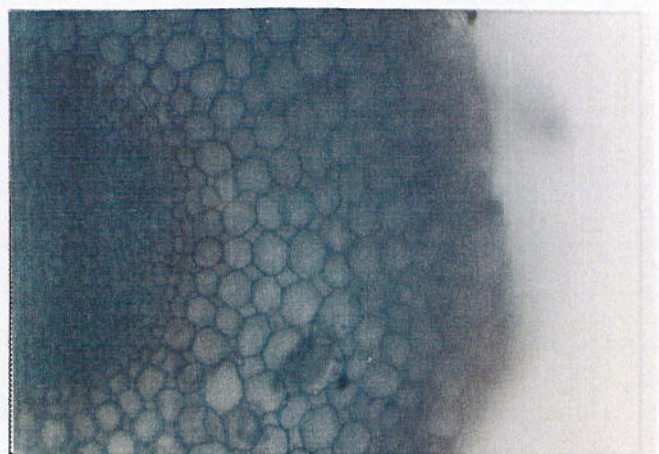
0.5Al•1.0Ca



0.5Al•0.05Ca



0Al•1.0Ca

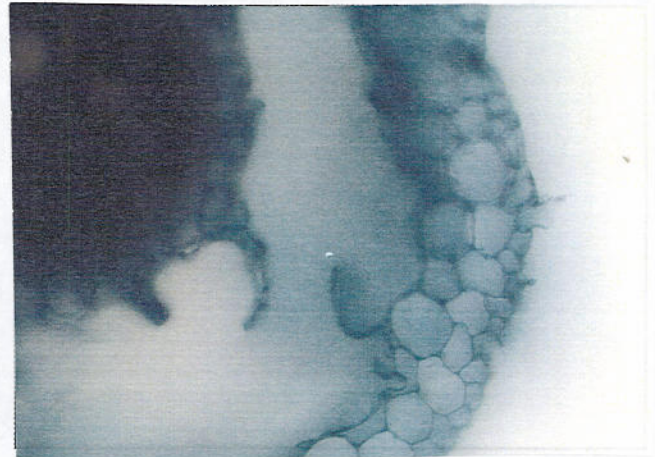


0Al•0.05Ca

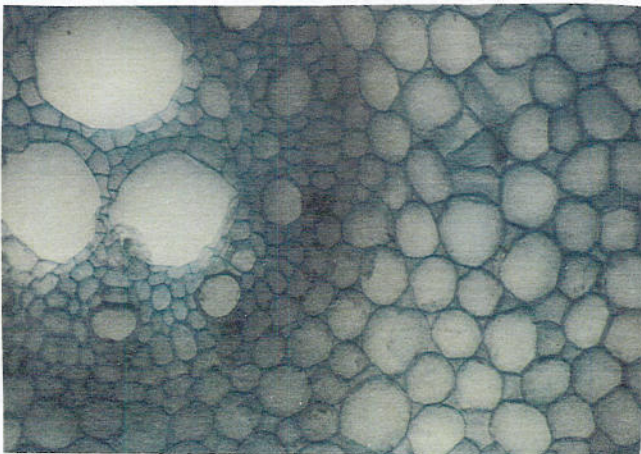
Fig. 3-9a Permeability of trypan blue into cells of roots in melastoma. The cells shows blue color seem to have some disorder of plasma membrane.



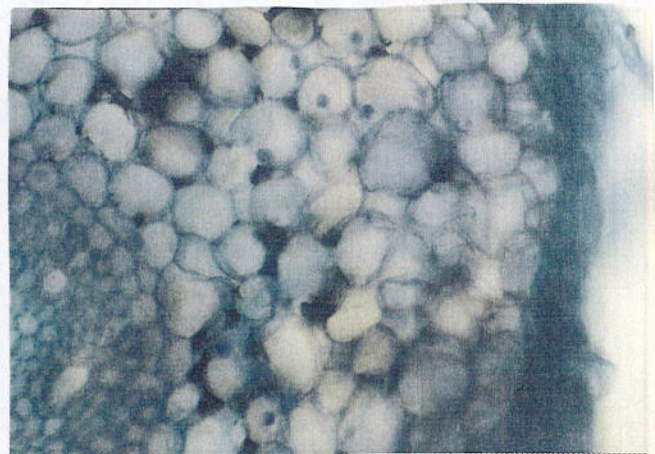
0.5Al•1.0Ca



0.5Al•0.05Ca



0Al•1.0Ca



0Al•0.05Ca

Fig. 3-9b Permeability of trypan blue into cells of roots in barley.

は無かったが、多くの細胞は染色され、核の染色も確認された。一方、0Al・1.0Ca区では、核が染色されることはなく、細胞は健康な状態を保っていた。

メラストーマ根のリグニン含量

メラストーマ根のリグニン含量はAl添加区、特に0.5Al・1.0Ca区で少なく、生育とは反対の傾向を示した (Fig. 3-10)。

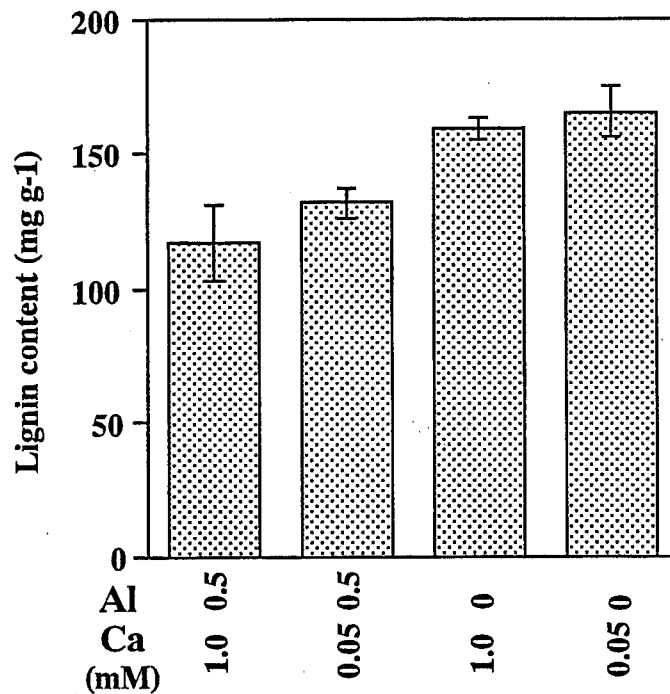


Fig. 3-10 Lignin content of melastoma grown in the Al and Ca treatment.

第3節 考察

一般に植物細胞中の Ca 含有率は比較的高いが、そのほとんどは細胞壁に結合、あるいはオルガネラ中に隔離されおり、細胞質内の遊離の Ca^{2+} 濃度は 10^{-7} から 10^{-6} M と非常に低い (Clarkson, 1984)。Ca は生体膜の構造と機能を維持し、細胞壁構造の保持に重要な元素である (高橋, 1993)。また、液胞中には炭酸カルシウムあるいはシュウ酸カルシウムの結晶として存在し、小胞体、ミトコンドリアなどにも存在する。細胞質内の遊離の Ca^{2+} は非常に低濃度ではあるが、セカンドメッセンジャーとして細胞の代謝に重要な役割を果たしている。一般に酸性土壌では塩基の溶脱した土壌が多く、さらに Al が Ca 吸収に対して拮抗阻害をすることは先に第1章で述べたとおりである。Pegtel (1987) は、このような酸性土壌に生育し、Al 集積性を持ち、Al により生育が促進されるコマススキは培地の Ca および Mg が低濃度の場合、これらの濃度が高い場合と比べて Al による生育促進効果ははるかに大きいことを報告した。この報告は、酸性土壌に適応した植物に対して、Al が Ca あるいは Mg の何らかの効果を代替していることを示唆するものである。

前章の実験で、メラストーマは Ca を含まない培地でも Al が存在すると根の生育が促進されたため (第2章-第3節)、メラストーマにおいて、根の細胞壁あるいは膜の構造と機能の保持において Al が Ca の代替をしている、あるいは Ca 以上の効果を Al が発揮している可能性が予想された。本章の実験で、メラストーマは、通常の作物では生育が著しく低下するような低濃度 (0.1 mM) の培地 Ca 濃度でも、Al が存在すると旺盛な生育を維持することができ (Fig. 3-1)、塩基が溶脱された酸性土壌での生育には非常に適していることが明らかとなった。しかしながら、Ca に対する Al の代替性に関しては、低 Ca 養分条件下でのメラストーマにおける Al の生育促進効果が高 Ca 養分条件下よりも大きいことはなく (Fig. 3-1)、培地 Ca 濃度がさらに下がると Al の生育促進効果は

小さくなり (Fig. 3-6)、Ca を完全に培地から除去すると、地上部および根部ともに Al による Ca 欠乏促進に起因する生育阻害が観察された (Fig. 3-4)。この結果から、メラストーマにおいて Al は Ca の完全な代替はできず、むしろ Al による生育促進効果を十分に発揮するには Ca がある程度必要であることが明らかとなった。

しかし、生育からだけでは根の細胞機能の面における Al と Ca 処理の影響を知ることはできない。そこで、まず、根細胞の膜機能に焦点を当て、トリパンブルーの原形質膜透過性に与える Al と Ca の影響を調査したところ、メラストーマの根では、0Al・0.05Ca 区で他の処理よりもトリパンブルーによる濃い染色が観察された (Fig. 3-9a)。メラストーマの場合、オオムギの 0Al・0.05Ca 区のように核がトリパンブルーによって染色されているわけではなく (Fig. 3-9b)、根の細胞全体が染色されているため、トリパンブルーが膜を透過したのかどうかは明らかではない。しかし、著しい根の生長阻害を受け、根の構造が破壊されたオオムギの 0.5Al 区の根細胞が、全体的に濃くトリパンブルーに染色されていたことから (Fig. 3-9b)、トリパンブルーによって染色された細胞が何らかの異常な状態にある可能性は高い。この染色が細胞内へのトリパンブルーの侵入を示しているのなら、メラストーマにおいて、0Al・0.05Ca 区以外ではこの現象が観察されなかったため、1.0Ca 処理および 0.5Al 処理によって、膜が正常に維持されたと考えることができる。この結果から、メラストーマの根細胞の膜の機能保持に対して Al は Ca と類似した効果を持つ可能性があり、このことは膜を介した養分吸収に対しても関わっていると思われる。

また、TTC 法により根の活性の測定した結果、メラストーマの根の活性は 0Al・1.0Ca 区と比較して 0Al・0.05Ca 区で大差なく、0.5Al・0.05Ca 区で約 1.3 倍、0.5Al・1.0Ca 区で約 1.5 倍にそれぞれ上昇した (Fig. 3-6)。今回、根の活性測定に用いた TTC 法では、呼吸系と直接関連のあるコハク酸脱水素酵素の活性を測定し、根の養分吸収に必要なエネルギーの供給能を調べたことになる。一般に、通常の作物では、Al は主にミトコンドリア電子伝達における cytochrome

pathway を阻害し (de Lima and Copeland, 1994)、それによって引き起こされる呼吸の低下が養分吸収阻害に関わると考えられている (Keltjens, 1988)。メラストーマにおいて、その呼吸能に基づいた根の活性が Al によって上昇することは、根の N、P、K 等の養分の能動的吸収が Al により高まる原因であることを示唆する (Tables 3-1, 3-2, 3-3)。実際に、前章ではメラストーマの能動的 P 吸収能が Al によって大きく上昇することが確認されている (Fig. 2-7)。処理後のメラストーマの乾物重 (Fig. 3-5) と根の活性 (Fig. 3-6) の間には強い相同性があることから、根の活性の上昇によって引き起こされた養分吸収能の上昇が、Al による生育促進の主因であると考えられる。さらにメラストーマでは、この養分吸収の促進に加えて、吸収された Al が代謝に対して有益な効果をおよぼすことも示唆されている (第2章-第3節)。

メラストーマの根の伸長が Al によって促進されることはすでに明らかにしたが、根の細胞の生長に対しても Al は同様の効果を持つことが本章の実験で明らかになった。根の皮層細胞の長さは、根端から 3mm の部位では Al 処理間に差はないが、根端から 5cm の部位では、Al 添加したほうが約 25% 長かった (Fig. 3-8)。

一般に、細胞伸長を阻害する要因の一つとして、病原、外傷、あるいは Al ストレスによって引き起こされるリグニン沈積等による細胞壁の強化が報告されている (Hamel et al., 1998; Sasaki et al., 1996)。そこで、メラストーマの根のリグニン含量を測定したところ、Al 添加区と比較して Al 無添加区で高い値を示した (Fig. 3-10)。根におけるリグニンは、主に成熟した細胞壁に蓄積するため、根端から 5cm の部位におけるリグニン集積量の増加が、この部位の細胞伸長阻害に関係していると予想される。先に述べたように、細胞壁におけるリグニン沈積量の増加は Al ストレスを含めた各種ストレスによって引き起こされるが、メラストーマの場合は Al 欠乏時に根の細胞がストレスを受け、リグニン沈積量が増加するものと思われる。このリグニン沈積量の増加は Al 無添加時の根の伸長不良や細根の減少を引き起こし (Fig. 3-3)、根の養分吸収能を低下させる原

因になると理解される。また、メラストーマの根が Al 無添加時に褐色を呈することにも (Figs. 3-2, 3-7a)、このリグニン集積量の増加が関わっているかも知れない。

通常の植物では Al は Ca 吸収を原形質膜上で拮抗的に阻害するが (Dign et al., 1993; Huang et al., 1992ab; Piñeros and Tester, 1993; Rengel and Elliott, 1992)、Al 集積植物であるメラストーマの Al 吸収は Ca によって阻害されることはなかった (Tables 3-1, 3-2, 3-3)。このことはメラストーマの Al 吸収が独自の機構によりなされている可能性を示唆する。メラストーマの葉の Al 含有率は古葉と若葉の差が小さく、未展開の最も若い葉でも $7,000 \text{ mg kg}^{-1}$ を超えた (Table 3-2)。一方、メラストーマと同様に、Al により生育促進を受ける Al 集積植物としてよく知られるチャを圃場で栽培したときの葉の Al 含有率は、古葉では $30,000 \text{ mg kg}^{-1}$ に達するが、若葉では 600 mg kg^{-1} 程度にしかならないことが報告されている (Matsumoto et al., 1976b)。彼らは Al がチャの根の伸長において何らかの生理的作用を果たした後、老廃物として徐々に葉に集積されるのではないかと推定している。しかし、メラストーマ体内での Al は、チャと比べてその移行速度が非常に速く、彼らが述べるような単なる老廃物として葉に蓄積されているとは考えにくく、地上部においても何らかの代謝系に関与していると推定される。メラストーマにおける Al 吸収機構と体内に取り込まれた Al に関する考察は第5章で詳しく行う。

第4節 要約

- 1) 膜機能が正常に働いている細胞はトリパンプルーを細胞内に侵入させない。低 Ca 濃度下で Al を添加することによりメラストーマ根細胞のトリパンプルー排除能が改善されたことから、Al はメラストーマの根細胞の膜機能の保持に対して、Ca と類似した効果を持つと考えられた。
- 2) Al はメラストーマの根の活性 (TTC 法により測定) を上昇させた。この活性の上昇は Al による生育促進の結果と同じ傾向であったため、Al がメラストーマの根の能動的な養分吸収を上昇させ、生育を促進させることが裏付けられた。
- 3) Al 不在下で生育したメラストーマの根のリグニン含有率は Al 存在下で生育した根より高く、このことは根の細胞伸長阻害の原因となり、結果的には細根減少等の形態的な生育不良を引き起こすと予想された。
- 4) 通常の植物では Ca 吸収は Al によって拮抗的に阻害されるが、Al 集積植物であるメラストーマの Al 吸収に対して Ca は全く影響せず、独自の Al 吸収機構が存在している可能性が示唆された。また、若葉の Al 含有率は成葉と大差なく、他の Al 集積植物であるチャよりはるかに高いことから (Matsumoto et al., 1976b)、メラストーマの体内での Al 移行速度は相当速いと考えられた。

第4章 強酸性土壤に適応した植物におけるアルミニウムと窒素源の相互作用

強酸性土壤では硝酸化成作用が抑制されるため、アンモニウム態窒素 ($\text{NH}_4\text{-N}$) が主な窒素源となる (Foy et al., 1978; Foy, 1988; Pilbeam and Kirkby, 1992)。このため、これまで述べてきた Al 過剰に対する適応能力とともに $\text{NH}_4\text{-N}$ を有効利用する能力も強酸性土壤で旺盛な生育を維持するには重要である。多くの植物種は硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$) を積極的に吸収し、硝酸態窒素が窒素源であるほうが生育が良好である (但野と田中, 1976; 森次ら, 1980; Pilbeam and Kirkby, 1992)。しかしながら、異なる窒素源の吸収は培地の pH 変化に大きく影響するため、窒素源そのものの嗜好性だけではなく、窒素吸収に関わる培地の pH 変化が生育に与える影響も考慮する必要がある (森次ら, 1980; Schubert and Yan, 1997)。 $\text{NO}_3\text{-N}$ の吸収においては、 H^+ が細胞内に共輸送されるため、根圏のアルカリ化を生ずる。一方、 NH_4^+ 吸収は原形質膜の脱分極を引き起こすため、 H^+ の放出量が増加し、根圏の酸性化を引き起こす (Schubert and Yan, 1997)。第1章—第2節で述べたように、酸性土壤における Al は pH の上昇によって沈殿し、無毒となり、逆に pH が低下すると Al が溶解するため、窒素源の嗜好性は Al 耐性とも大きく関わる可能性がある。そこで、本章では強酸性土壤に適応した植物の異なる窒素源に対する生育反応および根圏の pH 変化能を調査し、強酸性土壤への適応性との関連を解析した。

第1節 異なる窒素源とアルミニウムが生育と養分吸収に与える 影響

実験方法

育苗

熱帯に生育する木本植物種であるメラストーマ、*A. mangium*、メラルーカ、および Al 感受性作物であるオオムギ (var. Manriki) を第2章-第1節と同様に育苗した。

処理

前培養後、約 10cm の高さの幼植物体をメラストーマとメラルーカは2個体、*A. mangium* は4個体、オオムギは6個体、処理培養液を含む 3L ポットにそれぞれ移植した。処理は 0.5mM Al・2mM NH₄ 区 (+Al+NH₄ 区)、0.5mM Al・2mM NO₃ 区 (+Al+NO₃ 区)、0mM Al・2mM NH₄ 区 (-Al+NH₄ 区)、および 0 mM Al・2 mM NO₃ 区 (-Al+NO₃ 区) の4区を設定した。Al、NH₄、および NO₃ はそれぞれ AlCl₃、NH₄Cl、および NaNO₃ として添加した。根が引き起こす根圏の pH 変化を直接的に Al 耐性に影響させるため、培養液の pH は処理開始時に 4.00 に NaOH あるいは HCl で合わせた後は1週間の処理の間、調節しなかった。処理培養液中の養分は N 以外は標準培養液に従った (Table 2-2; P=0.1mM)。蒸散による液量の減少を防ぐため、毎日脱塩水を培養液に補給した。実験は栽培、分析ともに3反復で行った。

培養液の分析

1 週間の処理後、培養液中の pH、有機酸濃度、全 P 濃度、モノマー態 Al 濃度、および全 Al 濃度を調査した。植物体を植えていない培養液の pH は一週間、温室において変化することがなかったので、植物による培養液の H⁺ 濃度の変化は、pH メーターで測定した値から計算した。培養液を濾紙 (No. 5C,

ADVANTEC TOYO, Japan) で濾過後、有機酸濃度はキャピラリー電気泳動法 (Quanta 4000 CE, Waters) で、全 P 濃度はバナドモリブデン酸イエロー法で、モノマー態 Al 濃度はピロカテコールバイオレット (PCV) 法 (Kerven et al., 1989) で、全可溶性 Al 濃度は原子吸光光度法でそれぞれ測定した。モノマー態 Al 濃度の測定は、各サンプル中の全 Al 濃度が $10 \mu\text{M}$ になるように希釈した後、行った。キャピラリー電気泳動法の測定条件は以下の通りである; 電解液: CIA-PACTM OFM Anion-BT、 $100 \text{ mM Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 、キャピラリー: Fused silica ($50 \mu\text{m} \times 60\text{cm}$)、検出: 185 nm 。

植物体の分析

50-150 mg のサンプルを $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ により湿式灰化し、 25mL に定容した (水野と南, 1980)。各元素の分析法は第2章—第1節に準ずる。

メラストーマ根の pH 変化能と Al 吸収との関係

メラストーマ根の pH 変化部位を調査するため、水ごけ上で培養したメラストーマの幼植物 (地上部の高さ約 3cm) を $0.05 \text{ (w/v) \% BCG}$ (bromocresol green) を含む $1\% \text{ (w/v)}$ 寒天培地に移植した。寒天培地には 0.5mM NH_4 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) を含む処理区 ($+\text{NH}_4$ 区) と含まない処理区 ($-\text{NH}_4$ 区) を設定した。移植した植物体を暗所、 25°C で 24 時間培養した。

次に、メラストーマの Al 吸収部位を調査するため、Al を含まない標準培養液 (Table 2-2) で生育させた植物体の新根を、先端から約 6cm のところで切断した。処理のための塩 (AlCl_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) および 0.1mM CaCl_2 を含む $1\% \text{ (w/v)}$ 寒天培地に切断根を包埋した。処理は $0\text{mM Al} \cdot 0.3\text{mM NH}_4$ 区 ($-\text{Al}+\text{NH}_4$ 区)、 $2\text{mM Al} \cdot 0\text{mM NH}_4$ 区 ($+\text{Al}-\text{NH}_4$ 区)、および $2\text{mM Al} \cdot 0.3\text{mM NH}_4$ 区 ($+\text{Al}+\text{NH}_4$ 区) の3区である。それぞれの培地に包埋した根を暗所、 25°C で 24 時間培養した。培養後、寒天に $0.035\% \text{ (w/v)}$ PCV を添加し、PCV を寒天中に浸透させるため 80°C で 5 分間加熱した。

結果

生育

処理期間の生長量を $-Al+NO_3$ 区に対する相対値として Fig. 4-1 に示した。熱帯の強酸性土壌に適応した植物、特にメラストーマで $+Al$ 処理および $+NH_4$ 処理によって生育は促進された。対照的に、オオムギの生育は $-Al+NO_3$ 区で最も良好であり、 $+Al$ 処理および $+NH_4$ 処理の両処理によって生育は低下した。熱帯の3種における $+NH_4$ 処理の生育促進効果は $+Al$ 区で $-Al$ 区より顕著であった。

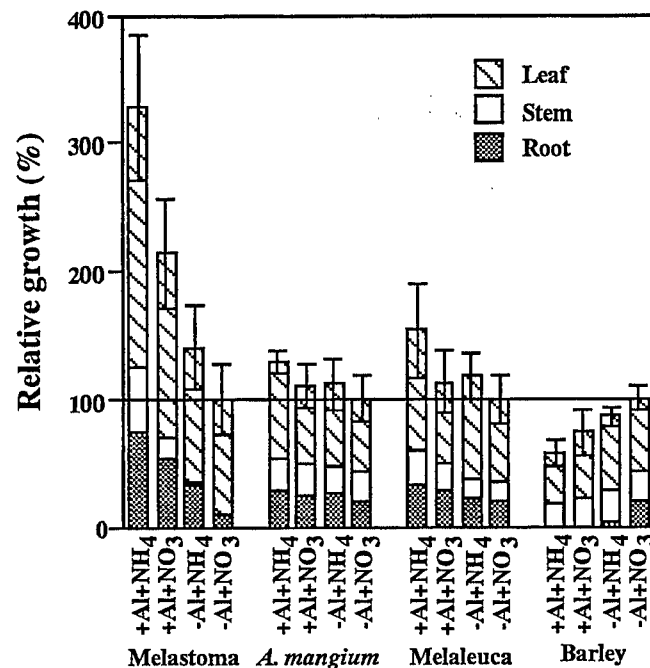


Fig. 4-1 Relative growth of plants grown in Al and N-source treatment.

元素含有率

メラストーマの葉は $+Al$ 区で $3mg\ g^{-1}$ 以上の Al を集積した (Table 4-1)。メラストーマの $-Al$ 区の葉に集積した少量の Al は前培養中に集積したものと思われる。全ての植物で根の Al 含有率は $+Al+NH_4$ 区よりも $+Al+NO_3$ 区で高かったが、葉の Al 含有率に影響はなかった。

Table 4-1 Al concentrations (mg g^{-1}) in leaves, stems, and roots of plants grown in the Al-N treatment. Values are means of 3 replicates $\pm$ SE.

Species	Treatment	Leaves	Stems	Roots
Melastoma	+Al+NH ₄	3.20 $\pm$ 0.09	1.73 $\pm$ 0.03	4.71 $\pm$ 0.17
	+Al+NO ₃	3.49 $\pm$ 0.42	1.93 $\pm$ 0.07	7.38 $\pm$ 0.25
	-Al+NH ₄	0.22 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.07
	-Al+NO ₃	0.24 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.09
<i>A. mangium</i>	+Al+NH ₄	*Trace	Trace	0.44 $\pm$ 0.04
	+Al+NO ₃	Trace	Trace	4.85 $\pm$ 0.38
	-Al+NH ₄	Trace	Trace	Trace
	-Al+NO ₃	Trace	Trace	Trace
Melaleuca	+Al+NH ₄	Trace	Trace	1.85 $\pm$ 0.26
	+Al+NO ₃	Trace	Trace	4.15 $\pm$ 0.21
	-Al+NH ₄	Trace	Trace	0.20 $\pm$ 0.04
	-Al+NO ₃	Trace	Trace	0.15 $\pm$ 0.02
Barley	+Al+NH ₄	Trace	Trace	2.97 $\pm$ 0.55
	+Al+NO ₃	Trace	Trace	4.60 $\pm$ 0.94
	-Al+NH ₄	Trace	Trace	0.79 $\pm$ 0.28
	-Al+NO ₃	Trace	Trace	0.50 $\pm$ 0.08

*Trace: $<0.1 \text{ mg g}^{-1}$

Al 添加処理と窒素源処理が養分吸収に与える影響を調査するため、処理後の葉の養分含有率を調査した (Table 4-2)。両窒素源区において、Al 処理は3種の熱帯植物の葉の N 含有率にほとんど影響しなかった。一方オオムギでは、+NO₃ 区で+Al 処理によって著しく葉の N 含有率が低下した。窒素源の影響については、3種の熱帯植物では両 Al 処理ともに+NH₄ 区で+NO₃ 区より N 含有率が高かった。オオムギは、Al 欠除区では+NO₃ 区で NH₄ 区より葉の N 含有率は高く、逆に Al 添加区では+NH₄ 区で+NO₃ 区より高かった。

葉の P 含有率はメラストーマでは処理間でほとんど差はなかったが、*A. mangium* とメラルーカでは+Al+NO₃ 処理によって有意に低下した。オオムギの葉の P 含有率は N 含有率と同様の傾向であった。

メラストーマの葉のカチオン (K、Mg、および Ca) 含有率はあまり処理の影響は受けなかった。*A. mangium* とメラルーカの葉のカチオン含有率は -Al+NO₃ 区の K 含有率が他の処理と比べて低く、Ca 含有率が高かったが、その他では処理の影響は小さかった。オオムギの葉のカチオン含有率は Al 添加および NH₄ 添加によって低下した。

Table 4-2 N, P, K, Ca, and Mg concentrations (mg g⁻¹) in leaves of plants grown in the Al-N treatment. Values are means of 3 replicates $\pm$ SE.

Species	Treatment	N	P	K	Ca	Mg
Melastoma	+Al+NH ₄	38.2 $\pm$ 0.7	3.16 $\pm$ 0.28	18.4 $\pm$ 0.6	6.50 $\pm$ 0.34	3.27 $\pm$ 0.45
	+Al+NO ₃	33.9 $\pm$ 0.8	2.98 $\pm$ 0.37	20.2 $\pm$ 0.0	6.91 $\pm$ 0.20	3.26 $\pm$ 0.54
	-Al+NH ₄	37.3 $\pm$ 1.3	3.08 $\pm$ 0.25	18.4 $\pm$ 1.6	7.29 $\pm$ 0.46	3.18 $\pm$ 0.26
	-Al+NO ₃	33.1 $\pm$ 0.3	3.40 $\pm$ 0.24	22.4 $\pm$ 1.4	6.92 $\pm$ 0.60	2.68 $\pm$ 0.24
<i>A. mangium</i>	+Al+NH ₄	48.4 $\pm$ 1.0	3.61 $\pm$ 0.14	18.9 $\pm$ 0.2	1.91 $\pm$ 0.13	1.98 $\pm$ 0.08
	+Al+NO ₃	43.1 $\pm$ 0.9	2.38 $\pm$ 0.16	17.2 $\pm$ 0.4	2.49 $\pm$ 0.11	2.06 $\pm$ 0.09
	-Al+NH ₄	47.3 $\pm$ 0.4	3.93 $\pm$ 0.21	18.7 $\pm$ 0.2	2.14 $\pm$ 0.06	2.02 $\pm$ 0.06
	-Al+NO ₃	42.8 $\pm$ 0.7	3.36 $\pm$ 0.10	15.8 $\pm$ 0.1	3.80 $\pm$ 0.24	2.14 $\pm$ 0.09
Melaleuca	+Al+NH ₄	49.7 $\pm$ 0.8	3.22 $\pm$ 0.22	18.1 $\pm$ 1.0	4.17 $\pm$ 0.09	5.10 $\pm$ 0.28
	+Al+NO ₃	37.9 $\pm$ 3.7	1.75 $\pm$ 0.08	16.1 $\pm$ 0.9	4.66 $\pm$ 0.31	4.73 $\pm$ 0.15
	-Al+NH ₄	45.9 $\pm$ 7.1	2.95 $\pm$ 0.06	17.1 $\pm$ 0.7	4.33 $\pm$ 0.23	6.07 $\pm$ 0.25
	-Al+NO ₃	41.4 $\pm$ 0.3	3.03 $\pm$ 0.16	13.4 $\pm$ 0.9	5.79 $\pm$ 0.27	5.12 $\pm$ 0.14
Barley	+Al+NH ₄	66.4 $\pm$ 2.3	6.67 $\pm$ 0.52	56.0 $\pm$ 2.5	1.55 $\pm$ 0.02	1.82 $\pm$ 0.05
	+Al+NO ₃	47.6 $\pm$ 2.1	4.90 $\pm$ 0.38	60.8 $\pm$ 3.5	1.72 $\pm$ 0.18	2.17 $\pm$ 0.14
	-Al+NH ₄	65.8 $\pm$ 1.8	9.67 $\pm$ 0.30	63.5 $\pm$ 1.9	1.93 $\pm$ 0.07	2.55 $\pm$ 0.08
	-Al+NO ₃	70.6 $\pm$ 0.7	10.23 $\pm$ 0.15	86.4 $\pm$ 2.7	3.66 $\pm$ 0.04	3.52 $\pm$ 0.06

根からの H⁺ および有機酸の分泌

処理後の培養液の pH と、それをもとに計算した単位根重当たりの H⁺放出量を Fig. 4-2 に示した。Al を含む溶液は緩衝能を持つのでこの H⁺放出量の値は正確なものではないが、傾向を読みとることは可能である。メラストーマでは、培養液の pH は +Al+NH₄ 区、+Al+NO₃ 区、および -Al+NH₄ 区で低下した (H⁺濃度は上昇した)。一方、メラストーマの -Al+NO₃ 区では pH の変化はなかった。*A. mangium*、メラルーカ、およびオオムギでは培養液の pH は +NH₄ 区で低下し、+NO₃ 区で上昇する傾向であった。

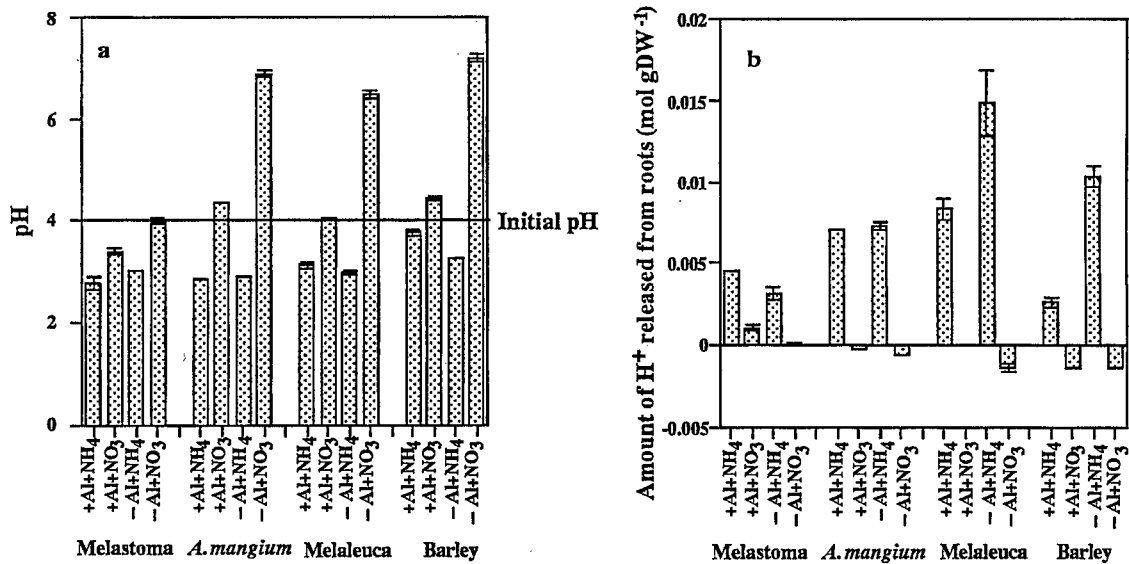


Fig. 4-2 pH of culture solution after the treatment (a) and released H⁺ per root dry weight (b) .

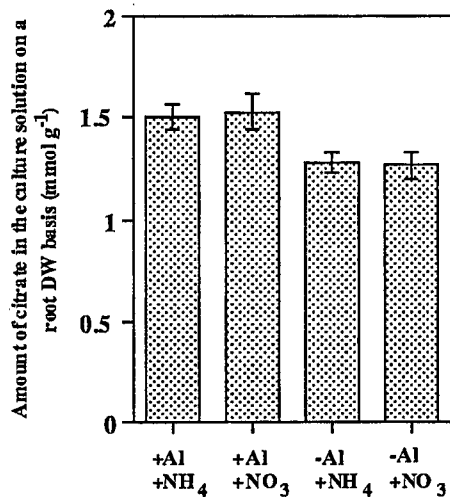


Fig. 4-3 Amount of citrate in culture solution per root dry weight after the treatment in melaleuca.

培養液中の有機酸濃度はメラストーマ、*A. mangium*、およびオオムギでは検出限界以下であった（濃縮サンプルで $<10 \text{ mg L}^{-1}$ ）。しかし、メルルーカでは培養液中にクエン酸が検出され、+Al 区での濃度は -Al 区よりも約 18% 高かった（Fig. 4-3）。窒素源処理の影響はなかった。

培養液中の Al と P の分析

PCV 法による分析結果から、*A. mangium* 以外では、培養液中に存在する Al のほとんどはモノマー態（PCV と速やかに反応する形態）であった（Fig. 4-4）。しかし、*A. mangium* ではモノマー態 Al の比率は +Al+NH₄ 区で低く、このことは培養液中に Al キレート物質が存在することを示唆するものである。キャピラリー電気泳動による分析では有機酸と思われるピークは確認されなかったため、この +Al+NH₄ 区におけるキレート物質は有機酸以外の物質であると推察される。

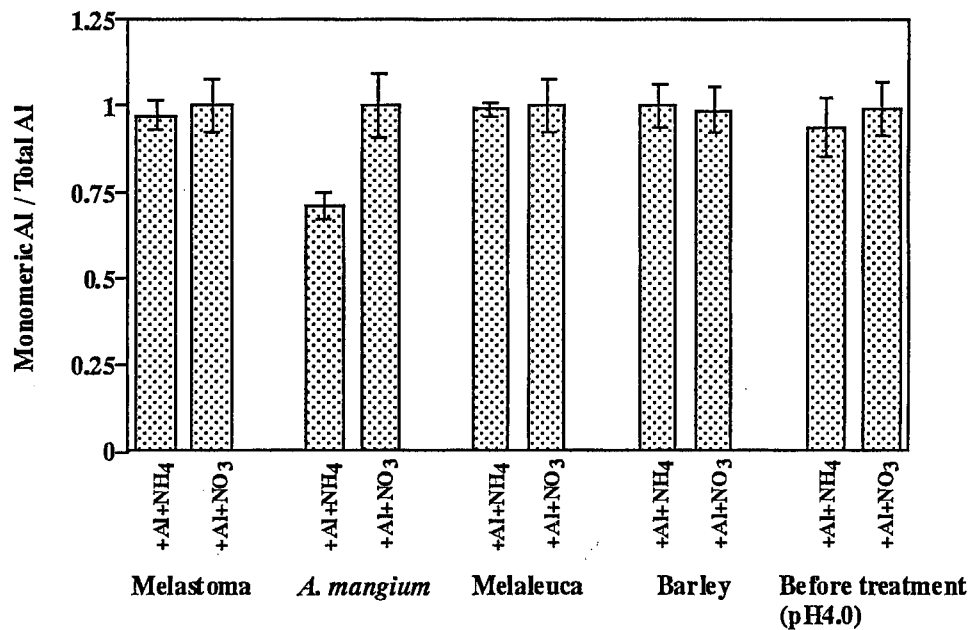


Fig. 4-4 Ratio of monomeric Al to total soluble Al in treatment solution. Monomeric Al was determined by PCV method.

培養液中の全可溶性 Al 濃度と pH の間には負の相関があった (Fig. 4-5a)。
A. mangium、メラルーカ、オオムギの -Al 区の培養液中の溶存 P 濃度は 50~100 μ M であり、pH の影響はなかった (データは示していない)。+Al 区ではリン酸アルミニウム沈殿が生成するため培養液中の溶存 P 濃度は -Al 処理よりも低かったが、培養液の pH が低下するとリン酸アルミニウム沈殿が溶解し、溶存 P 濃度は上昇した (Fig. 4-5b)。メラストーマでは処理に関係なく培養液の溶存 P 濃度が低かったが、これは個体が大きく、処理期間中にほぼ全ての P を吸収し尽くしたためと考えられる。

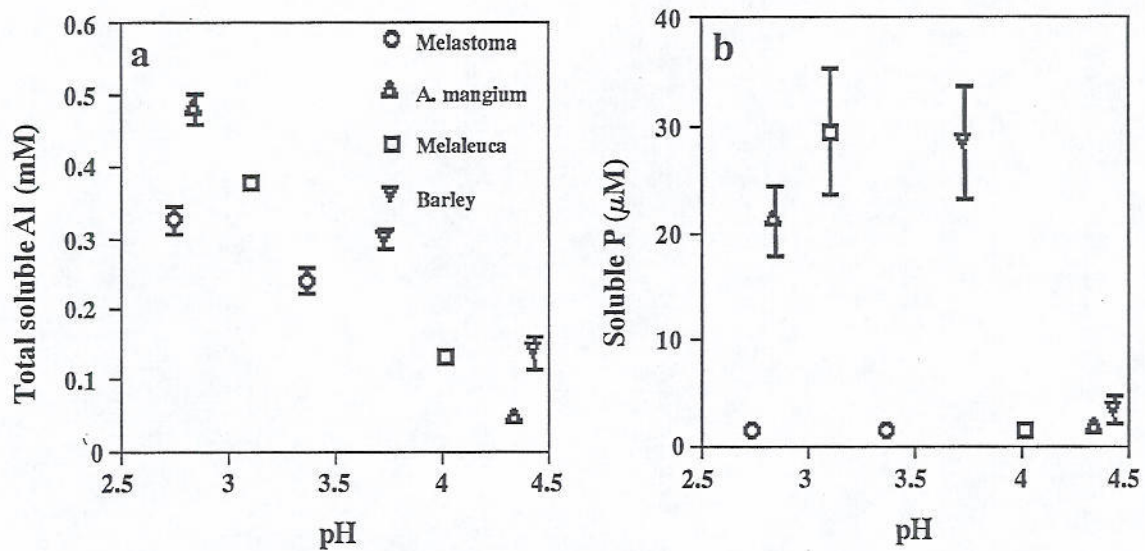


Fig. 4-5 Relationships between pH and total soluble Al (a) and soluble P (b) concentration in culture solution after the treatment. Concentrations of Al and P added were 0.5 mM and 0.1 mM, respectively.

メラストーマ根の pH 変化部位と Al 吸収部位

NH₄ 吸収による根圏の pH 低下と Al 吸収の関係を調査するために Al 集積植物であるメラストーマを供試した。BCG は pH が低下するにつれて、青→緑→黄と色の変化し、黄色い色は pH4 以下を示す。メラストーマ根は NH₄ 共存区において根の全ての部位で pH を低下させたが、NH₄ 欠除区では根圏 pH に変化は無かった (Fig. 4-6)。

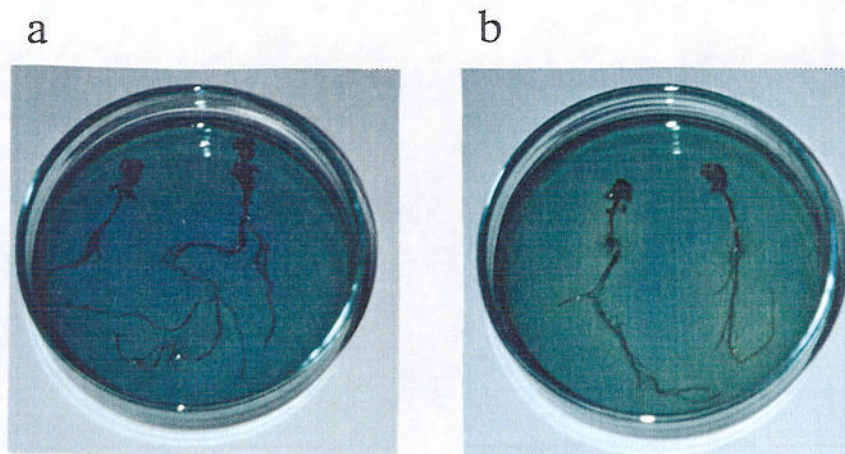


Fig. 4-6 Change of pH in rhizosphere of melastoma stained by BCG. The yellow color indicates a decrease of pH. a: -NH₄, b: +NH₄.

PCV は Al イオンとキレートを作ると青色を示すが、Al の存在しない $-Al+NH_4$ 区では、寒天は黄色を示した (Fig. 4-7a)。今回の実験における寒天の pH は約 6 であり、 $+Al$ 区ではほとんどの Al が沈殿しているため、十分なキレートの形成ができず、寒天の色は青色の前の段階である茶褐色にしかならなかった (Fig. 4-7b, c)。 $+Al-NH_4$ 区では、根の周りも一様に茶褐色を示したのに対し (Fig. 4-7b)、 $+Al+NH_4$ 区では、根の周り、特に根端から 2 cm までの部分が黄色く染色された (Fig. 4-7c)。

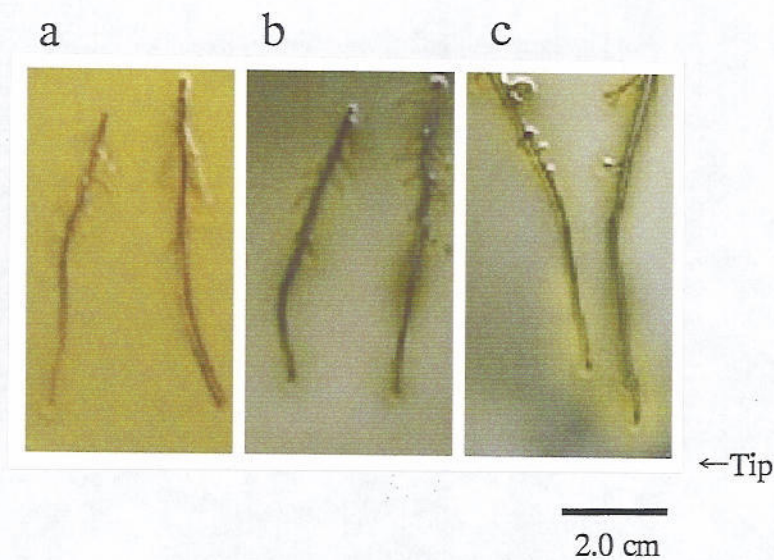


Fig. 4-7 Al uptake of excised roots of melastoma stained by PCV.
a: $-Al+NH_4$, b: $+Al-NH_4$, c: $+Al+NH_4$. The yellow color shows the absence of Al.

第2節 NH_4NO_3 を窒素源として与えた場合の根圏 pH 変化能

実験方法

育苗

第2章－第1節で Al 耐性を調査した各種植物のうち、メラストーマ、メラルーカ、*A. mangium*、*S. guianensis*、*I. barbatum*、ルジグラス、オオイタドリ、ソバ、イネ、およびオオムギ(var. Manriki)を第2章－第1節と同様に育苗し、実験に供試した。

根圏の pH 変化の測定

標準培養液 (Table 2-2、 $\text{P}=10\text{mg L}^{-1}$) を入れた 56L 培養槽に移植し、2 週間の前培養後、実験を開始した。地上部の高さが約 10cm になった植物体を十分に通気した標準培養液 ($\text{P}=10\text{mg L}^{-1}$) を 80mL 加えた 100mL 容試験管にスポンジで 1 個体ずつ固定した。開始時に培養液の pH を NaOH と H_2SO_4 で 4.0 に合わせ、その後は pH の調節は行わなかった。培地 pH を経時的に 36 時間測定した。実験は温室で 2 反復で行い、培養液の温度は 23°C に保った。

結果

培地の pH の変動は植物種間で大きな差があった (Fig. 4-8)。根圏の pH は *A. mangium*、*I. barbatum*、オオイタドリ、およびオオムギでは時間の経過に比例して上昇し、特に *A. mangium* で顕著であった。*S. guianensis*、ルジグラス、イネ、およびソバでは根圏の pH はほぼ一定に保たれた。一方、メラストーマとメラルーカでは根圏の pH は時間の経過に比例して低下した。各種植物の Al 排除能と (Table 2-3) と根圏の pH 変化能の間に有意な関係はなかった。

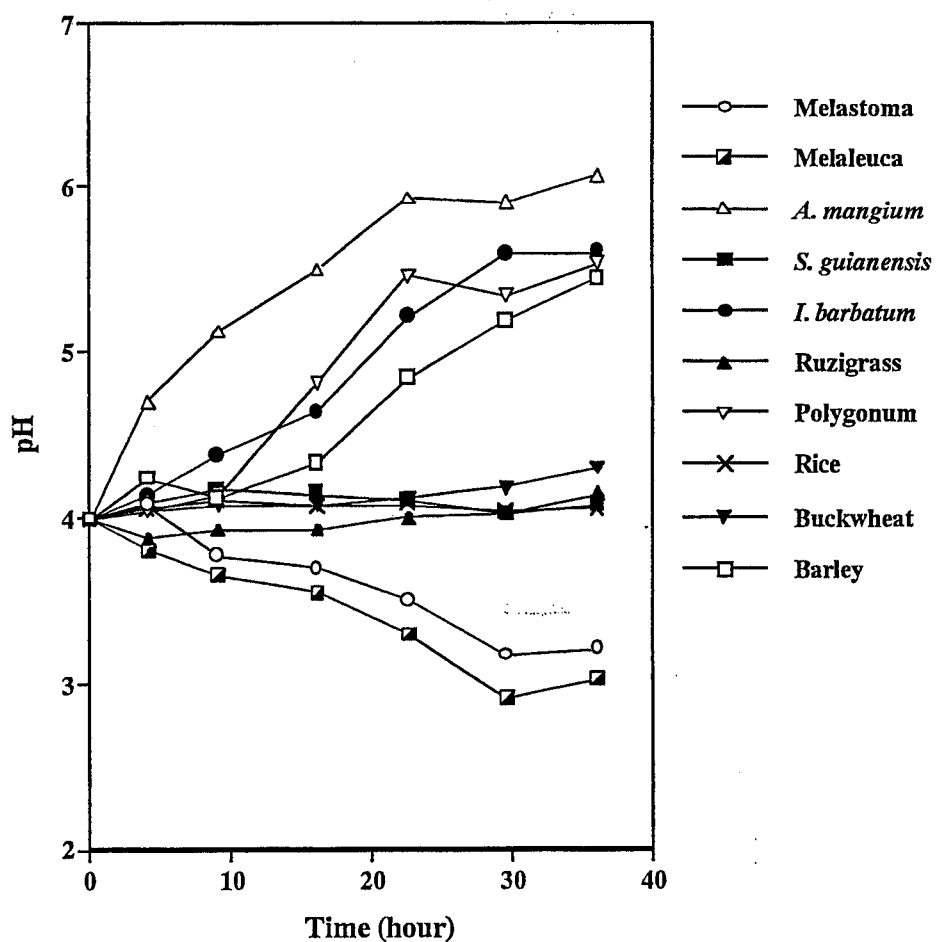


Fig. 4-8 Root-induced pH change in medium. Data are means of two replications.

第3節 考察

第1節の実験では熱帯の強酸性土壤に生育する3種（メラストーマ、*A. mangium*、メラルーカ）、特にメラストーマの生育はこれまでの実験と同様にAl添加により促進され、また、NO₃添加区よりNH₄添加区で生育は良好であった（Fig. 4-1）。一方、オオムギの生育はAl添加によって低下し、NH₄添加区よりNO₃添加区で良好であった（Fig. 4-1）。オオムギの場合、NH₄添加区で生育が不良であったのは、NH₄吸収が引き起こす根圏のpH低下も一因であると思われる（Figs. 2-3, 4-2a）。対照的に熱帯の3種はNH₄吸収による根圏のpH低下（pH 3.0以下）にもかかわらず（Fig. 4-2a）、NH₄添加によって生育は促進された。pH低下自体はこれらの種の生育促進の原因ではないので（Fig. 2-3）、NH₄自身によってこれらの種の生育が促進されると結論づけられる。熱帯の3種の葉のN含有率がNH₄添加区で高かったことは（Table 4-2）、N吸収量の増加がNH₄添加による生育促進の主因であることを示唆する。

一般に、強酸性土壤は溶存Al濃度が高く、有効態窒素の主体がNH₄であるため（Foy et al., 1978; Foy, 1988; Pilbeam and Kirkby, 1992）、このような土壤に生育する種が、AlとNH₄の存在下で生育が良好であるということは非常に有利な特性である。Al耐性の強いシダレカンバ、ヨーロッパカラマツ、ヨーロッパアカマツ、アメリカトガサワラ、およびコナラといった木本種も好NH₄性を持つことが報告されている（Keltjens and van Loenen, 1989）。また、NH₄吸収は他のカチオン吸収を阻害する傾向があると報告されているように（van Beusichem et al., 1988; Pilbeam and Kirkby, 1992）、本実験でもオオムギの葉のカチオン含有率はNH₄添加により低下したが、熱帯の3種では逆に上昇している場合があり（Table 4-2）、このことも強酸性土壤での生育に有利となるであろう。

窒素源の嗜好性は根圏のpH変化に大きく影響するが、根圏のpH変化能は植物のAl耐性を決める上で重要な因子の一つである。pHの上昇は沈殿により

Al 毒性を低下させ、逆に pH の低下は Al の溶解度を上昇させ、その結果 Al 毒性を上昇させるからである。Arabidopsis の変異株である *alr-104* は、根端の周囲の pH を 4.4 から 4.5 に 0.1 上昇させるだけで、20 μ M Al 存在下での根の生長量が、pH 変化能を持たない野生株と比較して3倍以上増加することが報告されている (Degenhardt et al., 1998)。強酸性土壌に適応した植物は、その多くが非常に強い Al 耐性を獲得しているが (第2章)、これまで、根圏の pH 変化能と酸性土壌に適応した植物の Al 耐性との関係を調査した報告は非常に少ない。Cuenca et al. (1990) は、熱帯の酸性土壌に生育する非 Al 集積植物である *Erythroxylon amazonicum* は Al 集積植物である *Richeria grandis* よりも 0.1 mM Al 存在下における根圏の pH 上昇能が高いことを示し、Al 排除能と根圏の pH 上昇能の間に正の相関があることを推定した。しかし、本章の第2節で窒素源として硝酸アンモニウム (NH_4NO_3) を含む標準培養液中での根圏 pH 変化能を 10 種の Al 耐性を異にする各種植物について調査したところ、これらの植物の pH 変化能と Al 排除能との間に一貫した関係はみられなかった (Table 2-3, Fig. 4-8)。第1節の実験で *A. mangium* は NH_4 を窒素源としたほうが生育が若干良好であったが (Fig. 4-1)、両方の窒素源が等モル含まれる場合は根圏の pH を上昇させた (Fig. 4-8)。この pH 上昇は NO_3 吸収のほうが NH_4 吸収よりも優勢であることを示唆する。植物における窒素の同化は NH_4 によってなされるが、体内での NH_4 の過剰集積は植物にとって有害であるため (高橋, 1993)、*A. mangium* は両窒素源が十分量存在する場合は、過剰に集積しても害の少ない NO_3 の吸収量を増加させていると推察される。また、*A. mangium* は Al による生育促進は受けるものの、その濃度が過剰になると生育低下を示すため (Fig. 2-1)、強酸性土壌において根圏の pH を上昇させることは、過剰の Al を減少させることに貢献するであろう。根圏の pH を上昇させた他の種についても、オオイタドリを除いて Al 耐性がそれほど強くなく、pH 上昇による同様の効果が予想できる (Fig. 2-1, 4-8)。

一方、Al による生育促進の割合が最も大きかったメラストーマとそれに次ぐメラルーカは、硝酸アンモニウム存在下でも共通して著しい pH 低下能を示し、

好 NH_4 性が非常に強いことが示された。 NH_4 吸収が引き起こす根圏の pH 低下は培地中の有効態 P と Al の濃度を上昇させる (Fig. 4-5)。メラストーマとメラルーカにとって、培地の有効態 P と Al の増加は、両方とも生育に対してプラスに働く要因となる。これらの種では +Al 区のほうが -Al 区よりも NH_4 添加による生育促進効果が大きかったという結果からもそのことは裏付けられる (Fig. 4-1)。メラルーカは実際に生育している強酸性土壤下でも葉の Al 含有率は極めて低く、Al 排除能が強いが (Osaki et al., 1998)、本実験の結果から、メラルーカの Al 排除には根圏 pH の上昇は関わっていないと考えられる。

+ NH_4 処理は培地の pH 低下をもたらす (Fig. 4-2)、この pH 低下は培地の溶存 Al 濃度の上昇を引き起こしたが (Fig. 4-5a)、植物体の根の Al 含有率は全ての種で + NO_3 区で高かった (Table 4-1)。根の Al 含有率の違いは地上部の Al 含有率にはほとんど影響していないため、+ NO_3 区の根における Al 含有率の上昇は主に細胞外で起こったものと推定される。根の Al 含有率が + NO_3 処理のほうが高かった第一の理由として NH_4 の存在により低下した培地の pH が根に付着した Al を溶解させたことが考えられる。この他にも根のカチオン交換基を NH_4 または H^+ が交換することが若干影響しているかも知れない。

メラストーマは Al 集積植物であり、本実験でも葉に 3 mg g^{-1} 以上の Al を集積した (Table 4-1)。メラストーマは土壤 pH が高く、交換態 Al の量が非常に低い場合でも、葉に多量の Al を集積することが明らかにされている (Osaki et al., 1998)。このことはメラストーマが根圏の難溶性 Al を可溶化していることを意味する。 NH_4 共存下における根圏の pH 低下が、この不溶性 Al の可溶化とその吸収に貢献するかどうかを切断根を用いた実験で調査したところ、 NH_4 共存下で切断根の周り全体、特に根端において Al の吸収が認められた (Fig. 4-7c)。寒天培地の pH は約 6 と高いため、根が根圏の pH を低下させ (Fig. 4-6)、Al を可溶化し、溶出した Al を吸収したと予想される。実際の土壤でもこのような現象が起こっていると考えられ、難溶性 Al の可溶化時には、リン酸の放出も伴われる可能性があり、このこともメラストーマの生育にとってプラスに働くであ

ろう。なお、メラストーマは根圏に有意な量の有機酸を放出することはなかったため、根圏の pH 低下、あるいは Al の体内への取り込みの過程に有機酸は関わっていないものと考えられる。

Al を含む溶液は pH 緩衝能を持つにもかかわらず、メラストーマの根乾物重当たりの培養液の H^+ 濃度上昇 (pH 変化から算出) は $-Al+NH_4$ 区より $+Al+NH_4$ 区で大きかった (Fig. 4-2b)。また、メラストーマの培養液の pH は $-Al+NO_3$ 区では処理期間の変動はなかったが、 $+Al+NO_3$ 区では低下を示した (Fig. 4-2a)。これらの結果はメラストーマの Al 吸収に H^+ の放出が伴われていることを示す。この H^+ の放出と Al 吸収の関係については第5章で詳しく解析する。

第1節で詳しく述べたように、根圏への有機酸の放出能は、植物の Al 耐性を決める大きな要因の一つと考えられている。これは有機酸が Al とキレートを形成することにより、Al の毒性が軽減されるためと考えられている。全ての有機酸が Al 毒性を軽減する能力を持つわけではなく、Al と5員環、あるいは6員環キレート構造を取れるものが候補に上げられ、キレートの安定度が高いほど Al の毒性は軽減される (Hue et al., 1986; Vance et al., 1996)。植物体内に一般的に存在する有機酸の中で最も Al 毒性を軽減する能力が高いと考えられているのがクエン酸である。本実験において、メラルーカは根圏に多量のクエン酸を放出し、その放出量は $+Al$ 処理で増加を示した (Fig. 4-3)。単位根重当たりのクエン酸放出量は、これまで報告されていた *Cassia tora* (Ma et al., 1997ab) やサヤインゲンの Al 耐性品種 (Miyasaka et al., 1991) よりも多い。このクエン酸の放出は、培養液中のモノマー態 Al の量を低下させることはなかったが (Table 4-3)、根のアポプラストで濃縮されたクエン酸がメラルーカ根の Al 排除に寄与している可能性はある。

A. mangium も Al 処理により根からクエン酸を放出することが報告されているが (Osawa et al., 1997)、本実験では *A. mangium* の処理後の培養液中にクエン酸を検出することはできなかった。この差は実験条件の違い、つまり、彼らの実験は 5 mM という高濃度の Al 処理と、30 日間という長期の処理期間であった

ことによるのかも知れない。クエン酸の放出は認められなかったが、 $+Al+NH_4$ 処理の培養液中の可溶性 Al に占めるモノマー態 Al の比率は他の種あるいは処理と比較して有意に低く (Fig. 4-4)、さらに、 $+Al+NH_4$ 区における *A. mangium* の根の Al 含有率は他の種と比較して明らかに低かった。これらのことは *A. mangium* の $+Al+NH_4$ 区の培養液中に何らかの Al キレート物質が存在することを示唆する。 $+Al+NH_4$ 区の培養液を分析したキャピラリー電気泳動のチャートには一般的な有機酸のピークは認められなかったことから、このキレート物質は有機酸以外の物質であると推定される。また、この培養液中のタンパクおよび多糖をエタノールで沈殿させても、モノマー態 Al の低い割合は変わらなかったため、Al キレート物質はタンパクや多糖ではないと考えられる。 $+Al+NH_4$ 区の培養液中の Al 濃度は $+Al+NO_3$ 区より約 10 倍高いため、このキレート物質の放出は Al と NH_4 の共存によって誘導されるというよりも、過剰の Al によって誘導されると考えたほうが妥当であろう。

第4節 要約

- 1) 熱帯の強酸性土壤に生育するメラストーマ、*A. mangium*、およびメラルーカの生育は NO_3 を窒素源とした培地より NH_4 を窒素源とした培地で良好であり、 NH_4 添加による生育促進は N 吸収量の増加が主因であると考えられた。
- 2) メラストーマとメラルーカでは、 $-\text{Al}$ 区より $+\text{Al}$ 区で NH_4 添加による生育上昇割合が大きかった。 NH_4 吸収は培地の pH を低下させ、リン酸アルミニウムの沈殿を可溶化させることから、 $+\text{Al}+\text{NH}_4$ 区では N 吸収量の増加に加えて、培地の溶存 Al および P 濃度の上昇がこれらの種の生育に対して有益な効果をもたらしたと推定された。また、強酸性土壤に適応した各種植物の根圏 pH 変化能と Al 排除能の間に明白な関係はなかった。
- 3) メラストーマの切断根は NH_4 添加により根圏の不溶性 Al を可溶化し、その Al を主に根端から吸収した。また、メラストーマは NH_4 吸収時だけではなく、Al 吸収時にも H^+ を放出した。
- 4) メラルーカの根からはクエン酸が恒常的に放出され、*A. mangium* の根からは未知化合物の放出が Al によって誘導された。これらの物質が根圏で Al とキレートすることにより、メラルーカおよび *A. mangium* の Al 排除能に貢献していると考えられた。一方、メラストーマは有機酸を根圏に放出することはなかった。

第5章 アルミニウム集積植物-メラストーマ-における アルミニウム集積の生理的意義と吸収特性

一般に植物の Al 耐性機構は主に2つのカテゴリーに分ける事ができる。つまり、根細胞に Al を近づけない機構と、体内における Al の解毒機構の2つである。この後者の Al 耐性機構を発達させたのが、Al 集積植物である。Chenery (1948a) は Al 集積植物の目安を、地上部に $1,000 \text{ mg kg}^{-1}$ 以上の Al を集積する種と設定しているが、地上部に $10,000 \text{ mg kg}^{-1}$ を超えるような、極めて高濃度の Al を集積する種も多く存在し、そのほとんどは、熱帯、亜熱帯の強酸性土壤に生育する木本種である (Geoghegan and Sprent, 1996; Haridasan, 1982; Osaki et al., 1995)。このような Al 集積種の体内の Al 耐性機構に関する情報は非常に乏しく、ほとんどわかっていない。

これまでの実験結果から、熱帯の強酸性土壤に適応した木本植物であるメラストーマも体内の Al 含有率が $10,000 \text{ mg kg}^{-1}$ を超える Al 集積植物であり、かつ極めて強い Al 耐性を有し、むしろ Al 施与が生育に対して有益な効果を持つことが明らかとなった (第2、3、4章)。メラストーマにおける Al の有益な効果には、Al による養分吸収促進の他に、体内の Al が持つ何らかの生理的な効果も含まれると考えられる (第2章)。

そこで、本章では Al 集積植物であるメラストーマの体内での Al の存在形態を明らかにし、体内の Al がメラストーマの生育に対して生理的な影響を与えている可能性について検討した。また、多量の Al を地上部に集積するメラストーマには、特異的な Al 吸収機構が存在することが予想されるため、メラストーマの Al 吸収機構に関しても詳しく調査した。

第1節 メラストーマ体内におけるアルミニウムの分配と存在形態の解析

実験方法

育苗およびAl処理

第2章-第1節と同様に育苗したメラストーマの幼植物体を4個体、標準培養液 (Table 2-2、P=10ppm、pH4.0) を含む56L培養槽に移植し、3ヶ月間培養した。その後、植物体を360Lの培養槽に移植し、処理を開始した。処理は1mMの AlCl_3 を添加した区 (+Al区) と添加しない区 (-Al区) を設けた。培養液は2週間に1回交換し、2ヶ月間以上処理を行った。

顕微鏡によるAlの局在部位の調査

Al処理後の成葉および根を採取し、脱塩水でよく洗った後、葉についてはクライオミクロトーム (Laica) で10 μm の厚さの切片を作成した。根についてはミクロトームでの切片作成が困難であったので、剃刀を用いて厚さ約100-200 μm の切片を作成した。根の切片は根端から1mmと5mmの2ヶ所で切片を作成した。スライドガラス上に切片を置き、0.02%ピロカテコールバイオレット (PCV)、2.5%ヘキサミン- NH_4OH 緩衝液 (pH6.2) で15分間染色し、2.5%ヘキサミン- NH_4OH 緩衝液 (pH6.2) で洗浄した後、光学顕微鏡 (Carl Zeiss) で観察した。

Al化合物の分画および分析

(1) Tris-HCl 緩衝液による抽出

新鮮重で20-30gの葉 (若葉、成葉、および古葉) と根を採取し、脱塩水でよく洗浄した。試料に20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) を加え (試料 (g) : 緩衝液 (mL) = 1 : 10)、4℃下でホモジナイズした。ホモジネートを直ちにガーゼを用いて濾過し、濾液を10,000×gで20分間遠心分離した。上清をメンブランフィルター (pore size=0.45 μm) で濾過した。

(2) デタージェント法による残査中の Al の分画

(1)における残査を 80℃で乾燥した後、デタージェント法 (Van Soest, 1963ab; Shinano et al., 1991) により酸性デタージェント繊維画分 (ADF 画分、セルロース+リグニン) および酸不溶性化合物 (Lignin 画分) に分画した。残査中の Al は乾燥後も依然 Tris-HCl 緩衝液に対して不溶性であったため、Al の形態は乾燥の影響を受けていないと推定された。デタージェント法は一般に繊維とリグニンの定量に利用され (Shinano et al., 1991; Osaki et al., 1991) 0.5M あるいは 72% の H_2SO_4 を分解に用いる。デタージェント法を以下に簡略化して示す。

ADF の単離 (セルロース+リグニン) ; 三角フラスコに入れた 100mg の乾燥した抽出残査に 10mL の酸性デタージェント溶液 (2% cetyl trimethylammonium bromide (CTAB、タンパク分解のため) を含む 0.5M H_2SO_4) を添加し、アルミホイルでふたをし、100℃下で 1 時間分解した。分解後、分解液をガラス濾紙 (GA200、Advantec Toyo) を敷いたガラスろ過器を通して吸引濾過し、濾紙上の残査を 80-90℃の熱水とアセトンで洗浄した。この濾紙上に残ったものが ADF 画分である。

Lignin の単離 ; 上記の通りに調整した ADF をガラス濾過器ごと 80℃で乾燥させた後、残査を 72% の H_2SO_4 で覆った。1 時間毎に H_2SO_4 を補充しながら室温中で 3 時間放置した後、残査を 80-90℃の熱水で酸性でなくなるまで吸引洗浄した。

Tris-HCl 緩衝液による抽出残査、ADF 画分、およびリグニン画分中の Al 含有量を湿式灰化後 (水野と南, 1980)、原子吸光光度法で測定した。

(3) Tris-HCl 抽出液の Sephadex G-50 による分画

(1)における抽出液 6mL を葉と根ともに Sephadex G-25 カラム (i.d.=2.0 × 30cm、14mL h⁻¹、3.5mL fraction⁻¹) によりゲルろ過した。分画後、各フラクショ

ンの Al、タンパク、および糖の含有率を原子吸光光度法、Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad)、およびアンスロン法 (Trevelyan and Harrison, 1952) でそれぞれ測定した。得られた Al のピークを構成するフラクションを集め、全可溶性 Al 濃度が 0.3mg L^{-1} になるように希釈し、Kerven et al. (1989) の方法でピロカテコールバイオレット (PCV) に対する反応性を調査した。すなわち、希釈したサンプル 3mL に対し 0.5mL の Fe 妨害試薬 (0.1% 1,10-phenanthroline、0.5% アスコルビン酸溶液) を加え、1mL の 15% ヘキサミン- NH_4OH 緩衝液 (pH6.2) および 0.2mL の 0.0375% PCV 溶液を添加し、経時的に 585nm における吸光度の変化を測定した。

(4) Tris-HCl 抽出液中の Al の TCA およびメタノールに対する溶解度

抽出液中に存在する Al がタンパクや多糖と結合しているかどうかを調べるため、トリクロロ酢酸 (TCA) あるいはメタノールに対する抽出液中の Al の溶解度を調査した。タンパクは TCA 溶液中で沈殿し、多糖とタンパクはメタノール中で沈殿する。一定量の葉および根の抽出液をとり、TCA の場合は濃度が 5 % となるように TCA を添加し、懸濁した。メタノールの場合は抽出液をロータリーエバポレーターで乾固し、そこに同量のメタノールを入れて懸濁した。それぞれ 4 °C で 12 時間放置後、 $10,000\times g$ で 20 分遠心分離し、さらに上清を $0.45\text{ }\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過した。濾液中の Al を原子吸光光度法で測定した。

(5) 抽出液中の Al 濃度と有機酸濃度の関係

+Al 区と -Al 区における葉 (若葉、成葉、古葉) および根 (根端側、基部側) を Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) で (1) と同様に抽出し、その抽出液中の Al 濃度と有機酸濃度の関係を調査した。Al 濃度は原子吸光光度法で、有機酸濃度はキャピラリー電気泳動で測定した。キャピラリー電気泳動の測定パラメータは第 4 章 - 第 1 節に従う。

(6) ^{27}Al NMR

^{27}Al NMR 分光法を新鮮葉中の Al の形態の調査に用いた。+Al 区の成葉を採取し、NMR 試料管（直径 10mm）に入れた。1M の AlCl_3 (pH2.5) をケミカルシフト (0ppm) の較正のため、0.6M AlCl_3 + 0.3M シュウ酸溶液 (pH2.5) を葉のスペクトルと比較するために用いた。 ^{27}Al NMR スペクトルは Bruker MSL-400 spectrometer により 104.262MHz で測定した。測定パラメータは frequency range: 62.5kHz、パルス幅: 12 μ s、cycle time: 0.5s、積算回数: 4 回（溶液）・5,000 回（葉）である。

オオムギ幼植物を用いたシュウ酸の Al 解毒能の調査

次亜塩素酸ナトリウムにより表面殺菌したオオムギ (var. Manriki) 種子を水道水を入れたビーカーに入れ、通気しながら、室温で暗所下、3-4 日間放置した。その後、発芽しかけている種子を選択し、実験に用いた。シャーレにガラスビーズ（直径 1.5mm）を敷き詰め、10mL の処理溶液を添加し、種子を置き、暗所（25℃）で 3 日間培養した。処理は 0mM Al・0mM シュウ酸、0.2mM Al・0mM シュウ酸、0.2 mM Al・0.5mM シュウ酸、0.2mM Al・1.0mM シュウ酸、0.2mM Al・2.0mM シュウ酸、および 0.2mM Al・4.0mM シュウ酸の 6 区を設けた。溶液は 0.2 μ m のメンブランフィルターを通して濾過滅菌した脱塩水を用いた。各区とも、10 の個体反復で行った。培養後、各植物体の全根長を測定した。

葉中の Al が光合成に与える影響

標準培養液（Table 2-2、P=10ppm、pH4.0）で育苗し、実験 1 と同様に Al 処理をしたメラストーマの光合成能を測定した。Al 処理開始から 10 日後、+Al、-Al、両区において若葉、成葉（最大展開葉）、および古葉を 2 反復で携帯用光合成測定装置 KIP-9010（小糸工業）を用いて測定した。チャンバーで葉を挟んだ上から冷光照明装置 KTS-100R（Kenko）を用いて 1,000 $\mu\text{E m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ 以上の光を当て、値が安定してから 30 秒ごとに 20 回連続的に測定し、値を平均した。チャンバー内には大気を約 0.50L min^{-1} の流速で通気した。光合成能を測定した

後、葉を採取し、元素分析を行った。

結果

顕微鏡による Al の局在部位の調査

PCV 染色法により、葉と根における Al の局在部位を調査した。PCV は Al だけでなく、他の元素とも反応する。このうち植物体中で問題となるのは Fe、Zn、および Cu であるが、Fe、Zn、Cu の含有率はそれぞれ 328、74、10mg kg⁻¹ であり、Al と比較してはるかに低かったので、本実験における影響はほとんど無いと考えて良い。

PCV によって染色した切片の写真を Fig. 5-1 および 5-2 に示した。Al-PCV 複合体は青色を示す。+Al 区の葉では、表側の表皮の細胞壁が特に濃く染色され、次に葉肉細胞が染色された (Fig. 5-1b)。染色された+Al 区の葉は構造的に -Al 区よりもしっかりとしていた (Fig. 5-1ab)。-Al 区の根は Al 含有率が低いため染色されなかったが (Fig. 5-2ab)、+Al 区の根の横断切片は全体的に染色され、特に表皮と内皮で濃く染色された (Fig. 5-2cd)。基部側の根 (根端から 5mm) のほうが根端側 (根端から 1mm) よりも濃く染色され、木部の染色も観察された。葉と根いずれにおいても細胞内の染色の有無ははっきりとしなかったが、細胞内への PCV の浸透能が不明であり、また、細胞内容物が切片作成時に喪失してしまっている可能性もあるため、細胞内への Al の侵入に関しては本実験では明らかにできなかった。

植物体内の Al 化合物の分離

古葉以外の葉、および根では全 Al の約 60%が、古葉では約 45%が Tris-HCl 緩衝液可溶性であった (Fig. 5-3)。葉では、Tris-HCl 緩衝液抽出で生じた残渣中の Al のほとんどが酸性デタージェント溶液 (CTAB を含む 0.5M H₂SO₄) に溶解した。この画分にはペクチン様物質やヘミセルロースに結合した Al だけではなく、酸可溶性 Al (Al(OH)₃ 等の沈殿、Al³⁺等のイオン) も含まれる。根におい

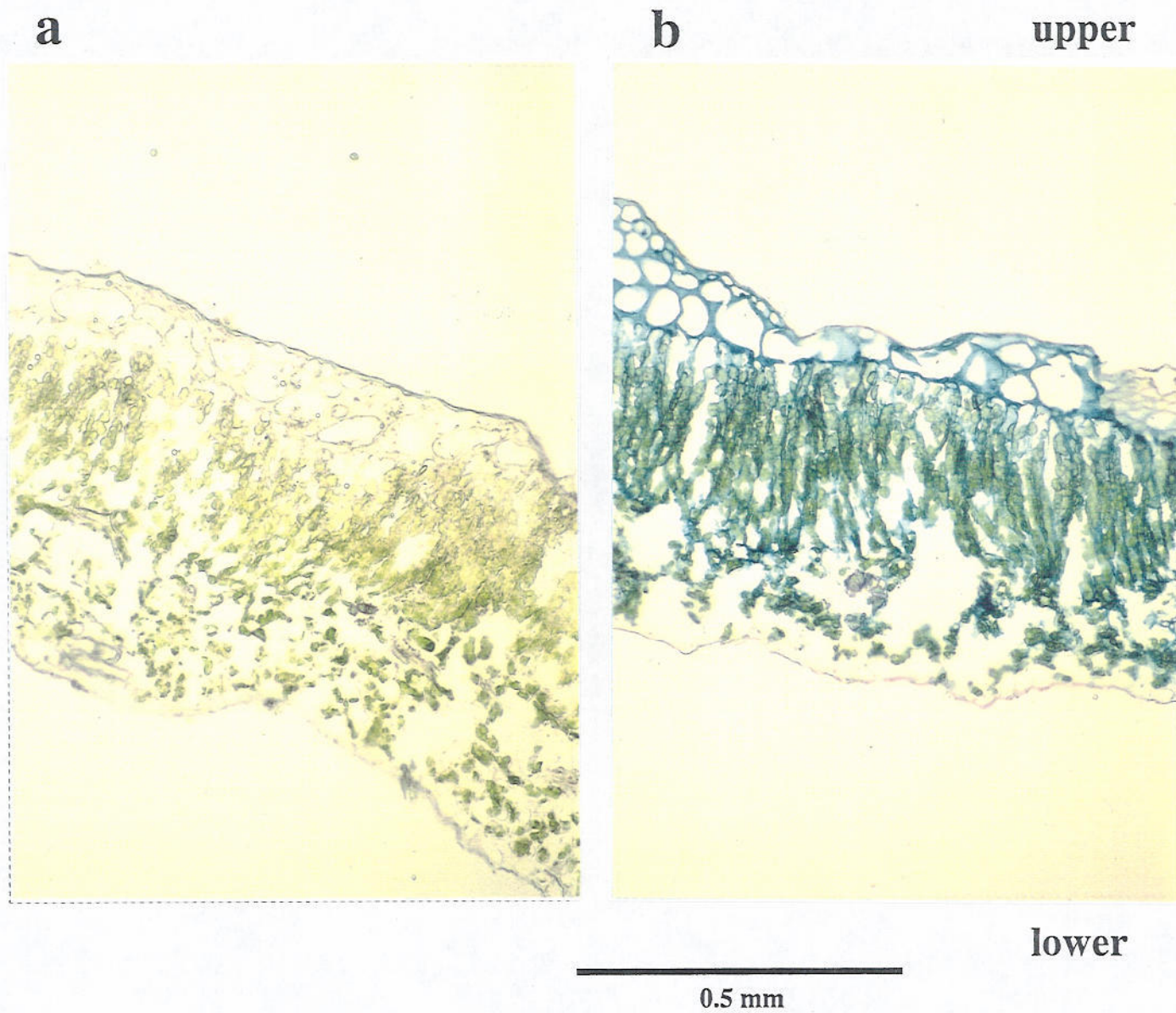


Fig. 5-1 Localization of Al in melastoma leaf stained by PCV.
a: 0 mM Al; b: 1 mM Al.

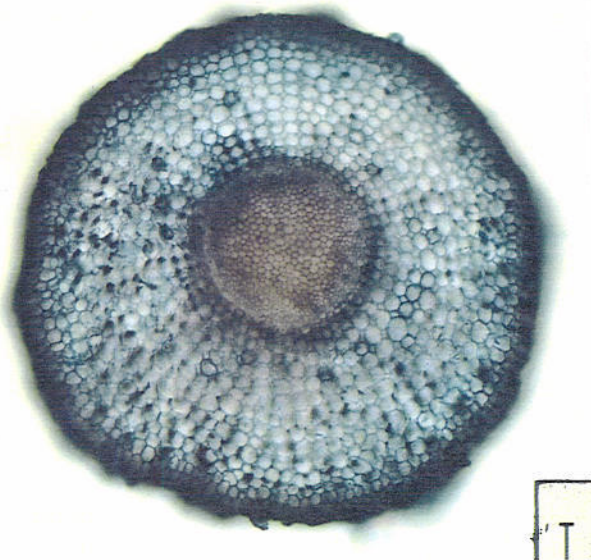
a (-Al, 1 mm)



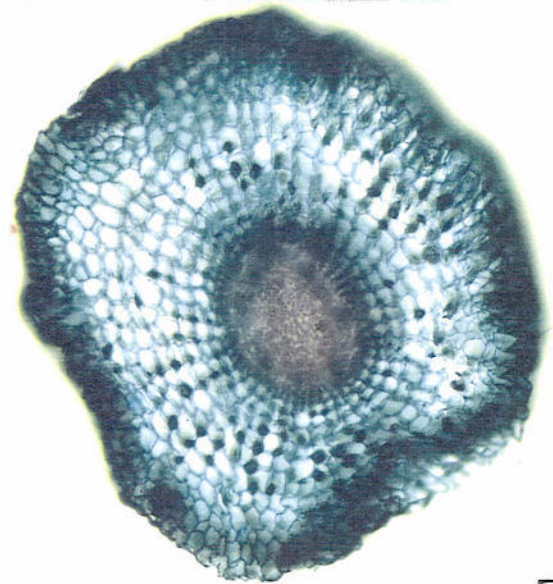
b (-Al, 5 mm)



c (+Al, 1 mm)



d (+Al, 5 mm)



1.0 mm

Fig. 5-2 Localization of Al in melastoma root stained by PCV.
a and b: 0 mM Al, 1 and 5 mm from the tip, respectively.
c and d: 1 mM Al, 1 and 5 mm from the tip, respectively.

でも残査中の Al の多くは酸性デタージェント溶液に溶解したが、72% H_2SO_4 によっても溶出しない Al が存在した。乾物当たりの Al 含有率は若葉で 8.0、成葉で 9.2、古葉で 14.4、および根で 10.1 g kg^{-1} であった。

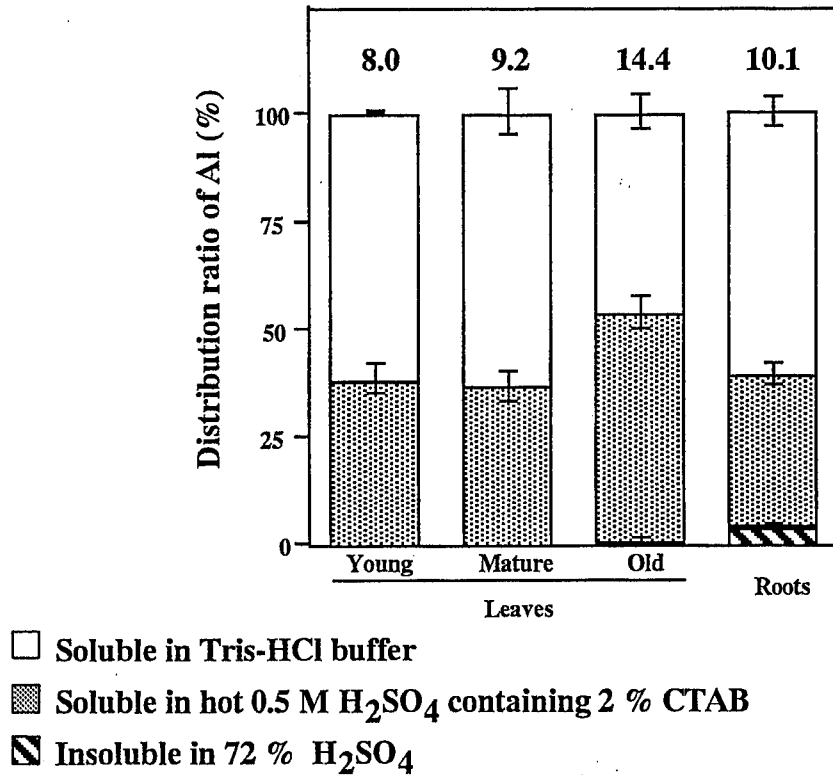


Fig. 5-3 Al distribution ratio in leaves and roots of melastoma fractionated by Tris-HCl buffer extraction and detergent method. Value on the bar indicates Al concentration (mg g^{-1}). Al in cellulose fraction (insoluble in hot 0.5M H_2SO_4 containing 2% CTAB and soluble in 72% H_2SO_4) was trace.

根の Tris-HCl 緩衝液による抽出液は、pH7.4 を保ったが、葉の抽出液は予想以上に液胞由来と思われる pH 低下が大きく、pH4.5 まで低下した。AlCl₃ を Sephadex G-50 に添加し、Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) を溶離液としてゲルろ過した場合、Al がカラム中で沈殿してしまったため、本実験におけるゲルろ過は Tris-HCl 緩衝液を pH4.5 に合わせたものを溶離液として行った。葉抽出液のゲルろ過の結果では、Al のピークは 10 mM の AlCl₃ を流した場合のピークと一致し、また、タンパクと糖のピークもほぼ一致した (Fig. 5-4、Leaves: Fraction No. 24-

25)。しかしながら、厳密にはタンパクのピークはAlのピークと比べて鋭く、完全に一致したわけではなかった。根では、AlのピークはFraction No. 21 (peak 1) と Fraction No. 24 (peak 2) の二カ所にみられ、peak 1は糖のピークのひとつと一致した (Fig. 5-4、Roots)。

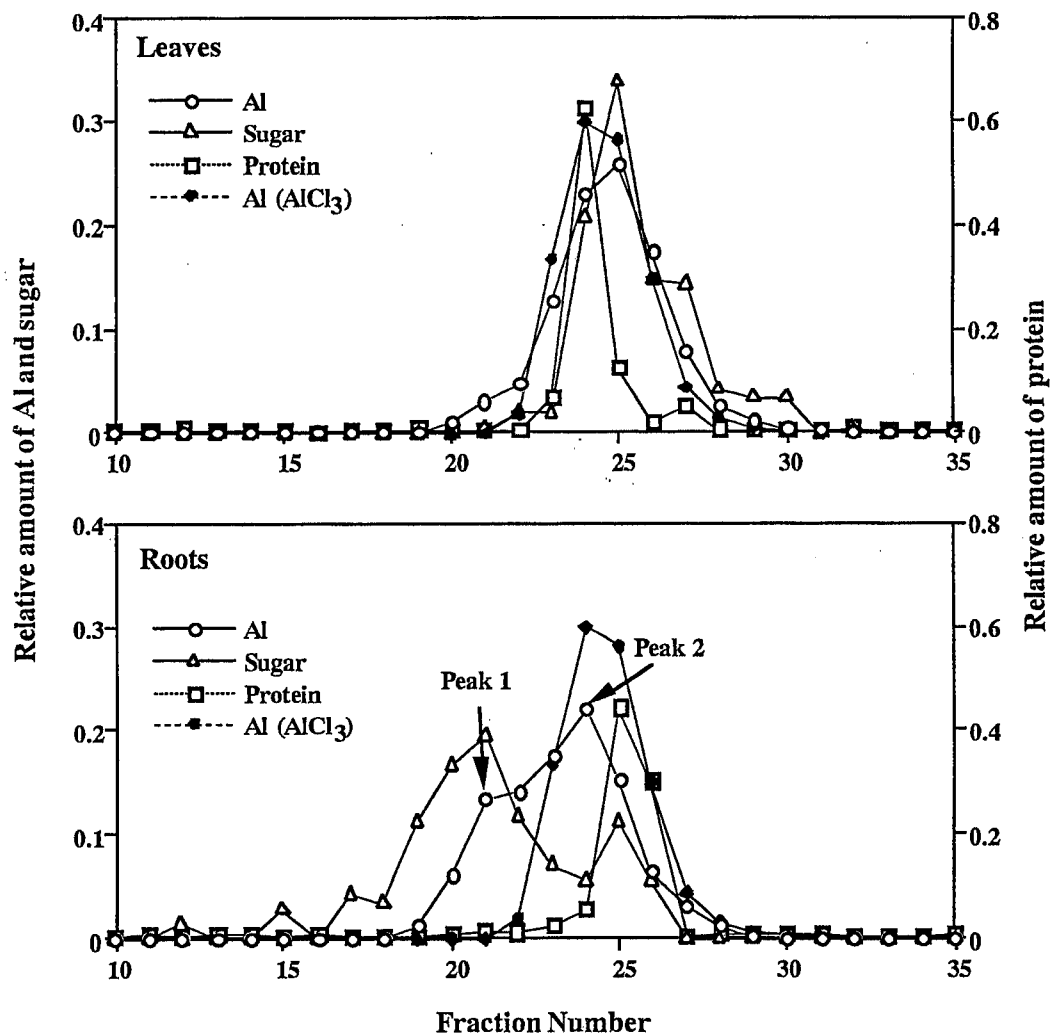


Fig. 5-4 Chromatography of the leaf and root extracts of melastoma and 10 mM AlCl₃ on a Sephadex G-50 column. Extract (6mL) was chromatographed on a 2.0 × 30 cm column with 20 mM Tris-HCl buffer (pH4.5) at a flow rate of 14 mL h⁻¹. Al, protein and sugar concentrations of extracts in each fraction (3.5 mL tube⁻¹) were measured and expressed as relative value; amount in the fraction / total amount injected.

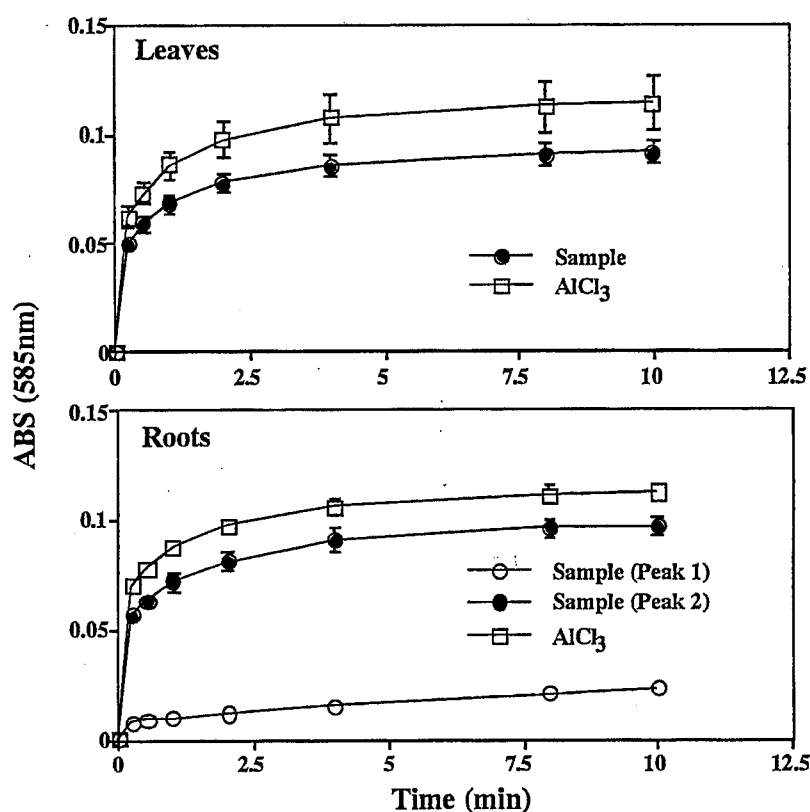


Fig. 5-5 Development of Al-PCV chelate with time. All the solutions contained 0.3 mg L^{-1} of total Al. Range for each value indicates $\pm \text{SE}$ value.

葉の Fraction No. 23-26、根の Fraction No. 20-22 (peak 1) および 23-26 (peak 2) を集め、全 Al 濃度が 0.3 mg L^{-1} になるように希釈したものを用いて、PCV に対する抽出液中の Al の反応性を調査した (Kerven et al., 1989)。抽出液中の Al は、 AlCl_3 の場合と比較して PCV との反応性が低く、このことはそれらがモノマー態ではない、何らかの複合体を形成したものであることを示唆する (Fig. 5-5)。特に、根の peak 1 に存在する Al の PCV との反応性は著しく低く、キレートが非常に強固であると考えられる。

次に、抽出液中の Al がタンパクあるいは多糖と結合しているかどうかを調べるため、メタノールおよび 5% TCA に対する抽出液中の Al の溶解度を調査した。その結果、抽出液中の Al のメタノールに対する溶解度は、葉では約 67%、根では約 45% であり、5% TCA に対しては全ての Al が溶解した (Fig. 5-6)。ち

なみに AlCl_3 はメタノールと 5% TCA の両方に溶解する。葉の抽出液において、メタノールに溶解した Al をエバポレーターで乾固させた後、再び水に溶解させても、PCV に対する反応性はメタノール沈殿処理前と同様に低かったので (Fig. 5-7)、メタノール中で Al キレートが解離し、キレート化合物のみが沈殿した可能性はほとんど無い。

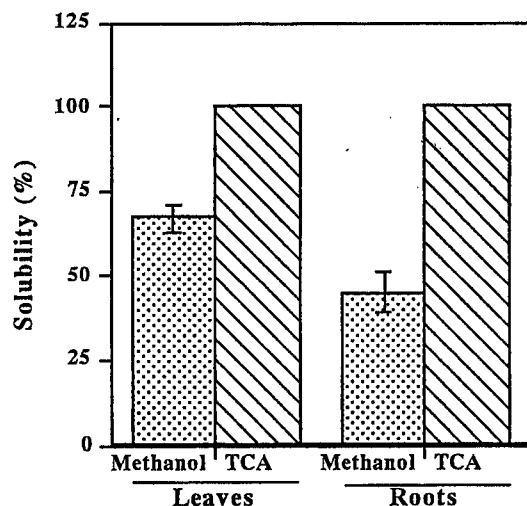


Fig. 5-6 Solubility of Al extracted with Tris-HCl buffer in methanol or 5% TCA.

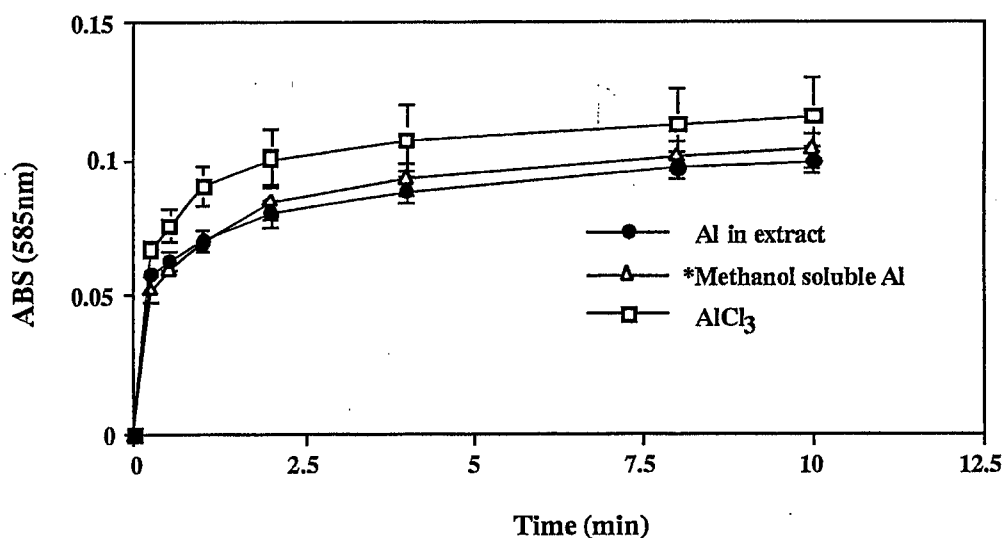


Fig. 5-7 Development of Al-PCV chelate with time.

*Tris-HCl buffer extract in leaves was evaporated, dissolved in methanol and filtrated, evaporated again, and dissolved in deionized water.

次に、Tris-HCl 緩衝液による抽出液中の有機酸を分析したところ、シュウ酸が体内の有機酸の中で突出して多かった。そこで、+Al 区と -Al 区で生育させ

た植物体の様々な部位の葉および根を Tris-HCl 緩衝液で抽出し、その可溶性 Al 濃度とシュウ酸濃度を調査した。葉では -Al 区より +Al 区でシュウ酸濃度がはるかに高く、+Al 区の抽出液の Al 濃度とシュウ酸濃度に正の相関の傾向が認められた (Fig. 5-8)。さらに +Al 区、-Al 区全体では、Al 濃度とシュウ酸濃度の間の相関は有意であり、シュウ酸 : Al の比率は約 2 : 1 であった。根では +Al 区と -Al 区でシュウ酸濃度の差は全く無かったが、+Al 区において Al 濃度とシュウ酸濃度の間に有意な正の相関がみられ、シュウ酸 : Al の比率は約 1 : 2 であった。

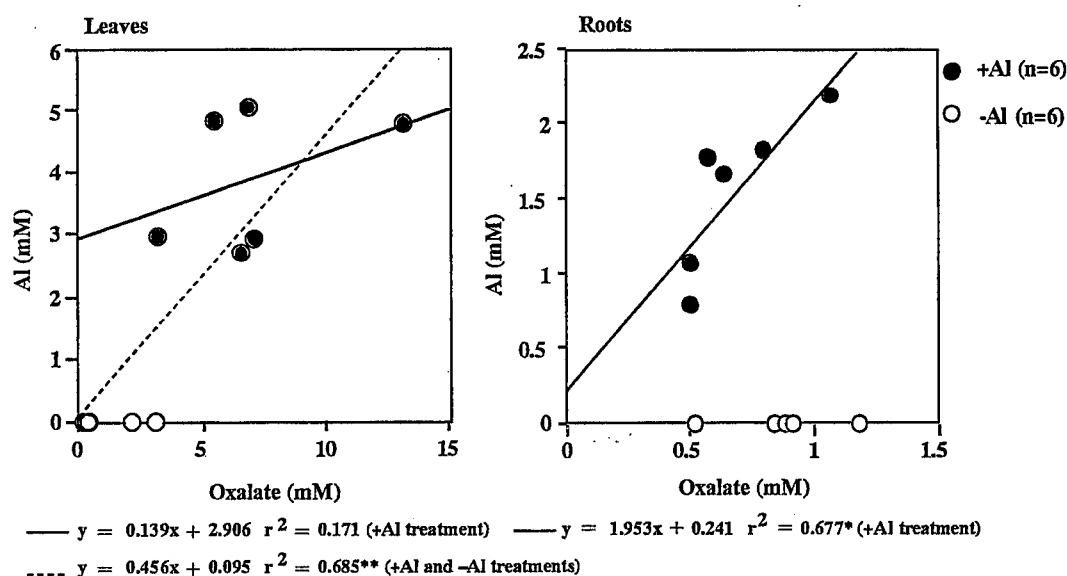


Fig. 5-8 Relationships of Al and oxalate concentrations in the Tris-HCl buffer (pH 7.4) extracts.
* and **: significant at 5% and 1% levels, respectively.

^{27}Al NMR

1mM Al を含む培養液で生育させたメラストーマの新鮮葉の ^{27}Al NMR スペクトルは 0 ppm 付近に大きな共鳴ピークがあり、その他にも 7.6、12.1、および 16.9ppm に連続した共鳴ピークが存在した (Fig. 5-9)。連続した共鳴ピークのうち、一番大きな共鳴ピーク (7.6ppm) は、 AlCl_3 + シュウ酸の ^{27}Al NMR スペクトルにおける 7.0 ppm の共鳴ピークとほぼ一致したため、このピークは Al-シュウ酸キレートに相当すると考えられる。一方、 AlCl_3 + シュウ酸および新鮮葉の 0 ppm 付近の大きな共鳴ピークは Al^{3+} と思われる。新鮮葉の共鳴ピークは全体

的に約 0.6 ppm 低磁場側にシフトしていたが、これは測定誤差の範囲と推定される。

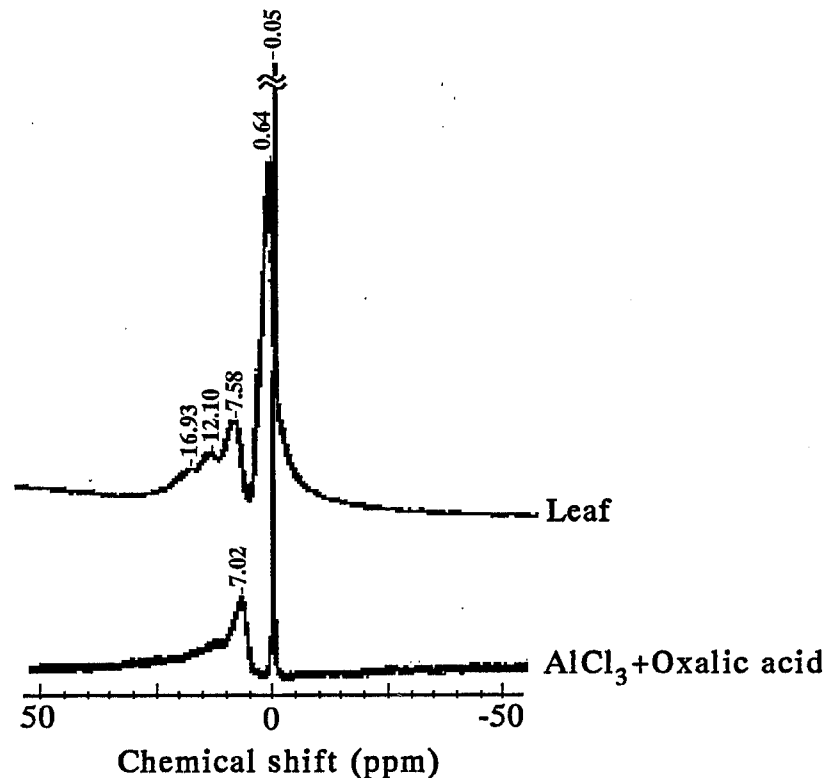


Fig. 5-9 ^{27}Al NMR spectra of intact leaves of Melastoma and 0.6 M AlCl_3 + 0.3 M oxalate solution. 1.0 M AlCl_3 solution was used as an external reference for calibration of chemical shift (0 ppm).

オオムギ幼植物を用いたシュウ酸のAl解毒能の調査

実験1の結果から、メラストーマの体内でシュウ酸とAlがキレートしていることが示されたため、シュウ酸の持つAl毒性軽減効果について調査した。シュウ酸の添加量が増加するに従って、培養液中のモノマー態Al濃度は低下し（Fig. 5-10a）、オオムギ根のAlによる生育阻害は軽減された（Fig. 5-10b）。しかし、Al毒性軽減に要するシュウ酸濃度は高く、シュウ酸のAl解毒能はそれほど高くなかった。

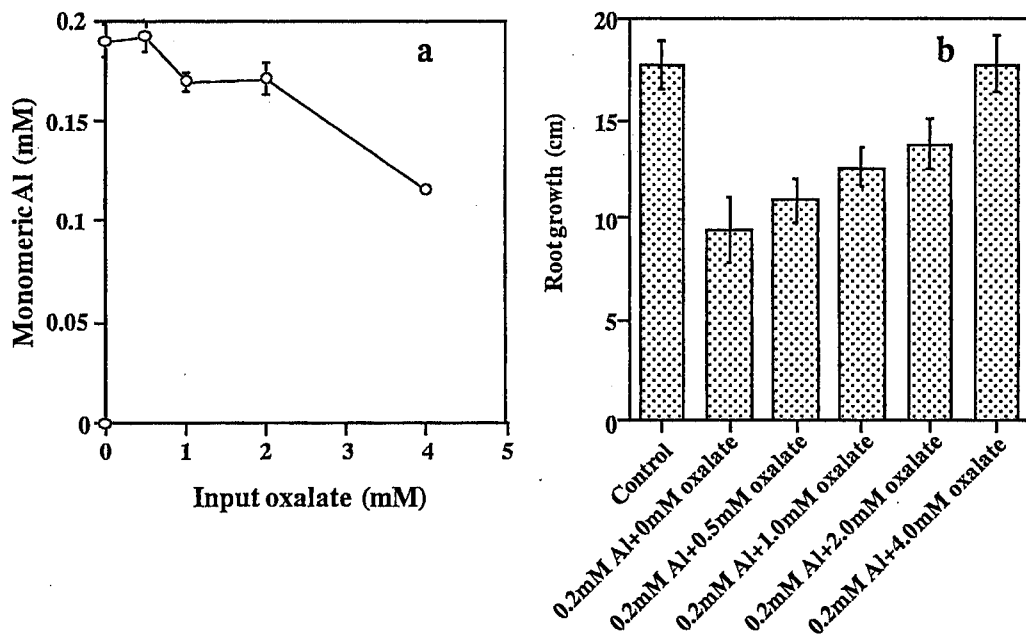


Fig. 5-10 Effect of oxalate application on monomeric Al in culture solution and Al toxicity in root growth of barley.

葉中の Al が光合成に与える影響

実験 1 で、葉の葉肉細胞に多量に Al が確認されたので、本実験では光合成能に与える Al の影響を調査した。Al 含有率は+Al 区の若葉では $6,000 \text{ mg kg}^{-1}$ を超えたが、光合成速度が+Al 区で-Al 区より低下することはない、むしろ、+Al 区で高い傾向であった (Table 5-1)。また、データは示していないが、微量元素も含めた他の元素含有率に処理区間で有意な差はなかった。

Table 5-1 Photosynthetic rate of melastoma grown in nutrient solution with or without 1 mM Al for 10 days.

	Leaf position	Photosynthetic rate ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ LA sec}^{-1}$)	Al concentration (mg kg^{-1})
-Al	Young	29.1 ± 0.7	297 ± 49
	Mature	25.5 ± 3.1	241 ± 14
	Old	24.9 ± 3.0	219 ± 9
+Al	Young	31.0 ± 1.3	6777 ± 1531
	Mature	29.3 ± 0.9	4286 ± 1554
	Old	25.0 ± 2.7	2886 ± 1045

第2節 メラストーマのアルミニウム吸収機構の解析

実験方法

育苗およびAl処理

メラストーマを第2章-第1節と同様に育苗し、56Lの水槽でAl処理を行った。培養液の組成はTable2-2 ($P=10\text{mg L}^{-1}$)に従い、0.5mMの AlCl_3 を添加した区(+Al区)としない区(-Al区)を設けた(pH4.0)。培養液は10日毎に交換し、3ヶ月以上処理した。

経時的なAl吸収の測定

Al無添加で栽培した植物体の根を先端から5cmの部位で切断し、実験に用いた。切断根を脱塩水でよく洗浄した後、0.2mM Ca溶液(pH4.0)で洗浄した。新鮮重で200mgの切断根を50mL容フラスコに入れ、15mLの0.1mM AlCl_3 と0.2mM CaCl_2 を含む溶液(pH4.0)を加え、暗所で穏やかに振盪しながら25℃で培養した。コントロールはAlを含まない0.2mM CaCl_2 溶液(pH4.0)とした。培養開始後15、30、60、120、および180分後に溶液を回収した。溶液のpHを測定した後、溶液のAl濃度を原子吸光光度法で測定し、吸収されたAlの量を求めた。なお、全ての実験は少なくとも4反復で行った。

培地のAl濃度を変えた場合のAl吸収の測定

上記と同様に調整したフラスコ中の切断根(新鮮重で200mg)に0.025、0.05、0.1、0.25、0.5、および1.0mMの AlCl_3 溶液(0.2mM CaCl_2 を含む、pH4.0)を15mL添加し、暗所で180分間培養した後に溶液を回収した。上記と同様に吸収されたAlの量と溶液中の H^+ 濃度を求めた。

Al吸収に与えるCCCPの影響

フラスコ中の切断根に10 μM の脱共役剤であるCCCPを加えた0.1mM AlCl_3

溶液 (0.2mM CaCl_2 を含む、pH4.0) 15mL を上記と同様に調整したフラスコ中の切断根に添加し、暗所で 180 分間培養した後に溶液を回収した。上記と同様に吸収された Al の量と溶液中の H^+ 濃度を求めた。

他の多価カチオンが切断根の H^+ 放出に与える影響

フラスコ中の切断根 (新鮮重で 200mg 程度) に 0.2mM CaCl_2 を含む 0.1mM の AlCl_3 および LaCl_3 溶液 (pH4.0) を 15mL 添加し 180 分後に溶液を採取し、pH を測定した。

切断根中の Al の分画

アポプラスト、シンプラスト、および残査中の Al の分画を Tice et al. (1992) の行った方法を若干改変して行った。フラスコ中の切断根 (新鮮重で 200mg) に 0.1mM の AlCl_3 溶液 (0.2mM CaCl_2 を含む、pH4.0) を 15mL 添加し、暗所で 180 分間培養した後に溶液を回収した。切断根を脱塩水でよく洗浄した後、0.5mM クエン酸と 5mM CaCl_2 (pH4.0) を含む溶液 10mL で 0℃暗所で 30 分ずつ 4 回洗浄し、それぞれ洗浄溶液を回収した。この洗浄溶液中に含まれる Al をアポプラスト Al とした。洗浄後、-50℃で 1 時間凍結し、細胞を破壊した。凍結後、上記と同様に 3 回洗浄を行い、洗浄溶液を回収した。この洗浄溶液中に含まれる Al をシンプラスト Al とした。残査は乾燥した後 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ で湿式分解し、ここに含まれる Al を残査 Al とした。それぞれの画分に含まれる Al 量は原子吸光光度法で測定した。

さらに、3 か月間、0.5mM の AlCl_3 を含む培養液で培養したメラストーマの根の先端から 5cm の部位で切断し、脱塩水でよく洗浄した後、上記と同様の方法で分画を行った。このサンプルに関しては、抽出されるシンプラストの Al の量が多かったので、凍結後の洗浄を 4 回とした。

結果

メラストーマ切断根による Al 吸収

切断根による Al 吸収は 0.1mM Al 添加後 30 分までは急速であったが、その後、吸収速度は低下し、120 分から 180 分の間はほとんど吸収しなかった (Fig. 5-11)。培地の Al 濃度を変えた実験では、Al 吸収速度は、培地 Al 濃度が 0.1mM になるまで急激に上昇し、0.25mM Al で最大吸収速度に達した (Fig. 5-12)。培地 Al 濃度が 1.0mM の場合の吸収速度は最大吸収速度を有意に下回った (Fig. 5-12)。

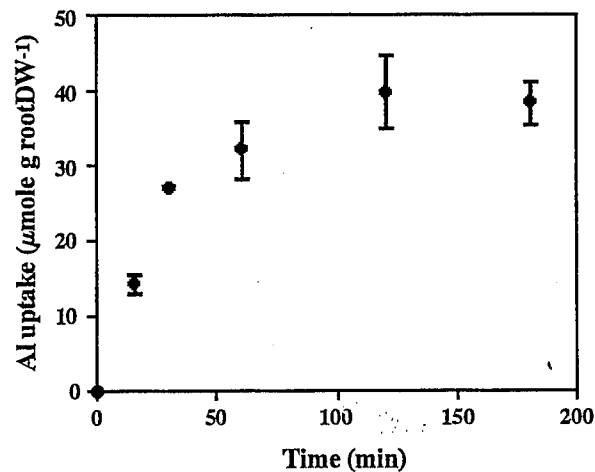


Fig. 5-11 Aluminum uptake of excised roots of melastoma. Culture solution contains 0.1 mM Al.

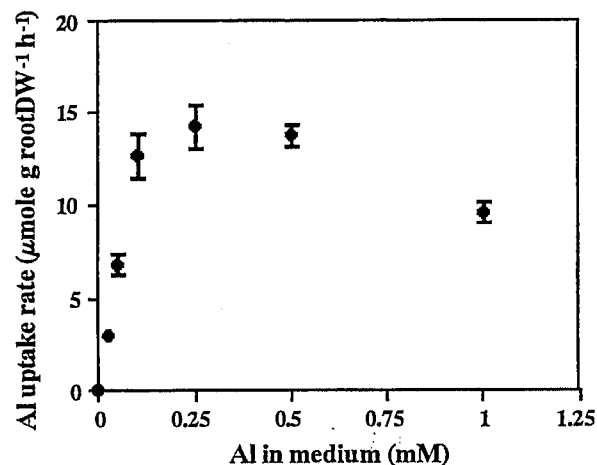


Fig. 5-12 Aluminum uptake rate as a function of aluminum concentration in the uptake medium by excised roots of melastoma.

Al 吸収と H^+ 放出の関係

Al 吸収時に培養液の pH 低下が認められたので、Fig. 5-12 の元データを用いて放出された H^+ 量と吸収された Al 量の相関を検討した (Fig. 5-13)。Al を含む溶液は pH 緩衝能を持つので、Al 存在下で根から放出された H^+ 量は、別に実施した各 Al 濃度の溶液における加えた H^+ 量 (稀 HCl) と溶液の pH 変化の関係の調査結果から推定した。その結果、Al : H^+ はほぼ 1 : 3 となり、吸収される Al の電荷を +3 とすれば、その電荷の比率は等しかった。そこで、この H^+ 放出に原形質膜のプロトンポンプが関与しているかどうかを調べるため、脱共役剤である CCCP を $10 \mu M$ 添加し、Al 吸収に与える影響を調査した。その結果、CCCP は Al 吸収にはほとんど影響せず (Fig. 5-14)、Al 吸収に対する H^+ 放出の割合も CCCP 無添加の場合と比較して差がなかった (Fig. 5-13)。

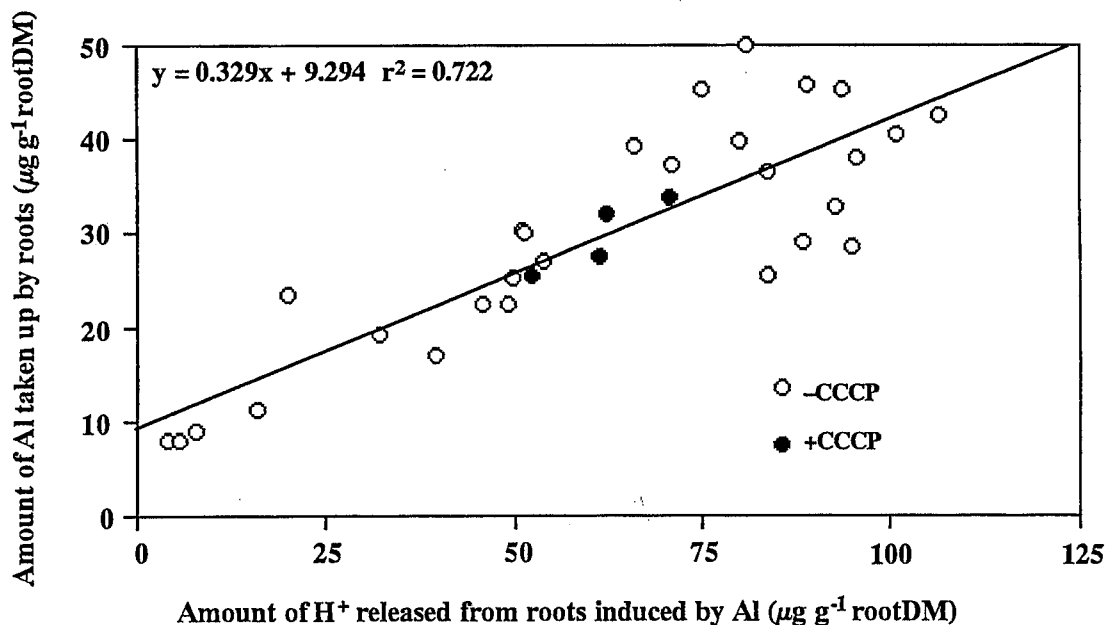


Fig. 5-13 Relationship between amount of H^+ released from roots and amount of Al taken up by roots. Data were cited from original data in Figs. 5-12 and 5-14. Regression was estimated from -CCCP treatment data.

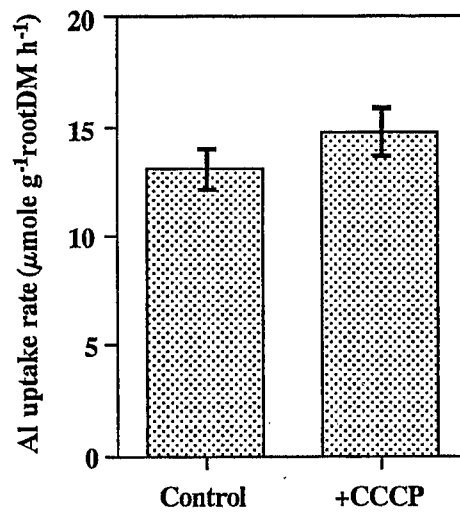


Fig. 5-14 Effects of CCCP on Al uptake rate of excised roots of melastoma.

Al 以外の 3 価カチオンでも H^+ 放出が起こるかどうかを調査するために、0.1mM の La と Al をそれぞれ添加し、根圏の H^+ 量変化を比較した。その結果、+La 処理の場合も +Al 処理と同様に根は H^+ を放出したが、その放出量は +Al 処理よりもはるかに少なかった (Fig. 5-15)。

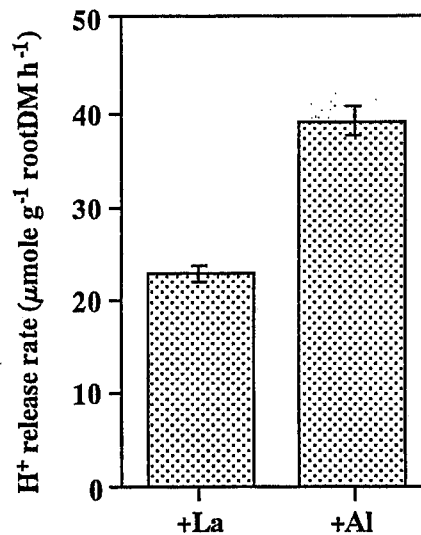


Fig. 5-15 Effect of La^{3+} or Al^{3+} application on H^+ release rate.

根中の Al の分画

180 分の Al 吸収処理を行った後の切断根中の Al は、ほとんどがアポプラストに存在し、シンプラストにはわずかしかなく、残査中の Al 量も少なかった (Fig. 5-16A)。一方、3 ヶ月間 Al 処理をした根中の Al は、アポプラストよりもシン

プラストのほうが多く、残査に含まれる Al の割合も大きく上昇した (Fig. 5-16B)。

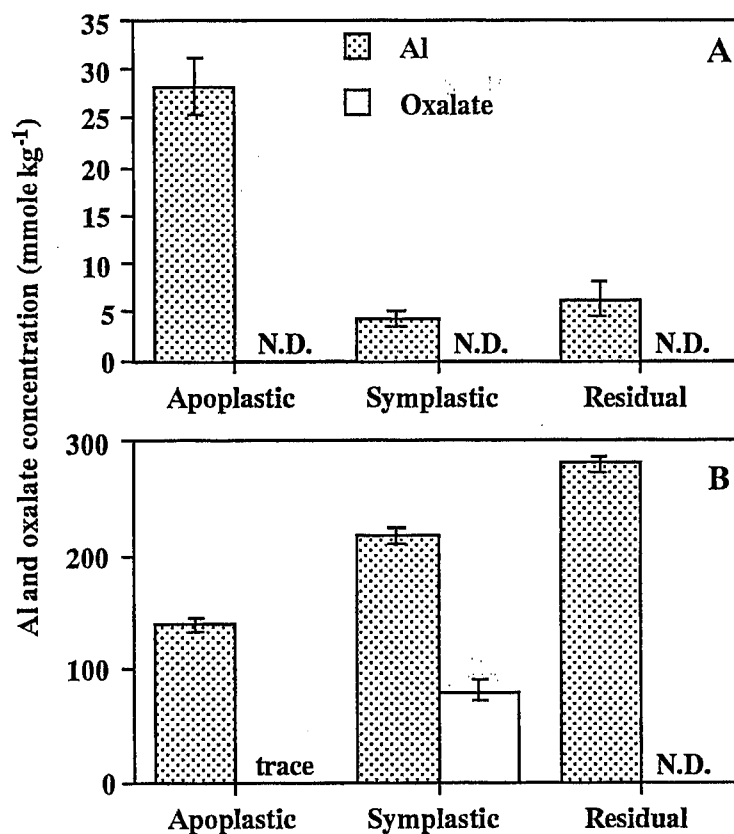


Fig. 5-2-6 Distribution of Al or oxalate in roots fractionated as described in materials and methods.

A: Excised roots incubated in 0.1 mM Al solution for 180 min.

B: Roots of melastoma plants grown with standard nutrient solution with 0.5 mM Al for 3 months.

N.D.: not determined (oxalate)

第3節 考察

メラストーマの葉は、発生直後から高濃度の Al を含む (Fig. 5-3)。この高濃度の Al は、葉の表側の表皮細胞の細胞壁に最も多く局在し、次いで柵状組織に多く分布した (Fig. 5-1b)。葉の表皮における Al の局所的な集積はチャ (Matsumoto et al., 1976b)、中央ブラジルのセラード地域に生育する Al 集積植物 10 種 (Haridasan et al., 1986)、*Richeria grandis* Vahl (Cuenca et al., 1991) でも確認されており、Al 集積種における共通の Al 集積部位であるのかも知れない。一方、柵状組織への Al の集積は Al がメラストーマの光合成に対して直接影響している可能性を示唆する。そこで、メラストーマの葉の光合成能に対する葉の Al 含有率の影響を調査したところ、1 mM Al を含む培養液で生育させたメラストーマの成葉 (最大展開葉) は $4,000 \text{ mg kg}^{-1}$ 以上の Al を含み、その光合成能は Al 無添加で育てた個体の光合成能より高かった (Table 5-1)。一般の作物 (Al 非集積植物) の光合成能に対する Al の影響は、Al が引き起こす養分吸収阻害による二次的な影響であると報告されているが (Moustakas et al., 1995)、本実験では、メラストーマの葉の養分含有率は Al 以外は処理間でほとんど差はなく、葉の栄養状態が光合成に影響する可能性は低いため、Al そのものが光合成能を上昇させているものと考えられる。また、Al の集積した葉は (Fig. 5-1b)、Al の集積していない葉 (Fig. 5-1a) よりも堅固な構造を取っており、Al が葉構造の安定化に貢献している可能性が考えられる。

根においては、皮層全体に Al は存在し、表皮および内皮における集積量が多かった (Fig. 5-2cd)。内皮における Al の集積は多くの Al 非集積植物種において報告されている (Delhaize et al., 1993a; Ishikawa et al., 1996)。この現象は、これらの種の Al 吸収が、主にアポプラスティックなものであり、カスパリー帯の存在する内皮でその移行がせき止められている事を示している。メラストーマでも、内皮には多くの Al が集積しているため、Al の根中での主な移行経路は

アポプラスティックなものと思われる。しかし、Al 非集積植物では観察されない、木部における Al の集積がメラストーマでは認められているため、シンプラストティックな経路、あるいはカスパリー帯の発達していない根端部位等により Al は木部に到達し、導管を経て地上部へと移行するものと推定される。このようなメラストーマ根横断面の Al の分布は一般の植物における Ca の分布と非常に類似しており（茅野, 1982）、メラストーマにおける Al の吸収過程が Ca と類似している可能性が考えられる。

また、リグニンはカスパリー帯の成分の一つであるが、メラストーマの根のリグニン画分に少量ながら Al が存在した（Fig. 5-3）。このことから、アポプラストに存在する Al の一部が細胞壁のリグニン化の過程でその内部に取り込まれ、固定されることが示唆される。

植物の根の Al 吸収機構については、Al 非集積植物に関しては数多くの報告がある。これらの報告では、Al 添加後 30 分までは急速な、時間に対して非直線的（対数関数的）な吸収があり、その後はゆっくりとした、時間に対して直線的な吸収が観察されている。この初期の急速な吸収は、アポプラストへの Al の流入が主体であり、それに続くゆっくりとした吸収はシンプラストへの吸収が主体ではないかと予想されている。今回行ったメラストーマの Al 吸収を調査した実験でも、非 Al 集積植物の場合と同様の傾向が観察され、Al 処理後 30 分までは急速な吸収を、その後はゆっくりとした吸収を示し（Fig. 5-11）、吸収速度も他の非 Al 集積植物に関する報告と大差なかった（Rengel and Reid, 1997）。さらに、180 分間の Al 吸収実験を行った根中の Al は、ほとんどがアポプラスト画分に存在し（Fig. 5-16A）、Al 吸収に対して代謝阻害剤である CCCP は影響しなかったことから（Fig. 5-14）、Al 吸収の初期の段階においては、アポプラストへの流入がほとんどであると考えられる。一方、Al 処理後 3 ヶ月を経過した個体の根中の Al はアポプラストよりもシンプラストのほうが多く、その量自体も非常に多かった（Fig. 5-16B）。これらの結果から、メラストーマ根の体内の集積可能 Al 量は他の種と比較して高いが、アポプラストからシンプラストへの Al

の取り込みは、比較的ゆっくりとしたものであると結論づけられる。

また、メラストーマの切断根の Al 吸収には H^+ の放出が伴われ、そのモル比 ($Al : H^+$) は 1 : 3 であった (Fig. 5-13)。この H^+ 放出は CCCP の影響を受けなかったことから、代謝エネルギー依存ではない。このことに加え、切断根実験における Al のほとんどがアポプラストに存在していたことから判断すると、アポプラストに流入した Al は根の細胞壁の陽イオン交換基に結合している H^+ と交換し、保持されていると考えられる。この交換基に対する親和性は Ca^{2+} (細胞の保持のため全ての溶液に添加、Al 不在時は根からの H^+ 放出はほとんど無し) あるいは La^{3+} (Fig. 5-15) よりも Al^{3+} のほうが高く、交換基の配置が Al 特異的なものになっているのかもしれない。ドンナンフリースペースに保持される Ca あるいは Mg の量と根が取り込むそのカチオンの量の間には密接な正の相関があることが報告されていることから (橘, 1982; Keltjens, 1995)、根のドンナンフリースペースへの Al の優先的な結合が、メラストーマの Al 吸収量が多いことと関わっている可能性がある。なお、培地の Al 濃度が非常に高くなると根の Al 吸収量が低下するという現象が観察されたが (Fig. 12)、これは Al と交換して放出された H^+ が培地の pH を下げ、根に吸着した Al を放出させたためかも知れない。

ではメラストーマ体内の Al はどのような形態で存在しているのか？メラストーマの葉、根ともに、全 Al 含有量の約 60% が Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) 可溶の形態であった。Sephadex G-50 カラムによる抽出液の分画の結果、葉では一つの、根では二つの Al ピークが得られ (Fig. 5-4)、これらの Al ピークに存在する Al は Al^{3+} と比較して PCV に対する反応性が低いため (Fig. 5-5)、何らかのキレート形態であると予想される。葉の Al ピークおよび根の Al ピーク 2 はタンパクのピークと重なったが (Fig. 5-4)、抽出液中の Al は 5% TCA に完全に溶解したので、Al がタンパク質とキレートしている可能性は低い。一方、根のピーク 1 は糖のピークの一つと重なり、抽出液の一部がメタノール中で沈殿したため、Al の一部は水溶性多糖と結合しているものと予想される。メラストーマの

根のドンナンフリースペースでは、 H^+ と交換的に Al^{3+} が保持されていると考えられることから (Fig. 5-13)、交換基の主体であるペクチン様物質に含まれる酸性多糖が、この水溶性多糖の主要成分ではないかと推定される。

Al 集積植物の体内に有機酸と結合した Al が存在することが報告されている (Webb, 1953; Ma et al., 1997cd)。そこで、メラストーマの様々な部位の葉および根を Tris-HCl 緩衝液で抽出し、液中の Al 濃度と有機酸濃度の関係を調査したところ、メラストーマはシュウ酸の含有率が著しく高く、葉の抽出液において Al とシュウ酸含有率の間に正の相関が認められた (Fig. 5-8)。そこで、1mM Al 添加処理をした新鮮葉の ^{27}Al NMR スペクトルを Al とシュウ酸を混合した溶液のスペクトルと比較した。葉のスペクトルには Al^{3+} と思われる 0ppm 付近の共鳴ピークの他に、下流側に 7.6、12.1、および 16.9ppm の三つの共鳴ピークが確認された (Fig. 5-9)。これらの下流側のピークは Al がシュウ酸とキレートした形態と考えられる。下流側のピークのうち最も大きなピークは Al-シュウ酸混合溶液における下流側のピークとほぼ一致したが、その他のピークははっきりとしなかった。Kerven et al. (1995) は Al-シュウ酸混合溶液は、 ^{27}Al NMR スペクトルにおいて、4つの共鳴ピーク、つまり、0ppm (Al^{3+})、6.4ppm (Al-シュウ酸)、11.4ppm (Al-(シュウ酸)₂)、および 16.0ppm (Al-(シュウ酸)₃) を与えることを示した。これらのピークは、メラストーマの新鮮葉のスペクトルにおける4つのピークとほぼ一致する。

Al 集積性をもつアジサイ、ソバ、およびチャの葉を ^{27}Al NMR により分析した報告では、アジサイの葉では Al-クエン酸が (Ma et al., 1997d)、ソバでは Al-シュウ酸が (Ma et al., 1997c; 1998)、チャでは Al-カテキン (Nagata et al., 1992; 1993) が葉に存在する主な Al の形態である事が示されている。これらの報告では、葉の ^{27}Al NMR スペクトルの 0ppm 付近に共鳴ピークは認められないことから、葉中の Al はリガンドにより不活性化され、 Al^{3+} はほとんど存在していないと考えられる。対照的に、メラストーマでは、 Al^{3+} であると推定されるピークの面積が、得られた共鳴ピークの中で最も大きかった (Fig. 5-9)。また、Tris-HCl

緩衝液 (pH7.4) で抽出した後の残査中に含まれる Al は、ほとんどが酸性デタージェント溶液に可溶であった事も考慮すると、メラストーマの葉中には多量の Al^{3+} が存在すると理解される。通常、植物の細胞質の pH は中性付近であり、高濃度の Al^{3+} は存在できなため、もしメラストーマの細胞質においても同様な pH であるとする、この Al^{3+} はアポプラストや液胞あるいはその他のオルガネラ等に存在する可能性が高い。

一方、Al とシュウ酸の複合体に関しては、Al にシュウ酸が1つキレートした形態である Al-シュウ酸の割合が多く、Al-(シュウ酸)₂、Al-(シュウ酸)₃ の割合は少ない (Fig. 5-9)。Al-(シュウ酸)₂ と Al-(シュウ酸)₃ のキレート安定度定数はそれぞれ 11.9 と 15.12 であり、Al 活性を低下させる能力が高いが、Al-(シュウ酸) のキレート安定度定数は 6.10 と低く、Al 活性低下能は低いと予想される (Vance et al., 1996)。実際、Al に対するシュウ酸の比率が相当大きくなないとオオムギの根の生長に対する Al 毒性は解消されなかった (Fig. 5-10)。

メラストーマの葉のシュウ酸含有率は -Al 処理で低く、+Al 処理で高く、さらに、Al 含有率との間に正の相関が存在したが、根では Al 処理間でシュウ酸含有率に差はなかった (Fig. 5-8)。このことは、地上部におけるシュウ酸の集積が、Al とキレートしたシュウ酸が根から葉へ移行した影響を強く受けていることを示唆する。これらの理由から、メラストーマ体内における Al とシュウ酸のキレートは Al の無毒化というよりも、むしろ体内での Al の移行に関わっている可能性が高い。一方、培養液中 (第4章-第1節)、あるいはアポプラスト中に (Fig. 5-16) シュウ酸は検出されなかったことから、根圏から根細胞内部への Al の輸送にはシュウ酸は関わっていないと思われる。

結論としてメラストーマの葉においては、キレート化された Al の量は少なく、存在する Al の大部分は活性の高い Al (Al^{3+}) であり、この形態の Al が葉の構造の安定化 (Fig. 5-1) および光合成能の上昇 (Table 5-1) に対して機能している可能性が高い。

第4節 要約

- 1) メラストーマは葉に $10,000\text{mg kg}^{-1}$ 以上の Al を集積し、その分布は葉の表側の表皮細胞の細胞壁で最も多く、次いで柵状組織に多く分布した。Al を集積していない葉より集積した葉で細胞の配列および細胞壁構造がしっかりしており、Al が細胞壁等の安定化に寄与している可能性が示唆された。一方、成葉の光合成能は 1mM Al 処理下で Al 無処理下よりも高く、柵状組織における Al の集積が、光合成に対して有益な効果を持っていると考えられた。
- 2) メラストーマの根細胞組織内への Al の侵入はオオムギ等の Al 非集積植物と同様に、アポプラスティックな経路が主体であったが、木部にも Al が認められたことから、Al は Ca と同様にシンプラスティックな経路あるいはカスパリー帯の発達していない根端部位等より木部に到達し、導管を経て地上部に移行すると推定された。
- 3) メラストーマの切断根の Al 吸収は、Al 添加後 30 分までは急速な、時間に対して対数関数的な吸収であり、その後は緩やかであった。この傾向はこれまでに報告されている Al 非集積植物と同様であり、Al 供給開始後数時間内での吸収速度も Al 非集積植物と大差無く、吸収された Al のほとんどはアポプラストに存在した。しかし、長期間 Al を含む培養液で生育した植物体の根では、シンプラストに含まれる Al の量は非常に多く、アポプラストに含まれる量よりも多かった。
- 4) メラストーマの根の Al 吸収の初期の段階においては、ドンナンフリースペースの陽イオン交換基に保持された H^+ との交換的な結合がほとんどであり、Al は Ca^{2+} あるいは La^{3+} より優先的にこれらの陽イオン交換基と結合した。結論として、メラストーマの根のシンプラストの集積可能な Al 量は他の種と比較して高いが、アポプラストからシンプラストへの Al の取り込みは比較的ゆっくりと継続的に行われると考えられた。

- 5) Tris-HCl 緩衝液による抽出、デタージェント法による分画、および ^{27}Al NMR による分析の結果、メラストーマの葉に存在する Al の形態は Al^{3+} が最も多く、次いで Al-シュウ酸、Al-(シュウ酸) $_2$ 、Al-(シュウ酸) $_3$ の順であった。 Al^{3+} は pH が中性付近では大量に存在することはできないので、葉中の Al^{3+} は細胞壁のようなアポプラストや液胞あるいはその他のオルガネラ等に局在し、構造的あるいは代謝的に有益な効果を与えていると推定された。
- 6) ^{27}Al NMR による分析結果から、シュウ酸が Al 毒性を軽減している可能性は低く、むしろ、根部から地上部への Al の移行に関わっている可能性の方が高いと考えられた。また、メラストーマを水耕栽培した時の培養液あるいはアポプラストからシュウ酸は検出されなかったので、Al 吸収過程にシュウ酸は関わっていないと理解された。

第6章 総合考察

植物のストレス耐性に関する研究の中で、耐酸性に関する研究は最も盛んに行われているにもかかわらず、耐酸性の本質に関して未だ明白な回答は得られていない。このことには、酸性土壌で植物の生育を制限する要因、特に Al が植物に与える影響が複雑であり、未だに十分に解明されていないことが大きく関係している。一方で、このような酸性土壌にも数多くの野生種が自生している。これらの種は独自の耐酸性機構を発達させていると考えられるが、その機構についてはこれまでほとんど明らかにされていない。そこで本研究は強酸性土壌に適応した植物を供試し、その適応機構、特に高濃度 Al に対する適応機構の解明を試みた。本章では、得られた実験結果をもとに、酸性土壌に適応した植物の生育特性と Al による生育促進機構の解析の2つの節に分けて総合的に考察する。

第1節 強酸性土壌に適応した植物の生育特性

酸性土壌における植物の生育を制限する要因としては、過剰の H^+ 、Al、あるいは Mn による影響、P や Ca、Mg、K といった塩基の不足、あるいは土壌微生物活性の低下等があげられている（但野と安藤, 1984）。第1章の緒論でも述べたように、これらの要因の中で最も重要度が高いのは Al 過剰の影響である。植物の生育に対する Al の影響に関する研究は、ほとんどがその生育阻害効果に関する研究である。しかしながら、Al が生育促進効果を持つことを示す結果も多くの植物種、特に野生植物種において報告されている（チャ: Konishi, 1992; ラジアタマツとユーカリ: Huang and Bachelard, 1993; ユーカリ: Mullette, 1975; *Miconia albicans*: Haridasan, 1988; アルニカとコメススキ: Pegtel, 1987; トウモロコシ: Clark, 1977; Llugany et al., 1995; ササゲ: Malkanthi et al., 1995a）。Kinraide (1993) はコムギの Al 感受性品種 Scout の生育は Al 耐性品種の Atlas や Al 耐性

が中程度の Tyler と同様に Al によって促進されるが、生育促進が観察される Al 濃度は Atlas あるいは Tyler と比較してはるかに低く、臨界濃度を超えると急速に生育低下へと転じることを示した。このことから、Al 耐性に関係なく、ほとんどの植物に対して Al は生育促進効果と生育阻害効果を持つが、両効果に対する感受性が植物種によって大きく異なることが予想される。

そこで、熱帯、亜熱帯、および温帯の強酸性土壤に生育する各種植物の生育に与える Al 添加の影響を、数種の一般作物を対照として調査した（第2章－第1節）。その結果、Al 処理に対する生育反応は植物種によって様々であったが、Al の持つ2つの効果、すなわち Al の生育促進効果と生育阻害効果が複合して生育に対し影響していると理解された（第2章; Fig. 2-1）。Fig. 2-1 の生育結果から、複合したこれら2つの効果を完全に分けることは不可能であるが、低 Al 区 (3mg L^{-1}) では Al の生育促進効果が、高 Al 区 (15mg L^{-1}) では Al の生育阻害効果が主体であると仮定することにより、各種植物の Al による生育促進の大きさ（Al 要求性）と Al 耐性を分類した。すなわち、Al 要求性に関しては Al 添加区（低 Al 区あるいは高 Al 区）の生長量が Al 無添加区の4倍以上の場合を「+++」、2～4倍の場合を「++」、1～2倍の場合を「+」、Al 添加によって生育促進が起らなかった場合を「-」とし、Al 耐性に関しては、低 Al 区の生長量が Al 無添加区より大きく、かつ高 Al 区における生長量が低 Al 区より大きいかわからない場合を「+++」、高 Al 区の生長量が低 Al 区より小さく、かつ Al 無添加区より大きい場合を「++」、高 Al 区の生長量が Al 無添加区より小さく、かつ低 Al 区の生長量が Al 無添加区より大きいかわからない場合を「+」、Al 添加区の生長量が Al 無添加区より小さい場合を「-」として分類した（Table 6-1）。

この分類結果から、強酸性土壤に適応した植物は、Al 要求性と Al 耐性のどちらか一方、あるいは両方を発達させることにより、土壤中の高濃度の Al に適応していることが明らかになった。特にメラストーマは Al 無添加時には生長量が少なく Al 要求性が非常に高いため、メラストーマにとっての Al は、むしろ必須元素に近いと言える。メラストーマのように、強酸性土壤に生育する植物が

Al を含まない培地で生長量が著しく低下するという事は、ラジアタマツ (Huang and Bachelard, 1993) および *Miconia albicans* (Haridasan, 1988) でも報告されている。なお、メラルーカとアジサイは低 Al 区より高 Al 区で生育が促進されているため、実際の Al 要求性は Table 6-1 に示すよりも高い可能性もある。一方、典型的な Al 感受性植物として知られるオオムギ (Ikeda and Tadano, 1992; 大塚, 1968) は、Al による生育促進はなく、Al 耐性も強酸性土壌に適応した植物種と比較してはるかに弱かった。

Table 6-1 Classification of Al requirement and Al tolerance of each plant species determined from the results in chapter 2-1 (Fig. 2-1).

Species	Growth enhancement	Al tolerance
Melastoma	+++	++
Melaleuca	++	+++
<i>A. mangium</i>	+	++
Leucaena	++	+
Hydrangea	+	+++
Cranberry	++	+++
Ruzigrass	-	+++
<i>I. barbatum</i>	+	+
<i>S. guianensis</i>	-	+
Polygonum	++	+++
Buckwheat	-	+
Rice	++	++
Barley (Kitamihadaka)	-	-
Barley (Manriki)	-	-

たとえ強酸性土壌に適応した植物種であっても、限度を越えた高濃度の Al は有毒であり、生育は低下した (第2章; Fig. 2-1)。このため、過剰の Al の毒性を回避する能力も強酸性土壌に生育する植物種には重要であると考えられる。一般に、植物は根から Al を排除することにより Al 過剰毒性を回避している。現在、Al を排除する機構として最重視されているのは、根圏からの有機酸等の Al キレート物質の放出である。詳しくは第1章の緒論に記述してあるので割愛するが、キレート結合した Al はそのキレート力が強いほど植物根に対する毒性が低下し (Hue et al., 1986)、吸収もされにくくなる (Jones and Darrah, 1995)。

第4章-第1節では、メラストーマ、メラルーカ、*A. mangium*、およびオオ

ムギの根からの有機酸の放出能を調査した。その結果、メラルーカの根において多量のクエン酸放出が認められ、その放出量は Al 添加によって約 18% 上昇した（第4章; Fig. 4-3）。Al 排除植物であるメラルーカの根の Al 含有率は高 Al 区 (15mg L^{-1}) においても非常に低く、Al による Ca および Mg 吸収阻害もほとんど認められなかった（第2章; Table 2-3）。また、データは示していないが、アルミノン染色による検定では、根の表皮より内側に Al は侵入していなかった。これらの結果から、メラルーカの Al 排除能は非常に強力であり、この強力な Al 排除能に根からのクエン酸の放出が関わっていると理解される。

一方、*A. mangium* は Al 毒性を軽減するに足る量の有機酸を放出することはなかったが、高濃度の Al により未知の Al キレート物質の放出が誘導され、培養液中のモノマー態 Al の割合は低下した（第4章; Fig. 4-4）。このキレート物質を放出した処理区 (+Al+ NH_4 区) の *A. mangium* の根の Al 含有率は非常に低く（第4章; Table 4-1）、キレート物質の放出が Al 排除に対して強く関与することが示唆される。

根圏の Al を無毒化する機構として Al キレート物質の放出の他に、根圏の pH 上昇機構が提案されているが（Foy et al. 1965; Mugwira and Elgawhary 1979; Degenhardt et al., 1998）、本実験で供試した強酸性土壤に適応した種の Al 排除能と根圏の pH 上昇能の間には全く相関がなかった（第4章; Fig. 4-8）。最も典型的なのはメラストーマとメラルーカである。両者とも根圏の pH を著しく低下させたが、Al 集積性に関しては大きく異なり、メラストーマは Al 集積植物であるのに対し、メラルーカは Al 排除能が非常に強い（第2章; Table 2-3 他）。

このような植物根における根圏 pH の変化には培地に含まれる窒素源が大きく関わっている。強酸性土壤では、硝酸化成作用が低下するために、有効態窒素の主体はアンモニウム態窒素 ($\text{NH}_4\text{-N}$) である。第4章—第1節の結果から、強酸性土壤に適応した植物種は硝酸態窒素 ($\text{NO}_3\text{-N}$) を窒素源として与えた場合より $\text{NH}_4\text{-N}$ を窒素源とした場合に生育および窒素吸収が良好であったことから（第4章; Fig. 4-1, Table 4-2）、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の利用能が高いと考えられる。さら

に、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 吸収時に起こる培地 pH 低下による溶存 P と Al 濃度の上昇にも生育を促進する効果があることが明らかになった（第4章; Figs. 4-2, 4-5, Table 4-2）。

また、Al は植物の Ca および Mg 吸収を拮抗的に阻害する性質を持つため（Rengel and Elliott, 1992; Huang et al., 1992ab; 1993; 1996; Piñeros and Tester, 1993; Sasaki et al., 1994）、もともと塩基の不足している強酸性土壌での作物生育をさらに困難にしている。しかし、強酸性土壌に適応した植物種には Al によって Ca および Mg の吸収が阻害されない種が多く、Al によって Ca および Mg の吸収が低下する種においても、低 Ca および Mg 含有率耐性が強く、高 Al 区でもそれらの欠乏症状は観察されなかった（第2章; Table 2-3, Fig. 2-1, 第3章; Fig. 3-1, Table 3-1）。

さらに、メラストーマ、メラルーカ、*I. barbatum* オオイタドリなどの種では Al 非共存下で、4.0 あるいは 3.5 という極めて低い pH でも生育が低下することではなく、低 pH そのものはこれらの種の生育阻害要因にはならなかった（第2章; Fig. 2-3）。

このように、強酸性土壌に自生する植物は、強酸性土壌での生育を制限する諸要因に対して高度に適応している。特に、土壌溶液中での過剰毒性が問題になる Al に対しては、耐性だけではなく、その存在により生育が促進されるという性質を多くの種が持っていた。次節ではこの Al による生育促進の機構について詳しく考察する。

第2節 アルミニウムによる生育促進機構の解析

2-1 アルミニウムによる窒素、リンをはじめとする養分吸収促進

植物の生育に対する Al の有益な効果に関する研究の歴史は古く、かなり以前から報告されている。1945 年に発表された Hutchinson の総説によると、当時は Al の有益な効果に関する研究の方がむしろ Al 毒性に関する研究より盛んであったことが推察される（Hutchinson, 1945）。例えば、Yoshii (1937) の報告で

は、ススキ、オオイトドリ、およびアジサイの生育が Al 添加によって促進されることが示されている。1960 年代以後にも、Hackett (1962) はコメススキ、オオスズメノテッポウ、ウシノケグサ、およびホソムギの生育が、Sivasubramaniam and Talibudeen (1971) はチャの生育が Al によって促進されることを報告している。前節で示したように、最近でも Al の有益な効果を示した報告は数多くみられる。

しかしながら、Al による生育促進の機構を調査した研究の数は非常に限られている。Konishi (1992) は Al によるチャの生育促進にホウ素の持つ役割の一部代替、あるいは P 過剰時の吸収抑制が関わっているのではないかと推定したが、本研究を含めた多くの実験において、ホウ素および P 濃度が適正な条件でも Al による生育促進は観察されるので、Al による生育促進機構の本質がこれらの要因であるとは考えにくい。Kinraide は 1993 年に、それまでの実験データを綿密に分析し、さらに必要と思われる実験を追加して、Al による生育促進現象の解明を試みた (Kinraide, 1993)。その結果、Al による生育促進は低 pH における H^+ の毒性、例えば H^+ 過剰による根細胞からの溶質の漏出のような障害を Al^{3+} が軽減するため、低 pH 条件下で毒性の低い Al 濃度によって生育促進現象が観察されると結論づけた。Llugany et al. (1995) も同様の報告をしている。しかし、本研究で供試した植物種のほとんどは、培地の pH が極めて低い条件でも生育が低下することはなく、 H^+ 毒性の軽減だけで Al による生育促進現象を説明するのは不可能である。

第2章－第1節の実験で、Al 添加による生育の促進には N、P、あるいは K などの養分含有率の上昇が伴われた (Fig. 2-1, Table 2-3)。また、第2章－第3節の実験で、養分が共存しない場合には Al による生育促進の程度がはるかに小さくなる、あるいは全く促進効果がみられなかったことから (Figs. 2-5, 2-6)、本研究で観察された Al による生育促進は養分吸収の促進が主要因であると推定された。そこで、各種植物の Al による無機栄養状態の改善と生育促進の関係を調べるため、第2章－第1節の実験における Al 無添加区に対する低 Al 区 (3mg

L⁻¹) の若葉の多量養素含有率の相対値と個体の生長量の相対値の間の相関を検討した。なお、高 Al 区 (15mg L⁻¹) とオオムギのデータは Al 毒性の影響が強く出ている可能性があるため用いなかった。

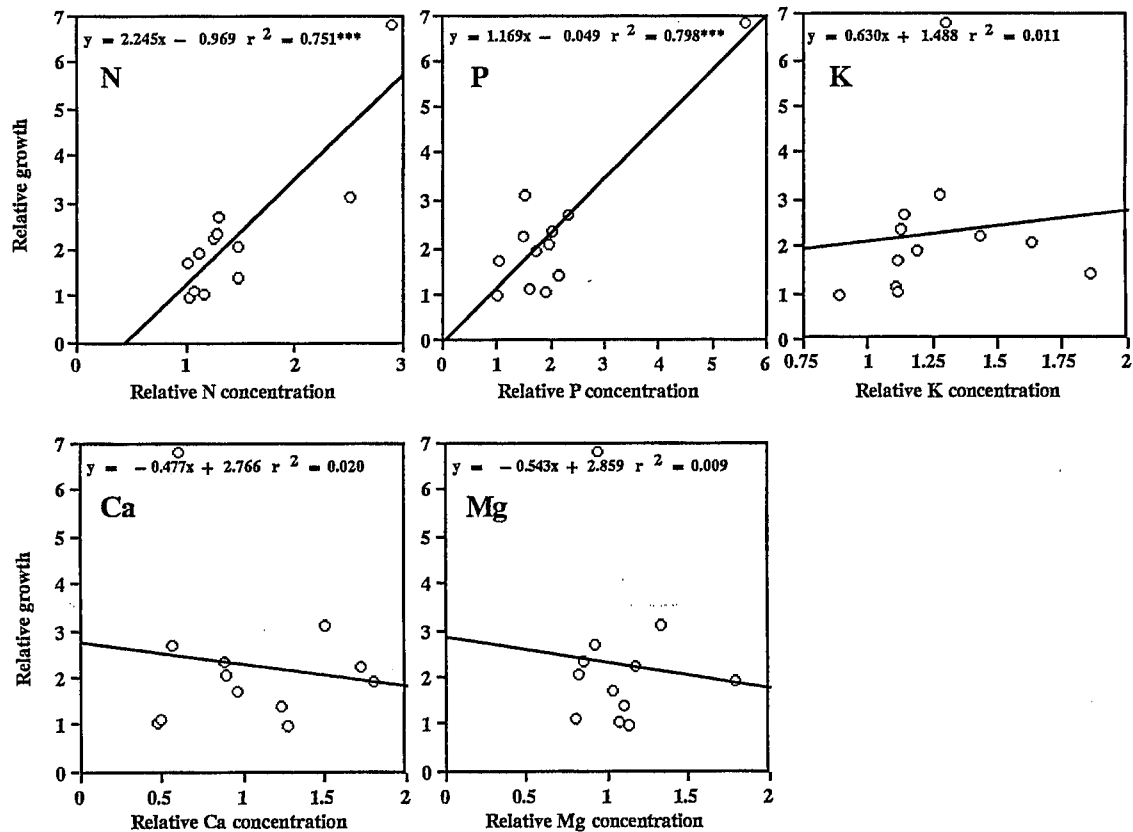


Fig. 6-1 Relationships between relative mineral concentration and relative growth in L (3mg L⁻¹ Al) treatment to N (0mg L⁻¹ Al) treatment. Original data were cited from Fig. 2-1 and Table 2-3.
***: significant at 0.1% level.

その結果、生育の促進は若葉の N および P 含有率の上昇と相関が高く、これらの吸収促進が Al による生育促進機構に強く関わっていることはほぼ間違いないと考えられた (Fig. 6-1)。

そこで、特に Al 添加による上昇率の高かった P 吸収の促進に注目して、能動的 P 吸収に与える Al 処理の影響を調査した。供試植物には、Al による生育促進と P 含有率の上昇が最も顕著であったメラストーマを用いた。その結果、メラストーマの切断根の能動的 P 吸収が、Al 前処理を行うことにより大きく上昇することが示された (第2章; Fig. 2-7)。また、能動的吸収に対するエネルギー

の供給能を示す根の活性 (TTC 法により測定) が Al 存在下で上昇することも確認された (第3章; Fig. 3-6)。これらの結果から、強酸性土壌に適応した植物種の Al による生育促進機構には、P 吸収や N 吸収を中心とした能動的養分吸収能の活性化が大きく関わっていると考えられる。

Ca は原形質膜の安定化に不可欠であるが、メラストーマの根において Al も Ca と同様の膜安定化機能を持つことがトリパンプルーの透過性を調べた結果から示唆された (第3章; Fig. 3-9)。このことは Ca および他の養分を含まない培養液を用いた水耕実験において、培地に Al を添加すると生育が改善されたことと関係していると思われる (第2章; Fig. 2-5)。また、培地に Ca を添加することにより K 吸収が促進されることが報告されているが (Viets, 1944; Tadano et al., 1969)、強酸性土壌に生育する多くの種の K 含有率が Al 添加により上昇したことは (第2章; Table 2-3, Fig. 6-1)、これらの種においては Al が K 吸収に対して Ca と同様の促進効果を持つことを示している。低培地 Ca 濃度下におけるメラストーマの葉の K 含有率が、Al 添加によって上昇し、Ca 添加によってさらに上昇したことは、この可能性を支持するものである (第3章; Table 3-1)。

2-2 アルミニウム独自の効果

培養液中に Al が含まれない時、強酸性土壌に適応した植物では細根の発達が不十分であり、根も褐色を呈する症状が観察された (第2章; Fig. 2-2, 第3章; Figs. 3-3, 3-7)。これらの Al 不在時の形態的な障害は、Al 不在ストレスを受けた根細胞の周囲にリグニンが集積し、細胞の正常な伸長を阻害したことによると考えられる (第3章, Fig. 3-10)。根細胞壁のリグニン集積量の増加は、Al 感受性の高い植物が示す Al 障害に対する反応の一つであるが (Sasaki et al., 1996; 1997a)、Al 障害だけではなく、各種ストレスによっても引き起こされるため、何らかの細胞障害による二次的な症状であると思われる。

先に述べたメラストーマの根細胞の原形質膜透過性が Al 不在時に増加するという現象も、Al 感受性植物が Al 障害により示す症状と同様である (第3章; Fig.

3-9)。Al 感受性の高い植物における Al 障害症状として根細胞の原形質膜透過性が上昇するのは、Al が原形質膜のリン脂質 (Matsumoto et al., 1992) あるいは膜タンパク (Cardwell, 1989) と結合することやリン脂質を過酸化することが原因と考えられており、このような膜機能の障害がリグニンの集積を引き起こす原因である可能性がある。一方、強酸性土壌に適応した植物種の多くでは、先に述べたように Al によって N、P などの能動的養分吸収が促進されたが (第2章; Table 2-3, Fig. 2-7, 第3章; Fig. 3-6)、能動的養分吸収は原形質膜を介するものであり、Al 施与には Ca 施与と類似した原形質膜安定化効果も認められたこと (第3章; Fig. 3-9) を考慮すると、これらの植物においては Al は原形質膜機能を強化していると理解される。このことを逆に考えれば、Al 感受性植物において Al による膜機能障害がリグニンを集積を引き起こすように、強酸性土壌に適応した植物では Al 欠除時に原形質膜機能が正常に働かず、リグニン集積量が増大し、根が褐変あるいは細根の減少などの症状を呈したという結論が導かれる。根の形態の正常化あるいは養分吸収の促進は、他の元素によって代替できなかったことから (第3章; Tables 3-1, 3-2, 3-3)、この Al による膜機能の正常化は Al 独自の効果であると考えられる。

Al が持つ原形質膜機能を正常化する効果は、根および地上部の Al 含有率が低い種、例えばメラルーカなどでも認められたため (第2章; Table 2-3, 第4章; Table 4-2)、この効果は根表皮細胞の原形質膜で起きていると考えられる。実際、培地に養分が共存しない場合は、メラルーカの生育は Al によって促進されることはなかった (第2章; Figs. 2-5, 2-6)。しかし、メラストーマの生育は培地に養分が共存しない場合でも Al によって促進された (第2章; Figs. 2-5, 2-6)。メラストーマは根だけではなく葉にも $10,000\text{mg kg}^{-1}$ 以上の Al を集積する Al 集積植物であるため (第3章; Tables 3-1, 3-2, 3-3, 第5章; Fig. 5-3)、根の原形質膜上での効果に加えて、体内に集積された Al も生育に対して有益な効果を持っていると考えられる。

そこで、体内の Al、特に葉に存在する多量の Al が、根と同様に有益な効果

を与えているのか、あるいはキレート化などにより無毒化され、老廃物として徐々に蓄積したものであるのかを検討するために、その吸収機構、体内での形態、および生理的機能を検討した。

メラストーマの Al 含有率は発生したばかりの葉でも $7,000\text{mg kg}^{-1}$ に達し、成葉との差は小さい（第3章; Table 3-2）。このことはメラストーマの体内を速やかに Al が移行していることを意味し、その主な供給源と考えられる根の Al 吸収速度も非常に速いことが予想された。しかし、メラストーマの切断根の Al 吸収の初期段階（Al 添加後数時間）は、ほとんどがアポプラストの陽イオン交換基への Al の受動的な吸着であり（第5章; Figs. 5-14, 5-16）、シンプラストへの流入速度はかなり緩やかであった（第5章; Fig. 5-16）。吸収カインेटクスもこれまでに報告されている Al 非集積植物と同様の傾向であり、吸収速度も大差無かった（第5章; Fig. 5-11, Archambault, 1996; Rengel and Reid, 1997）。一方、アポプラストの陽イオン交換基への Al の吸着はかなり特異的であるため（第5章; Fig. 5-15）、 Ca^{2+} あるいは Mg^{2+} のように根の交換態 Al が多いことが Al 吸収量の増加の原因である可能性がある（橘, 1982; Keltjens, 1995）。また、Al 処理培養液で長期間培養したメラストーマにおいて根シンプラストの Al 集積量が非常に多いことは（第5章; Fig. 5-16）、Al の原形質膜透過は緩やかではあるが、継続的であることを示す。

Ca 吸収については全植物体における吸収速度は切断根における吸収速度の4倍以上になることが報告されている（橘, 1982）。このことは蒸散流が Ca のような多価カチオンの地上部への移行には重要であることを意味する。また、Ca の木部への到達経路はカスパリー帯が未発達な根端部におけるアポプラステイックな経路が主体であると考えられている（Clarkson and Hanson, 1980）。Al 処理下で生育させた場合、メラストーマ地上部の若い組織の Al 含有率が極めて高く（第3章; Tables 3-1, 3-2, 3-3, 第5章; Fig. 5-3）、メラストーマの Al 吸収が根端部で顕著であることは（第4章; Fig. 4-7）、通常の植物の Ca^{2+} 吸収と同様に、メラストーマの全植物体の Al 吸収においても、カスパリー帯が未発達である根

端部などから蒸散流によって Al は速やかに導管に到達し、地上部に移行することを強く示唆する。

葉中の Al の存在形態を葉の成分の分画と ^{27}Al NMR により調査したところ、シュウ酸とキレートした形態の Al が確認された（第5章; Fig. 5-9）。しかし、その全 Al に対する割合は小さく、葉に存在する Al の主要形態は Al^{3+} であった（第5章; Fig. 5-9）。可溶性シュウ酸含有率は根では +Al 区（1mM Al）と -Al 区の間で差がなかったが、葉では +Al 区で -Al 区よりはるかに高く、可溶性 Al 含有率との間に有意な正の相関があった（第5章; Fig. 5-8）。このことは、葉中におけるシュウ酸の集積が、根で Al とキレートしたシュウ酸が Al と共に葉に移行した結果として生じたものであることを示唆する。すなわち、Al-シュウ酸複合体は Al を無毒化するための形態ではなく、シンプラストにおける Al の移行に関わっている可能性が高い。また、根のアポプラストあるいは培地中にシュウ酸は検出されなかったことから、根細胞の膜を介した Al の輸送にシュウ酸は関わっていないと考えられる。

メラストーマと同様に Al 集積植物であるアジサイ（Ma et al., 1997d）、ソバ（Ma et al., 1997c）、およびチャ（Nagata et al., 1992; 1993）では、葉中に存在する Al はほとんどがキレート態であり、 Al^{3+} は検出されていないため、Al は無毒化されて葉に蓄積されているものと考えられる。しかしメラストーマでは多量の Al^{3+} が存在した。 Al^{3+} は pH が中性付近の細胞質中にはほとんど存在できないため、葉中の Al^{3+} は細胞質以外の細胞壁、液胞、あるいはその他のオルガネラなどに存在すると考えられる。顕微鏡による観察で細胞壁に Al の存在が確認された葉の表皮細胞では、細胞の形態は集積しないものと比較して堅固であったため（第5章; Fig. 5-1）、根の場合と同様に活性の高い Al^{3+} が壁あるいは膜の構造安定化に寄与していると考えられる（第5章; Fig. 5-1）。さらに、Al は葉の柵状組織にも多く集積し（第5章; Fig. 5-1）、Al を集積した葉の光合成能が集積していない葉より高かったことから（第5章; Table 5-1）、クロロプラスト中の Al が葉の光合成能を直接活性化していることも考えられる。また、 Ca^{2+} のよう

に細胞壁あるいは液胞に過剰の Al を貯蔵することにより低濃度に維持された細胞質内の Al が生理的に機能している可能性も否定できない。

以上、本研究の結果から、強酸性土壌に生育する植物は、強酸性土壌での Al 過剰をはじめとする生育制限要因に適応する能力や、通常の植物においては強酸性土壌で最も重要な生育阻害要因である Al を逆に利用する能力を有し、植物の耐酸性機構を研究する上で非常に有用であることが明らかとなった。特に興味深いのは、これらの種が極めて強い Al 耐性を持つだけでなく、Al によって生育が促進される性質を持つことであった。この Al による生育促進は Al 非集積種では能動的養分吸収、特に N や P 吸収の促進によるものであり、Al 集積種であるメラストーマでは、養分吸収の促進に加えて吸収された Al による細胞壁構造や原形質膜の安定化、および光合成能の活性化が関わっていると理解された。今後、Al の毒性だけではなく、これらの Al の持つ有益性に関する一層の研究が必要になるであろう。

第7章 要約

世界に分布する不良土壌の中で、作物の生産上、最も重要なものの一つが酸性土壌である。酸性土壌では低 pH だけではなく、低 pH が引き起こす二次的な要因、特に Al 過剰毒性により、多くの作物種は正常に生育することができない。食糧生産のために酸性土壌を有効に利用することを目的として、植物の耐酸性機構についてこれまでに様々な研究がなされてきたが、未だ決定的な結果は得られていない。一方、強酸性土壌であってもほとんどの場合不毛ではなく、多くの植物種が自生している。これらの種は強酸性土壌に対する何らかの適応機構を獲得しているものと考えられるが、その特性に関して明らかになっていることは非常に少ない。そこで本研究では、強酸性土壌に生育する各種植物の生育特性、特に Al 過剰に対する適応機構について調査し、以下の結果を得た。

1. 強酸性土壌に適応した植物の生育特性

1) 強酸性土壌に適応した植物種は、Al 耐性が非常に強いだけでなく、その多くは Al によって生育が促進された。特にメラストーマは培地に Al が含まれない場合に生育が障害を受け、体内の N、P、および K 含有率が低かったが、培地への Al 添加によってそれらは著しく改善された。

2) 土壌酸性により硝酸化成作用が阻害されるため、強酸性土壌における有効態窒素はアンモニウム態窒素が主体である。強酸性土壌に適応した植物では硝酸態窒素よりアンモニウム態窒素を窒素源とした場合に生育および窒素吸収が良好であった。また、アンモニウム態窒素吸収による根圏 pH の低下は培地の溶存 Al および P 濃度を上昇させ、強酸性土壌に適応した植物の生育に対して有益な効果を与えることが示された。

3) 酸性土壌ではしばしば塩基が不足し、さらに Al は植物の Ca 吸収と Mg 吸収を拮抗的に阻害すると報告されているが、強酸性土壌に適応した植物種は Al によって Ca や Mg の吸収が阻害されない特性、あるいは低 Ca 含有率耐性や

低 Mg 含有率耐性が強い特性を持っていた。

4) 通常、低 pH 自身も強酸性土壌での植物の生育を制限する要因であるが、強酸性土壌に適応した植物種のほとんどは、3.5 という極めて低い pH でも生育は影響されなかった。

5) メラルーカの根は非常に強力な Al 排除能を持つが、その排除能には根からのクエン酸放出が関わっていることが示された。*A. mangium* の根では、培地 Al 濃度が高濃度であるときに何らかの Al キレート物質の放出が誘導され、Al 排除に貢献していることも示された。通常の植物と同様に強酸性土壌に適応した植物種にとっても Al 濃度が極めて高い場合は毒性を示すため、これらの Al 排除能が Al 耐性機構の一つとして機能していると理解された。

6) 以上の結果から、強酸性土壌に生育する植物は強酸性土壌における生育を制限する様々な要因に対して適応していることが明らかになった。

2. アルミニウムによる生育促進機構の解析

1) 一般に、Al による生育の促進は低 pH 条件における H^+ 毒性を Al が軽減することが原因であると考えられているが、本研究で供試した強酸性土壌に適応した植物種の多くは培地 pH が 3.5 という極めて強い酸性条件でも生育が低下しなかったことから、 H^+ 毒性の軽減だけでは Al による生育促進機構を説明することはできなかった。

2) Al による生長量の増加は、Al による葉の N 含有率および P 含有率の上昇と密接に関連しており、Al と養分元素が培地に共存しない場合には、Al による生育促進の程度がはるかに小さくなる、あるいは全く生育が促進されなかったことから、Al による生育促進には N、P、K などの養分吸収の促進が関わっていると推定された。

3) 2) の推定を検証するために、Al 無添加で生育させたメラストーマの切断根に Al 前処理を行い、P 吸収を調査したところ、能動的 P 吸収能が Al 前処理により著しく上昇した。また、能動的養分吸収に対するエネルギーの供給能を

意味する根の活性も Al 処理をすることにより上昇した。これらの結果から、強酸性土壌に適応した植物種の Al による生育促進は、養分吸収能の活性化に起因する N、P、K などの吸収増加が重要な要因として関与すると考えられた。

4) Al による N、P、K など養分吸収能の上昇は Al 独自の効果であり、この養分吸収能の上昇による生育促進作用は Al の間接的な効果であると結論された。

5) メラストーマを用いて原形質膜のトリパンプルー透過性に与える Al と Ca の影響を比較した結果、Al が Ca の持つ根細胞の原形質膜機能安定化と類似した効果を持つことが示された。

6) 強酸性土壌に生育する植物種の根が、Al 無添加時に細根の減少や褐色を呈すなどの形態的な障害を示したことには、Al 無添加時に根の細胞壁のリグニン沈積量が増大し、細胞の伸長が阻害されたことが関わっていると考えられた。強酸性土壌に生育する植物の根では Al 無添加時に原形質膜機能が低下し、細胞が障害を受けたためにリグニン集積が起こると理解された。

7) 本研究で供試した植物の中で最も Al 要求性の高かったメラストーマは根だけではなく葉にも $10,000\text{mg kg}^{-1}$ 以上の Al を集積する Al 集積植物であった。メラストーマは Al による養分吸収の促進に起因しない、Al 単独の効果によっても生育が促進されたことから、体内の Al が何らかの有益な効果を与えていると考えられた。

8) Al 集積植物であるメラストーマの切断根の Al 吸収は Al 非集積植物の場合と同様に、初期の段階では、ほとんどがアポプラストの陽イオン交換基への受動的な吸着であり、シンプラストへの流入は緩やかであった。しかし、長期間 Al 処理下で生育した植物体の根ではシンプラストの Al が非常に多いことから、膜透過は継続的に行われていると理解された。また根の陽イオン交換基に Al が特異的に吸着されることも長期間 Al 処理した場合に Al の膜透過量が増大する原因になると考えられた。さらに、根端近傍などの若い部位から蒸散流により地上部に速やかに移行する Al も相当量存在すると考えられた。

9) メラストーマの葉において Al は表側の表皮細胞の細胞壁に最も多く集積し、次いで柵状組織への集積が多かった。Al が集積することにより葉の構造、特に表皮細胞の構造は安定化し、光合成能は上昇した。

10) メラストーマの葉には Al-シュウ酸キレートが存在したが、主形態は Al^{3+} であり、Al-シュウ酸キレートは、Al を無毒化するための形態ではないと考えられた。可溶性シュウ酸含有率は、根では Al 処理の影響を受けなかったが、葉では +Al 区で -Al 区より高く、可溶性 Al 含有率との間に正の相関があったことから、シュウ酸はシンプラスティックな経路による地上部への Al の移行に関わっている可能性が高かった。

11) メラストーマの葉に存在する Al の主形態である Al^{3+} は pH が中性付近の細胞質内に高濃度で存在することはできないため、細胞壁、液胞、あるいはその他のオルガネラに集積していると考えられた。細胞壁における Al の集積には、根の場合と同様に細胞の安定化および活性化の効果があり、クロロプラストへの集積は光合成能の上昇に貢献していると理解された。また、 Ca^{2+} と同様に細胞壁あるいは液胞に過剰の Al を貯蔵することにより低濃度に維持された細胞質内の Al が生理的に機能している可能性が考えられた。

以上の結果から、強酸性土壌に生育する植物の多くは、通常の植物では生育阻害の原因である Al によって生育が促進され、この生育促進の主な要因は、Al 非集積植物では Al による能動的養分吸収の促進であり、Al 集積植物では Al による養分吸収促進に加えて、吸収された Al による細胞構造の安定化や光合成能の活性化なども強く影響していると結論された。

謝辞

本研究の遂行ならびに論文作成にあたり懇切丁寧に御指導とご配慮をいただきました北海道大学農学部作物栄養学講座教授 但野利秋先生に心から感謝いたします。お忙しい中、本当にありがとうございました。本論文の御校閲と適切な御教示をしていただきました同土壌学講座教授 波多野隆介先生に心から感謝いたします。実験の計画、遂行にあたり御指導、御助言をいただき、本論文の御校閲をいただきました同園芸緑地学講座助教授 大崎満先生に心から感謝いたします。

また、研究活動において有益な御助言、御示唆を頂きました同作物栄養学講座助教授 山口淳一先生に深く感謝いたします。研究遂行にあたり御指導、御助言をいただいた同生物有機化学講座教授 吉原照彦先生ならびに御指導、御助言をいただきました酪農学園大学教授 水野直治先生に心から感謝いたします。研究活動において相談にのっていただき、適切な御助言をいただいた北海道大学農学部作物栄養学講座助手 信濃卓郎先生に深く感謝いたします。研究生生活の間、同技官 浦山勝氏には色々とお世話になりました。ありがとうございました。

6年間、本講座での有意義な研究生生活を送らせていただき、色々と力になっていただいた、たくさんの先輩、同輩、後輩、ならびに事務官の皆様には大変感謝しています。長い間本当にお世話になりました。

最後に21年間という長い学生生活を見守り、支援していただいた両親に感謝いたします。

引用文献

- Alva, A. K., Asher, C. J., and Edwards, D. C. 1986: Relationships between root length of soybean and calculated activities of aluminum monomers in nutrient solution. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **50**, 959-962.
- Alva, A. K., Kerven, G. L., Edwards, D. G., and Asher, C. J. 1991: Reduction in toxic aluminum to plants by sulfate complexation. *Soil Sci.*, **152**, 354-359.
- Aniol, A. 1984: Induction of aluminum tolerance in wheat seedlings by low doses of aluminum in the nutrient solution. *Plant Physiol.*, **75**, 551-555.
- Archambault, D. J., Zhang, G., and Taylor, G. J. 1996: A comparison of the kinetics of aluminum (Al) uptake and distribution in roots of wheat (*Triticum aestivum*) using different aluminum sources. A revision of the operational definition of symplastic Al. *Physiol. Plant.*, **98**, 578-586.
- Barcelo, J., Guevara, P., and Poschenrieder, C. 1993: Silicon amelioration of aluminium toxicity in teosinte (*Zea mays* L. ssp. *mexicana*). *Plant Soil*, **154**, 249-255.
- Bartlett, R. J. and Riego, D. C. 1972: Effect of chelation on the toxicity of aluminium. *Plant Soil*, **37**, 419-423.
- Basu, A., Basu, U., and Tylor, G. J. 1994a: Induction of microsomal membrane proteins in roots of an aluminum-resistant cultivar of *Triticum aestivum* L. under conditions of aluminum stress. *Plant Physiol.*, **104**, 1007-1013.
- Basu, U., Basu, A., and Taylor, G. J. 1994b: Differential exudation of polypeptides by roots of aluminum-resistant and aluminum-sensitive cultivars *Triticum aestivum* L. in Response to aluminum stress. *Plant Physiol.*, **106**, 151-158.
- Basu, U., McDonald-Stephens, J. L., Archambault, D. J., Good, A. G., Briggs, K. G., Taing-Aung, and Taylor, G. J. 1997: Genetic and physiological analysis of doubled-haploid, aluminium-resistant lines of wheat provide evidence for the involvement of a 23 kD, root exudate polypeptide in mediating resistance. *Plant Soil*, **196**, 283-288.
- Baylis, A. D., Gragopoulou, C., Davidson, K. J., and Birchall, J. D. 1994: Effects of silicon on the toxicity of aluminium to soybean. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **25**, 537-546.
- Birchall, J. D. 1992: The interrelationship between silicon and aluminium in the biological effects on aluminium. *Ciba Found. Symp.*, **169**, 50-68.
- Blamey, F. P. C., Robinson, N. J., and Asher, C. J. 1992: Interspecific differences in aluminium tolerance in relation to root cation-exchange capacity. *Plant Soil*, **146**,

77-82:

- Blamey, F. P. C., Asher, C. J., Kerven, G. L., and Edwards, D. G. 1993a: Factors affecting aluminium sorption by calcium pectate. *Plant Soil*, **149**, 87-94.
- Blamey, F. P. C., Asher, C. J., Edwards, D. C., and Kerven, G. L. 1993b: In vitro evidence of aluminum effects on solution movement through root cell walls. *J. Plant. Nutr.*, **16**, 555-562.
- Blamey, F. P. C. and Dowling, A. J. 1995: Antagonism between aluminium and calcium for sorption by calcium pectate. *Plant Soil*, **171**, 137-140.
- Blamey, F. P. C., Ostatek-Boczynski, Z., and Kerven, G. L. 1997: Ligand effects on aluminium sorption by calcium pectate. *Plant Soil*, **192**, 269-275.
- Blancaflor, E. B., Jones, D. L., and Gilroy, S. 1998: Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol.*, **118**, 159-172.
- Brown, L. R. 1998: 穀物増産のための戦い. In 地球白書 1998-99, Ed. L. R. Brown, p. 142-172, ダイヤモンド社, 東京.
- Cakmak, I. and Horst, W. J. 1991: Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.*, **93**, 463-468.
- Caldwell, C. R. 1989: Analysis of aluminum and divalent cation binding to wheat root plasma membrane proteins using Terbium phosphorescence. *Plant Physiol.*, **91**, 233-241.
- Chen, J., Sucoff, E. I., and Stadelmann, E. J. 1991: Aluminum and temperature alteration of cell membrane permeability of *Quercus rubra*. *Plant Physiol.*, **96**, 644-649.
- Chenery, E. M. 1948a: Aluminium in the plant world. Part I, general survey in dicotyledons. *Kew Bull.*, **2**, 173-183.
- Chenery, E. M. 1948b: Aluminium in plants and its relation to plant pigments. *Ann. Bot. N. S.*, **12**, 121-136.
- Chenery, E. M. 1949: Aluminium in the plant world Part II and III, monocotyledons, gymnosperms and cryptograms. *Kew Bull.*, **4**, 463-473.
- Chenery, E. M. 1955: A preliminary study of aluminium and the tea bush. *Plant Soil*, **5**, 174-200.
- 茅野充男 1982: 植物根内における元素分布のXMAによる解析. In 植物と金属元素—その吸収と体内挙動—, 日本土壌肥料学会編, p. 87-122, 博友社, 東京

- Clark, R. B. 1977: Effect of aluminum on growth and mineral elements of Al-tolerant and Al-intolerant corn. *Plant Soil*, **47**, 653-662.
- Clarkson, D. T. and Hanson, J. B. 1980: The mineral nutrition of higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 239-298.
- Clarkson, D. T. 1984: Calcium transport between tissues and its distribution in the plant. *Plant Cell Environ.*, **7**, 449-456.
- Cocker, K. M., Evans, D. E., and Hodson, M. J. 1998: The amelioration of aluminium toxicity by silicon in wheat (*Triticum aestivum* L.): exudation as evidence for an *in planta* mechanism. *Planta*, **204**, 318-323.
- Cruz-Ortega, R., Cushman, J. C., and Ownby, J. D. 1997: cDNA clones encoding 1,3- β -glucanase and fimbrin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots. *Plant Physiol.*, **114**, 1453-1460.
- Cuenca, G., Herrera, R., and Medina, E. 1990: Aluminium tolerance in trees of a tropical cloud forest. *Plant Soil*, **125**, 169-175.
- Cuenca, G., Herrera, R., and Mérida, T. 1991: Distribution of aluminium in accumulator plants by X-ray microanalysis in *Richeria grandis* Vahl leaves from a cloud forest in Venezuela. *Plant Cell Environ.*, **14**, 437-441.
- de Andrade, L. R. M., Ikeda, M., and Ishizuka, J. 1997: Excretion and metabolism of malic acid produced by dark carbon fixation in roots in relation to aluminium tolerance of wheat. In *Plant nutrition - for sustainable food production and environment*, Eds. T. Ando et al., p. 445-446, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- de la Fuente, J. M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J. L., and Herrera-Estrella, L. 1997: Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science*, **276**, 1566-1568.
- de Lima, M. L., and Copeland, L. 1994: The effect of aluminium on respiration of wheat roots. *Physiol. Plant.*, **90**, 51-58.
- Degenhardt, J., Larsen, P. B., Howell, S. H., and Kochian, L. V. 1998: Aluminum resistance in the Arabidopsis mutant *alr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol.*, **117**, 19-27.
- Delhaize, E., Craig, S., Beaton, C. D., Bennet, R. J., Jagdish, V. C., and Randall, P. J. 1993a: Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). I. Uptake and distribution of aluminium in root apices. *Plant Physiol.*, **103**, 685-693.
- Delhaize, E., Ryan, P. R., and Randall, P. J. 1993b: Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminium-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.*, **103**, 695-702.

- Ding, J. P., Badot, P.-M., and Pickard, B. G. 1993: Aluminium and hydrogen ions inhibit a mechanosensory calcium-selective cation channel. *Aust. J. Plant Physiol.*, **20**, 771-778.
- Ezaki, B., Yamamoto, Y., and Matsumoto, H. 1995: Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminium treatment and Pi starvation in cultured tobacco cells. *Physiol. Plant.*, **93**, 11-18.
- Foy, C. D., Burns, G. R., Brown, J. C., and Fleming, A. L. 1965: Differential aluminum tolerance of two wheat varieties associated with plant-induced pH changes around their roots. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **29**, 64-67.
- Foy, C. D., Fleming, A. L., and Gerloff, G. C. 1972: Differential aluminum tolerance in two snapbean varieties. *Agron. J.*, **64**, 815-818.
- Foy, C. D., Chaney, R. L., and White, M. C. 1978: The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **29**, 511-566.
- Foy, C. D. 1988: Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **19**, 959-987.
- Foy, C. D., Lee, E. H., Coradetti, C. A., and Taylor, G. J. 1990: Organic acids related to differential aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. In *Plant Nutrition-Physiology and Applications*, Ed. M. L. van Beusichem, p. 381-389, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Gassmann, W. and Schroeder, J. I. 1994: Inward-rectifying K⁺ channels in root hairs of wheat. *Plant Physiol.*, **105**, 1399-1408.
- Geoghegan, I. E. and Sprent, J. I. 1996: Aluminum and nutrient concentrations in species native to central Brazil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **27**, 2925-2934.
- Golley, F. B., Yantko, J., Richardson, T., and Klinge, H. 1980a: Biogeochemistry of tropical forests: 1. The frequency distribution and mean concentration of selected elements in a forest near Manaus, Brazil. *Trop. Ecol.*, **21**, 59-70.
- Golley, F. B., Yantko, J., and Jordan, C. 1980b: Biogeochemistry of tropical forests: 2. The frequency distribution and mean concentration of selected elements near San Carlos de Rio Negro Venezuela. *Trop. Ecol.*, **21**, 71-80.
- Grimme, H. and Lindhauer, M. G. 1989: The effect of Al and Mg on the transpiration rate of young maize plants. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, **152**, 453-454.
- Gunsé, B., Poschenrieder, C., and Barceló, J. 1997: Water transport properties of roots and root cortical cells in proton- and Al-stressed maize varieties. *Plant Physiol.*, **113**, 595-602.
- Hackett, C. 1962: Stimulative effects of aluminium on plant growth. *Nature*, **195**, 471-472.

- Hamel, F., Breton, C., and Houde, M. 1998: Isolation and characterization on wheat aluminum-regulated genes: possible involvement of aluminum as pathogenesis response elicitor. *Planta*, **205**, 531-538.
- Hammond, K. E., Evans, D. E., and Hodson, M. J. 1995: Aluminium/silicon interactions in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Soil*, **173**, 89-95.
- Haridasan, M. 1982: Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. *Plant Soil*, **65**, 265-273.
- Haridasan, M., Paviani, T. I., and Schiavini, I. 1986: Localization of aluminium in the leaves of some aluminium-accumulating species. *Plant Soil*, **94**, 435-437.
- Haridasan, M. 1988: Performance of *Miconia albicans* (SW.) Triana, an aluminum accumulating species, in acidic and calcareous soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **19**, 1091-1103.
- Hecht-Buchholz, C. and Schuster, J. 1987: Responses of Al-tolerant Dayton and Al-sensitive Kearney barley cultivars to calcium and magnesium during Al stress. *Plant Soil*, **99**, 47-61.
- Hodson, M. J. and Sangster, A. G. 1993: The interaction between silicon and aluminium in *Sorghum bicolor* (L.) Moench : Growth analysis and X-ray microanalysis. *Ann. Bot.*, **72**, 389-400.
- Horst, W. J., Wagner, A., and Marshner, H. 1982: Mucilage protects root meristems from aluminium injury. *Z. Pflanzenphysiol.*, **109**, 95-103.
- Horst, W. J. and Göppel, H. 1986: Al tolerance of horse bean, yellow lupin, barley and rye. II. Mineral element concentrations in shoots and roots as affected by Al supply. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, **149**, 94-109. (in German with English summary)
- Horst, W. J., and Klotz, F. 1990: Screening soybean for aluminium tolerance and adaptation to acid soils. In Genetic aspects of plant mineral nutrition, Eds. N. E. Bassan et al., p. 355-360, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Horst, W. J. 1995: The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants : a review. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, **158**, 419-428.
- Howeler, R. H. and Cadavid, L. F. 1976: Screening of rice cultivars for tolerance to Al-toxicity in nutrient solutions as compared with a field screening method. *Agron. J.*, **68**, 551-555.
- Huang, J. and Bachelard, E. P. 1993: Effects of aluminium on growth and cation uptake in seedlings of *Eucalyptus mannifera* and *Pinus radiata*. *Plant Soil*, **49**, 121-127.
- Huang, J. W., Shaff, J. E., Grunes, D. L., and Kochian, L. V. 1992a: Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminium-tolerant and aluminium-

- sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol.*, **98**, 230-237.
- Huang, J. W., Grunes, D. L., and Kochian, L. V. 1992b: Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. *Planta*, **188**, 414-421.
- Huang, J. W., Grunes, D. L., and Kochian, L. V. 1993: Aluminum effects on calcium ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) translocation in aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Physiol.*, **102**, 85-93.
- Huang, J. W., Grunes, d. L., and Kochian, L. V. 1995: Aluminium and calcium transport interactions in intact roots and root plasmalemma vesicles from aluminium-sensitive and tolerant wheat cultivars. *Plant Soil*, **171**, 131-135.
- Hue, N. V., Craddock, G. R., and Adams, F. 1986: Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **50**, 28-34.
- Huett, D. O. and Menary, R. C. 1979: Aluminium uptake by excised roots of cabbage, lettuce and kikuyu grass. *Aust. J. Plant Physiol.*, **6**, 643-653.
- Huett, D. O. and Menary, R. C. 1980: Aluminium distribution in freeze-dried roots of Cabbge, Lettuce, Kikuyu grass by energy-dispersive x-ray analysis. *Aust. J. Plant Physiol.*, **7**, 101-111.
- 福島正子 1998: アルミニウム摂取と現状. *生物工学会誌*, **76**, 280.
- Hunter, D. and Ross, D. S. 1991: Evidence for a phytotoxic hydroxy-aluminum polymer in organic soil horizons. *Science*, **251**, 1056-1058.
- Hutchinson, G. E. 1945: Aluminium in soils, plants, and animals. *Soil Sci.*, **60**, 29-40.
- Ikeda, H. and Tadano, T. 1993: Ultrastructural changes of the root tip cells in barley induced by comparatively low concentration of aluminum. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **39**, 109-117.
- Ishikawa, S., Wagatsuma, T., and Ikarashi, T. 1996: Comparative toxicity of Al^{3+} , Yb^{3+} , and La^{3+} to root-tip cells differing in tolerance to high Al^{3+} in terms of ionic potentials of dehydrated trivalent cations. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **42**, 613-625.
- Ishikawa, S. and Wagatsuma, T. 1998: Plasma membrane permeability of root-tip cells following temporary exposure to Al ions is a rapid measure of Al tolerance among plant species. *Plant Cell Physiol.*, **39**, 516-525.
- 石川覚・我妻忠雄・秋元徹・佐々木亮一・高野剛 1998: 有機酸放出以上に強力なAl耐性戦略 (I) -アルミニウム過剰条件に対する抵抗性の比較 (32)-. *日本土壌肥料学会講演要旨集*, **44**, 76.
- Jan, F. and Pettersson, S. 1993: Effect of low aluminium levels on growth and nutrient relations in three rice cultivars with different tolerances to aluminium. *J. Plant*

Nutr., **16**, 359-372.

- Johnson, R. E. and Jackson, W. A. 1964: Calcium uptake and transport by wheat seedlings as affected by aluminium. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **28**, 381-386.
- Jones, D. L. and Darrah, P. R. 1995: Influx and efflux of organic acids across the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in rhizosphere C flow. *Plant Soil*, **173**, 103-109.
- Jones, D. L., Prabowo, A. M., and Kochian, L. V. 1996: Kinetics of malate transport and decomposition in acid soils and isolated bacterial populations: The effect of microorganisms on root exudation of malate under Al stress. *Plant Soil*, **182**, 239-247.
- 唐原一郎 1994: カスパリー線. In 根ハンドブック, Eds. 森田茂紀, 阿部淳, p. 13-14, 根研究会, 東京.
- Kasai, M., Sasaki, M., Yamamoto, Y., and Matsumoto, H. 1992: Aluminum stress increases K⁺ efflux and activities of ATP- and PPI-dependent H⁺ pumps of tonoplast-enriched membrane vesicles from barley roots. *Plant Cell Physiol.*, **33**, 1035-1039.
- Kasai, M., Sasaki, M., Tanakamaru, S., Yamamoto, Y., and Matsumoto, H. 1993: Possible involvement of abscisic acid in increases in activities of two vacuolar H⁺-pumps in barley roots under aluminum stress. *Plant Cell Physiol.*, **34**, 1335-1338.
- Keltjens, W. G. 1988: Short-term effects of Al on nutrient uptake, H⁺ efflux, root respiration and nitrate reductase activity of two sorghum genotypes differing in Al-susceptibility. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **19**, 1155-1163.
- Keltjens, W. G., and van Loenen, E. 1989: Effects of aluminium and mineral nutrition on growth and chemical composition of hydroponically grown seedlings of five different forest tree species. *Plant Soil*, **119**, 39-50.
- Keltjens, W. G. 1995: Magnesium uptake by Al-stressed maize plants with special emphasis on cation interactions at root exchange sites. *Plant Soil*, **171**, 141-146.
- Kerven, G. L., Edwards, D. G., Asher, C. J., Hallman, P. S., and Kokot, S. 1989: Aluminium determination in soil solution. II. - Short term colorimetric procedures for the measurement of inorganic monomeric aluminium in the presence of organic acid ligands. *Aust. J. Soil Res.*, **27**, 91-102.
- Kerven, G. L., Larsen, P. L., Bell, L. C., and Edwards, D. G. 1995: Quantitative ²⁷Al NMR spectroscopic studies of Al(III) complexes with organic acid ligand and their comparison with GEOCHEM predicted values. *Plant Soil*, **171**, 35-39.

- Kinraide, T. B. and Parker, D. R. 1987: Non-phytotoxicity of the aluminum sulfate ion, AlSO_4^+ . *Physiol. Plant.*, **71**, 207-212.
- Kinraide, T. B. 1988: Proton extrusion by wheat roots exhibiting severe aluminum toxicity symptoms. *Plant Physiol.*, **88**, 418-423.
- Kinraide, T. B. and Parker, D. R. 1990: Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum to four dicotyledonous species. *Physiol. Plant.*, **79**, 283-288.
- Kinraide, T. B. 1991: Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant Soil*, **134**, 167-178.
- Kinraide, T. B. 1993: Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media. A case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations. *Physiol. Plant.*, **88**, 619-625.
- Kinraide, T. B., Ryan, P. R., and Kochian, L. V. 1994: Al^{3+} - Ca^{2+} interactions in aluminium rhizotoxicity - II. Evaluating the Ca^{2+} -displacement hypothesis. *Planta*, **192**, 104-109.
- Kochian, L. V. 1995: Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **46**, 237-260.
- Konishi, S., Miyamoto, S., and Taki, T. 1985: Stimulatory effects of aluminum on tea plants grown under low and high phosphorus supply. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **31**, 361-368.
- Konishi, S. 1992: Promotive effects of aluminium on tea plant growth. In Plant-soil interactions at low pH, Ed. T. Sakuma, p. 83-88, Fac. of Agric., Hokkaido Univ.
- Koyama, H., Okawara, R., Ojima, K., and Yamaza, T. 1988: Reevaluation of characteristics of a carrot cell line previously selected as aluminum tolerant cells. *Physiol. Plant.*, **74**, 683-687.
- 久馬一剛 1984: 第4章 世界における酸性土壌の分布と利用状態. In 酸性土壌とその農業利用, Ed. 田中明, p. 101-142, 博友社, 東京.
- Larkin, P. J. 1987: Calmodulin levels are not responsible for aluminium tolerance in wheat. *Aust. J. Plant Physiol.*, **14**, 377-385.
- Lazof, D. B., Goldsmith, J. G., Rufty, T. W., and Linton, R. W. 1994: Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. *Plant Physiol.*, **106**, 1107-1114.
- Le Van, H., Kurashi, S., and Sakurai, N. 1994: Aluminum-induced rapid root inhibition and changes in cell-wall components of squash seedlings. *Plant Physiol.*, **106**, 971-976.
- Li, M., Osaki, M., Rao, I. M., and Tadano, T. 1997: Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus-deficient conditions. *Plant Soil*, **195**,

161-169.

- Lindström, A. and Nyström, C. 1987: Seasonal variation in root hardness in container grown Scots pine, Norway spruce, and Lodgepole pine seedlings. *Can. J. For. Res.*, **17**, 787-793.
- Llugany, M., Poschenrieder, C., and Barceló, J. 1995: Monitoring of aluminium-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminium and proton toxicity. *Physiol. Plant.*, **93**, 265-271.
- Ma, J. F., Zheng, S. J., and Matsumoto, H. 1997a: Secretion of citric acid as an aluminium-resistant mechanism in *Cassia tora* L. In Plant nutrition - for sustainable food production and environment, Eds. T. Ando et al., p. 449-450, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Ma, J. F., Zheng, S. J., and Matsumoto, H. 1997b: Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol.*, **38**, 1019-1025.
- Ma, J. F., Zheng, S. J., Matsumoto, H., and Hiradate, S. 1997c: Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature*, **390**, 569-570.
- Ma, J. F., Hiradate, S., Nomoto, K., Iwashita, T., and Matsumoto, H. 1997d: Internal detoxification mechanism of Al in *Hydrangea*. *Plant Physiol.*, **113**, 1033-1039.
- Ma, J. F., Sasaki, M., and Matsumoto, H. 1997e: Al-induced inhibition of root elongation in corn, *Zea mays* L. is overcome by Si addition. *Plant Soil*, **188**, 171-176.
- Ma, J. F., Hiradate, S., and Matsumoto, H. 1998: High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiol.*, **117**, 753-759.
- Malkanthi, D. R. R., Yokoyama, K., Yoshida, T., Moritsugu, M., and Matsushita, K. 1995a: Effects of low pH and Al on growth and nutrient uptake of several plants. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **41**, 161-165.
- Malkanthi, D. R. R., Moritsugu, M., and Yokoyama, K. 1995b: Effects of low pH and Al on absorption and translocation of some essential nutrients in excised barley roots. *Soil. Sci. Plant Nutr.*, **41**, 253-262.
- Marienfeld, S., Lehmann, H., and Stelzer, R. 1995: Ultrastructural investigations and EDX-analyses of Al-treated oat (*Avena sativa*) roots. *Plant Soil*, **171**, 167-173.
- Marschner, H. 1991: Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant Soil*, **134**, 1-20.
- Matsumoto, H., Hirasawa, E., Torikai, H., and Takahashi, E. 1976a: Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nucleic acids. *Plant Cell Physiol.*, **17**, 127-137.

- Matsumoto, H., Hirasawa, E., Morimura, S., and Takahashi, E. 1976b: Localization of aluminium in tea leaves. *Plant Cell Physiol.*, **17**, 627-631.
- Matsumoto, H. and Yamaya, T. 1986: Inhibition of potassium uptake and regulation of membrane-associated Mg^{2+} -ATPase activity of pea roots by aluminium. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **32**, 179-188.
- Matsumoto, H., Yamamoto, Y., and Kasai, M. 1992: Changes of some properties of the plasma membrane-enriched fraction of barley roots related to aluminum stress: Membrane-associated ATPase, aluminum and calcium. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **38**, 411-419.
- McCormick, L. H. and Borden, F. Y. 1974: The occurrence of aluminum-phosphate precipitate in plant roots. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **38**, 931-934.
- Messiaen, J., Nérinckx, F., and Cutsem, P. V. 1995: Callose synthesis in spirostanol treated carrot cells is not triggered by cytosolic calcium, cytosolic pH or membrane potential changes. *Plant Cell Physiol.*, **36**, 1213-1210.
- Miyasaka, S. C., Kochian, L. V., Shaff, J. E., and Foy, C. D. 1989: Mechanisms of aluminum tolerance in wheat. An investigation of genotypic differences in rhizosphere pH, K^+ , and H^+ transport, and root-cell membrane potentials. *Plant Physiol.*, **91**, 1188-1196.
- Miyasaka, S. C., Buta, J. G., Howell, R. K., and Foy, C. D. 1991: Mechanism of aluminium tolerance in snapbeans - Root exudation of citric acid. *Plant Physiol.*, **96**, 737-743.
- 水野直治・南松雄 1980: 硫酸-過酸化水素による農作物中N、K、Mg、Ca、Fe、Mn定量のための迅速前処理法. *土肥誌*, **51**, 418-420.
- Moustakas, M., Ouzounidou, G., and Lannoye, R. 1995: Aluminum effects on photosynthesis and elemental uptake in an aluminum-tolerant and non-tolerant wheat cultivar. *J. Plant Nutr.*, **18**, 669-683.
- 森次益三・鈴木孝夫・河崎利夫 1980: 作物生育ならびに無機養分吸収に及ぼす窒素源の影響. 1. 自動pH栽培法と従来法の比較.
- Mugwira, L. M. and Elgawhary, S. M. 1979: Aluminium accumulation and tolerance of triticale and wheat in relation to root cation exchange capacity. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, **43**, 736-740.
- Mullette, K. J. 1975: Stimulation of growth in Eucalyptus due to aluminium. *Plant Soil*, **42**, 495-499.
- Nagata, T., Hayatsu, M., and Kosuge, N. 1992: Identification of aluminium forms in tea leaves by ^{27}Al NMR. *Phytochem.*, **31**, 1215-1218.

- Nagata, T., Hayatsu, M., and Kosuge, N. 1993: Aluminium kinetics in the tea plant using ^{27}Al and ^{19}F NMR. *Phytochem.*, **32**, 771-775.
- Naidoo, G., Stewart, J. M., and Lewis, R. J. 1978: Accumulation sites of Al in snapbean and cotton roots. *Agron. J.*, **70**, 489-492.
- Newman, E. I. 1966: A method of estimating the total length of root in a sample. *J. Appl. Ecol.*, **3**, 139-145.
- Noble, A. D. and Sumner, M. E. 1988: Calcium and Al interactions and soybean growth in nutrient solutions. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **19**, 1119-1131.
- Ojima, K. and Ohira, K. 1988: Aluminium-tolerance and citric acid release from a stress-selected cell line of carrot. *Commun. Sci. Plant Anal.*, **19**, 1229-1236.
- 岡川長郎 1984: 第2章 世界における酸性土壌の分布と利用状態. In 酸性土壌とその農業利用, Ed. 田中明, p. 21-49, 博友社, 東京.
- Osaki, M., Shinano, T., and Tadano, T. 1991: Redistribution of carbon and nitrogen compounds from the shoot to the harvesting organs during maturation in field crops. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **37**, 117-128.
- Osaki, M., Sittibush, C., and Nuyim, T. 1995: Nutritional characteristics of wild plants grown in peat and acid sulfate soils distributed in Thailand and Malaysia. In *A Tropical Swamp Forest Ecosystem and Its Greenhouse Gas Emission*, Eds. P. Vijarsorn, K. Suzuki, K. Kyuma, E. Wada, T. Nagano and Y. Takai, p. 63-76, Tokyo University of Agriculture, Tokyo.
- Osaki, M., Watanabe, T., Ishizawa, T., Nilnond, C., Nuyim, T., Sittibush, C., and Tadano, T. 1998: Nutritional characteristics in leaves of native plants grown in acid sulfate, peat, sandy podzolic, and saline soils distributed in peninsular Thailand. *Plant Soil*, **201**, 175-182.
- Osawa, H., Kojima, K., and Sasaki, S. 1997: Excretion of citrate as an aluminium-tolerance mechanism in tropical leguminous trees. In *Plant nutrition - for sustainable food production and environment*, Eds. T. Ando et al., p. 455-456, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Ostatek-Boczynski, Z., Kerven, G. L., and Blamey, F. P. C. 1995: Aluminium reactions with polygalacturonate and related organic ligands. *Plant Soil*, **171**, 41-45.
- 大塚恭司 1968: 大麦、小麦、エンバクおよびライ麦の生育におよぼすアルミニウムの影響. *土肥誌*, **39**, 469-474.
- Parker, D. R., Kinraide, T. B., and Zelanzny, L. W. 1989: On the phytotoxicity of polynuclear hydroxy-aluminium complexes. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, **19**, 789-796.

- Pegtel, D. M. 1987: Effect of ionic Al in culture solutions on the growth of *Arnica montana* L. and *Deschampsia flexuosa* (L.) Trin. *Plant Soil*, **102**, 85-92.
- Pellet, D. M., Grunes, D. L., and Kochian, L. V. 1995: Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta*, **196**, 788-795.
- Peterson, C. A. 1988: Exodermal casparian bands: their significance for ion uptake by roots. *Physiol. Plant.*, **72**, 204-208.
- Pilbeam, D. J. and Kirkby, E. A. 1992: Some aspects of the utilization of nitrate and ammonium by plants. In Nitrogen Metabolism of Plants, Eds. K. Mengel and D. J. Pilbeam, p. 55-70, Clarendon press, Oxford.
- Piñeros, M. and Tester, M. 1993: Plasma membrane Ca^{2+} channels in roots of higher plant and their role in aluminium toxicity. *Plant Soil*, **155/156**, 119-122.
- Polle, E., Konzak, C. F., and Kittrick, J. A. 1978: Visual detection of aluminium tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. *Crop Sci.*, **18**, 823-827.
- Putterill, J. J. and Gardner, R. C. 1988: Proteins with the potential to protect plants from Al^{3+} toxicity. *Biochim. Biophys. Acta*, **964**, 137-145.
- Rasmussen, H. P. 1968: Entry and distribution of aluminum in *Zea mays*. The mode of entry and distribution of aluminum in *Zea mays* : Electron microprobe X-ray analysis. *Planta*, **81**, 28-37.
- Reid, R. J., Tester, M. A., and Smith, F. A. 1995: Calcium/aluminium interactions in the cell wall and plasma membrane of *Chara*. *Planta*, **195**, 362-368.
- Rengel, Z. and Robinson, D. L. 1989a: Competitive Al^{3+} inhibition of net Mg^{2+} uptake by intact *Lolium multiflorum* roots. I. Kinetics. *Plant Physiol.*, **91**, 1407-1413.
- Rengel, Z., and Robinson, D. L. 1989b: Aluminium and plant age effects on adsorption of cations in the donnan free space of ryegrass roots. *Plant Soil*, **116**, 223-227.
- Rengel, Z. 1992: Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytol.*, **124**, 499-513.
- Rengel, Z. and Elliott, D. C. 1992: Mechanism of aluminium inhibition of net $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by protoplasts. *Plant Physiol.*, **98**, 632-638.
- Rengel, Z. Piñeros, M., and Tester, M. 1995: Transmembrane calcium fluxes during Al stress. *Plant Soil*, **171**, 125-130.
- Rengel, Z. and Reid, R. J. 1997: Uptake of Al across the plasma membrane of plant cells. *Plant Soil*, **192**, 31-35.
- Richards, K. D., Snowden, K. C., and Gardner, R. C. 1994: *wali6* and *wali7*. Genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.*, **105**, 1455-1456.
- Ryan, P. R. and Kochian, L. V. 1993: Interaction between aluminium toxicity and

- calcium uptake at the root apex in near-isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) differing in aluminium tolerance. *Plant Physiol.*, **102**, 975-982.
- Ryan, P. R., DiTomaso, J. M., and Kochian, L. V. 1993: Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J. Exp. Bot.*, **44**, 437-446.
- Ryan, P. R., Kinraide, T. B., and Kochian, L. V. 1994: Al^{3+} - Ca^{2+} interactions in aluminum rhizotoxicity. I. Inhibition of root growth is not caused by reduction of calcium uptake. *Planta*, **192**, 98-103.
- Ryan, P. R., Delhaize, E., and Randall, P. J. 1995: Characterisation of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta*, **196**, 103-110.
- Ryan, P. R., Reid, R. J., and Smith, F. A. 1997: Direct evaluation of the Ca^{2+} -displacement hypothesis for Al toxicity. *Plant Physiol.*, **113**, 1351-1357.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., and Matsumoto, H. 1994: Putative Ca^{2+} channels of plasma membrane vesicles are not involved in the tolerance mechanism of aluminum in aluminum tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **40**, 709-714.
- Sasaki, M., Kasai, M., Yamamoto, Y., and Matsumoto, H. 1995: Involvement of plasma membrane potential in the tolerance mechanism of plant roots to aluminium toxicity. *Plant Soil*, **171**, 119-124.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., and Matsumoto, H. 1996: Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Physiol. Plant.*, **96**, 193-198.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., Ma, J. F., and Matsumoto, H. 1997a: Early events induced by aluminum stress in elongating cells of wheat root. In *Plant nutrition - for sustainable food production and environment*, Eds. T. Ando et al., p. 439-444, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., and Matsumoto, H. 1997b: Aluminum inhibits growth and stability of cortical microtubules in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **43**, 469-472.
- Schaeffer, H. J. and Walton, J. D. 1990: Aluminium ions induce oat protoplasts to produce an extracellular (1→3) β -D-glucan. *Plant Physiol.*, **94**, 13-19.
- Schreiner, K. A., Hoddinott, J., and Taylor, G. J. 1994: Aluminum-induced deposition of (1,3)- β -glucans (callose) in *Triticum aestivum* L. *Plant Soil*, **162**, 273-280.
- Schubert, S. and Yan, F. 1997: Nitrate and ammonium nutrition of plants: effects on acid/base balance and adaptation of root cell plasmalemma H^+ ATPase. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, **160**, 275-281.

- Shen, Z., Wang, J., and Guan, H. 1993: Effect of aluminium and calcium on growth of wheat seedlings and germination of seeds. *J. Plant Nutr.*, **16**, 2135-2148.
- Shinano, T., Osaki, M., and Tadano, T. 1991: Comparison of reconstruction of carbon and nitrogen compounds during germination between Gramineae and Leguminosae. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **37**, 249-258.
- Siegel, N. and Haug, A. 1983: Calmodulin-dependent formation of membrane potential in barley root plasma membrane vesicles: A biochemical model of aluminium toxicity in plants. *Physiol. Plant.*, **59**, 285-291.
- Sivasubramaniam, S. and Talibudeen, O. 1971: Effect of aluminium on growth of tea (*Cmellia sinensis*) and its uptake of potassium and phosphorus. *J. Sci. Fd. Agric.*, **22**, 325-329.
- Snowden, K. C. and Gardner, R. C. 1993: Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.*, **103**, 855-861.
- Snowden, K. C., Richards, K. D., and Gardner, R. D. 1995: Aluminum-induced genes. Induction by toxic metals, low calcium, and wounding and pattern of expression in root tips. *Plant Physiol.*, **107**, 341-348.
- Staß, A. and Horst, W. J. 1995: Effect of aluminium on membrane properties of soybean (*Glycine max*) cells in suspension culture. *Plant Soil*, **171**, 113-118.
- Stevens, D. P., McLaughlin, M. J., and Alston, A. M. 1997: Phytotoxicity of aluminium-fluoride complexes and their uptake from solution culture by *Avena sativa* and *Lycopersicon esculentum*. *Plant Soil*, **192**, 81-93.
- 高橋英一 1993: 必須元素. In 植物栄養・肥料学, p. 73-101, 朝倉書店, 東京.
- Takeda, K., Kubota, R., and Yagioka, C. 1985a: Copigments in the blueing of sepal color of *Hydrangea macrophylla*. *Phytochem.*, **24**, 1207-1209.
- Takeda, K., Kariuda, M., and Itoi, H. 1985b: Blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. *Phytochem.*, **24**, 2251-2254.
- Tan, K. and Keltjens, W. G. 1990: Interaction between aluminium and phosphorus in sorghum plants - II. Studies with the aluminium tolerant sorghum genotype SC0283. *Plant Soil*, **124**, 25-32.
- 田中 明・但野利秋・吉田志郎 1981: Al-P 系水耕液における作物生育に対する pH の影響. *土肥誌*, **52**, 475-480.
- Tanaka, A., Tadano, T., Yamamoto, K., and Kanamura, N. 1987: Comparison of toxicity to plants among Al^{3+} , AlSO_4^+ , and Al-F complex ions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **33**, 43-55.
- Tadano, T., Baker, J. H., and Drake, M. 1969: Role of the accompanying anion in the

- effect of calcium salts on potassium uptake by excised barley roots. *Plant Physiol.*, **44**, 1639-1644.
- 但野利秋・田中明 1976: アンモニア態および硝酸態窒素適応性の作物種間差(第1報) 生育初期におけるアンモニア態および硝酸態窒素選択吸収能と生育反応 -比較植物栄養に関する研究-. *土肥誌*, **47**, 321-328.
- 但野利秋・安藤忠男 1984: 第5章 世界における酸性土壌の分布と利用状態. *In* 酸性土壌とその農業利用, Ed. 田中明, p. 143-168, 博友社, 東京.
- 但野利秋・田中明 1985: アルミニウムによる作物根の伸長阻害と根先端近傍におけるアルミニウムの集積. *土肥誌*, **56**, 77-84.
- 但野利秋 1993: 栄養特性. *In* 植物栄養・肥料学, p. 130-161, 朝倉書店, 東京.
- 橘泰憲 1982: 各種植物のカルシウム吸収・移行特性. *In* 植物と金属元素—その吸収と体内挙動—, 日本土壌肥料学会編, p. 5-36, 博友社, 東京.
- Tice, K. R., Parker, D. R., and DeMason, D. A. 1992: Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiol.*, **100**, 309-318.
- Trevelyan, A. and Harrison, J. S. 1952: Studies on yeast metabolism. 1. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.*, **50**, 298-303.
- Truman, R. A., Humphreys, F. R., and Ryan, P. J. 1986: Effect of varying solution ratios of Al to Ca and Mg on the uptake of phosphorus by *Pinus radiata*. *Plant Soil*, **96**, 109-123.
- van Beusichem, M. L., Kirkby, E., and Baas, R. 1988: Influence of nitrate and ammonium nutrition on the uptake, assimilation and distribution of nutrients in *Ricinus communis*. *Plant Physiol.*, **86**, 914-921.
- Van Soest, P. J. 1963a: Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **46**, 825-829.
- Van Soest, P. J. 1963b: Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **46**, 829-835.
- Vance, G. F., Stevenson, F. J., and Sikora, F. J. 1996: Environmental chemistry of aluminum-organic complex. *In* The environmental chemistry of aluminum, Ed. G. Sposito, p. 169-220, Lewis Publishers, Boca Raton.
- Varner, J. E. and Lin, L.-S. 1990: 植物細胞壁の構造. *植物細胞工学 suppl.* **1**, **2**,

421-433.

- Viets, F. G. 1944: Ca and other multivalent cations as accelerators of ion accumulations by excised barley roots. *Plant Physiol.*, **19**, 466-480.
- Vitorello, V. A. and Haug, A. 1996: Short-term aluminium uptake by tobacco cells: Growth dependence and evidence for internalization in a discrete peripheral region. *Physiol. Plant.*, **97**, 536-544.
- von Uexküll, H. R. and Mutert, E. 1995: Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil*, **171**, 1-15.
- Wagatsuma, T. and Ezoe, Y. 1985: Effect of pH on ionic species of aluminium in medium and on aluminium toxicity under solution culture. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **31**, 547-561.
- Wagatsuma, T. and Yamasaku, K. 1985: Relationship between differential aluminum tolerance and plant-induced pH change of medium among barley cultivars. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **31**, 521-535.
- Wagatsuma, T. and Kaneko, M. 1987: High toxicity of hydroxy-aluminium polymer ions to plant roots. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **33**, 57-67.
- 我妻忠雄 1988: 耐アルミニウム性機構に関する作物栄養学的研究. 山形大学紀要(農学)別冊, **10**, 637-745.
- Wagatsuma, T., Ishikawa, S., Obata, H., Tawaraya, K., and Katohda, S. 1995: Plasma membrane of younger and other cells in the primary specific site for aluminium toxicity in roots. *Plant Soil*, **171**, 105-112.
- Wallace, A. 1989: Plant responses to some hardly known trace elements and trace element composition and distribution in plants. *Soil Sci.*, **147**, 461-464.
- Webb, L. J. 1953: An occurrence of aluminium succinate in *Cardwellia sublimis* F. Muell. *Nature*, **171**, 656.
- Widell, S., Asp, H., and Jensén, P. 1994: Activities of plasma membrane-bound enzymes isolated from roots of spruce (*Picea abies*) grown in the presence of aluminium. *Physiol. Plant.*, **92**, 459-466.
- Yamamoto, Y., Masamoto, K., Rikiishi, S., Hachiya, A., Ymaguchi, Y., and Matsumoto, H. 1996: Aluminum tolerance acquired during phosphate starvation in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.*, **112**, 217-227.
- Yoshii, Y. 1937: Aluminium requirements of solfatara-plants. *Bot. Mag.*, **51**, 262-270.
- Zhang, G. and Taylor, G. J. 1989: Kinetics of aluminum uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. *Plant Physiol.*, **91**, 1094-1099.

- Zhang, G. and Taylor, G. J. 1990: Kinetics of aluminum uptake in *Triticum aestivum* L. *Plant Physiol.*, **94**, 577-584.
- Zhang, G., Slaski, J. J., Archambault, D. J., and Taylor, G. J. 1997: Alternation of plasma membrane lipids in aluminum-resistant and aluminum-sensitive wheat genotypes in response to aluminum. *Physiol. Plant*, **99**, 302-308.
- Zhao, X.-J., Sucoff, E., and Stadelmann, E. J. 1987: Al^{3+} and Ca^{2+} alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. *Plant Physiol.*, **83**, 159-162.
- Zheng, S. J., Ma, J. F., and Matsumoto, H. 1998a: High aluminum resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol.*, **117**, 745-751.
- Zheng, S. J., Ma, J. F., and Matsumoto, H. 1998b: Continuous secretion of organic acids is related to aluminium resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress. *Physiol. Plant.*, **103**, 209-214.
- Zimmermann, H. M. and Steudle, E. 1998: Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. *Planta*, **206**, 7-19.