

## 第3章 *Melaleuca* 属と *Eucalyptus* 属樹木のアルミニウム耐性の評価

### 3.1 はじめに

本章では、フトモモ科の *Melaleuca cajuputi* を含む *Melaleuca* 属と *Eucalyptus* 属 9 種の Al 耐性を評価し、耐性種と感受性種を選抜することを目的とした。また、Al による根端へのカロースの蓄積とリグニンの蓄積が種間の Al 耐性比較の指標となるか検討した。

*Melaleuca cajuputi* は pH が 3.5 を下回るような酸性硫酸塩土壌で生育できる (Osaki et al. 1998, Nakabayashi et al. 2001, 第 2 章)。酸性硫酸塩土壌では、土壌溶液の Al 濃度がしばしば 1 mM を超えるような極めて高い値を示す (Minh et al. 1998, 第 2 章)。従って、酸性硫酸塩土壌で生育できる *M. cajuputi* は非常に高い Al 耐性を持っていると考えられる。実際、*M. cajuputi* は、培養液中の 555  $\mu\text{M}$  (Osaki et al. 1997) や 380  $\mu\text{M}$  の Al (Nguyen et al. 2003b) によっても成長が阻害されなかったとの報告がある。植物の Al 耐性に関する研究に主に用いられている作物やモデル植物は、Ca 溶液中の 1~50  $\mu\text{M}$  の Al で根の伸長が阻害されるので (第 1 章)、*M. cajuputi* は作物やモデル植物と比べて非常に高い Al 耐性を持っているといえる。耐性種の Al 耐性機構を解明するには、耐性種とその近縁の感受性種の Al に対する反応を比較することが効率的かつ確実性の高い方法である。なぜなら、Al 耐性に関わっていると思われる現象の中から、本質的な現象を抽出できるからである。しかし、*Melaleuca* 属およびフトモモ科樹木の Al 耐性に関する情報は十分ではない。

植物において最も顕著な Al 障害は根の伸長阻害なので、Al による根の伸長阻害が Al 耐性評価の指標として広く受け入れられている (Delhaize and Ryan 1995)。従って本章では Al による根の伸長阻害を Al 耐性評価の指標として用いた。なお、Al による根の伸長阻害は、根を Al にさらしてから 30 分から 2 時間で確認できることが知られている (Barceló and Poschenrieder 2002)。

Al によるカロース(1,3- $\beta$ -D-glucan)の蓄積は多くの植物で見られる現象である(例えば Wissemeier et al. 1987, Llugany et al. 1994, Zhang et al. 1994, Larsen et al. 1996, Kaneko et al. 1999)。樹木においては調べられた例が少ないが、*Picea abies* (L.) H.Karst. (Jorns et al. 1991)とチャノキ(*Camellia sinensis*; Lian et al. 1998)で、Al によるカロースの蓄積が報告されている。Al によるカロースの蓄積は、極めて短時間で、特に根端の表皮と皮層の外側で観察される(Schreiner et al. 1994)。この Al に対するカロースの蓄積は、コムギ(*Triticum aestivum*)とダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)の根端では処理開始から 30 分以内に(Zhang et al. 1994, Wissemeier and Horst 1995)、ダイズの培養細胞では 15 分以内に(Staß and Horst 1995)検出された。Al 耐性の異なるダイズやトウモロコシ(*Zea mays*)、インゲンマメ(*Phaseolus vulgaris* L.)の遺伝子型において、根の伸長とカロースの蓄積の程度の間には負の相関が見られたことから、Al によるカロースの蓄積が Al 耐性評価の指標として使えることが示された(Wissemeier et al. 1992, Llugany et al. 1994, Massot et al. 1999)。そのため、Al によるカロースの蓄積は、しばしば種内において Al 耐性評価の指標として使用されている(例えば Basu et al. 2001, Ezaki et al. 2001, Ermolayev et al. 2003)。しかし、種間において、根端におけるカロースの蓄積が Al 耐性評価の指標として使用できるかどうかを調べた例はない。

傷害や菌類の感染はリグニンの蓄積を引き起こす(Vance et al. 1980, Lewis and Yamamoto 1990)。Al がリグニンの蓄積に及ぼす影響についてはほとんど調べられていないが、Sasaki et al. (1996)は、コムギにおいて根の伸長阻害を伴った根端におけるリグニンの蓄積を、組織化学的および定量的に示している。トウモロコシや *Pinus sylvestris* L.において過剰な Al によるリグニンの蓄積が組織化学的手法によって見いだされている(Budikova 1999, Oleksyn et al. 1996)。また、リグニン生成に関わる酵素をコードするいくつかの遺伝子の発現が、Al によってコムギやイネ(*Oryza sativa*)の根端で高まったとの報告がある(Snowden and Gardner 1993, Mao et al. 2004)。従って、リグニンの蓄積もまた Al 耐性評価の指標となる可能性がある。

本章では、まず、*M. cajuputi*を含む *Melaleuca* 属と *Eucalyptus* 属 9 樹種の Al 耐性を 24 時

間の 1 mM Al 処理に対する根の伸長阻害を指標として評価した(実験 1)。また、根端へのカロースやリグニンの蓄積に Al が及ぼす影響を調べ、根端へのカロースやリグニンの蓄積が Al 耐性評価の指標となりうるかを検討した(実験 1)。次に、20 日間の 1 mM Al 処理を行い、Al が 9 樹種の個体成長と植物体の Al 濃度に及ぼす影響を調べた(実験 2)。さらに、*M. cajuputi* と *E. camaldulensis*、*M. bracteata* の 3 樹種について does-response (用量反応) 試験を行った。

## 3.2 材料と方法

### 植物材料

*M. cajuputi* の種子はタイ国ナラティワート県の酸性硫酸塩土壤に生育する一本の木から採取した。他の樹木の種子は Australian Tree Seed Centre (CSIRO Forestry and Forest Products, オーストラリア) から購入した。種名と種子のロット番号は以下の通りである。*M. bracteata* (lot 17255)、*M. glomerata* F. Muell. (lot 17257)、*M. leucadendra* (lot 18424)、*M. quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake (lot 18549)、*M. viridiflora* Sol. ex Gaertner (lot 18903)、*E. camaldulensis* (lot 19708)、*E. deglupta* Bl. (lot 19492)、*E. grandis* (lot 19307, 図 3-1)。1 M HCl で酸洗後、180°C で 24 時間滅菌した珪砂を培土としてこれらの種子を播いた。実生は、植物育成装置内 (16 h 明期/8 h 暗期, 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD, 30 °C) で、改変した Yamanoshita et al. (2005) の培養液を毎日与えて育成した。培養液は、2 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、0.1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.6 mM KCl、0.35 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.25 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、3  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.5  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を含み pH を 4.0 に調整した。

### 24 時間アルミニウム処理 (実験 1)

播種後 2~4 ヶ月の上記 9 種の実生を前述の培養液を満たしたプラスチックポット (3 L) に 6 本ずつ植え替えた。前述と同じ条件の植物育成装置内で 7 日間通気しながら水耕栽培したのち、実生の根を 24 時間、0 あるいは 1 mM  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  の培養液 (pH 4.0) に浸ける Al 処理をした。処理 12 時間前に実生 1 個体あたり 5 本程度の根に、根の先端から約 15 mm のところにペイントマーカー (三菱鉛筆) で印を付け、処理開始 12 時間前、処理開始時と処理終了時にスキャナーで根の画像を取り込んだ (解像度 1200 dpi)。画像分析ソフトウェア (WinRHIZO,

Régent Instruments, カナダ) を使って根の先端からペイントマーカで付けた印までの距離を計測することによって根の伸長を算出した。処理開始前 12 時間の伸長がほぼ同じ根端を各個体から 1 個ずつ選び、10 個体について処理期間中の根の伸長を測定した。根端のカロースとリグニン、Al の濃度の測定には 5 反復を設けた。

### 根端のカロースの測定

カロースの測定を Köhle et al. (1985) の方法により蛍光分析によって行ったが、試料中の夾雑物による干渉を除くために改変を加えた。根を脱イオン水で洗ったのち、根端 5 mm を切り取って生重量を測定し、99.5%(v/v)エタノールに 60 分間以上浸けて固定した。固定した根端を 1.5 mL チューブの中で 99.5%(v/v) エタノールとともにホモゲナイザーで破碎した。12 000 g で 20 分間遠心し、上澄みを捨て、沈殿を 70%(v/v)エタノールに再懸濁し、再び 12 000 g で 20 分間遠心した。上澄みを捨てたのち、沈殿を 400  $\mu$ L の 1 M NaOH に懸濁し、80°C で 30 分間保温しカロースを抽出した。12 000 g で 20 分間遠心したのち、上澄みをカロースの定量に用いた。

カロースと結合したアニリンブルーの蛍光が試料中の物質によって干渉されるため、カロース濃度は標準添加法によって定量した。細菌由来の 1,3- $\beta$ -D-グルカンであるカードラン(和光純薬工業)を標準物質として用いた。50  $\mu$ L の試料と 50  $\mu$ L の種々の濃度の標準液、200  $\mu$ L の 0.05%(w/v) アニリンブルー(水溶性; 和光純薬工業)、105  $\mu$ L の 1 N HCl、295  $\mu$ L の 1 M グリシン/NaOH 緩衝液(pH 9.5)を含む反応液を 50°C で 20 分間保温し、その後室温に 30 分間置いた。393 nm で励起し、450 と 484 nm の放射を分光蛍光光度計(F-2500, 日立ハイテクノロジーズ)によって測定した。

アニリンブルーの代わりに水を反応液に加えて測定したところ、試料中に強い自家蛍光を発する物質が含まれていることが判明した。アニリンブルーを加えた反応液の蛍光の値からアニリンブルーを加えない反応液の蛍光の値を差し引いて自家蛍光の影響を除くことを試みた

が、負の値が頻繁に得られた。アニリンブルーは、450 nm と 484 nm の光はほとんど吸光しないが、励起光の波長である 393 nm の光を強く吸光する。従って、アニリンブルーが励起光を減衰させた結果、負の値が得られたと考えられた。そこで、自家蛍光の影響を除くため、以下のような等式を立てることによってカロース濃度を求めた。450 nm と 484 nm における蛍光の測定値 ( $F_{total}^{450}$ 、 $F_{total}^{484}$ ) は以下のように分解することができる。

$$F_{total}^{450} = F_{callose}^{450} + F_{autofluo}^{450}, \quad F_{total}^{484} = F_{callose}^{484} + F_{autofluo}^{484} \quad (1)$$

ここで、 $F_{callose}^{450}$  と  $F_{callose}^{484}$ 、 $F_{autofluo}^{450}$ 、 $F_{autofluo}^{484}$  は、それぞれ、450 nm と 484 nm におけるカロースと結合したアニリンブルーからの蛍光強度、450 nm と 484 nm における自家蛍光の強度である。アニリンブルーによる励起光の減衰が 450 nm と 484 nm における放射を等しい割合 ( $a$ ) で減衰させるので、 $F_{autofluo}^{450}$  と  $F_{autofluo}^{484}$  は以下のように表すことができる。

$$F_{autofluo}^{450} = aF_{autofluo}^{484} = aF_{total}^{484}, \quad F_{autofluo}^{484} = aF_{autofluo}^{450} = aF_{total}^{450} \quad (2)$$

ここで、 $F_{autofluo}^{450}$  と  $F_{autofluo}^{484}$ 、 $F_{total}^{450}$ 、 $F_{total}^{484}$  は、それぞれ、450 nm と 484 nm におけるアニリンブルーを加えない場合の自家蛍光の強度、アニリンブルーを加えない場合の蛍光の測定値である。また、 $F_{callose}^{450}$  と  $F_{callose}^{484}$  は以下のように表される。

$$F_{callose}^{450} = CF_{unit}^{450}, \quad F_{callose}^{484} = CF_{unit}^{484} \quad (3)$$

ここで、 $C$  はカロースの濃度、 $F_{unit}^{450}$  と  $F_{unit}^{484}$  は標準添加法によって求めた標準物質単位濃度あたりの蛍光値である。等式(2)と等式(3)を等式(1)に代入し、以下の式を得た。

$$F_{total}^{450} = CF_{unit}^{450} + aF_{total}^{484}, \quad F_{total}^{484} = CF_{unit}^{484} + aF_{total}^{450} \quad (4)$$

等式(4)から、以下の式を得て、カロース濃度  $C$  を求めた。

$$C = \frac{F_{total}^{484}F_{total}^{450} - F_{total}^{450}F_{total}^{484}}{F_{unit}^{484}F_{total}^{450} - F_{unit}^{450}F_{total}^{484}} \quad (5)$$

## 根端のリグニンの測定

根端のリグニンを Fukuda and Komamine (1982) の方法によって測定した。根を脱イオン水で洗淨したのち、根端 5 mm を切り取って生重量を測定し、乳鉢と乳棒を用いて 95%(v/v)エタノール中で磨砕した。磨砕後の懸濁液をスクリーキャップ付きガラス遠沈管に移し 1000 g で 5 分間遠心し、沈殿を 95%(v/v)エタノールで 3 回、エタノールとヘキサンの混合液(1:2, v/v)で 2 回洗淨した。沈殿を風乾させ、25%(v/v)臭化アセチルの酢酸溶液で洗淨したのち、500  $\mu$ L の 25%(v/v)臭化アセチルの酢酸溶液を加え 70°C で 30 分間保温した。反応液を室温まで冷却し、450  $\mu$ L の 2 M NaOH と 50  $\mu$ L の 7.5 M ヒドロキシルアミン塩酸塩を加え、酢酸で 5 mL に定容した。1000 g で 5 分間遠心したのち、上澄みの 280 nm における吸光度を分光光度計 (U-2000, 日立ハイテクノロジーズ) で測定した。*M. cajuputi* の磨砕リグニン (milled wood lignin, MWL, 東京大学の飯山賢治博士より提供を受けた) を標準物質として用いた。

#### 根端のアルミニウムの測定

根を脱イオン水で洗淨したのち、根端 5 mm を切り取って生重量を測定した。根端を 200  $\mu$ L の 30%(w/w)過酸化水素と 60%(w/w)硝酸の混合液(1:1, v/v)に浸け、80°C で 3 時間加熱し溶解させた。溶解液のアルミニウム濃度をファーンエス原子吸光分析装置 (SIMAA6000, パーキンエルマー) で定量した。

#### 20 日間アルミニウム処理 (実験 2)

播種後 2~3 ヶ月の前述 9 樹種の実生を、3 L のプラスチックポットに 6 本ずつ植え替え、実験 1 と同条件で水耕栽培した。移植 12 日~14 日後に 0 あるいは 1 mM の  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  の培養液 (pH 4.0) に根を浸けて処理をした。培養液を 5 日毎に取り替え、培養液の pH を毎日 1 M NaOH で pH 4.0 に合わせた。処理開始から 20 日後に実生を収穫し、80 °C で 2 日間乾燥させ、葉と茎、根の乾重量を測定した。根の画像を処理開始時と処理終了時にスキャナーで取り込み (解像度 500 dpi)、画像解析ソフトウェア WinRHIZO を使って根全体の長さを計測した。

処理終了時の根の長さから処理開始時根の長さを引くことによって、根の伸長量を求めた。根の伸長と乾重に 6~12 反復を、Al 濃度の測定に 6~8 反復を設けた。

### 葉と茎、根のアルミニウムの測定

葉と茎、根それぞれを 60%(w/w)硝酸と 60%(w/w)過塩素酸の混合液(5:3, v/v)に浸し、熱して灰化したのち、Al 濃度を ICP 発光分析装置(ULTIMA2, 堀場製作所)で測定した。

### 用量反応試験(実験 3)

播種後 2~4 ヶ月の *M. cajuputi*、*E. camaldulensis*、*M. bracteata* の実生を、3 L のプラスチックポットに 6 本ずつ植え替え、実験 1 と同条件で水耕栽培した。移植 7 日後に 0 あるいは 0.1、0.2、0.5、1、2.5、5 mM の  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を含む培養液(pH 4.0)に切り替え Al 処理をした。Al 処理開始時の *M. cajuputi*、*E. camaldulensis*、*M. bracteata* の実生の乾重は、それぞれ約 96、73、84 mg だった。培養液を 5 日毎に取り替え、培養液の pH を毎日 1 M NaOH で pH 4.0 に合わせた。根の画像を処理開始時と処理 5 日目にスキャナーで取り込み(解像度 500 dpi)、画像解析ソフトウェア WinRHIZO を使って根全体の長さを計測した。処理 5 日目の根の長さから処理開始時根の長さを引くことによって、5 日間の根の伸長量を求めた。また、5 日毎に生残を確認し樹高を測定した。実生を処理開始から 40 日後に収穫し、80 °C で 2 日間乾燥させ、葉と茎、根の乾重を測定した。根の伸長と乾重に 6 反復を設けた。

### 統計分析

ソフトウェア STATISTICA(スタットソフト)あるいは Mac 統計解析(エスミ)を使って統計分析した。Al 処理が与える影響を *t* 検定あるいはウィルコクソン検定で分析し、樹種間の差をクルスカル-ウォリス検定で分析した。0 mM Al 区と各濃度の Al 処理区の平均を比較するのにダネットの方法を、各処理の平均を比較するのにチューキーの方法を用いた。また、ピアソンの



相関検定を用いて相関を調べた。AIによるカローズの蓄積は対数変換したのち分析した。



*E. camaldulensis*



*E. deglupta*



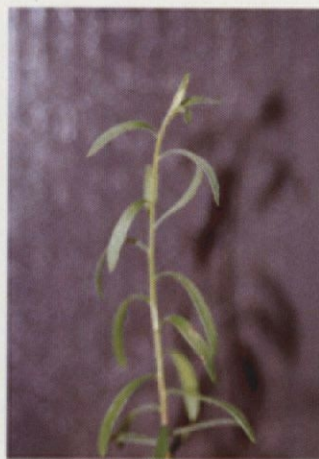
*E. grandis*



*M. bracteata*



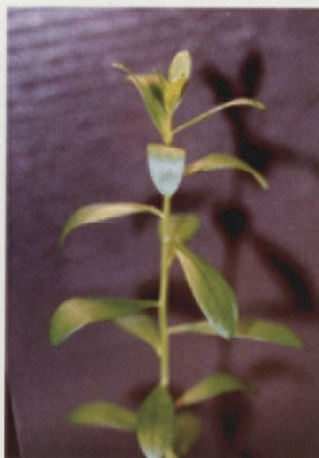
*M. cajuputi*



*M. glomerata*



*M. leucadendra*



*M. quinquenervia*



*M. viridiflora*

図 3-1. アルミニウム耐性を評価したフトモモ科樹木9種

### 3.3 結果

#### 24 時間アルミニウム処理における根の伸長

*Melaleuca* 属 6 種と *Eucalyptus* 属 3 種の Al 耐性を、1 mM Al 区における根の相対伸長(0 mM Al 区の根の伸長量の平均に対する 1 mM Al 区の根の伸長量の相対値)を指標として評価した(図 3-2)。*M. leucadendra* と *M. cajuputi*、*E. grandis*、*M. quinquenervia*、*E. deglupta* では、相対根伸長がそれぞれ 111%、106%、104%、101%、82%で、24 時間の 1 mM Al 処理によって根の伸長が影響を受けなかった(*t* 検定,  $P > 0.05$ )。*M. viridiflora* と *E. camaldulensis*、*M. glomerata*、*M. bracteata* では、相対根伸長がそれぞれ 67%、51%、51%、32%で、Al によって根の伸長が阻害された(*t* 検定,  $P < 0.05$ )。

#### 24 時間アルミニウム処理における根端のカロース、リグニン、アルミニウム濃度

24 時間 Al 処理後の根端のカロース、リグニン、Al の濃度を測定した(図 3-3)。根端のカロース濃度は、1 mM Al 区の方がすべての種で 0 mM Al 区よりも高かった(*t* 検定,  $P < 0.01$ ; 図 3-3)。9 樹種の中で Al によって最も根の伸長が阻害された *M. bracteata* では、Al 処理によって根端のカロース濃度が 9 倍になった(図 3-3)。

根端のリグニン濃度は、*M. bracteata* で 1 mM Al 区の方が 0 mM Al 区よりも高かったが(*t* 検定,  $P = 0.019$ ; 図 3-3)、他の種では Al による影響を受けなかった(*t* 検定,  $P > 0.05$ ; 図 3-3)。

根端の Al 濃度は、すべての種で 0 mM Al 区において  $16 \mu\text{g (g 生重)}^{-1}$  以下であり、24 時間の Al 処理によって濃度が高まった。*M. leucadendra* と *M. cajuputi*、*E. grandis*、*M. quinquenervia*、*M. viridiflora*、*E. camaldulensis* の根端の Al 濃度が同程度(およそ  $400 \mu\text{g (g 生重)}^{-1}$ )だった。*M. cajuputi* と *E. grandis*、*M. quinquenervia*、*M. viridiflora* の根端の Al 濃度が

*E. deglupta* と *M. glomerata*, *M. bracteata* よりも低かった(チューキーの方法,  $P < 0.05$ ; 図 3-3)。

### 根の伸長と根端のカロース、リグニン、アルミニウム濃度の関係

24 時間 Al 処理によるカロースの蓄積を、1 mM Al 区のカロース濃度から 0 mM Al 区のカロース濃度を差し引くことによって求め、相対根伸長との関係を調べた(図 3-4a)。Al によるカロース蓄積と相対根伸長の間には負の相関が見られた(全 9 樹種,  $r = -0.712$ ,  $P = 0.031$ ; *Melaleuca* 属のみ,  $r = -0.871$ ,  $P = 0.024$ )。Al によるリグニンの蓄積を、1 mM Al 区のリグニン濃度から 0 mM Al 区のリグニン濃度を差し引くことによって求め、相対根伸長との関係を調べた(図 3-4b)。Al によるリグニン蓄積と相対根伸長の間には、有意な相関は認められなかった(全 9 樹種,  $r = -0.591$ ,  $P = 0.094$ ; *Melaleuca* 属のみ,  $r = -0.731$ ,  $P = 0.099$ )。根端への Al の集積を 1 mM Al 区の根端の Al 濃度から 0 mM Al 区の Al 濃度を差し引くことによって求め、相対根伸長との関係を調べた(図 3-4c)。Al 集積と相対根伸長の間には相関はなかった(全 9 樹種,  $r = -0.482$ ,  $P = 0.184$ ; *Melaleuca* 属のみ,  $r = -0.644$ ,  $P = 0.166$ )。

### 20 日間アルミニウム処理における根の伸長と乾重

20 日間の Al 処理ののち、1 mM Al 区における根の相対伸長(0 mM Al 区の根伸長量の平均に対する 1 mM Al 区の根伸長量の相対値)を算出した(図 3-5)。*M. leucadendra* の根の伸長は、Al によって促進され( $t$  検定,  $P = 0.035$ )、*M. bracteata* の根の伸長は、阻害された( $t$  検定,  $P = 0.0001$ )。他樹種の根の伸長は、Al によって有意には影響を受けなかった( $t$  検定,  $P > 0.05$ )。20 日間の Al 処理における相対根伸長と 24 時間の Al 処理における相対根伸長の間には相関があった(全 9 樹種,  $r = 0.685$ ,  $P = 0.042$ ; *Melaleuca* 属のみ,  $r = 0.866$ ,  $P = 0.026$ ; 図 3-6)。*M. bracteata* では、根の乾重は Al によって有意な影響を受けなかったが(ウィルコクソン検定,  $P = 0.212$ ; 表 3-1)、葉と茎、個体全体の乾重は Al によって減少した(ウィルコクソン検

定,  $P < 0.05$ ; 表 3-1)。他の種では、Al がどの器官の乾重にも有意には影響を与えなかった (ウィルコクソン検定,  $P > 0.05$ ; 表 2-1)。

## 20 日間アルミニウム処理における葉、茎、根のアルミニウム濃度

20 日間の Al 処理ののち、葉と茎、根の Al 濃度は種によって異なっていた (クルスカル-ウォリス検定,  $P < 0.0001$ , 図 3-7)。 *M. bracteata* では、根の伸長が著しく阻害されたが (図 3-5)、他の種よりも各器官の Al 濃度が特に高いということとはなかった (図 3-7)。葉と茎、根の Al 濃度と相対乾重の間に相関は見られなかった (葉,  $r = -0.254$ ,  $P > 0.05$ ; 茎,  $r = 0.182$ ,  $P > 0.05$ ; 根,  $r = -0.131$ ,  $P > 0.05$ )。また、20 日間 Al 処理後の葉と茎、根の Al 濃度と 24 時間 Al 処理後の根端の Al 濃度の間に相関は見られなかった (葉,  $r = 0.575$ ,  $P > 0.05$ ; 茎,  $r = 0.308$ ,  $P > 0.05$ ; 根,  $r = 0.067$ ,  $P > 0.05$ )。

## 用量反応試験における根の伸長

*M. cajuputi*, *E. camaldulensis*, *M. bracteata* を 5 日間 Al 処理し、0 mM Al 区の根伸長量の平均に対する各 Al 濃度区の根伸長量の相対値を算出した (図 3-8)。 *M. cajuputi* は、5 mM Al 区のみで有意に 0 mM Al 区よりも根の伸長が小さかった (ダネットの方法,  $P < 0.05$ )。 *E. camaldulensis* は、2.5 mM 以上の濃度の Al で有意に根の伸長が阻害された (ダネットの方法,  $P < 0.05$ )。 *M. bracteata* は、0.2 mM 以上の濃度の Al 区で有意に根の伸長が阻害された (ダネットの方法,  $P < 0.05$ )。

## 用量反応試験における樹高と乾重

処理開始時 (0 日目) の樹高の平均に対する相対樹高を示す (図 3-9)。0 日目における *M. cajuputi* と *E. camaldulensis*, *M. bracteata* の 0 mM Al 区の樹高の平均は、それぞれ、8.2 cm、10.6 cm、9.9 cm だった。 *M. cajuputi* は、5 日目から 20 日目の樹高に 0.1~2.5 mM まで Al に

よる影響が認められなかった(ダネットの方法,  $P > 0.05$ )。 *M. cajuputi* の 5 mM Al 区は、15 日目の時点で半数以上の個体が枯死していた。 *E. camaldulensis* は、5 mM Al 区の 10 日目から 20 日目の樹高のみ 0 mM Al 区よりも低かった(ダネットの方法,  $P < 0.05$ )。 *M. bracteata* は、5 日目の樹高が 2.5 mM 以上の Al 区で 0 mM Al 区よりも低く、10 日目から 20 日目の樹高が 0.5 mM 以上の Al 区で 0 mM Al 区よりも低かった(ダネットの方法,  $P < 0.05$ )。 *M. bracteata* の 5 mM Al 区は、15 日目の時点で半数以上の個体が枯死していた。

40 日間の Al 処理終了時の乾重を、0 mM Al 区に対する相対値で示す(図 3-10)。処理終了時の 0 mM Al 区の個体全体の乾重は、 *M. cajuputi*、 *E. camaldulensis*、 *M. bracteata* で、それぞれ 611、836、425 mg だった。 *M. cajuputi* の 5 mM Al 区と、 *M. bracteata* の 2.5 と 5 mM Al 区で、処理終了時に半数以上の個体が枯死していたため、図に値を示していない。植物体全体の乾重は、 *E. camaldulensis* の 5 mM Al 区と *M. bracteata* の 1 mM Al 区で 0 mM Al 区よりも小さかった(ダネットの方法,  $P < 0.05$ )。 *M. cajuputi* の 0.2 と 0.5 mM Al 区と *E. camaldulensis* の 0.2 mM Al 区では、個体成長が促進される傾向にあった。葉と茎の乾重は、 *E. camaldulensis* の 5 mM Al 区と *M. bracteata* の 0.5 mM と 1 mM Al 区で、0 mM Al 区よりも小さかった(ダネットの方法,  $P < 0.05$ )。根の乾重は、 *E. camaldulensis* の 5 mM Al 区で 0 mM Al 区よりも小さかった(ダネットの方法,  $P < 0.05$ )。乾重の地下部/地上部比は、Al 処理によって大きくなる傾向にあった。

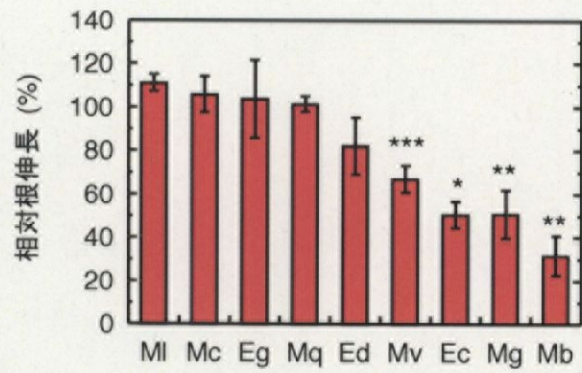


図 3-2. 24時間の1 mM Al処理がフトモモ科9樹種の根の伸長に及ぼす影響

0 mM Al区の根伸長の平均に対する1 mM Al区の根伸長として表す。MIは *Melaleuca leucadendra*、Mcは *M. cajuputi*、Egは *Eucalyptus grandis*、Mqは *M. quinquenervia*、Edは *E. deglupta*、Mvは *M. viridiflora*、Ecは *E. camaldulensis*、Mgは *M. glomerata*、Mbは *M. bracteata*の省略である。値は平均±標準誤差である ( $n = 10$ )。\*、\*\*、\*\*\*は、それぞれ  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ で0 mM Al区と1 mM Al区間に有意差があることを示す ( $t$ 検定)。

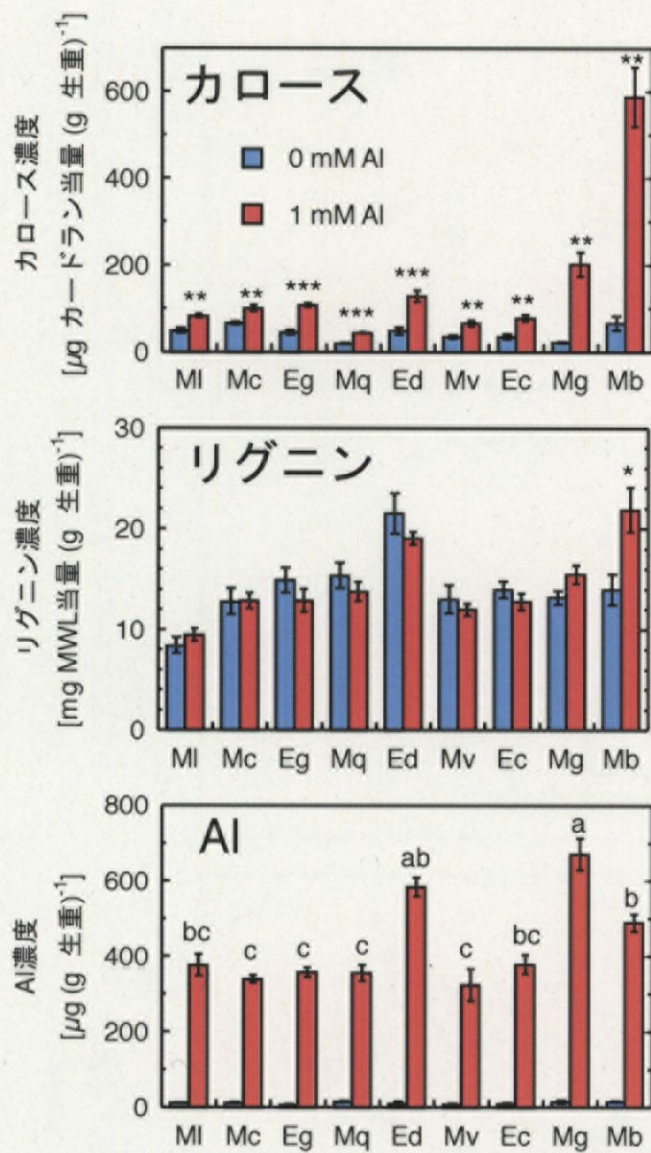


図 3-3. 24時間のアルミニウム処理がフトモモ科9樹種の根端のカロース、リグニン、アルミニウム濃度に及ぼす影響

種名の省略は、図3-2と同じである。値は平均±標準誤差である ( $n=5$ )。\*、\*\*、\*\*\*は、それぞれ $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$ で0 mM Al区と1 mM Al区の間には有意差があることを示す ( $t$ 検定)。異なるアルファベットは $P<0.05$ で有意差があることを示す (チューキーの方法)。



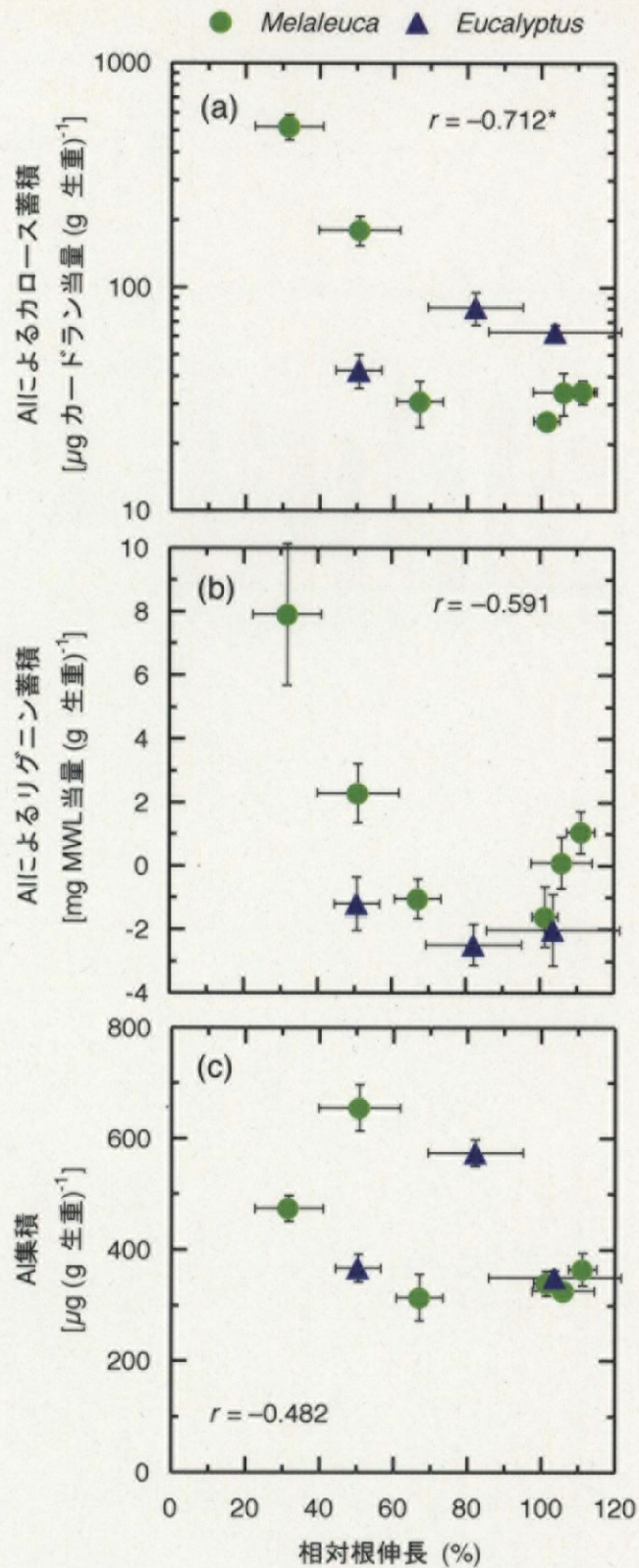


図 3-4. 24時間Al処理における根の伸長とAlによる根端へのカロース蓄積(a)、リグニン蓄積(b)、アルミニウム集積(c)の関係

1 mM Al区と0 mM Al区のカロース濃度、リグニン濃度、Al濃度の差をそれぞれAlによるカロース蓄積、リグニン蓄積、Al集積とした。\*は $P < 0.05$ で有意な相関があることを示す。

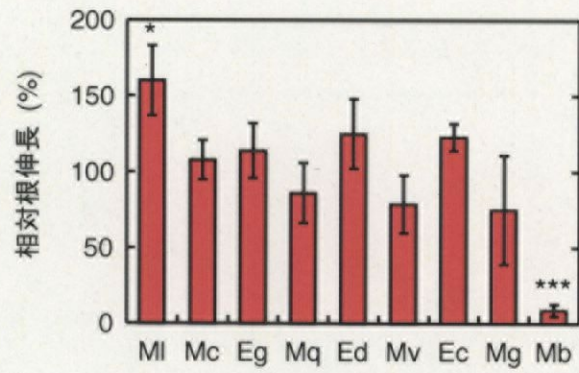


図 3-5. 20日間の1 mM Al処理がフトモモ科9樹種の根の伸長に及ぼす影響

0 mM Al区の根伸長の平均に対する1 mM Al区の根伸長として表す。種名の省略は、図3-2と同じである。値は平均±標準誤差である ( $n = 6 \sim 12$ )。\*、\*\*\*は、それぞれ  $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$  で0 mM Al区と1 mM Al区間に有意差があることを示す ( $t$ 検定)。

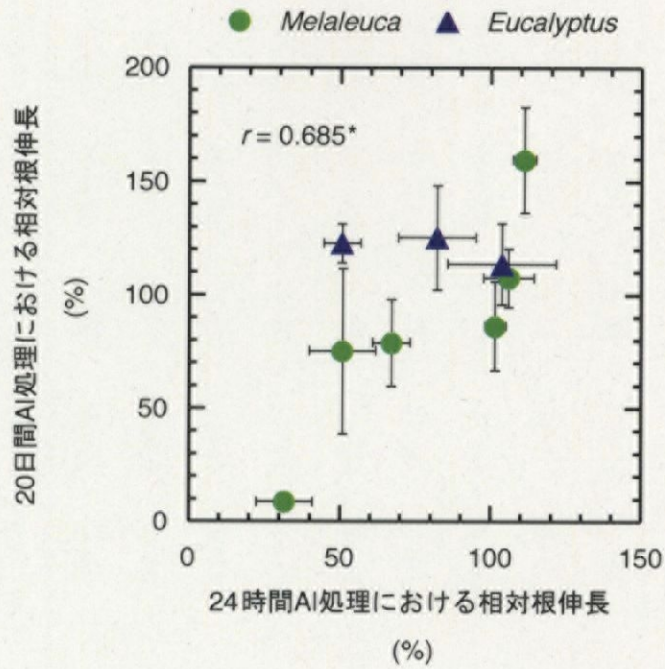


図 3-6. 24時間アルミニウム処理における根伸長と20日間アルミニウム処理における根伸長の関係

\*は $P < 0.05$ で有意な相関があることを示す。

表 3-1. 20 日間のアルミニウム処理がフトモモ科 9 樹種の乾重に及ぼす影響

樹種	葉			茎			根			全体		
	乾重 (mg)	相対乾重 (%)	0 mM Al	乾重 (mg)	相対乾重 (%)	0 mM Al	乾重 (mg)	相対乾重 (%)	0 mM Al	乾重 (mg)	相対乾重 (%)	0 mM Al
	1 mM Al	1 mM Al	1 mM Al	1 mM Al	1 mM Al	1 mM Al	1 mM Al	1 mM Al	1 mM Al	1 mM Al	1 mM Al	1 mM Al
<i>M. leucadendra</i>	282±26	295±30	105	165±17	159±19	97	76±9	91±11	120	523±49	545±59	104
<i>M. cajuputi</i>	293±23	300±28	103	152±16	159±17	104	84±9	93±10	110	529±46	552±54	104
<i>E. grandis</i>	316±47	278±47	88	259±44	237±41	91	55±8	59±12	109	629±97	574±96	91
<i>M. quinquenervia</i>	111±24	72±16	65	44±9	33±7	75	31±7	24±6	78	186±40	129±28	69
<i>E. deglupta</i>	66±23	47±10	72	24±7	20±4	84	23±8	19±4	84	113±38	87±18	77
<i>M. viridiflora</i>	44±8	39±8	88	13±2	13±3	94	10±2	10±2	93	68±13	61±13	90
<i>E. camaldulensis</i>	345±51	318±52	92	217±39	210±43	97	72±10	73±17	101	634±97	600±109	95
<i>M. glomerata</i>	17±5	14±2	82	7±2	7±1	104	6±2	5±1	87	30±9	26±4	89
<i>M. bracteata</i>	53±8	34±9*	64	44±9	26±7*	59	19±3	16±5	85	116±21	76±21*	66

値は平均±標準誤差である (n = 6~12)。\* は  $P < 0.05$  で 0 mM Al 区と 1 mM Al 区の間有意な違いがあることを示す (ワイルコクソン検定)。

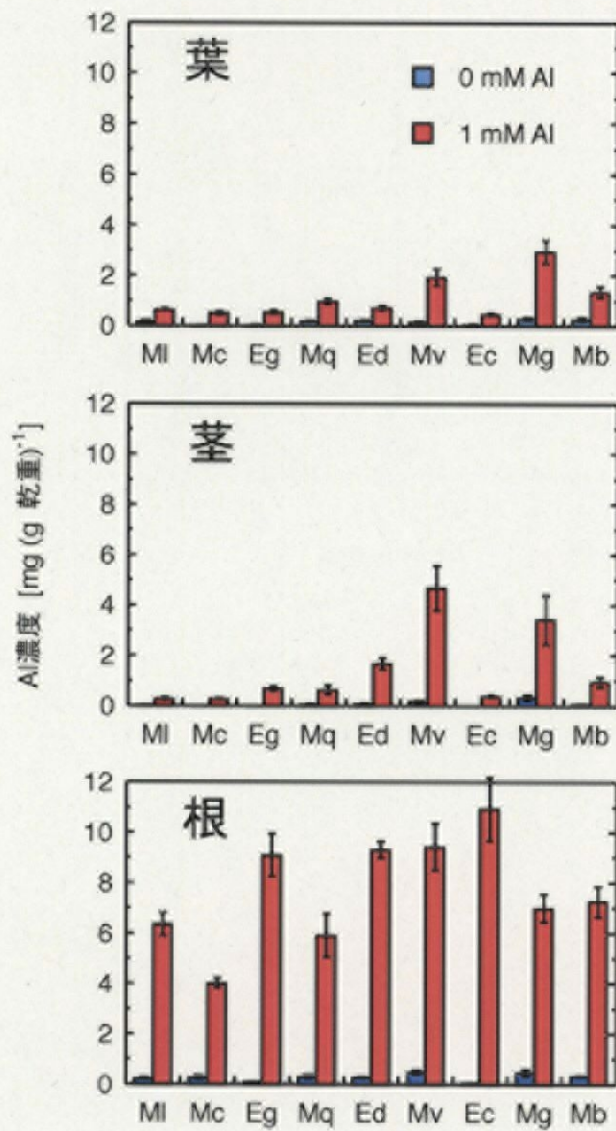


図 3-7. 20日間のアルミニウム処理が葉、茎、根のアルミニウム濃度に及ぼす影響

種名の省略は、図3-2と同じである。値は平均±標準誤差である ( $n = 6\sim 8$ )。

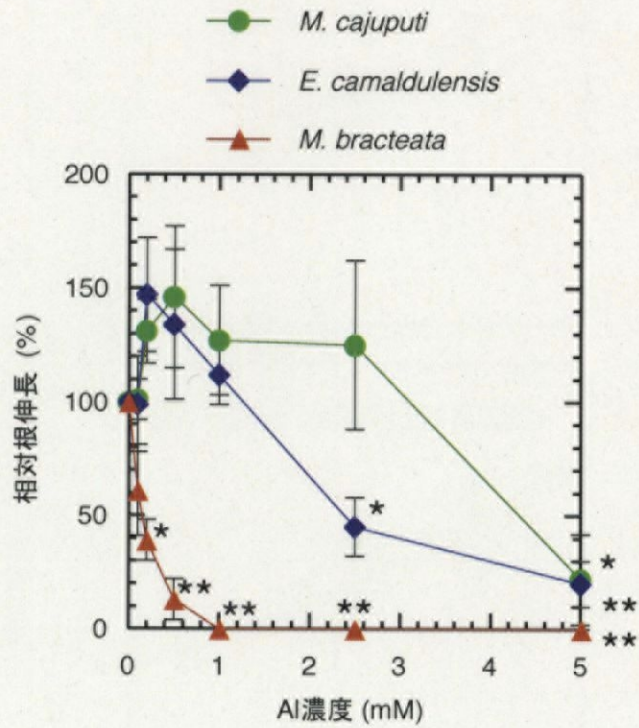


図 3-8. 5日間のアルミニウム処理が *Melaleuca cajuputi*, *Eucalyptus camaldulensis*, *M. bracteata* の根の伸長に及ぼす影響

0 mM Al 区の根伸長量の平均に対する 0.1、0.2、0.5、1、2.5、5 mM Al 区の根伸長量を示す。0 mM Al 区の根の伸長量の平均は、*M. cajuputi* で 71.0 cm、*E. camaldulensis* で 72.9 cm、*M. bracteata* で 36.6 cm だった。値は平均 ± 標準誤差である ( $n = 6$ )。\* と \*\* は、それぞれ  $P < 0.05$  と  $P < 0.01$  で 0 mM Al 区と有意差があることを示す (ダネットの方法)。

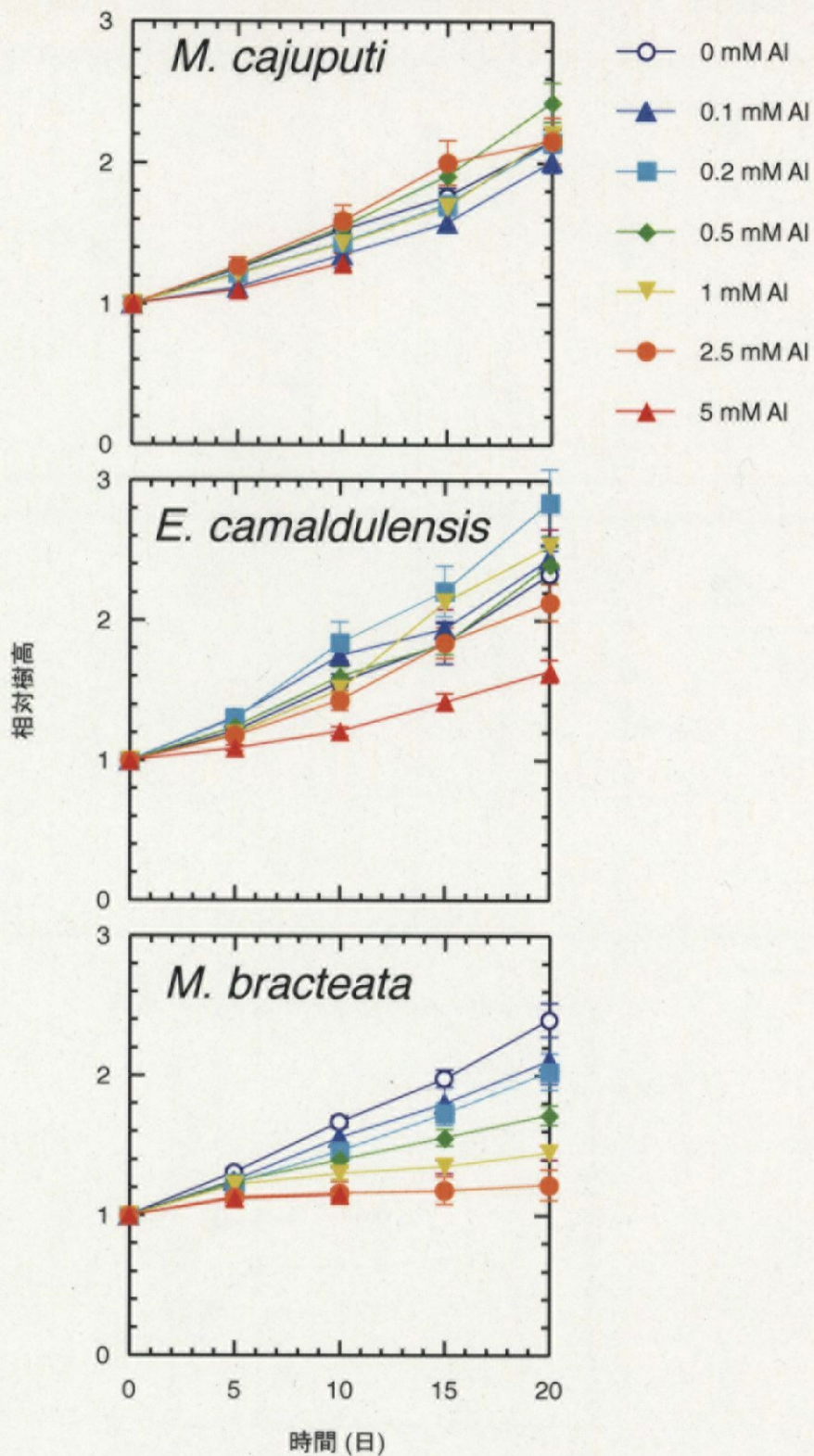


図 3-9. アルミニウムが *Melaleuca cajuputi*, *Eucalytus camaldulensis*, *M. bracteata* の樹高成長に及ぼす影響

Al処理0日目の樹高の平均に対する5、10、15、20日目の樹高を示す。0日目の0 mM Al区の樹高の平均は、*M. cajuputi*で8.2 cm、*E. camaldulensis*で10.6 cm、*M. bracteata*で9.9 cmだった。*M. cajuputi*と *M. bracteata*の5 mM Al区の15日目以降は枯死したため値がない。値は平均±標準誤差である ( $n=6$ )。

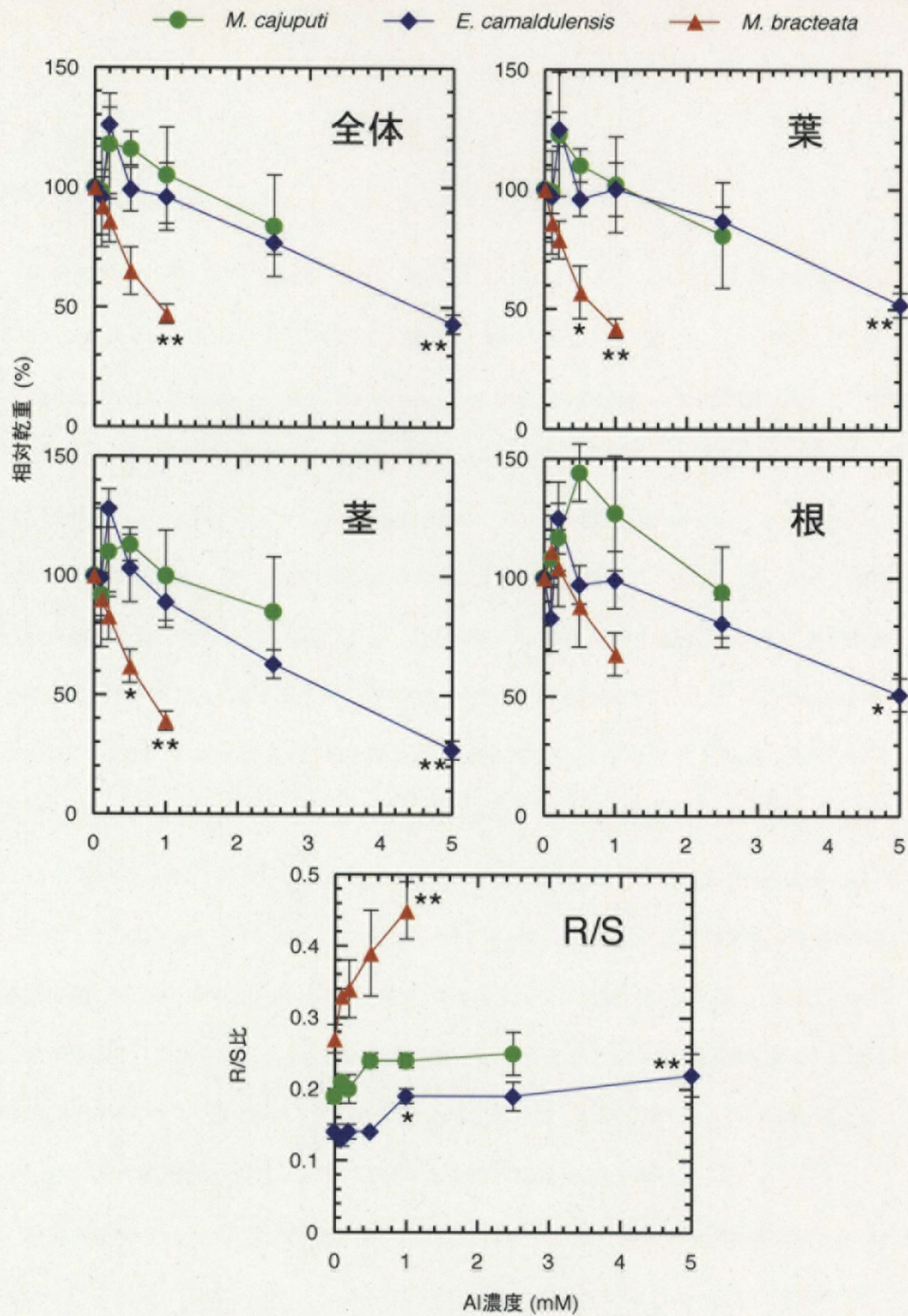


図 3-10. 40日間のアルミニウム処理が *Melaleuca cajuputi*, *Eucalyptus camaldulensis*, *M. bracteata* の乾重に及ぼす影響

0 mM Al 区の乾重の平均に対する 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2.5, 5 mM Al 区の乾重を示す。値は平均±標準誤差である ( $n=6$ )。\*, \*\*は、それぞれ  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  で 0 mM Al 区と有意差があることを示す (ダネットの方法)。 *M. cajuputi* の 5 mM Al 区と *M. bracteata* の 2.5 mM Al と 5 mM 区は枯死したため値がない。



### 3.4 考察

培養液中の 1 mM Al で 24 時間処理し、根の伸長を測定することによって Al 耐性を評価し、*Melaleuca* 属と *Eucalyptus* 属 9 樹種に Al 耐性の違いがあることを明らかにした(図 3-2)。*M. leucadendra*、*M. cajuputi*、*E. grandis*、*M. quinquenervia*、*E. deglupta* の 5 種は 1 mM Al に耐性があり、*M. viridiflora*、*E. camaldulensis*、*M. glomerata*、*M. bracteata* の 4 種は 1 mM Al によって根の伸長が阻害された。また、*M. leucadendra*、*M. cajuputi*、*E. grandis*、*M. quinquenervia*、*E. deglupta* の 5 種は、20 日間の培養液中の 1 mM Al による処理によっても、根の伸長と個体成長が阻害されなかった(図 3-5, 表 3-1)。植物の Al 耐性に関する研究は、主に農業作物を中心に行われてきた。イネは作物の中で Al 耐性が高いと言われているが、イネの品種の一つであるコシヒカリの根の伸長は 24 時間の Ca 溶液中の 50  $\mu$ M の Al で 42% 阻害された(Ma et al. 2002)。本研究において 1 mM (= 1000  $\mu$ M) の Al に対して耐性を持っていた種は、作物と比べて非常に Al 耐性が高いと言える。Schaedle et al.(1989)は、Al に対する成長反応によって樹木を 3 つのグループに分類した。すなわち、150  $\mu$ M 以下の Al によって成長が阻害される感受性種、150 から 800  $\mu$ M Al によって成長が阻害される中間種、800  $\mu$ M 以上の Al によって成長が阻害される耐性種である。この分類に従うと、本研究で 1 mM Al に耐性を持っていた 5 樹種は、樹木の中でも耐性種に分類できる。この 5 樹種は、土壌溶液に 1 mM を超えるような Al を含む酸性硫酸塩土壌において、造林する際の候補樹種となり得る。

培養液中の 1 mM Al による 24 時間の処理において、根の伸長が阻害されなかった *M. cajuputi*、中程度に阻害された *E. camaldulensis*、最も阻害された *M. bracteata* の 3 種について、Al 濃度を多段階設けて用量反応試験を行なったところ、3 樹種は異なる反応を示した(図 3-8)。*M. cajuputi* は培養液中の 2.5 mM Al によっても根の伸長が阻害されず、極めて高い耐性を示した。*M. bracteata* は 0.2 mM 以上の濃度の Al によって根の伸長が阻害され、*M.*

*cajuputi*よりも Al 耐性が非常に低かった。*E. camaldulensis* は 2.5 mM Al によって根の伸長が阻害され、*M. cajuputi* と *M. bracteata* の中間的な Al 耐性だった。*M. cajuputi* の根の伸長が培養液中の 555  $\mu\text{M}$  や 380  $\mu\text{M}$  Al によっても阻害されないとの報告は既にあったが (Osaki et al. 1997, Nguyen et al. 2003b)、本研究によって、*M. cajuputi* は 2.5 mM (= 2500  $\mu\text{M}$ ) の Al にも耐性を示すことが分かった (図 3-8)。培養液中の Al に対して高い耐性を示した樹木として以下のようなものが報告されている。*E. mannifera* Mudie と *Pinus radiata* D. Don は培養液中の 2222  $\mu\text{M}$  の Al でも根の伸長が阻害されず (Huang and Bachelard 1993)、*E. globulus* と *E. urophylla* は 1600  $\mu\text{M}$  の Al によっても (Silva et al. 2004)、*Betula pendula* Roth は 1300  $\mu\text{M}$  の Al によっても (Kidd and Proctor 2000) 根の伸長が阻害されなかった。これらの樹木と比べても、2500  $\mu\text{M}$  の Al で根の伸長が阻害されなかった *M. cajuputi* は極めて高い Al 耐性を持つ種であるといえる。Al 耐性種 *M. cajuputi* の Al に対する反応を *M. bracteata* など耐性の異なる樹種と比較することによって、*M. cajuputi* の Al 耐性機構を確実性を持って効率的に解明することができると考えられる。特に *M. bracteata* は、*M. cajuputi* と比べて非常に Al 耐性が低く、*M. cajuputi* の Al 耐性機構を解明する上で比較樹種として適していると考えられる。

Al が 9 種の根の伸長に及ぼす影響は、24 時間 Al 処理と 20 日間 Al 処理において、*E. camaldulensis* を除き同様の傾向を示した (図 3-6)。*E. camaldulensis* では、24 時間の 1 mM Al 処理 (実験 1) で 49% 根の伸長が阻害されたにもかかわらず (図 3-2)、20 日間 (実験 2) や 5 日間 (実験 3) の 1 mM Al 処理では根の伸長に影響を受けなかった (図 3-5, 3-8)。実験 1 では 1 個体あたり 1 根端の根の伸長量を、実験 2 と実験 3 では根全体の伸長量を測定した。*E. camaldulensis* では、Al によって 1 根端の根の伸長は小さくなるが、分枝の数が増えて根全体の伸長量が変わらなかった可能性が考えられる。しかし、根の分枝の数が Al によって影響を受けなかった (データ非表示)、実験 1 と実験 2、3 における Al に対する反応の違いは、根の伸長の測定法の違いによるものではないだろう。*E. camaldulensis* の根を Ca 溶液中の 1 mM Al で処理すると、処理前に 0.34  $\text{mm h}^{-1}$  だった根の伸長速度が処理開始 1~3 時間後に

0.18 mm h<sup>-1</sup>まで低下したが、処理開始 12~24 時間後には 0.31 mm h<sup>-1</sup>に回復した(Tahara et al. unpublished data)。Al 耐性機構としての根からの有機酸分泌には、Al 処理開始から有機酸の分泌が開始されるまでに数時間が必要なパターンが知られている(Ma 2000)。E. camaldulensis は、このように誘導されるまでにある程度時間が必要な Al 耐性機構を持っている可能性が考えられる。

20 日間の Al 処理における相対乾重と相対根伸長の間に正の相関が見られた( $r = 0.682$ ,  $P < 0.05$ )。また、用量反応試験における相対乾重と相対根伸長の間にも正の相関が見られた( $r = 0.887$ ,  $P < 0.01$ )。このように個体のバイオマス成長と根の伸長は Al によって同様に阻害されたが、阻害の程度が異なっていた。例えば、用量反応試験において M. bracteata のバイオマス成長は 1 mM Al によって 64%阻害されたが(図 3-10)、根の伸長はほぼ完全に阻害された(図 3-8)。このように、バイオマス成長よりも根の伸長のほうが大きく阻害される傾向にあった。従って、Al 耐性を評価する上では、バイオマス成長よりも根の伸長のほうが指標として感度が高いと考えられる。

M. leucadendra では、20 日間の 1 mM Al 処理によって根伸長が促進されるという現象が見られた(図 3-5)。また、用量反応試験では、根の伸長が M. cajuputi の 0.2、0.5、1 mM Al 区と E. camaldulensis の 0.2、0.5 mM Al 区で(図 3-8)、個体成長が M. cajuputi の 0.2 と 0.5 mM Al 区と E. camaldulensis の 0.2 mM Al 区で促進される傾向にあった(図 3-10)。障害を受けない程度の濃度の Al によって成長が促進されることが、Melaleuca 属と Eucalyptus 属樹木を含むいくつかの植物で報告されている(Mullette 1975, Huang and Bachelard 1993, Osaki et al. 1997, Nguyen et al. 2003a, Silva et al. 2004)。この Al による成長促進の機構は、まだ明らかになっていないが、Al<sup>3+</sup>と H<sup>+</sup>の競合による H<sup>+</sup>害の緩和などが提唱されている(Nguyen et al. 2003b)。

本章で用いた 9 種すべてで、Al によって根端にカロールが蓄積した(図 3-3)。根端における Al によるカロール蓄積と根の相対伸長の間に正の相関が認められた(全 9 樹種,  $r = -0.712$ ,

*Melaleuca* 属のみ,  $r = -0.871$ )。この結果は、特に *Melaleuca* 属樹木において、Al によるカロース蓄積が種間の Al 耐性比較の指標となることを示唆している。Al によるカロース蓄積と根の相対伸長の間には負の相関があることは、ダイズの遺伝子型間 (Wissemeier et al. 1992)、トウモロコシの品種間 (Llugany et al. 1994)、インゲンマメの品種間 (Massot et al. 1999) でも見いだされているが、異なる種間で見いだされたのは本研究が初めてである。*M. leucadendra*、*M. cajuputi*、*E. grandis*、*M. quinquenervia* では根の伸長が阻害されていないにもかかわらず、Al によって根端にカロースが蓄積した (図 3-3)。この結果は、カロース蓄積が根の伸長よりも Al に対して感受性が高いことを示している。

最も Al 耐性が低かった *M. bracteata* では、24 時間の Al 処理によって根端でリグニンが蓄積することを見いだした (図 3-3)。しかし、Al によって根伸長が阻害された *M. viridiflora*、*M. glomerata* では、Al によるリグニンの蓄積は見られなかった (図 3-3)。これらの結果から、リグニン蓄積は Al 毒性による初期反応の一つである可能性はあるが、根の伸長阻害よりも Al に対して感受性が低い反応であると考えられる。また、Al によるリグニン蓄積と根の相対伸長の間には有意な相関を見いだすことはできなかった (図 3-4)。このことは、Al によるリグニンの蓄積は Al 耐性の指標としては適当でないことを示している。

カロースやリグニンの細胞壁への蓄積は、細胞伸長を制御している因子の一つである細胞壁の伸展性を低下させるかもしれない (Matsumoto 2000, Schopfer et al. 2001)。従って、Al によるカロースとリグニンの蓄積が、Al が根の伸長阻害を引き起こす原因となっている可能性がある。しかし、Sasaki et al. (1996) は、Al によるリグニンの蓄積が Al による根の伸長阻害よりも遅い現象であるため、リグニン蓄積が Al による根伸長阻害の主な原因ではないだろうと考察している。*M. viridiflora* と *M. glomerata* において、Al によるリグニンの蓄積が見られなかったことは、Sasaki et al. (1996) の考察を支持する結果である。Sivaguru et al. (2000) は、Al によって原形質連絡に蓄積したカロースが細胞間の物質輸送を阻害することを明らかにし、このカロースの蓄積が Al による根の伸長阻害を引き起こす可能性を示唆している。しかしながら、Al によ

て蓄積したカロースが細胞壁の伸展性に及ぼす影響については未解明である。

根を 1 mM Al で 24 時間処理した場合、*M. cajuputi* と *E. grandis*、*M. quinquenervia*、*M. viridiflora* は、*E. deglupta* と *M. glomerata*、*M. bracteata* よりも根端への Al の集積が少なかった(図 3-3)。したがって、前者の樹種には、根端に Al が集積するのを防ぐ何らかの機構が存在する可能性がある。しかし、根端への Al の集積と根の相対伸長の間(図 3-4c)、葉と茎、根の Al 濃度とそれぞれの相対乾重の間(データ非表示)に相関は見られなかった。従って、本章で用いた *Melaleuca* 属と *Eucalyptus* 属樹種においては、Al 排除能力以外の機構も Al 耐性に寄与していると考えられる。

第 3 章では、*M. cajuputi* が培養液中の 2.5 mM の Al にも耐えられる極めて高い Al 耐性を持つ耐性種であることが明らかになった。*M. bracteata* は *M. cajuputi* に比べ耐性が非常に低く、*M. cajuputi* の Al 耐性機構を解明する上で比較樹種として用いるのに適していると考えられる。また、*E. camaldulensis* も高い耐性を持っており、その耐性は Al によって誘導される機構によるものである可能性がある。Al による 9 樹種の根端へのカロースの蓄積量と根の伸長に樹種を越えて負の相関が認められた。このことは、根端における Al によるカロースの蓄積が Al 耐性の種間比較のための指標になりうることを示している。