

第5章 根端内でのアルミニウム耐性機構

5.1 はじめに

第4章において耐性種 *M. cajuputi* の Al 耐性機構は Al 結合性物質の根からの分泌による Al 排除ではないことが明らかになった。*M. cajuputi* の Al 耐性機構は、根圏の pH を上昇させ Al を不溶化させるなど、Al 結合性物質の根からの分泌以外の Al 排除機構、あるいは根端内 Al 耐性機構によるものであると考えられる。そこで本章では、まず感受性種 *M. bracteata* との比較により *M. cajuputi* の Al 耐性が「Al 排除機構」によるものでなく、根端に Al が集積しても耐えられる「根端内 Al 耐性機構」によるものであることを明らかにし、さらに *M. cajuputi* がどのような根端内 Al 耐性機構を持っているのかを明らかにすることを目的とした。

Al によって植物に現れる最も顕著な障害は根の伸長阻害である (Delhaize and Ryan 1995)。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 (Barceló and Poschenrieder 2002)。Al は根の伸長阻害以外にも根端においてカロースやリグニンの蓄積などの初期反応を引き起こすことが知られている (Matsumoto 2000)。Al による根端でのカロースの蓄積は、数多くの植物種で認められる現象であり、*Melaleuca* 属でも Al によって根端にカロースが蓄積することが示された (第3章)。Al による根端へのカロースの蓄積は、Al 処理開始から 30 分以内に確認されることが知られている (Zhang et al. 1994, Wissemeier and Horst 1995)。また、Al によるカロースの蓄積は障害の程度に応じて増大することから、品種間や種間の Al 耐性比較の指標としてのほか (Llugany et al. 1994, 第3章)、Al 障害の指標として使うことができる (Zhang et al. 1994)。コムギ (*Triticum aestivum*) の根端において、6 時間の Al 処理によるリグニンの蓄積が報告されている (Sasaki et al. 1996)。感受性種 *M. bracteata* でも 24 時間の Al 処理によって根端へのリグニンの蓄積が認められた (第3章)。根端でのリグニン蓄積も Al によって引き起こされる初期障害反応の一つである可能性がある。そこで、*M. cajuputi* の Al

耐性が Al 排除機構によるものであるか、あるいは根端内 Al 耐性機構によるものであるかを明らかにするために、Al によって引き起こされる根の伸長阻害、根端へのカロースとリグニンの蓄積によって、耐性種 *M. cajuputi* と感受性種 *M. bracteata* の間で耐性の違いが現れる時間を調べ、その時間における根端の Al 濃度を両種で比較した。

根端内 Al 耐性機構として、根端内で Al が Al 結合性の物質と複合体を形成し無害化されることが考えられる。シュウ酸、クエン酸、リンゴ酸などの有機酸やカテキン、ケルセチンなどのフェノール物質は Al と結合して Al を無害な形態にすると考えられている (Barceló and Poschenrieder 2002)。ソバ (*Fagopyrum esculentum*) の根で Al がシュウ酸と 1:3 の割合でキレート結合していることが報告されている (Ma et al. 1998)。Silva et al. (2004) は、*Eucalyptus globulus* と *E. urophylla* の根端で Al 処理によってリンゴ酸の濃度が高まることから、これらの種では根端においてリンゴ酸が Al の無害化に寄与しているのではないかと推論している。また、Ofei-Manu et al. (2001) は、耐性の異なる作物や樹木の根のフェノール物質濃度と Al 耐性の間に正の相関があることを見だし、細胞内で Al がフェノール物質と結合し無害化されている可能性を示唆している。

Al によって根端で活性酸素種が蓄積することがシロイヌナズナ (*Alabidopsis thaliana*; Ezaki et al. 2000) やエンドウマメ (*Pisum sativum*; Yamamoto et al. 2002) において蛍光試薬を用いた研究で示されている。活性酸素障害の中で最も広範囲に見られるのが生体膜における脂質過酸化であり (Halliwell and Gutteridge 1999)、ダイズ (*Glycine max*) の根端、タバコ培養細胞、エンドウマメ (*Nicotiana tabacum*) の根端で Al によって脂質過酸化が引き起こされることが報告されている (Cakmak and Horst 1991, Ono et al. 1995, Yamamoto et al. 2001)。抗酸化剤を添加して活性酸素種の蓄積を抑えると、タバコ培養細胞の Al による増殖阻害が緩和されたので (Yamamoto et al. 2002)、根端における活性酸素種の蓄積が Al 障害の原因となっている可能性が指摘されている (Yamamoto et al. 2003)。抗酸化酵素を過剰発現させることによってシロイヌナズナやセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) の Al 耐性が高まることが報告されている (Ezaki

et al. 2000, Basu et al. 2001)。従って、根端で高い活性酸素消去能力を持つことも根端内 Al 耐性機構として考えられる。

本章では、*M. cajuputi* の Al 耐性が Al 排除機構によるものであるか、あるいは根端内 Al 耐性機構によるものであるかを明らかにし、さらに、*M. cajuputi* の根端内 Al 耐性機構として、根における根内の有機酸とフェノール物質による Al の無害化と、高い活性酸素種の消去能力について検討した。

5.2 材料と方法

植物材料

「3.2 材料と方法」の「植物材料」(第3章)と同じ方法で、*M. cajuputi*と*M. bracteata*の実生を栽培した。

根の伸長の測定

播種後3ヶ月の*M. cajuputi*と*M. bracteata*の実生を3Lのプラスチックポットに6本ずつ植え替え、実験1(第3章)と同条件で水耕栽培した。9日間水耕栽培したのち、前処理として実生の根を12時間0.35 mM CaCl_2 溶液(pH 4.0)に通気しながら浸け、続いて0 mMあるいは1 mMの AlCl_3 を含む0.35 mM CaCl_2 溶液(pH 4.0)に通気しながら浸けてAl処理をした。処理開始から1、3、6、12、24時間の根の伸長を測定した。根の伸長の測定は、「3.2 材料と方法」の「24時間Al処理」(第3章)と同じ方法で行った。根の伸長に1処理あたり8反復を設けた。

根端のカロースとリグニンの測定

播種後4ヶ月の*M. cajuputi*と*M. bracteata*の実生を3Lのプラスチックポットに6本ずつ植え替え、実験1(第3章)と同条件で水耕栽培した。6日間水耕栽培したのち、前処理として実生の根を12時間0.35 mM CaCl_2 溶液(pH 4.0)に通気しながら浸け、続いて0 mMあるいは1 mM AlCl_3 の0.35 mM CaCl_2 溶液(pH 4.0)に通気しながら浸けてAl処理をした。処理開始から0、1、3、6時間後に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た。根端のカロースとリグニンを「3.2 材料と方法」の「根端のカロースの測定」と「根端のリグニンの測定」(第3章)と同じ方法でそれぞれ定量した。また、根端のカロースを Larsen et al.

(1996)の方法により組織化学的に観察した。根を脱イオン水で洗い、根端約2 cmを切り取り、10%(v/v)ホルムアルデヒド、5%(v/v)酢酸、45%(v/v)エタノールを含む固定液に浸し、4時間減圧浸透させた。固定した根を0.1 M K_3PO_4 (pH 9.0)中の0.1% アニリンブルーで染色し、倒立型蛍光顕微鏡(IMT-2, オリンパス)で観察した(励起 405 nm 付近, 放射 455 nm 以上)。根端のカロースとリグニンの測定に5反復をそれぞれ設けた。

根端のアルミニウムの測定

根端のAl濃度をTice et al. (1992)の方法により、アポプラストAl、シンプラストAl、残渣Alに分画して測定した。「根端のカロースとリグニンの測定」と同様に *M. cajuputi* と *M. bracteata* の根をAl処理した。処理開始から0、1、3、6、12、24時間後に根の先端から5 mmを切り取り、脱イオン水で洗ったのち、生重量を測定した。1.5 mL スクリューキャップチューブ(2150, パイオビック)中の1 mM クエン酸三ナトリウム、5 mM $CaCl_2$ を含む溶液(脱着液)1 mLに根端を浸け4°Cで30分間根端からAlを脱着させた。この作業を脱着液を交換して4回繰り返し、これらの脱着液を合わせた溶液に含まれるAlをアポプラストAlとした。アポプラストAlを脱着させた根端を-80°Cで1時間冷凍し、細胞膜を破裂させたのち、1 mLの脱着液で根端を洗う作業をさらに4回繰り返した。これらの脱着液を合わせた溶液に含まれるAlをシンプラストAlとした。脱着後の根端を200 μ 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。この溶解液に含まれるAlを残渣Alとした。アポプラストAl、シンプラストAl、残渣Alをファーンズ原子吸光分析装置(SIMAA6000, パーキンエルマー)で定量した。アポプラストAl、シンプラストAl、残渣Alの量を合計することによって、根端のAlの総量を算出した。根端のAlの測定に1処理あたり5反復を設けた。

プロトプラストでのカロース生成の検出

M. cajuputi と *M. bracteata* の根端から、Ishikawa and Wagatsuma (1998)の方法を改変して

プロトプラストを単離し、Al によるカロース生成の検出を試みた。播種後 5 ヶ月の実生を 3 L のプラスチックポットに 6 本ずつ植え替え、実験 1 (第 3 章)と同条件で水耕栽培した。7 日間水耕栽培したのち、根の先端から 2 cm を切り取り、酵素を抜いた消化液に手早く浸けた。消化液は、0.6 M マンニトール、2%(w/v)セルラーゼ “オノズカ” RS (ヤクルト薬品工業)、0.25%(w/v)ペクトリアーゼ Y-23(協和化成)、0.05%(w/v) BSA (fraction V, シグマ アルドリッチ)、1 mM CaCl_2 、1%(w/v)ポリビニルピロリドン、0.5 mM (±)-ジチオトレイトールを含み、pH を 1 M HCl で 5.6 に調整した。根端をはさみで 2 mm 程度にきざんだのち、100 mL の消化液に浸け、30 rpm で緩やかに振とうしながら 27°C で 3.5 時間インキュベートした。消化液から 100 μm のナイロンメッシュでプロトプラストを分離した。ナイロンメッシュ上の残渣を 0.7 M マンニトール、0.35 mM CaCl_2 、1%ポリビニルピロリドン、0.5 mM (±)-ジチオトレイトール、5 mM Tris-MES 緩衝液 (pH 5.6)を含む溶液で緩やかに攪拌して、残渣からさらにプロトプラストを遊離させ、100 μm のナイロンメッシュで分離した。濾液を合わせ遠沈管に移し、150 g で 6 分間遠心して上澄みを捨て、粗製のプロトプラストを得た。

粗製プロトプラストを遠心密度勾配法で精製した。粗製プロトプラストを 13%(w/v) Ficoll PM400 (アマシャム バイオサイエンス)、0.7 M マンニトール、0.35 mM CaCl_2 、2 mM Tris-MES 緩衝液 (pH 5.6)を含む溶液 (13% Ficoll 溶液)に懸濁させ、その上に 8、5、0%の Ficoll 溶液の不連続層を重ねた。300 g で 20 分間遠心して、0%と 5% Ficoll 溶液の界面に集まったプロトプラスを採取した。プロトプラストを 0% Ficoll 溶液で洗い、150 g で 6 分間遠心して上澄みを捨て Ficoll を除いた。

精製したプロトプラストを 0.6 M マンニトール、0.35 mM CaCl_2 を含む溶液 (pH 4.0; 等張液)で洗い、150 g で 6 分間遠心して上澄みを捨てた。プロトプラストを 2 mL の等張液に懸濁させ、うち 1 mL に 3 mL 等張液を加え (0 mM Al 区)、残りの 1 mL に等張液 1 mL と 2 mM AlCl_3 、0.6 M マンニトール、0.35 mM CaCl_2 を含む溶液を 2 mL 加えた (1 mM Al 区)。30 rpm で緩やかに振とうしながら暗所でインキュベートした。3 時間処理したのち、130 g で 5 分間遠心して上澄

みを捨て、等張液を加え洗った。130 gで5分間遠心して上澄みを捨て0.2 mLまで液量を減らした。

プロトプラストの懸濁液 0.1 mL に 5 μ L の 25 μ g mL⁻¹ の二酢酸フルオレセイン (FDA) を加え、プロトプラストの生存を確認した。観察は、倒立型蛍光顕微鏡 (IMT-2, オリンパス) で行った (励起 405 nm 付近, 放射 455 nm 以上)。残りのプロトプラスト懸濁液 0.1 mL に 0.5% (w/v) アニリンブルー、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.5) を含む染色液を 10 μ L 加えた。30 分間静置したのち、等張液で洗い、130 gで5分間遠心して上澄みを捨て、倒立型蛍光顕微鏡を使って FDA による生存確認と同じ条件でカロースの蛍光を観察した。

根の有機酸の測定

「4.2 材料と方法」の「根から放出物の採取」(第 4 章)において、0 mM あるいは 1 mM の AlCl₃ を含む 0.35 mM CaCl₂ 溶液 (pH 4.0) で 24 時間処理し、採取した根から Delhaize *et al.* (1993b) の方法によって有機酸を抽出した。液体窒素中で試料を乳鉢と乳棒を用いてすばやく粉砕し、800 μ L の 0.6 N 過塩素酸を加え磨砕した。磨砕後の懸濁液を 15 000 g で 15 分間遠心分離し、上澄み液 500 μ L に 5 M 炭酸カリウム水溶液 44 μ L を加えて中和した。析出した過塩素酸カリウムを沈澱させるために、中和した溶液を 15 000 g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を試料溶液とした。試料溶液は分析まで -30°C で保存し、「4.2 材料と方法」の「有機酸、リン酸の分析」と同じ方法で有機酸の分析を行った。根の有機酸濃度に 6~7 反復を設けた。

根端のフェノール物質の測定

根端のフェノール物質を Weiss *et al.* (1997) の方法により可溶性画分と細胞壁結合性画分に分けて抽出した。「根端のカロースとリグニンの測定」と同様に *M. cajuputi* と *M. bracteata* の根を Al 処理した。処理開始から 6 時間後に根の先端から 5 mm を切り取り、脱イオン水で洗ったのち、生重を測定した。1.5 mL チューブ (A150, アシスト) 中で 50 μ L の 100% メタノールを

加えて根端を磨砕した。350 μL 80%(v/v)メタノールを加え懸濁させたのち、4°C、14 000 gで7分間遠心した。上澄みを試料溶液とし、含まれるフェノール物質を可溶性画分として測定した。

可溶性フェノール物質を抽出した後の残渣をアセトンで洗い、4°C、14 000 gで7分間遠心し上澄みを捨てた。この洗浄を2回繰り返した。遠心エバポレーターでアセトンを飛ばしたのち、80%(v/v)メタノールと1 M ナトリウムメトキシドを含む溶液 80 μL に懸濁させ、80°Cで3時間アルカリ加水分解した。10 μL の85%(w/w)リン酸を加えて酸性化させたのち、210 μL の80%メタノールを加え、4°C、14 000 gで7分間遠心した。上澄みを試料溶液とし、含まれるフェノール物質を細胞壁結合性画分として測定した。根端のフェノール物質に5反復を設けた。

試料溶液を脱イオン水で20倍から100倍に希釈したのち、試料溶液 1 mLあたり約0.1 gの陽イオン交換樹脂(Amberlite IR-120B, H⁺形, オルガノ)を加え、試料溶液中のFeを除いた。試料溶液のフェノール物質濃度を「4.2 材料と方法」の「フェノール物質の分析」(第4章)と同様にホーリン-デニス法(Swain and Hillis 1959)で定量した。

根端の脂質過酸化の測定

Velikova et al. (2000)の方法で脂質過酸化によって生成するマロンジアルデヒドを測定することにより、根端の脂質過酸化を評価した。播種後4ヶ月の *M. cajuputi* と *M. bracteata* の実生を3 Lのプラスチックポットに12本ずつ植え替え、実験1(第3章)と同様に水耕栽培した。7日間水耕栽培したのち、0 mMあるいは1 mM AlCl_3 の0.35 mM CaCl_2 溶液(pH 4.0)に通気しながら根を浸ける処理をした。処理開始から6時間後に根を0.35 mM CaCl_2 溶液(pH 4.0)で洗ったのち、根端約2 cmを切り取り、生重を測定し、直ちに液体窒素中で凍らせた。約30 mgの根端を1 mL 0.1%(w/v) TCA 溶液中で磨砕したのち、懸濁液を15 000 gで10分間遠心し、上澄みを分析に用いた。上澄み0.5 mLを20% TCAと0.5%(w/v) 2-チオバルビツール酸を含む溶液1 mLに加え、混合液を30分間湯煎したのち、氷上で反応を停止させた。15

000 gで10分間遠心し、上澄みの532 nmと600 nmにおける吸光度を測定した。532 nmにおける吸光度から600 nmにおける吸光度を引き、吸光係数 $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ からマロンジアルデヒドの濃度を求めた。根端の脂質過酸化に7反復を設けた。

根端の活性酸素種の検出

活性酸素の一種であるスーパーオキシド(O_2^-)と特異的に反応する蛍光試薬ジヒドロエチジウムを用いる方法(Yamamoto et al. 2002)で根端への O_2^- の蓄積を検出した。「根端のカロースとリグニンの測定」と同様に *M. cajuputi* と *M. bracteata* の根をAl処理した。処理開始から0、1、3、6時間後に根を0.35 mM CaCl_2 溶液(pH 4.0)で洗い、根端約2 cmを切り取り、直ちに10 μM ジヒドロエチジウム、0.35 mM CaCl_2 を含む染色液(pH 4.0)に浸けた。30分間染色液に浸けたのち、0.35 mM CaCl_2 溶液(pH 4.0)で洗い、倒立型蛍光顕微鏡(IMT-2, オリンパス)で観察した(励起 455~490 nm, 放射 515 nm 以上)。ポジティブコントロールとして、エンドウマメ(*Pisum sativum* cv Alaska)をYamamoto et al. (2002)の方法で10 μM AlCl_3 の0.1 mM CaCl_2 溶液(pH 4.75)で処理し、 O_2^- の蓄積を調べた。根端の O_2^- の蓄積の検出に5反復を設けた。

統計分析

ソフトウェア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、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。

5.3 結果

根の伸長阻害と根端へのカロースとリグニンの蓄積

処理開始後の根の伸長量を図 5-1 に示す。耐性種 *M. cajuputi* の根の伸長は、1 mM Al によって全く影響を受けなかった。一方、感受性種 *M. bracteata* の根の伸長は、1 mM Al 処理によって処理開始 3 時間後には根の伸長が阻害された (t 検定, $P = 0.0049$; 図 5-1b)。 *M. bracteata* の 1 mM Al 区における 24 時間の根の伸長量は、0 mM Al 区の 9% だった。

Al 処理をした *M. bracteata* では、根端においてカロースの蓄積を示す蛍光がアニリンブルーによる染色で観察されたが、*M. cajuputi* では観察されなかった (図 5-2a)。根端のカロースを定量すると、*M. cajuputi* では、処理開始 3 時間後までカロース濃度は Al によって影響を受けなかったが、処理開始 6 時間後のカロース濃度は、1 mM Al 区のほうがわずかに 0 mM Al 区よりも高かった (図 5-2b)。一方、*M. bracteata* では、処理開始 3 時間後には 1 mM Al 区の根端のカロース濃度が 0 mM Al 区よりも高くなり (t 検定, $P = 0.0049$)、処理 6 時間後まで更にカロースが蓄積した (図 5-2b)。

M. cajuputi の根端のリグニン濃度は、処理開始 1 時間後の 1 mM Al 区が 0 mM Al 区よりも若干低かったが、処理開始 3 時間後と 6 時間後は Al による影響を受けなかった (図 5-3)。一方、*M. bracteata* の根端には Al によってリグニンが蓄積し、処理開始 3 時間後には 1 mM Al 区の根端のリグニン濃度が 0 mM Al 区よりも高くなり (t 検定, $P = 0.0010$)、6 時間後まで更に蓄積した (図 5-3)。

根端へのアルミニウムの集積

1 mM Al による根端への Al の集積を図 5-4 に示す。1 mM Al 処理開始 1 時間後の根端の全 Al の濃度は、*M. cajuputi* が *M. bracteata* よりも高く (t 検定, $P = 0.031$)、3 時間後と 6 時間

後は両種の間には有意な差はなかった(t 検定, $P > 0.11$)。1 mM Al 処理開始 12 時間後と 24 時間後の根端の全 Al の濃度は、*M. cajuputi* が *M. bracteata* よりも低かった。根端のアポプラスト Al は、Al 処理開始 1 時間後の *M. cajuputi* の濃度が *M. bracteata* よりも高かったが、3～24 時間後の *M. cajuputi* の濃度は *M. bracteata* と同程度だった。根端のシンプラスト Al の濃度は、処理開始 1 時間後は *M. cajuputi* が *M. bracteata* よりも高く、3～12 時間後は両種で変わらなかったが、24 時間後は *M. cajuputi* が *M. bracteata* よりも低かった。残渣 Al は、1 mM クエン酸三ナトリウム、5 mM CaCl_2 を含む脱着液によっても根端から離れなかった Al であり、強く根端に結合していると考えられる。根端の残渣 Al は、Al 処理開始後、測定したすべての時間で *M. cajuputi* の濃度が *M. bracteata* よりも低かった(t 検定, $P < 0.014$)。このことは、*M. cajuputi* の根端に強く結合した Al が *M. bracteata* よりも少ないことを意味している。

根端から単離したプロトプラストでのカロース生成

M. cajuputi と *M. bracteata* の根端からプロトプラストを単離し、単離したプロトプラストを 0 mM あるいは 1 mM Al の等張液で 3 時間処理した。処理終了後に、いずれの樹種、処理ともプロトプラストが生存していることを FDA によって確認した(図 5-5a)。アニリンブルーを用いてカロース生成の検出を試みたが、蛍光強度が小さく処理や樹種による違いを明らかにするには至らなかった(図 5-5b)。

根の有機酸とフェノール物質

根のシュウ酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸濃度を図 5-6 に示す。両種とも根のシュウ酸濃度に Al による影響はなかった(チューキーの方法, $P > 0.05$)。1 mM Al 区における根のシュウ酸濃度は、*M. cajuputi* が *M. bracteata* よりも低かった(チューキーの方法, $P < 0.01$)。両種とも根のクエン酸に Al による影響はなかった(チューキーの方法, $P > 0.05$)。1 mM Al 区における根のクエン酸は、両種の間には統計的な有意差はなかった(チューキーの方法, $P > 0.05$)。両

種とも根のリンゴ酸に Al の影響はなく、1 mM Al 区の根のリンゴ酸濃度にも両種の間で有意差はなかった(チューキーの方法, $P > 0.05$)。根のコハク酸濃度は、樹種と処理を通じて $0.59 \mu\text{mol} (\text{g 根乾重})^{-1}$ 以下だった。根のコハク酸濃度に Al による影響はなく、1 mM Al 区において樹種による違いもなかった(チューキーの方法, $P > 0.05$)。

両種の根端の可溶性フェノール物質濃度に Al は影響を与えなかった(チューキーの方法, $P > 0.05$; 図 5-7)。また、1 mM Al 区における可溶性フェノール物質濃度に樹種による違いはなかった(チューキーの方法, $P > 0.05$; 図 5-7)。一方、根端の細胞壁結合性のフェノール物質は、*M. cajuputi* では Al の影響がなかったが(チューキーの方法, $P > 0.05$)、*M. bracteata* では 1 mM Al 区の濃度が 0 mM Al 区よりも高かった(チューキーの方法, $P < 0.01$, 図 5-7)。1 mM Al 区における根端の細胞壁結合性フェノール物質は、*M. cajuputi* の濃度が *M. bracteata* よりも低かった(チューキーの方法, $P < 0.01$, 図 5-7)。

根端での脂質過酸化とスーパーオキシドの蓄積

根端のマロンジアルデヒド濃度を測定することにより脂質過酸化の程度を評価した(図 5-8)。*M. cajuputi* の根端では、6 時間の Al 処理によって脂質過酸化の程度は影響を受けなかったが(ウィルコクソン検定, 片側, $P = 0.13$)、*M. bracteata* の根端では、6 時間の Al 処理によって脂質過酸化が促進される傾向が見られた(ウィルコクソン検定, 片側, $P = 0.036$)。

蛍光試薬ジヒドロエチジウムを用いた根端におけるスーパーオキシド(O_2^-)の検出の結果を図 5-9 に示す。ポジティブコントロールとして用いたエンドウマメでは、6 時間の 10 μM Al 処理によって赤い蛍光が観察された。これは、Al によってエンドウマメの根端で O_2^- が蓄積したことを示している。*M. cajuputi* と *M. bracteata* では、0、1、3、6 時間処理した 0 mM Al 区、1 mM Al 区いずれの根においても、 O_2^- の生成は観察されなかった(0~3 時間はデータ非表示)。

(b)

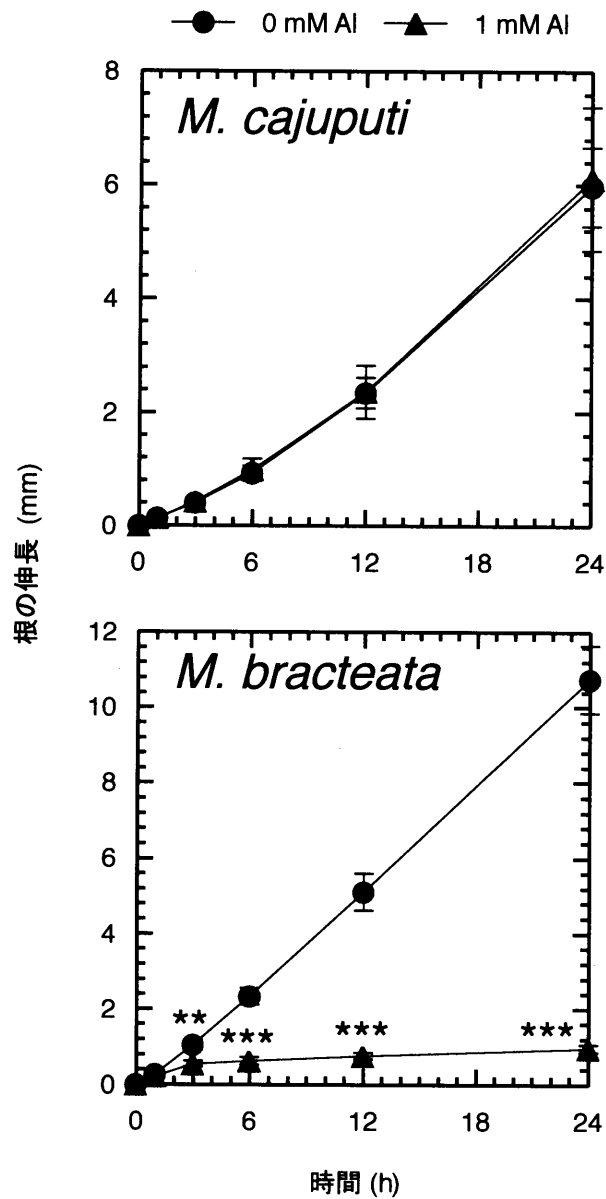


図 5-1b. *Melaleuca cajuputi*と *M. bracteata*の根の伸長にアルミニウムが及ぼす影響(続き)

値は平均±標準誤差である ($n=8$)。**、***は、それぞれ $P<0.01$ 、 $P<0.001$ 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)。

(a)

M. cajuputi

M. bracteata

-Al

+Al

-Al

+Al

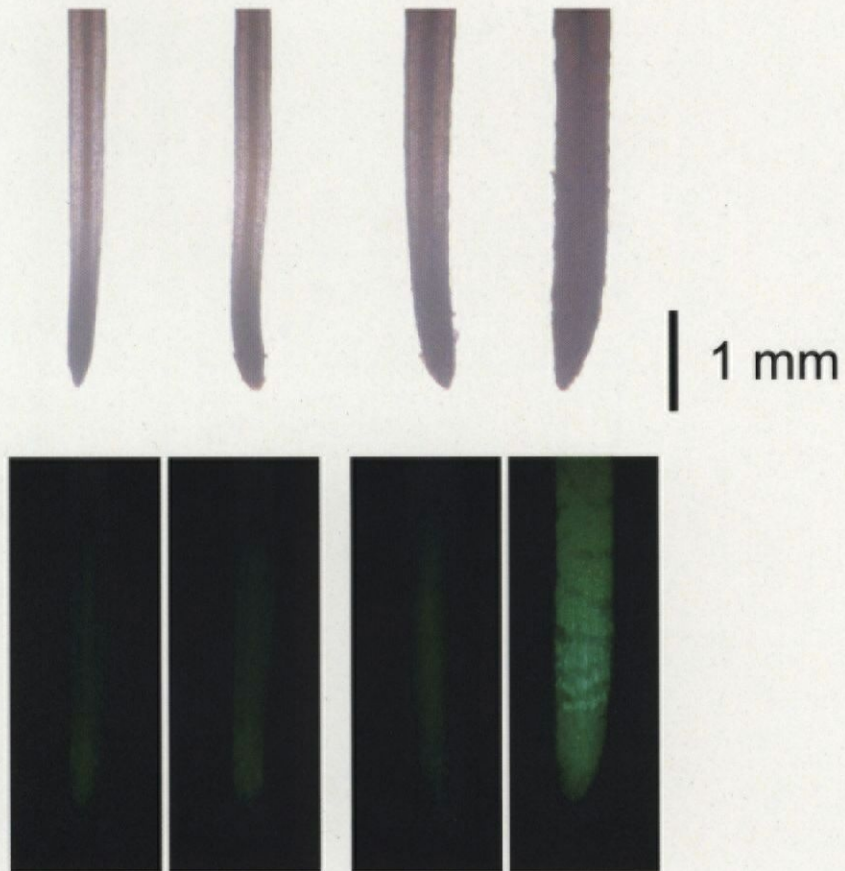


図 5-2a. *Melaleuca cajuputi*と*M. bracteata*の根端のカロース濃度にアルミニウムが及ぼす影響

6時間Al処理した個体の写真を示す。上段は明視野観察、下段は蛍光観察の写真である。

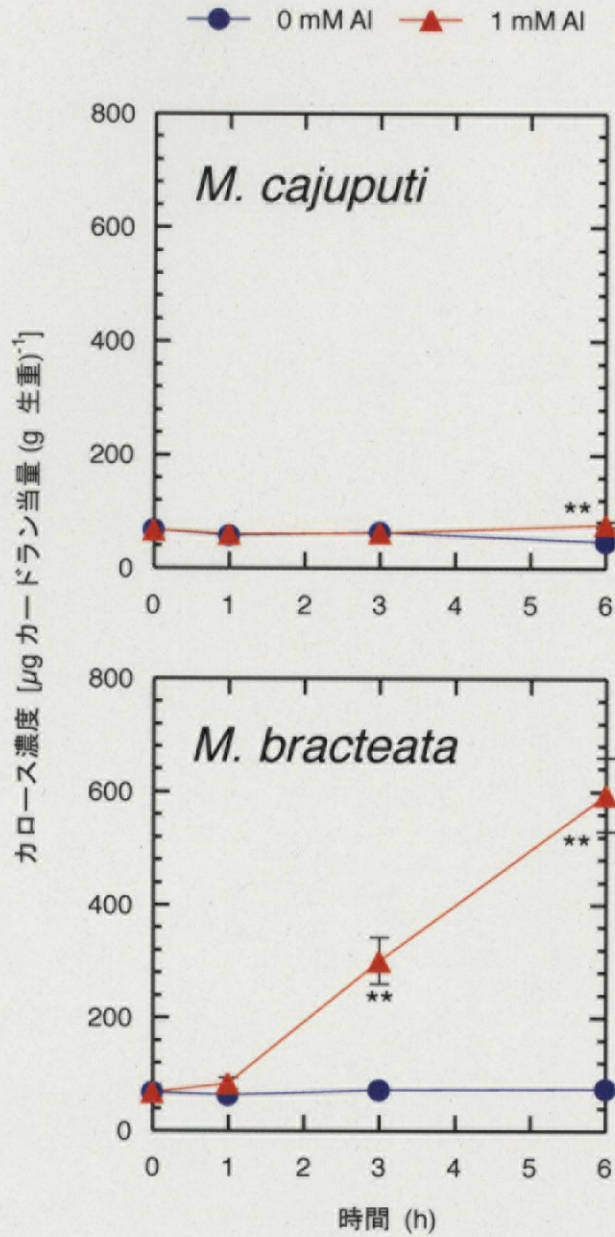


図 5-2b. *Melaleuca cajuputi*と *M. bracteata*の根端のカロース濃度にアルミニウムが及ぼす影響 (続き)

値は平均±標準誤差である ($n=5$)。**は $P<0.01$ 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)。

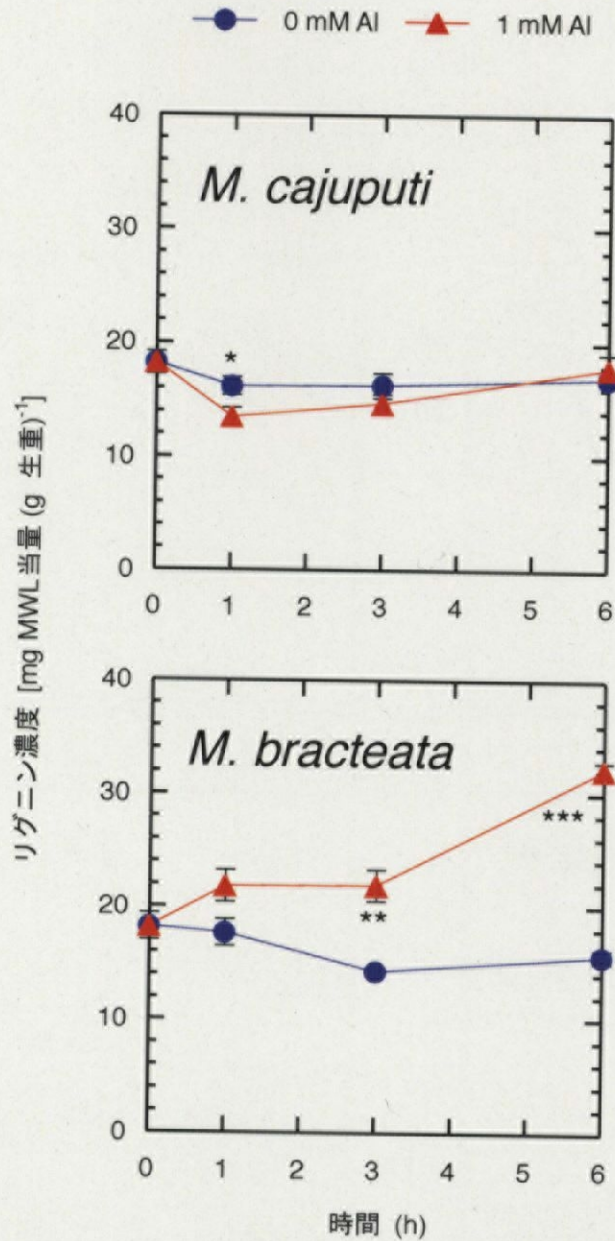


図 5-3. *Melaleuca cajuputi*と *M. bracteata*の根端のリグニン濃度にアルミニウムが及ぼす影響

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区間に有意差があることを示す (t 検定)。

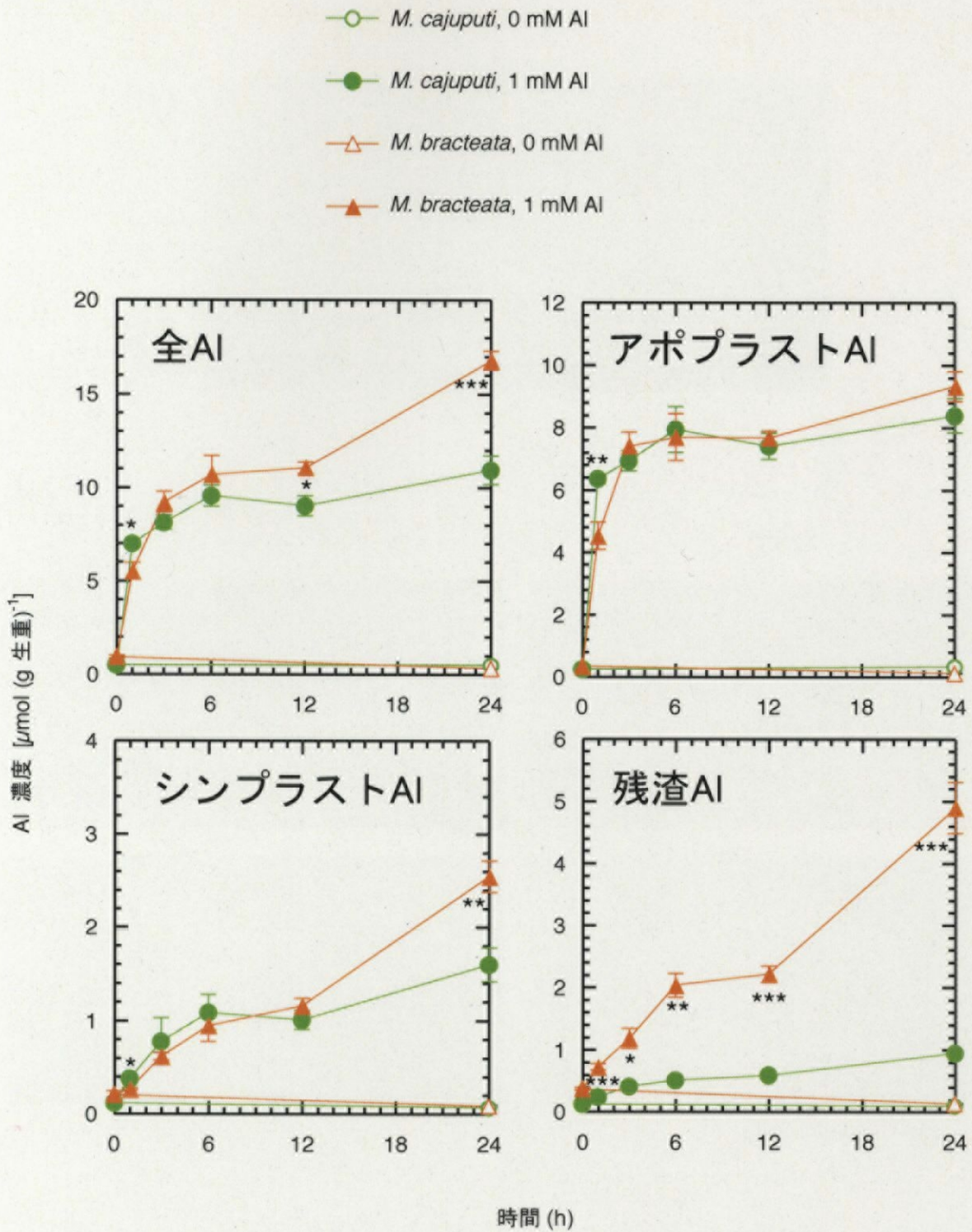


図 5-4. *Melaleuca cajuputi*と *M. bracteata*の根端のアルミニウム濃度

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 *M. cajuputi*と *M. bracteata*の間に違いがあることを示す (t 検定)。

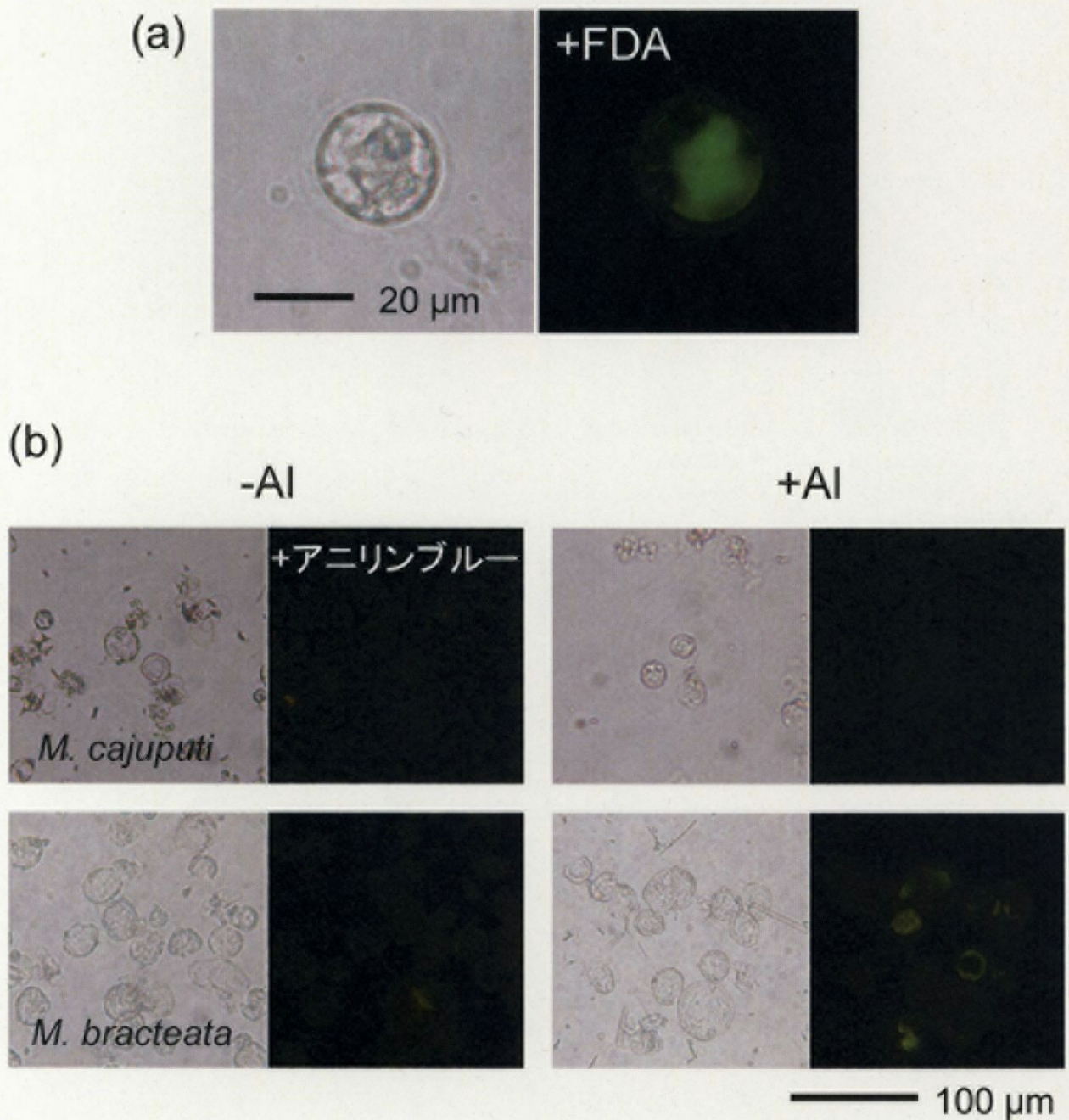


図 5-5. *Melaleuca cajuputi*と*M. bracteata*の根端から単離したプロトプラストにおけるAlによるカロース生成の観察

各々の写真の組で、左側が明視野観察、右側が蛍光観察したものである。(a) 処理後のプロトプラストの生存をFDAによって確認した。写真は*M. cajuputi*の1 mM Al区である。(b) プロトプラストでのカロースの生成をアニリンブルーによって観察した。

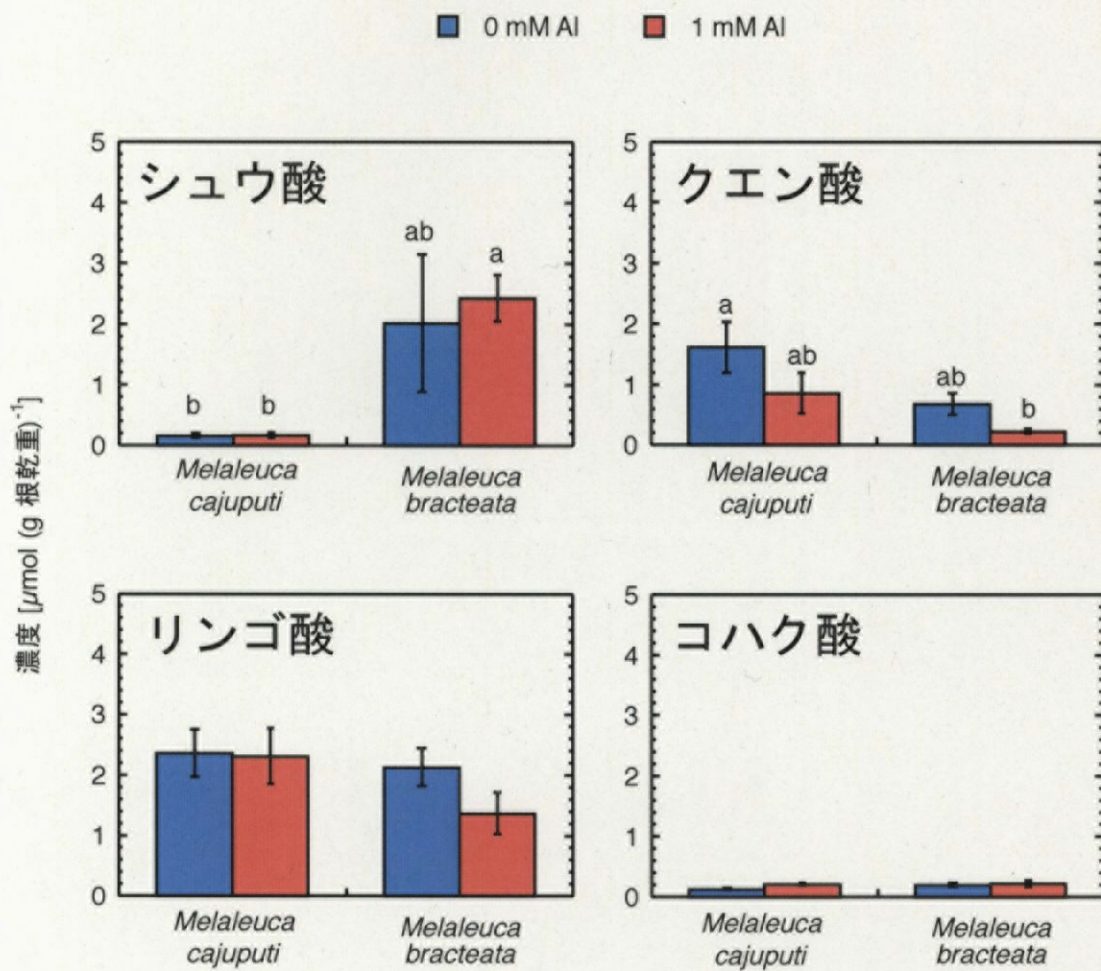


図 5-6. *Melaleuca cajuputi*と *M. bracteata*の根の有機酸濃度

値は平均±標準誤差である (n=6~7)。異なるアルファベットはP<0.05で有意な違いがあることを示す (チューキーの方法)。

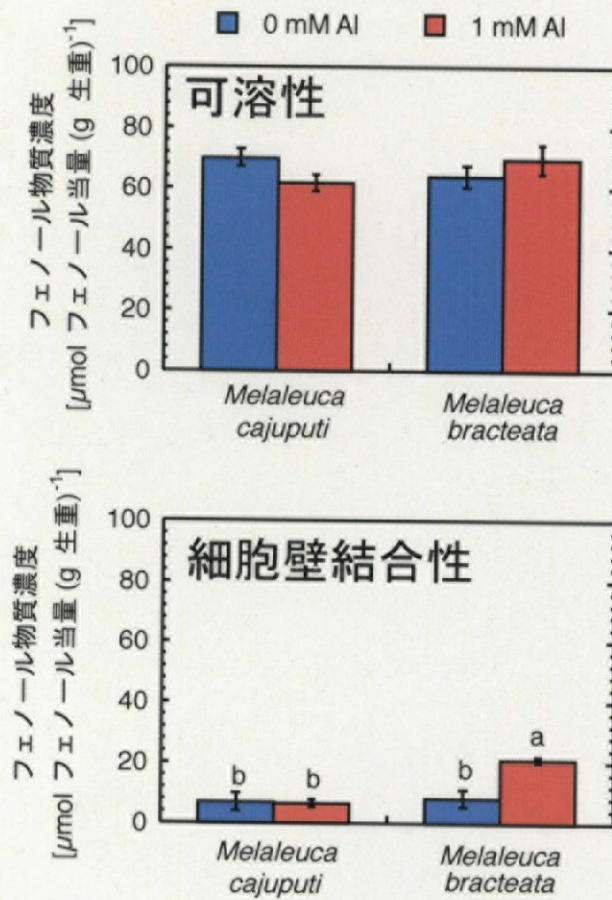


図 5-7. *Melaleuca cajuputi*と *M. bracteata*の根端のフェノール物質濃度

値は平均±標準誤差である ($n=5$)。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)。

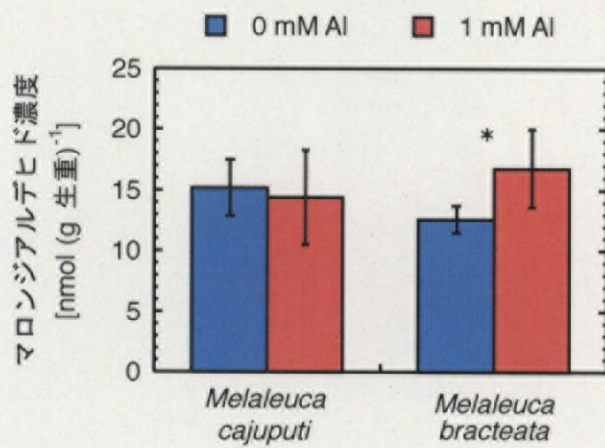


図 5-8. *Melaleuca cajuputi*と *M. bracteata*の根端の脂質過酸化にアルミニウムが及ぼす影響

値は平均±標準誤差である ($n = 7$)。*は $P < 0.05$ で0 mM Al区と1 mM Al区に有意差があることを示す (ウィルコクソン検定, 片側)。

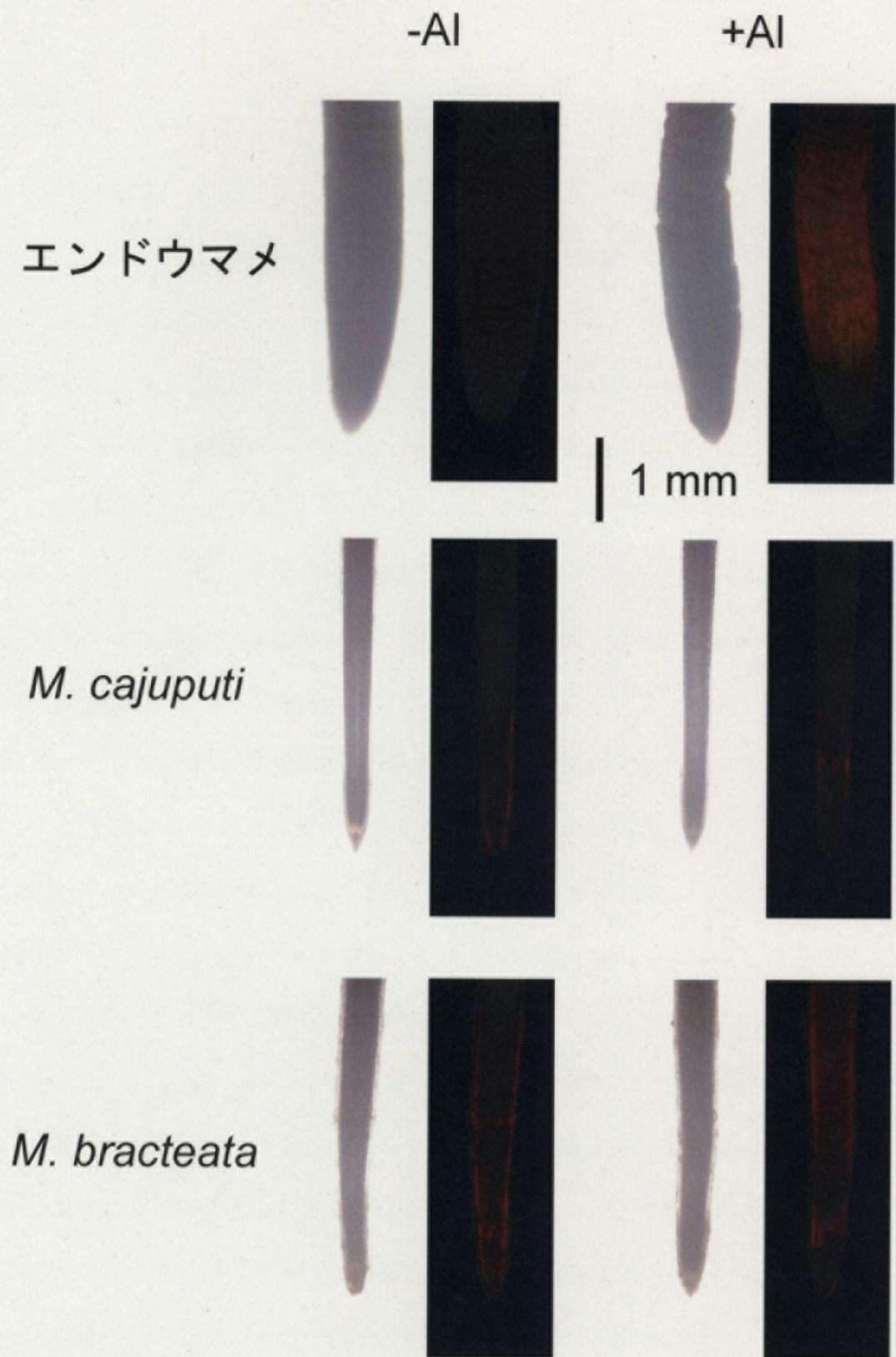


図 5-9. *Melaleuca cajuputi*と*M. bracteata*の根端でのスーパーオキシドの蓄積にアルミニウムが及ぼす影響

6時間Al処理した個体の写真を示す。各処理、左側は明視野観察、右側は蛍光観察の写真である。