

博士論文

ローズガラスにおける塩類腺からの塩類排出と  
マグネシウム過剰に対する反応

平成19年12月

小林 英和

## 目次

序文	1
第1章 ローズグラス耐塩性の他のイネ科牧草との比較	5
第2章 塩類腺からの塩類排出がローズグラス地上部の ミネラル含有率に及ぼす影響	20
第3章 ローズグラス塩類腺におけるナトリウムと カリウムの排出能力の比較	33
第4章 マグネシウム過剰条件下における塩類腺からの塩類排出	48
総合考察	62
要旨	66
略語一覧	70
謝辞	71
引用文献	72

## 序文

土壌の塩類集積は作物の生育や生産性に悪影響を与える要因の一つであり、世界的な問題となっている。塩類集積土壌は、全世界の陸地の約7%にあたる93億ヘクタールに達するとされており (Szabolcs, 1994)、また、全世界の農地約15億ヘクタールのうち、約5%の7700万ヘクタールにおいて塩類集積が生じているとされている (Munns et al., 1999)。塩類集積の原因は様々であり、海水流入などの自然現象に由来するものや、肥料の過剰投入や灌漑といった人間の行動に由来するものなどがあり、日本国内においても、海水流入や台風等による潮風害 (藤井ら, 2006; 山本ら, 2000)、肥料の不適切な利用や施設栽培による塩類集積などの事例 (堀ら, 2002, 2003; 大泉ら, 1979) が報告されている。

集積する塩類の種類や組成は、その原因や環境条件などによって異なり、広く研究が行われている塩化ナトリウム以外にもカリウム、カルシウム、マグネシウム、硝酸、リン酸など様々なイオンが集積することが示されている。このうち、マグネシウムは、肥料や土壌改良資材としても施用される植物の多量必須元素の一つであるが、その一方で、海水中にナトリウムに次いで多く含まれる陽イオンでもある (約 50 mM)。そのため、不適切な施肥や海水流入などにより集積することが示されており (Ammal et al., 1999; 堀ら, 2002)、海水流入によるマグネシウム集積が植物種の分布に影響を与えている事例も報告されている (Wu, 1981)。したがって、マグネシウム過剰による植物への影響を調査することは、植物のマグネシウム過剰耐性の向上につながり、塩類集積地での作物栽培にも貢献するものであると考えられる。また、塩類集積地での作物栽培は、単にその作物の生産というだけでなく、植物を用いた集積塩類の

除去にも結びつく可能性があり (Kumar 1996; Qadir et al., 1996)、植物による環境修復という点からも非常に重要である。

ローズグラス(*Chloris gayana* Kunth)は、イネ科スズメガヤ亜科に属するC<sub>4</sub>植物であり、世界的に広く栽培されている暖地型牧草である(Suttie, 2000)。日本においても、九州や沖縄などを中心に栽培され、暖地型牧草の中では最も栽培面積が広いとされている (澤井ら, 1996)。また、ローズグラスは耐塩性が強いことが示されており、塩類集積地における有望な牧草の一つであると考えられている(Masters et al., 2001)。

これまでに、ローズグラスの耐塩性には、「塩類腺(salt gland)」(図 1)という葉の表面にある特殊な器官が関与していることが示されている (Liphschitz et al., 1974)。塩類腺は、双子葉植物では *Atriplex* 属 (ハマアカザなど)、*Avicennia* 属 (ヒルギダマシなど)、*Limonium* 属 (スターチスなど) などで、単子葉植物では *Zoysia* 属 (シバなど) や *Cynodon* 属 (バミューダグラスなど) 等のイネ科スズメガヤ亜科植物などで確認されており、吸収した塩類の一部を体外に排出し、体内への塩類の過剰蓄積を防ぐ機能を果たしていると考えられている(Fahn, 1988; Liphschitz and Waisel, 1982)。実際に、塩類腺を持つ植物においては、塩類腺における塩類排出能力と耐塩性の間には正の相関があることが示されており、塩類過剰耐性において重要な役割を果たしていると考えられている (de Luca et al., 2001; Marcum et al., 1998; Marcum and Pessaraki, 2006)。しかしながら、塩類腺の研究を含めてこれまで行われてきたローズグラスの耐塩性の研究は、ナトリウム過剰に対するものが中心であり、他のカチオンの過剰に関する研究はほとんどなされていない。

以上のことから、本研究では、塩類腺からの塩類排出を中心に、ローズグラスに対するマグネシウム塩およびナトリウム塩による塩類過剰の

影響を調査し、ローズガラスの異なる塩類過剰に対する耐性の比較と、これらの塩類過剰における塩類腺の働きについて明らかにすることとした。

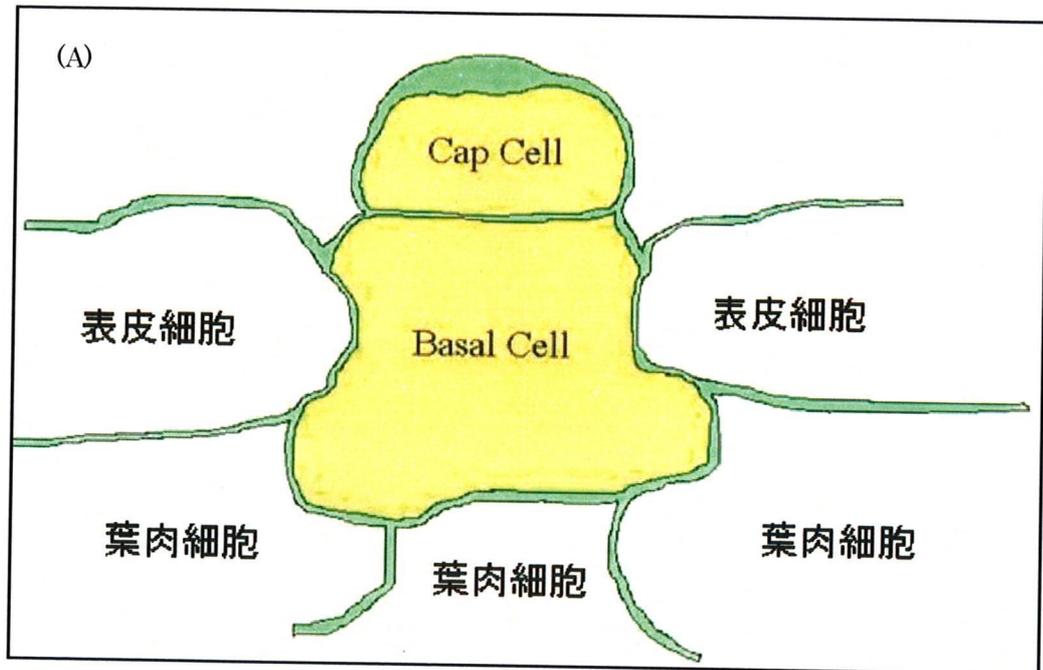


図 1. ローズグラス塩類腺の模式図 (A) 及び塩類腺から排出された塩類 (B)

- (A) 黄色で着色した部分が塩類腺を構成する細胞 (cap cell 及び basal cell)。なお、これらの細胞に関しては、日本語名が定義されていないため、本論文では英語記載とする。
- (B) 葉の表面の白い点が、排出された塩類の結晶。

## 第1章 ローズグラス耐塩性の他のイネ科牧草との比較

塩類過剰は最も重要な農業及び環境問題の一つであることから、イネ科牧草の耐塩性に関しても、これまでに多くの研究がなされている。しかしながら、これまでの研究の多くがナトリウム過剰に関連するものであり、他の陽イオンの過剰に関する研究はナトリウム過剰と比べると非常に少ない。ナトリウム以外の陽イオンが土壌に集積する例はこれまでも多数報告されていること（堀ら, 2002, 2003; 大泉ら, 1979）から、植物の耐塩性に関する研究においては、ナトリウム過剰に関する研究のみならず、他の陽イオン過剰に関する研究を実施することも重要であると考えられる。

その一方で、ナトリウム過剰に耐性を持つ植物は、他の陽イオン過剰に対する耐性も同時に有している可能性が考えられる。これまでにいくつかの植物において、ナトリウムに対する過剰耐性の選抜により、他の陽イオンに対する過剰耐性も向上したことが報告されている（Ashraf et al., 1989; Shah et al., 1993）。もし、このような現象が普遍的であるならば、ナトリウム過剰に関する研究のみを行えば十分であり、ナトリウム以外の陽イオン過剰に関する研究を別途実施する必要性は低いことになる。

そこで、研究の第一段階として、ローズグラスを含む12種類のイネ科牧草について、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム過剰の影響を調べ、これらを比較することによって、「ローズグラスの耐塩性の評価」及び「イネ科牧草におけるナトリウム過剰耐性とマグネシウム過剰耐性の関連性」について検討することとした。

## 材料及び方法

牧草の栽培及び処理は、近畿中国四国農業研究センター大田研究拠点内の人工気象室で行った。気温は、寒地型牧草の試験においては明期 23°C/暗期 15°C、暖地型牧草の試験においては明期 28°C/暗期 20°Cとし、明期 12 時間/暗期 12 時間とした。また、照明は高圧ナトリウムランプ及びメタルハライドランプを用いて、 $480 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度で照射した。

供試したイネ科牧草は寒地型牧草 6 種、暖地型牧草 6 種の計 12 草種 (表 1) で、種子は次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度 2.5%) で殺菌後、0.4% (w/w) の寒天培地を用いて播種及び育苗を行った。各牧草の草丈が 2 ~ 3 cm に達した段階で、発泡スチロール (30cm×45cm、厚さ 2cm) を浮かべたプラスチックタンク (15L) に寒地型牧草 6 種または暖地型牧草 6 種、各草種 6 個体 (合計 36 個体/タンク) を移植し、水耕栽培した。基本水耕液は、 $30 \mu \text{M}$  の Fe-EDTA、0.1mM の NaCl、 $25 \mu \text{M}$  の  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  を添加した 1/3 強度の Hoagland 溶液を用いた (Hoagland and Arnon, 1950)。水耕液は常時通気し、pH は 5.2 となるよう毎日調整した。また、水耕液は、移植 10 日後に交換した。

移植 7 日後、タンク当たり各草種 3 個体を採集した後、塩類過剰処理を開始した。塩類処理はそれぞれの塩類につき処理濃度 6 段階、2 反復とし、塩化カルシウム及び塩化マグネシウム処理では 0, 15, 30, 45, 60, 75mM、塩化ナトリウム処理では 0, 60, 90, 120, 150, 210mM となるよう基本水耕液に処理塩を投与した。なお、処理濃度は、最も耐性が強い草種においても生育量が半減するよう、予備試験の結果をもとに決定した。各植物体は、処理開始 10 日後に採集し、60°C で 72 時間乾燥させ、地上部と地下部を合わせた全植物体の乾燥重を測定した。

以上の実験で得られたデータから、乾燥重の草種間差を補整するため、各草種において塩類を投与しなかった場合（コントロール）に対する相対生育量を計算し、この相対生育量とモデル式を利用して各草種のそれぞれの塩類に対する耐性を評価した。相対生育量は、塩類過剰処理期間中の生育量を処理開始前後の乾燥重の差から求め、塩類を投与しなかった場合（コントロール）の値で割ることにより算出した。その後、コンピュータソフトウェア JMP（version 4.0.5J, SAS Institute Inc.）を用いて、van Genuchten and Hoffman (1984)のモデル式

$$Y = Y_m / [1 + (C / C_{50})^P]$$

Y: 各濃度での相対生育量、Y<sub>m</sub>: コントロールの相対生育量(=1)、

C: 処理濃度、C<sub>50</sub>: 相対生育量が半減する処理濃度、P: 定数

に当てはめ、C<sub>50</sub>を推定した。モデル式の精度は、Royo and Aragüés (1993, 1999)による3つの基準、(a)Yの推定値と実測値の間に有意な相関があること、(b)C<sub>50</sub>の値は0と有意に異なること、(c)C<sub>50</sub>の標準誤差はC<sub>50</sub>の値の25%以下であること、に合致するかどうかで検討した。

表 1. 供試草種

	学名	品種
寒地型牧草		
イタリアンライグラス	<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	ニオウダチ
ケンタッキーブルーグラス	<i>Poa pratensis</i> L.	アワード
オーチャードグラス	<i>Dactylis glomerata</i> L.	オカミドリ
ペレニアルライグラス	<i>Lolium perenne</i> L.	フレンド
レッドトップ	<i>Agrostis alba</i> L.	— <sup>S)</sup>
トールフェスク	<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.	サザンクロス
暖地型牧草		
バヒアグラス	<i>Paspalum notatum</i> Flugge	— <sup>S)</sup>
栽培ヒエ	<i>Echinochloa utilis</i> Ohwi et Yabuno	白ヒエ
バミューダグラス	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	Giant Bermuda cough
シコクビエ	<i>Eleusine coracana</i> (L.) Gaertn.	— <sup>T)</sup>
ローズグラス	<i>Chloris gayana</i> Kunth	アサツユ
ウィーピングラブグラス	<i>Eragrostis curvula</i> Nees	— <sup>S)</sup>

<sup>S)</sup> 雪印種苗より購入。

<sup>T)</sup> タキイより購入。

## 結果

まず、本実験で得られた塩濃度と生育との関係が van Genuchten and Hoffman (1984)のモデル式によく当てはまっているかどうかについて検討した。決定係数はいずれの草種においても  $R^2 > 0.89$  と非常に高く(表 2)、Yの推定値と実測値の間に 1%水準で有意な相関が認められた。また、各  $C_{50}$  値は 0 と 5%水準で有意に異なっており、各  $C_{50}$  値の標準誤差は  $C_{50}$  値そのものの 25%以下であった(表 2)。以上のように、いずれの草種においても Royo and Aragüés (1993, 1999)による 3つの基準に合致していたことから、本実験で得られた塩濃度と生育との関係は van Genuchten and Hoffman (1984)のモデル式によく当てはまっていると考えられた。そこで、各草種における塩類過剰耐性の比較の指標として、モデル式より得られた  $C_{50}$  値を用いることとした。

塩化カルシウム過剰に対する各草種の反応は図 2 のようになり、 $C_{50}$  の推定値は表 2 のようになった。寒地型牧草においては、耐性が最も強い草種はトールフェスク、最も弱い草種はケンタッキーブルーグラスであり、トールフェスクの  $C_{50}$  値はケンタッキーブルーグラスの値の約 1.9 倍であった。暖地型牧草においては、耐性が最も強い草種はバミューダグラス、最も弱い草種はウィーピングラブグラスであり、バミューダグラスの  $C_{50}$  値はウィーピングラブグラスの値の約 1.9 倍であった。ローズグラスの塩化カルシウム過剰耐性は、暖地型牧草においては 6 草種中 2 番目、全体では 12 草種中 4 番目に強かった。

塩化マグネシウム過剰に対する各草種の反応は図 3 のようになり、 $C_{50}$  推定値は表 2 のようになった。寒地型牧草においては、耐性が最も強い草種はトールフェスク、最も弱い草種はオーチャードグラスであり、トールフェスクの  $C_{50}$  値はオーチャードグラスの値の約 2 倍であった。暖地

型牧草においては、耐性が最も強い草種はバヒアグラス、最も弱い草種は栽培ヒエであり、バヒアグラスの $C_{50}$ 値は栽培ヒエの値の約 2.1 倍であった。ローズグラスの塩化マグネシウム過剰耐性は、暖地型牧草においては 6 草種中 5 番目、全体で 12 草種中 11 番目に強かった。

塩化ナトリウム過剰に対する各草種の反応は図 4 のようになり、 $C_{50}$ の推定値は表 2 のようになった。寒地型牧草においては、耐性が最も強い草種はトールフェスク、最も弱い草種はレッドトップであり、トールフェスクの $C_{50}$ 値はレッドトップの値の約 1.3 倍であった。暖地型牧草においては、耐性が最も強い草種はバミューダグラス、最も弱い草種はウィーピングラブグラスであり、バミューダグラスの $C_{50}$ 値はウィーピングラブグラスの値の約 4.2 倍であった。ローズグラスの塩化ナトリウム過剰耐性は、暖地型牧草においては 6 草種中 2 番目、全体では 12 草種中 4 番目に強かった。

3 種類の塩類に対する過剰耐性の関連性を明らかにするため、各塩類処理間における供試草種の $C_{50}$ 値の相関を調査した(図 5)。その結果、塩化カルシウム処理と塩化ナトリウム処理の間に有意な正の相関が認められたが ( $r = 0.783, P = 0.0026$ )、塩化マグネシウム処理と他の 2 処理との間には有意な相関が認められなかった ( $P > 0.05$ )。

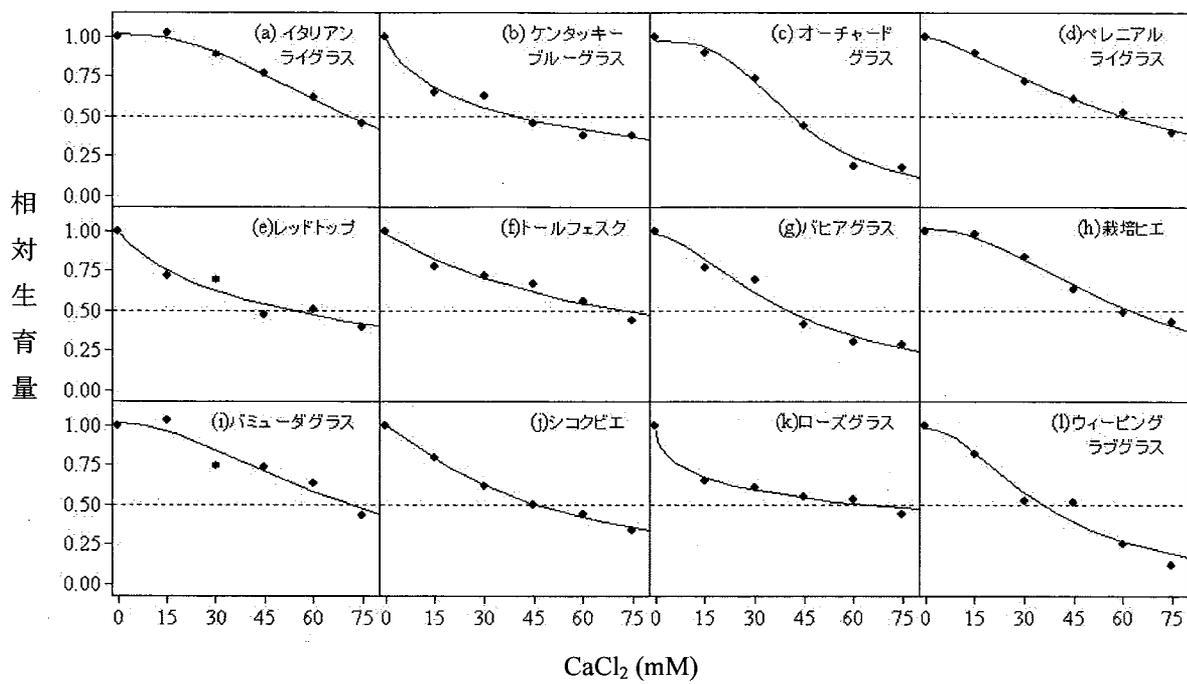


図 2. 塩化カルシウム過剰処理による相対生育量への影響

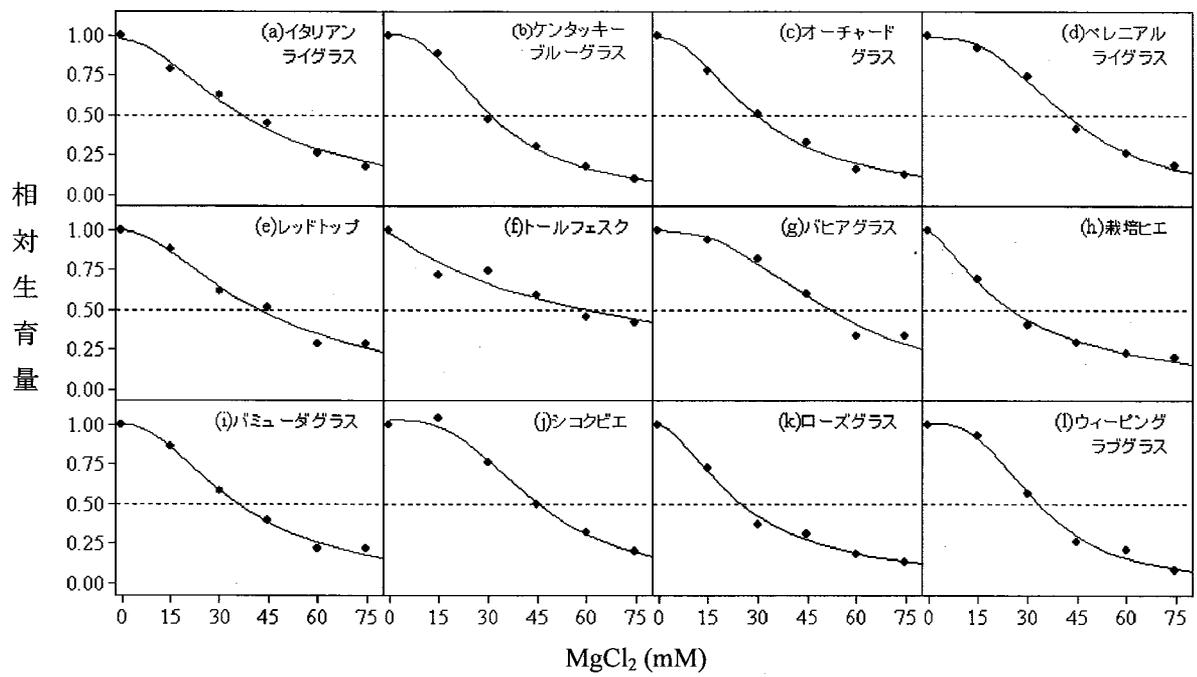


図 3. 塩化マグネシウム過剰処理による相対生育量への影響

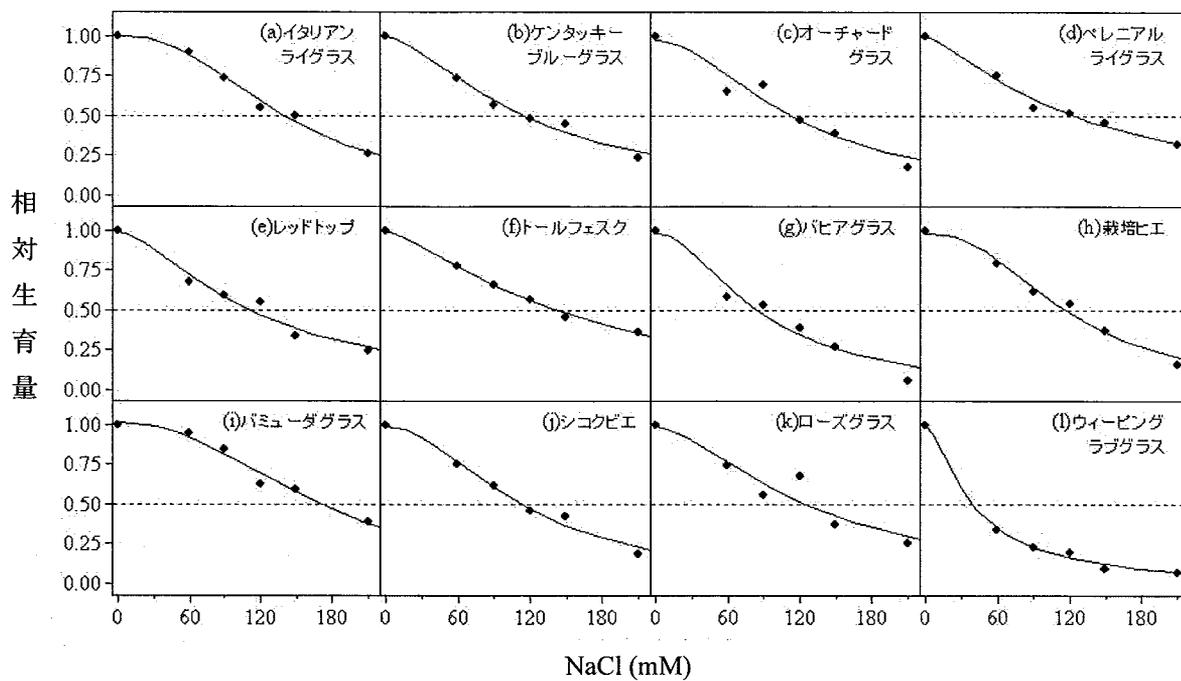


図 4. 塩化ナトリウム過剰処理による相対生育量への影響

表 2. CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 及び NaCl 過剰処理における C<sub>50</sub> 値及び決定係数 (R<sup>2</sup>)

	コントロール乾燥重*			CaCl <sub>2</sub>			MgCl <sub>2</sub>			NaCl		
	コントロール乾燥重* (mg plant <sup>-1</sup> )	C <sub>50</sub> (mM)	R <sup>2</sup>	C <sub>50</sub> (mM)	R <sup>2</sup>	C <sub>50</sub> (mM)	R <sup>2</sup>	C <sub>50</sub> (mM)	R <sup>2</sup>	C <sub>50</sub> (mM)	R <sup>2</sup>	
<b>寒地型牧草</b>												
イタリアンライグラス	298	70.4±2.1	0.994	37.9±3.2	0.987	139.0±6.0	0.991					
ケンタッキーブルーグラス	28	39.7±7.0	0.972	30.5±1.6	0.995	115.4±9.2	0.984					
オーチャードグラス	102	41.9±2.4	0.989	30.0±1.5	0.996	115.6±17.3	0.941					
ペレニアルライグラス	171	60.0±2.8	0.994	42.1±1.6	0.996	122.7±10.2	0.984					
レッドトップ	31	53.3±11.1	0.948	42.0±3.6	0.984	111.9±13.2	0.968					
トールフェスク	94	74.4±13.1	0.954	61.0±13.0	0.933	141.0±4.5	0.997					
<b>暖地型牧草</b>												
バヒアグラス	134	40.7±5.1	0.970	52.0±3.4	0.981	85.9±12.5	0.960					
栽培ヒエ	2039	60.8±2.9	0.989	25.0±1.7	0.995	118.1±7.5	0.986					
バミューダグラス	294	69.4±9.7	0.921	35.9±1.9	0.994	168.3±11.3	0.975					
シコクビエ	1082	45.9±1.8	0.997	44.4±2.1	0.992	114.3±8.1	0.985					
ローズグラス	449	64.1±12.7	0.983	25.1±2.2	0.991	126.1±25.1	0.897					
ウィーピングラブグラス	85	35.9±5.9	0.955	33.0±1.7	0.994	39.9±4.7	0.997					

\* コントロールの乾燥重は、3種の塩類過剰処理試験の平均値。C<sub>50</sub>値は、推定値±標準誤差。

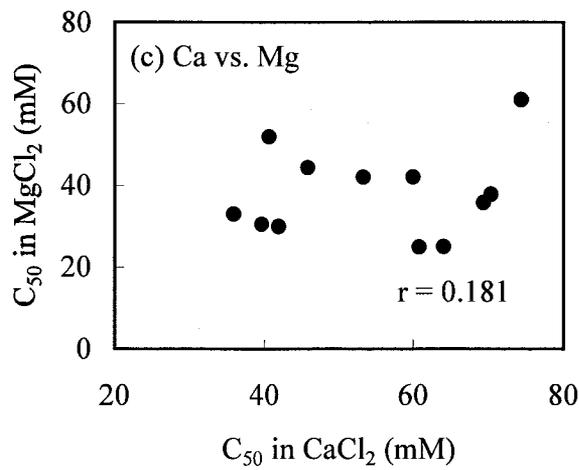
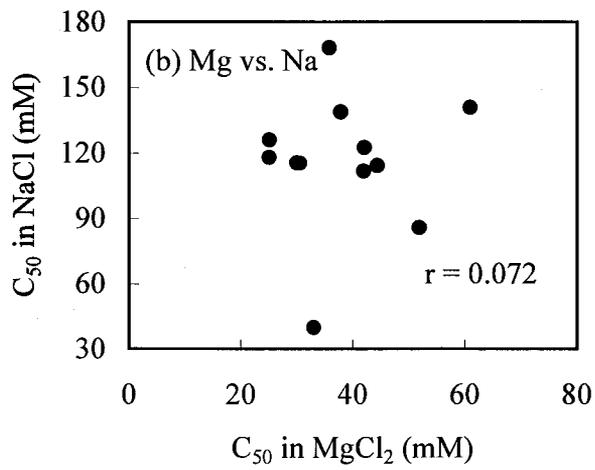
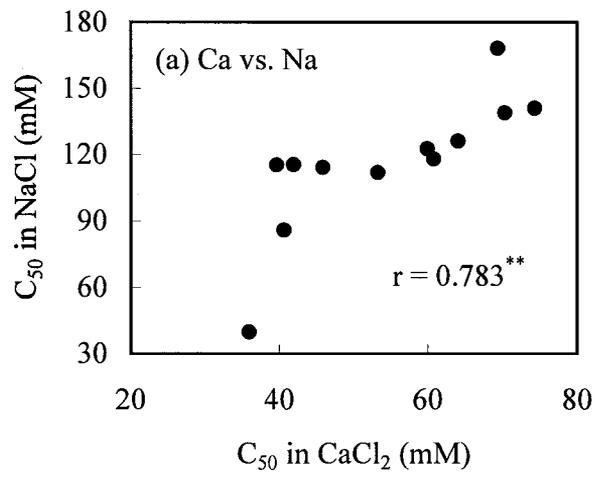


図 5. 塩化カルシウム、塩化マグネシウム及び塩化ナトリウム過剰処理間におけるC<sub>50</sub>値の相関

\*\* 1%水準で有意差あり。

## 考察

イネ科牧草の生育に対する各塩類過剰の影響は、草種間および塩類間で大きく異なっていた(表 2)。ローズグラスの各塩類過剰に対する耐性を他のイネ科牧草と比較すると、ローズグラスは供試した 12 種類のイネ科牧草の中では塩化カルシウム過剰及び塩化ナトリウム過剰に対しては耐性が強い草種に分類されたのに対し (12 草種中 4 番目)、塩化マグネシウム過剰に対しては弱い草種に分類された (12 草種中 11 番目)。これらのことから、ローズグラスの塩類過剰に対する耐性は、塩化ナトリウム過剰と塩化マグネシウム過剰とで大きく異なることが明らかになった。

ローズグラスにおける $C_{50}$ 値 (50%生育阻害濃度) を塩類間で比較すると、マグネシウム過剰における $C_{50}$ 値 (25.1 mM) はナトリウム過剰における値 (126.1 mM) の 5 分の 1 であった(表 2)。これらの塩類濃度における塩素イオン濃度を計算すると、塩化マグネシウム過剰は 50.2 mM、塩化ナトリウム過剰は 126.1 mMとなり、塩化マグネシウム過剰では塩化ナトリウム過剰の半分以下であった。このことから、ローズグラスにおける塩化ナトリウム過剰耐性と塩化マグネシウム過剰耐性の相違は、塩素濃度の違いに起因するものではなく、陽イオンが原因であることが考えられ、マグネシウムはナトリウムと比べて非常に低い濃度でローズグラスの生育を阻害することが考えられた。

次に、イネ科牧草全体における異なる塩類過剰の関連性について検討するため、各塩類過剰処理間における $C_{50}$ 値の相関について調査したところ、塩化カルシウム処理と塩化ナトリウム処理の間に有意な正の相関が認められ(図 5)、塩化カルシウム過剰耐性と塩化ナトリウム過剰耐性の間に何らかの関連がある可能性が考えられた。

これまでにいくつかの植物において、あるイオンに対する過剰耐性の

選抜により、他のイオンに対する過剰耐性も強くなる現象が報告されている (Hodson et al., 1981; Shah et al., 1993)。このような現象について、Cox and Hutchinson (1979)は *Deschampsia cespitosa* の重金属過剰耐性の研究から、重金属に対する耐性メカニズムには共通の機構があり、ある重金属に対する耐性の向上が、他の重金属に対する耐性の向上にもつながるといふ仮説を提示している。同様の仮説が今回認められた塩化カルシウム過剰と塩化ナトリウム過剰の間にもあてはまる可能性が考えられ、実際に、カンキツのカルスやイネ科植物において、塩化ナトリウム過剰耐性で選抜した系統では塩化カルシウム過剰耐性も強くなることが報告されている (Ashraf et al., 1989; Ben-Hayyim et al., 1987)。

塩化マグネシウム処理に関しては、塩化カルシウム処理及び塩化ナトリウム処理との間に、 $C_{50}$ 値の有意な相関は認められなかった(図 5)。「塩化ナトリウム過剰耐性で選抜した系統では塩化カルシウム過剰耐性も強くなる」といふ前述のAshrafらの研究(Ashraf et al., 1989)において、塩化マグネシウム過剰耐性についても検討がなされているが、塩化ナトリウム過剰耐性の選抜により塩化マグネシウム過剰耐性も向上したものは、供試したイネ科植物 4 草種のうち 1 草種しかなかった。これらのことから、ローズグラスを含めたイネ科植物においては、マグネシウム過剰に対する耐性機構はナトリウム過剰やカルシウム過剰に対する耐性機構と異なるメカニズムであることが考えられた。

以上の結果から、イネ科牧草においては、塩化ナトリウム過剰耐性と塩化カルシウム過剰耐性の間には共通性があるが、塩化マグネシウム過剰耐性はこれらの過剰耐性とは共通性が低いことが考えられた。また、ローズグラスに関しても、塩化カルシウム過剰及び塩化ナトリウム過剰に対しては耐性が強い草種に分類されるが、塩化マグネシウム過剰に対

しては耐性が劣る草種に分類されるというように、ナトリウム過剰とマグネシウム過剰に対する耐性は大きく異なっていた。そこで、次章以降において、ローズグラスの耐塩性機構として重要であるとされている塩類腺に着目し、ナトリウム過剰及びマグネシウム過剰に対する塩類腺の反応と体内ミネラル含有率に及ぼす影響について調査を行うこととした。

## 摘要

ローズグラスを含むイネ科牧草 12 草種を対象に、3 種類の塩類過剰による生育への影響を水耕条件で調査した。ローズグラスは、塩化カルシウム過剰及び塩化ナトリウム過剰に対しては強い草種に分類されたが、塩化マグネシウム過剰に対しては弱い草種に分類された。また、各草種の  $C_{50}$  (50%生育阻害濃度) を用いて各塩類処理の影響を比較したところ、塩化カルシウム処理と塩化ナトリウム処理の間には有意な正の相関が認められたが、塩化マグネシウム処理については他の塩類処理との間に相関が認められなかった。これらのことから、塩化カルシウム過剰耐性と塩化ナトリウム過剰耐性の間には共通のメカニズムが存在するが、塩化マグネシウム過剰耐性については、他の 2 種類の塩類に対する耐性と異なるメカニズムであることが考えられた。

## 第2章 塩類腺からの塩類排出がローズガラス地上部の ミネラル含有率に及ぼす影響

塩類過剰が植物のミネラル含有率に及ぼす影響は、これまでに様々な植物で解析されており、処理塩に含まれるミネラルの過剰蓄積や、処理塩に含まれないミネラルの吸収及び移行が阻害されることによる含有率の低下が示されている (Fageria 1983; Grant and Racz, 1987; Kent and Lauchli, 1985; Kim et al., 1999; Kurita, 1990)。加えて、ローズガラスにおいては、序章で述べたように葉に「塩類腺」という特殊な器官が存在するため、この塩類腺からの塩類排出も体内のミネラル含有率に影響を与えることが考えられる。しかしながら、ローズガラスにおいては、塩化ナトリウム過剰の影響に関しては研究されているものの(de Luca et al., 2001; Taleisnik et al., 1997)、他の塩類の過剰に関する研究はなされておらず、またナトリウム以外のミネラルの塩類腺からの排出に関してもよく分かっていない。

以上のことから、本章においては、根部への塩化ナトリウム、塩化カリウム及び塩化マグネシウム過剰処理を行い、これらの処理によるローズガラス塩類腺からの塩類排出と体内ミネラル含有率に対する影響について検討した。

## 材料及び方法

牧草の栽培及び処理は、前章と同じ人工気象室で行い、気温は明期 25°C / 暗期 20°C (明期 14 時間 / 暗期 10 時間) とした。ローズグラス種子 (品種アサツユ) は次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度 2.5%) で殺菌後、1/5 強度のHoagland溶液 (Hoagland and Arnon, 1950) を含む 0.4%(w/w)の寒天培地で播種及び育苗を行い、播種 14 日後、3.6Lの水耕液を入れた 1/5000aワグネルポットに 4 個体ずつ移植した。基本水耕液は、40  $\mu$  MのFe-EDTA及び 500  $\mu$  MのNa<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>を添加した 1/3 強度のHoagland溶液を用いた。水耕液は常時通気し、pHは 5.4 となるよう毎日調整した。また、水耕液は、移植 8 日後及び 15 日後に交換した。

移植 8 日後、ポット当たり 2 個体に間引きした後、塩類過剰処理を開始した。処理は、50mM の塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム処理及びコントロールとし、基本水耕液に塩類を添加した。

移植 20 日後 (処理開始 12 日後)、地上部を採集し、50mL の蒸留水を入れた試験管に入れて 10 秒間振り、排出された塩類を採集した。その後、地上部は 60°C で 72 時間乾燥させ、乾燥重を測定した。また、排出された塩類を採集した溶液は冷凍保存し、ミネラル及び塩素の分析に用いた。

地上部のミネラル含有率は、粉碎試料を 450°C で 7 時間灰化し、4M の硝酸で溶解させ、原子吸光光度計 (島津製作所製 AA-6200) を用いて測定した。塩素含有率は、蒸留水を用いて粉碎試料を常温下で 1 時間抽出し、イオンクロマトグラフィー (東ソー製、カラム: TSKgel IC-Anion-PW 4.6mmI.D.×5cm、検出器: UV-8000 (230nm)) を用いて測定した。また、排出された塩類に関しては、採集液をそのまま用いて、原子吸光光度計及びイオンクロマトグラフィーで分析した。統計処理は、以降のすべての章に共通して、2 群間の比較においては t-test、3 群以上における全群

間の比較では Tukey 法、3 群以上におけるコントロールと処理との比較  
においては Dunnett 法を用いた（永田及び吉田, 1997）。

## 結果

各塩類処理(50mM)はローズガラス地上部乾燥重に有意な影響を与え、いずれの処理もコントロールに比べ乾燥重を減少させた(図 6)。特に、塩化マグネシウム処理は影響が大きく、他の塩類処理よりも乾燥重を有意に減少させた。また、塩化ナトリウム処理と塩化カリウム処理の間には有意差が認められなかった。

塩類処理が地上部のミネラル含有率に与える影響は、塩類により異なっていた(表 3)。塩化ナトリウム処理はナトリウム含有率を有意に増加させ、カリウム含有率を有意に減少させた。塩化カリウム処理はカリウム含有率を有意に増加させ、ナトリウム含有率を有意に減少させた。塩化マグネシウム処理はマグネシウム含有率を有意に増加させ、ナトリウム含有率、カリウム含有率、カルシウム含有率を有意に減少させた。また、いずれの塩類処理もコントロールに比べ塩素含有率を有意に増加させた。

また、各塩類処理はローズガラス塩類腺からのミネラル排出にも様々な影響を与えた(表 4)。塩化ナトリウム処理はナトリウム排出量を有意に増加させた。塩化カリウム処理はカリウム排出量を有意に増加させ、ナトリウム排出量を有意に減少させた。塩化マグネシウム処理はマグネシウム排出量を有意に増加させたが、ナトリウムやカリウムと比べると、その排出量は少なかった。さらに、塩化マグネシウム処理はカリウム排出量を大幅に増加させた。また、いずれの塩類処理もコントロールに比べ塩素排出量を有意に増加させた。

各ミネラルの排出効率について検討するため、それぞれのミネラルについて含有率に対する排出量の比(排出量/含有率)を求め、表 5 に示す。各ミネラル処理条件下での含有率に対する排出量の比は、ナトリウ

ムが最も高く 0.87、カリウムは 0.36、マグネシウムは 0.023 であり、いずれの間にも有意差が認められた。

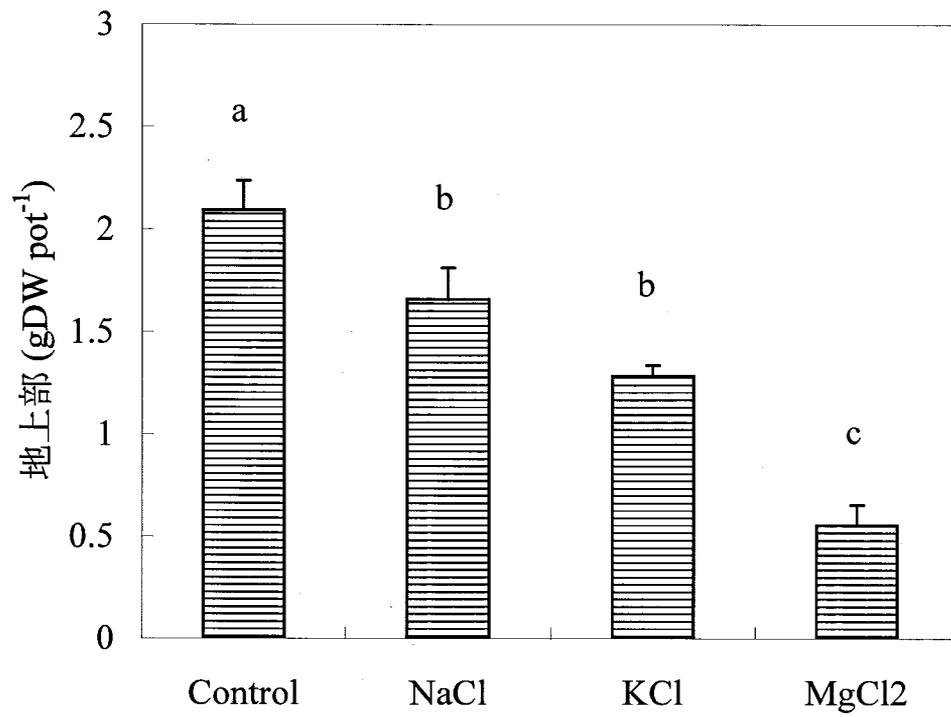


図 6. 50mMの塩類過剰処理がローズグラス地上部乾燥重に及ぼす影響

各値は、3ポット(2個体/ポット)の平均値±標準誤差を示す。  
 異文字間には5%水準で有意差あり(Tukey法)。

表 3. 50mM の塩類過剰処理がローズガラス地上部のミネラル含有率に及ぼす影響

	含有率 ( $\mu\text{ mol g}^{-1}\text{DW}$ )				
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>
Control	122 ±10	1406 ±49	77 ±5	81 ±8	200 ±16
NaCl	853 * ±56	797 * ±18	65 ±6	66 ±2	341 * ±23
KCl	54 * ±3	1618 * ±26	63 ±2	58 ±2	413 * ±8
MgCl <sub>2</sub>	45 * ±4	725 * ±38	487 * ±18	35 * ±2	358 * ±27

各数値は、3 ポット (2 個体/ポット) の平均値±標準誤差を示す。

\* はコントロールとの間に5%水準で有意差があることを示す (Dunnett 法)。

表 4. 50mM の塩類過剰処理が塩類腺からのミネラル排出量に及ぼす影響

	排出量 ( $\mu\text{ mol g}^{-1}\text{DW}$ )				
	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Cl}^-$
Control	95 $\pm 7$	224 $\pm 28$	0.7 $\pm 0.1$	2.2 $\pm 0.4$	47 $\pm 12$
NaCl	745 * $\pm 61$	132 $\pm 16$	0.8 $\pm 0.1$	2.3 $\pm 0.2$	347 * $\pm 20$
KCl	64 * $\pm 3$	582 * $\pm 97$	1.0 $\pm 0.1$	2.0 $\pm 0.3$	316 * $\pm 50$
$\text{MgCl}_2$	92 $\pm 4$	644 * $\pm 111$	11.4 * $\pm 3.1$	1.9 $\pm 0.1$	365 * $\pm 82$

各数値は、3 ポット (2 個体/ポット) の平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。

\* はコントロールとの間に 5%水準で有意差があることを示す (Dunnett 法)。

表 5. ローゼグラスの塩類腺における各ミネラルの排出効率

処理	排出量 / 含有率		
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
Control	0.78±0.12 bc	0.16±0.03 d	0.009±0.002 f
NaCl	0.87±0.09 b	0.17±0.02 d	0.012±0.003 ef
KCl	1.19±0.03 ab	0.36±0.06 cd	0.016±0.003 ef
MgCl <sub>2</sub>	2.13±0.33 a	0.91±0.18 b	0.023±0.011 e

各数値は、3 ポット (2 個体/ポット) の平均値±標準誤差を示す。

異文字間には5%水準で有意差あり (Tukey 法)。

## 考察

前章の結果と同様に、塩化マグネシウム過剰処理は、塩化ナトリウム過剰処理よりも、ローズグラスの生育に対する阻害作用が大きかった(図6)。また、過剰処理による地上部のミネラル含有率への影響は、塩化ナトリウム処理と塩化マグネシウム処理で異なっており、塩化ナトリウム処理においては、ナトリウム含有率の増加とカリウム含有率の減少のみに有意差が認められたのに対し、塩化マグネシウム処理では、マグネシウム含有率の増加とナトリウム、カリウム、カルシウム含有率の減少に有意差が認められた(表3)。これまでに、マグネシウム過剰による植物の生育阻害の要因として、オオムギではマグネシウムの過剰蓄積、ヒエではカルシウム欠乏、イネやグアユールゴムノキではカリウム欠乏及びカルシウム欠乏が挙げられている (Fageria, 1983; Grant and Racz, 1987; Kobayashi et al., 2005; Kurita, 1990)。また、C<sub>4</sub>植物であるローズグラスはナトリウムを積極的に吸収し、一定の範囲ではナトリウム処理がローズグラスの生育を促進することが示されていることから(安藤ら, 1979; 尾形ら, 1979)、ナトリウム含有率の減少もローズグラスの生育阻害を引き起こす可能性が考えられる。これらのことから、塩化マグネシウム過剰処理は塩化ナトリウム過剰処理よりも多くのミネラルの含有率に影響を与え、これらが複合的に作用することにより、ローズグラスにおける著しい生育阻害が生じていると考えられた。

次に、このようなミネラル含有率の変動に対する塩類腺からの塩類排出の影響について検討するため、処理終了時に葉の表面に排出されていた塩類の調査を行った(表4)。各塩類処理は、その処理塩に含まれるミネラルの排出量を有意に増加させたが、その増加量はミネラルによって大きく異なっていた。処理による排出の増加はナトリウムが最も大きく

(表 4)、また、塩化ナトリウム処理下では含有率の約 9 割に相当する量のナトリウムが塩類腺により排出されており(表 5)、ローズグラスの塩類腺は体内へのナトリウム蓄積の軽減に大きな役割を果たしていると考えられた。塩類腺からのカリウム排出はナトリウムに比べると少なく(表 4)、塩化カリウム処理下では含有率の約 4 割相当のカリウムが排出されていた(表 5)。塩類腺からのマグネシウム排出はさらに少なく(表 4)、塩化マグネシウム処理下でも含有率の 2% ほどしかマグネシウムは排出されていなかった(表 5)。このような他のミネラルと比べて高いナトリウム排出能力は、他のイネ科スズメガヤ亜科植物の塩類腺でも報告されており(Pollak and Waisel, 1970; Rozema et al., 1981; Wieneke et al., 1987)、イネ科スズメガヤ亜科植物における共通の性質であることが考えられた。

ローズグラス塩類腺からの塩類排出は、処理塩に含まれていないミネラルの排出にも影響を与えた。塩化マグネシウム処理はマグネシウム排出だけでなくカリウム排出も増加させたが、その増加量はマグネシウム排出よりもはるかに大きかった(表 4)。一方、塩化マグネシウム処理下では体内のカリウム含有率が有意に減少しており(表 3)、塩類腺からのカリウム排出が塩化マグネシウム処理下での体内カリウム含有率減少の要因となっていることが考えられた。それに対し、塩化ナトリウム処理下でもカリウム含有率は減少していた(表 3)が、カリウム排出量は増加しておらず(表 4)、塩化ナトリウム処理によるカリウム含有率の減少は、カリウムの根での吸収または地上部への移行に対する阻害が要因である可能性が考えられた。同様に、塩化カリウム処理下のナトリウム含有率、塩化マグネシウム処理下のナトリウム及びカルシウム含有率の減少(表 3)に関しても、塩類処理によるこれらのミネラルの排出量の増加が認められなかったこと(表 4)から、根での吸収または地上部への移行の阻害

が、含有率減少の主因であると推察された。

このように塩化マグネシウム過剰処理は、マグネシウム排出よりもむしろカリウム排出を大幅に増加させたが、この現象は他のいかなる植物種においても報告されていない。この現象は、排出されにくいマグネシウムに対するカリウムの代替的な排出である可能性が考えられるが、ローズガラス塩類腺からの塩類排出メカニズムに関しては不明な点が多く、このような現象が生じる原因を考察するためにはあまりにもその情報が不足している。そこで、根での吸収や地上部への移行段階での影響を排除するため切断葉を用い、ローズガラス塩類腺からの塩類排出に関するより詳細な研究を次章以降において行うこととした。

本章の結果から、ローズガラスにおいては、塩化マグネシウム過剰は塩化ナトリウム過剰と比べてより多くのミネラルの地上部含有率に影響を与えることが明らかとなり、それらが複合的に作用して塩化マグネシウム過剰による著しい生育阻害が生じている可能性が示された。また、このようなローズガラス地上部のミネラル含有率の変動は、ミネラルの根での吸収や地上部への移行だけではなく、塩類腺からの塩類排出もその原因の一つとなっていることが示唆された。

## 摘要

ナトリウム及びマグネシウム過剰におけるローズガラスのミネラル含有率の変動と、それに与える塩類腺の影響を検討するため、ローズガラスの根部に対し塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム過剰処理を行った。塩化ナトリウム処理によりローズガラス地上部のナトリウム含有率は増加し、カリウム含有率は減少した。それに対し、塩化マグネシウム処理ではマグネシウム含有率が増加し、ナトリウム含有率、カリウム含有率及びカルシウム含有率が減少しており、マグネシウム過剰処理によるローズガラスの著しい生育阻害は、複数種のミネラル含有率の変動が複合的に作用することにより生じている可能性が考えられた。また、各塩類処理は、処理塩に含まれるミネラルの塩類腺からの排出を増加させたが、その増加量はナトリウムが最も多く、次いでカリウムであり、マグネシウム排出量の増加は極めて小さかった。加えて、塩化マグネシウム過剰処理ではカリウム排出量が大幅に増加しており、その結果、塩化マグネシウム過剰処理下ではカリウム含有率が減少していた。これらのことから、ローズガラスにおいては、ミネラルの根での吸収及び地上部への移行だけでなく、塩類腺からの塩類排出も地上部のミネラル含有率に大きな影響を与えていることが考えられた。

### 第3章 ローズグラス塩類腺におけるナトリウムとカリウムの 排出能力の比較

前章において、ローズグラスの地上部ミネラル含有率に影響を与える要因の一つとなっていることが明らかになった塩類腺であるが、塩類腺を持つ植物はローズグラス以外にも双子葉植物及び単子葉植物の複数の種で見つかっている。また、塩類腺の形態や生理は植物種によって異なることが示されており、形態面においては、塩類腺を構成する細胞数や構造をもとに、*Limonium*属（スターチスなど）や*Tamarix*属（ギョリュウなど）など双子葉植物の多細胞型塩類腺、*Atriplex*属（ハマアカザなど）の囊状毛、イネ科スズメガヤ亜科植物などの2細胞型塩類腺の3種類に分類されている(Fahn, 1988)。生理面においては、排出能力に差があることに加えて、排出するイオンに選択性があることも示されている。これまでに、多細胞型塩類腺では、 $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Ca}^{2+}$  (*Glaux maritima*)、 $\text{K}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+$  (*Armeria maritima*)、2価イオン > 1価イオン (*Tamarix aphylla*) など、植物種により陽イオン選択性が大きく異なることが示されている(Berry, 1970; Rozema et al., 1981)。その一方で、イネ科植物の2細胞型塩類腺においては、これまでに調べられた全ての種において、ナトリウムの選択性が他のミネラルよりも高いことが示されている(Pollak and Waisel, 1970; Rozema et al., 1981; Wieneke et al., 1987)。排出能力のミネラル間差異は、環境適応という点からも重要であると考えられるが、このような差異が生じる機構については明らかになっていない。

塩類排出のメカニズムを調べる方法の一つとして、イオン輸送阻害剤の利用が考えられる。多細胞型塩類腺を持つ双子葉植物 *Avicennia germinans* においては、 $\text{H}^+$ -ATPase阻害剤(Dinitrophenol, Orthovanadate)、

Ca<sup>2+</sup>-ATPase阻害剤(ErythrosinB, Lanthanum)、カリウムチャネル阻害剤(TEA)、アニオンチャネル阻害剤(Niflumic acid)などが塩類排出に影響を与えることが示されており(Balsamo et al., 1995; Dischida et al., 1992)、これらの結果をもとに、プロトンポンプとイオンチャネルが協同的に作用する塩類排出モデルが提示されている。しかしながら、スズメガヤ亜科植物の塩類腺においては、阻害剤を利用した研究はほとんどなされておらず、Bhatti and Sarwar (1993)による*Leptochloa fusca*のナトリウム排出に対するDinitrophenol (H<sup>+</sup>-ATPase阻害剤)処理の影響のみしかない。

イオン輸送阻害剤の利用は、塩類腺における排出能力のイオン間差異の調査にも応用できる可能性が考えられる。もし、異なるイオンが同じ輸送機構により輸送されるのであれば、その輸送機構に対する阻害剤の投与はそれらのイオンの排出に対して同じような影響を与えるはずである。逆に異なる影響が見られた場合は、その阻害剤により影響を受ける輸送機構は特定のイオンの排出により強く関与していることになり、塩類排出のイオン間差異の原因となっている可能性が考えられる。しかしながら、このような視点で阻害剤を利用した研究はこれまで行われていない。

本章では、地下部での吸収や地上部への移行における影響を排除するため切断葉を用い、ローズガラス塩類腺からのナトリウム及びカリウムの排出を比較した。その後、イオン輸送阻害剤によるナトリウム及びカリウム排出への影響を調査し、塩類腺からの塩類排出におけるナトリウムとカリウムの輸送機構の相違について検討した。

## 材料及び方法

ローズガラスは塩類処理を除いて前章と同じ方法で栽培し、移植 14 日後の植物体を用いて実験を行った。実験には最も新しい完全展開葉を用いた。蒸留水を含んだ綿棒を用いて葉の表面に排出された塩類を除去した後、葉身を切断して処理液を入れた試験管に挿入し、24 時間インキュベートした。明条件下 ( $480 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) でインキュベートした場合には、光合成により葉の乾燥重が約 2 倍に増加し、ミネラル含有率にも影響が認められたことから、今回の実験では暗条件下でインキュベートを行った。また、インキュベートは室温 25°C、相対湿度 60-70% で実施した。

本章では、①投与量試験、②ナトリウム-カリウム競合試験、③阻害剤試験の 3 試験を行った。投与量試験においては、0, 40, 80, 120, 160 mM の濃度の塩化ナトリウムまたは塩化カリウム溶液で処理を行った。ナトリウム-カリウム競合試験では、80mM の塩化ナトリウム及び塩化カリウムそれぞれ単独の場合と混合した場合との比較を行った。阻害剤試験においては、80 mM の塩化ナトリウムまたは塩化カリウム溶液に表 6 に記載した阻害剤を加えてナトリウム及びカリウム排出への影響を調べた。なお、阻害剤の濃度は表 6 に記載したとおりであるが、これより高い濃度で処理した場合には葉にネクロシス等が生じた。

24 時間のインキュベート後、サンプルの処理液に触れていない部分のみを採集し、10mL の蒸留水を入れた試験管に入れて 10 秒間振り、排出された塩類を採集した。採集液は凍結保存し、葉身は 60°C で 72 時間乾燥させて、乾燥重を測定した。体内成分及び排出塩の分析は、前章と同様に原子吸光光度計及びイオンクロマトグラフィーを用いて実施した。

表 6. 供試した阻害剤の種類、処理濃度及び既知の阻害対象

阻害剤	供試濃度 (mM)	対象	References
Orthovanadate ( $K_3VO_4$ )	1.6	$H^+$ -ATPase (細胞膜)	Balsamo & Thomson, 1996. Briskin et al., 1995.
$Ba^{2+}$ ( $BaCl_2$ )	4	Cation channel Cation transporter	Maathuis & Amtmann, 1999. Véry & Sentenac, 2002.
Ouabain	4	$Na^+$ - $K^+$ -ATPase (動物細胞)	Brown et al., 1964. Davis & Jaworski, 1979.
TEA (Tetraethylammonium chrolide)	18	$K^+$ channel	Maathuis & Amtmann, 1999. Véry & Sentenac, 2002.
Verapamil	3	$Ca^{2+}$ channel $K^+$ channel	Véry & Sentenac, 2002.

## 結果

ローズガラス塩類腺からのナトリウム及びカリウムの排出は、今回使用した濃度の範囲では、それぞれ塩化ナトリウム及び塩化カリウムの処理濃度が上昇するにつれて増加した(図 7)。また、これらのミネラルの体内含有率においても同様に、処理濃度の上昇に伴う増加が認められた。

塩化ナトリウム処理と塩化カリウム処理における塩素排出を比較するため、80mM と 160mM の処理における塩素の排出及び体内含有率を測定した。塩素排出は塩化ナトリウム処理において多い傾向があり、80mM 処理では塩化カリウム処理との間に有意差が認められた(図 8)。それに対し、塩素含有率に関しては、塩化ナトリウム処理と塩化カリウム処理の間に有意差は認められなかった。

塩類腺からの排出におけるナトリウムとカリウムの競合関係を明らかにするために、これらを混合した場合と単独で処理した場合との比較を行った(図 9)。塩化ナトリウム単独処理と塩化ナトリウム+塩化カリウム混合処理を比較すると、ナトリウムの排出及び含有率には有意な違いは認められなかった。それに対し、塩化カリウム単独処理と塩化ナトリウム+塩化カリウム混合処理を比較した場合、カリウム排出は混合処理において有意に少なくなった。また、カリウム含有率に関しては、単独処理と混合処理との間に有意な違いは認められなかった。

塩類腺からの塩類排出におけるナトリウムとカリウムの輸送機構を調べるため、これらのミネラルの排出に対するイオン輸送阻害剤の影響を調査した。供試したいずれの阻害剤も塩化ナトリウム処理下のナトリウム排出を有意に減少させ(図 10A)、その結果ナトリウム排出は、それぞれコントロールの 67% (Orthovanadate), 74% ( $Ba^{2+}$ ), 69% (Ouabain), 55% (TEA), 69% (Verapamil)となった。また、葉身中のナトリウム含有率に関

しては、いずれの阻害剤においても有意な影響は認められなかった(図 10B)。

塩化カリウム処理下のカリウム排出に関しては、ナトリウムの場合と異なり、Orthovanadate処理とBa<sup>2+</sup>処理は有意な影響を与えなかった(図 11A)。それに対し、Ouabain, TEA, Verapamil処理はカリウム排出を有意に減少させ、各阻害剤処理におけるカリウム排出は、それぞれコントロールの 64% (Ouabain), 40% (TEA), 9% (Verapamil)となった。また、葉身中のカリウム含有率については、いずれの阻害剤においても有意な影響は認められなかった(図 11B)。

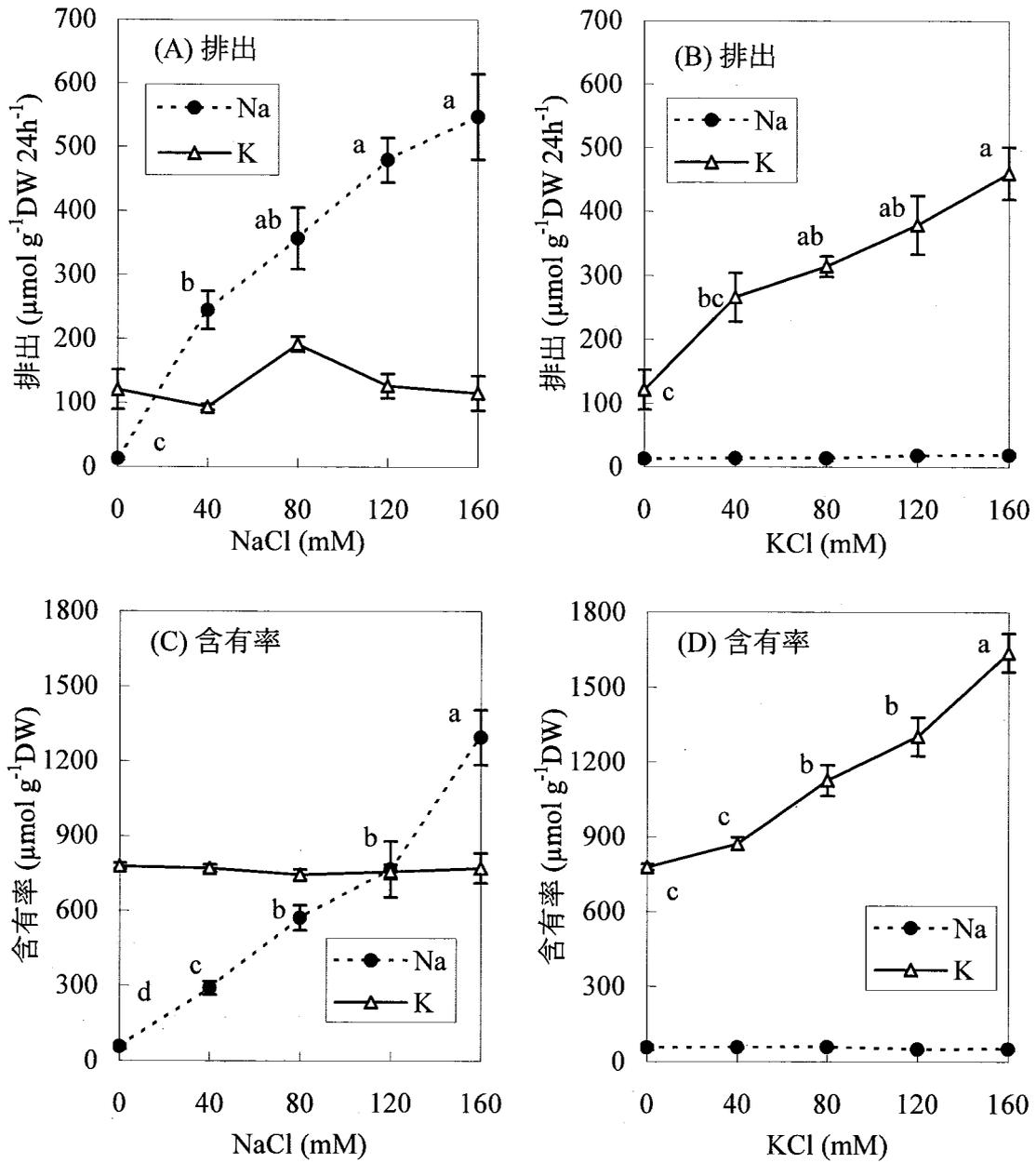


図7. 塩化ナトリウム(A,C)及び塩化カリウム過剰処理(B,D)におけるミネラル排出及び含有率の推移

各値は、4サンプルの平均値±標準誤差を示す。  
異文字間に5%水準で有意差あり(Tukey法)。

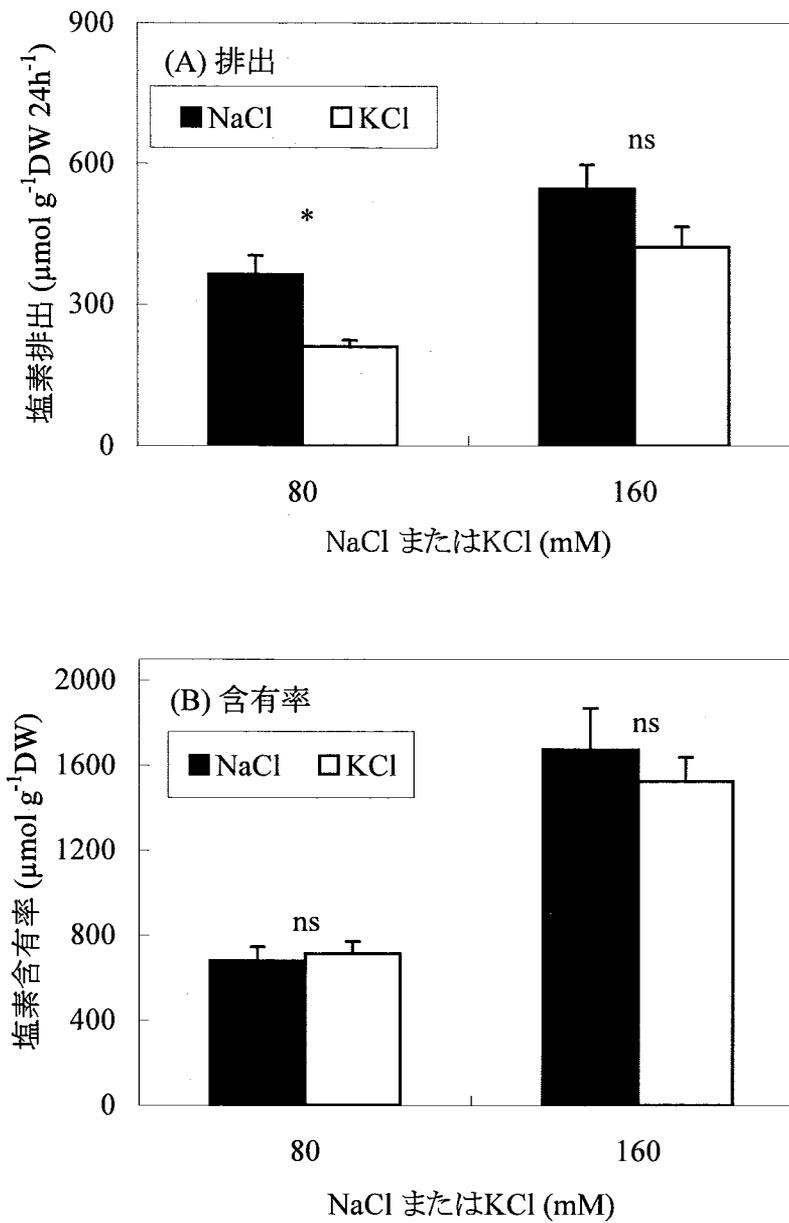


図 8. 塩化ナトリウム及び塩化カリウム過剰処理が塩素排出及び含有率に及ぼす影響

各値は、4サンプルの平均値±標準誤差を示す。

\* 5%水準で有意差あり(t-test)。

ns 5%水準で有意差なし(t-test)。

蒸留水処理下での排出: $11 \pm 2 \mu\text{mol g}^{-1}\text{DW } 24\text{h}^{-1}$ , 含有率: $112 \pm 12 \mu\text{mol g}^{-1}\text{DW}$ 。

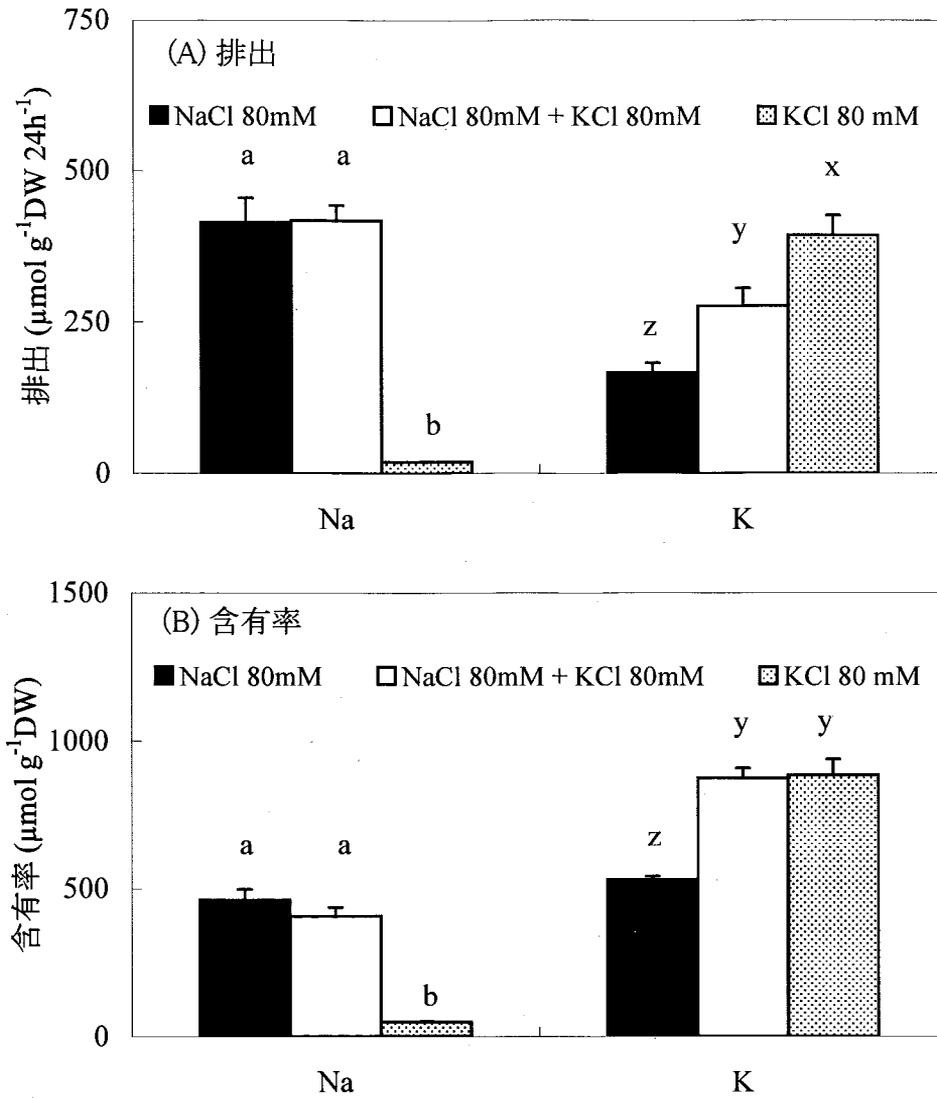


図 9. 塩化ナトリウムと塩化カリウムを混合した場合と単独施用した場合のミネラル排出(A)及び含有率(B)

各値は、8サンプルの平均値±標準誤差を示す。  
異文字間に5%水準で有意差あり(Tukey法)。

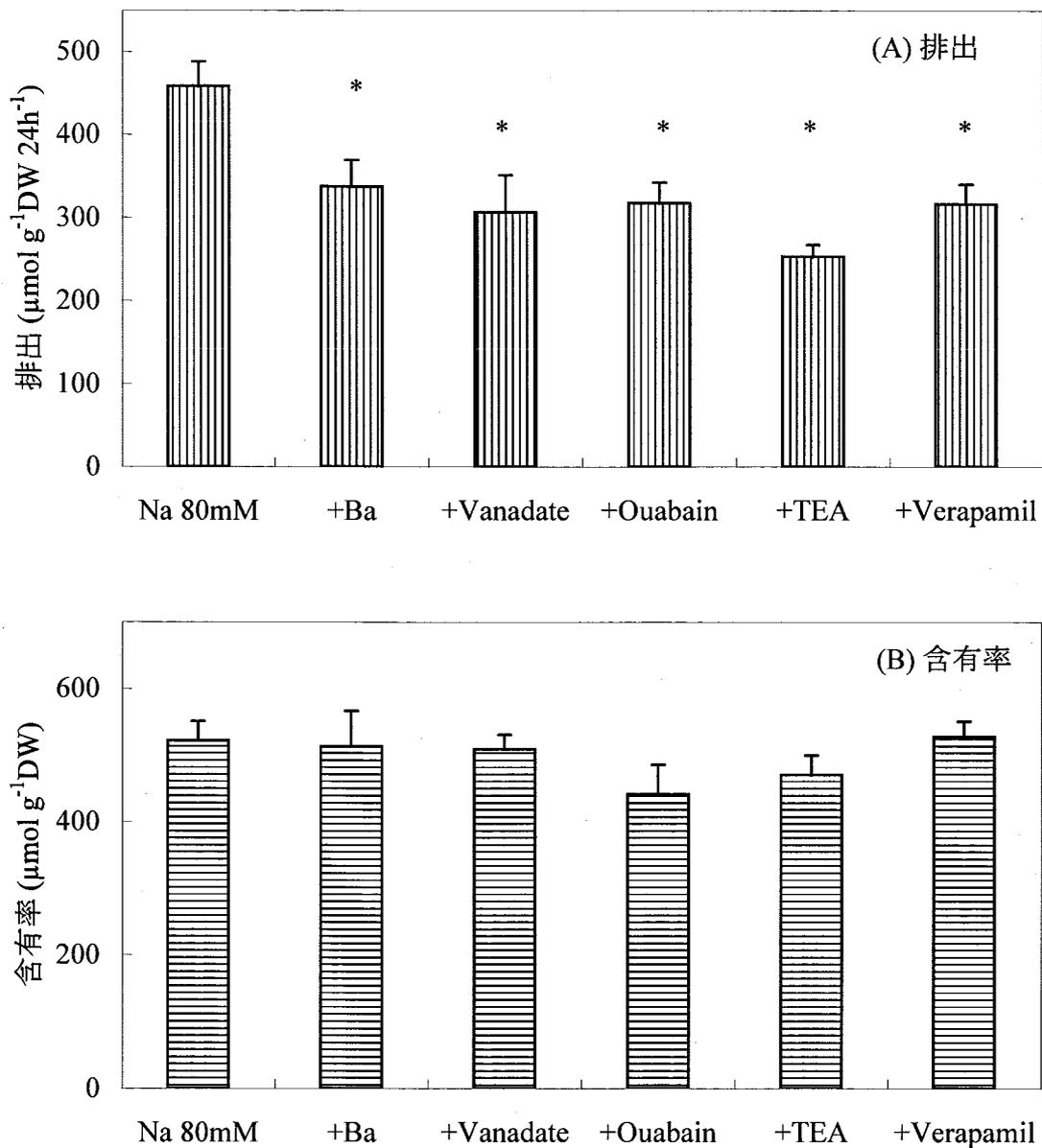


図 10. 塩化ナトリウム過剰条件下におけるナトリウム排出(A)及び含有率(B)への阻害剤の影響

各値は、8サンプルの平均値±標準誤差を示す。

\* 5%水準でコントロールとの間に有意差あり(Dunnett法)。

蒸留水処理下での排出: $8 \pm 3 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW 24h}^{-1}$ , 含有率: $57 \pm 9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$ 。

+Ba: BaCl<sub>2</sub> 4mM, +Vanadate: K<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1.6mM, +Ouabain: Ouabain 4mM,

+TEA: Tetraethylammonium chloride 18mM, +Verapamil: Verapamil 3mM

の濃度になるよう各種阻害剤を80mM NaCl溶液に投与。

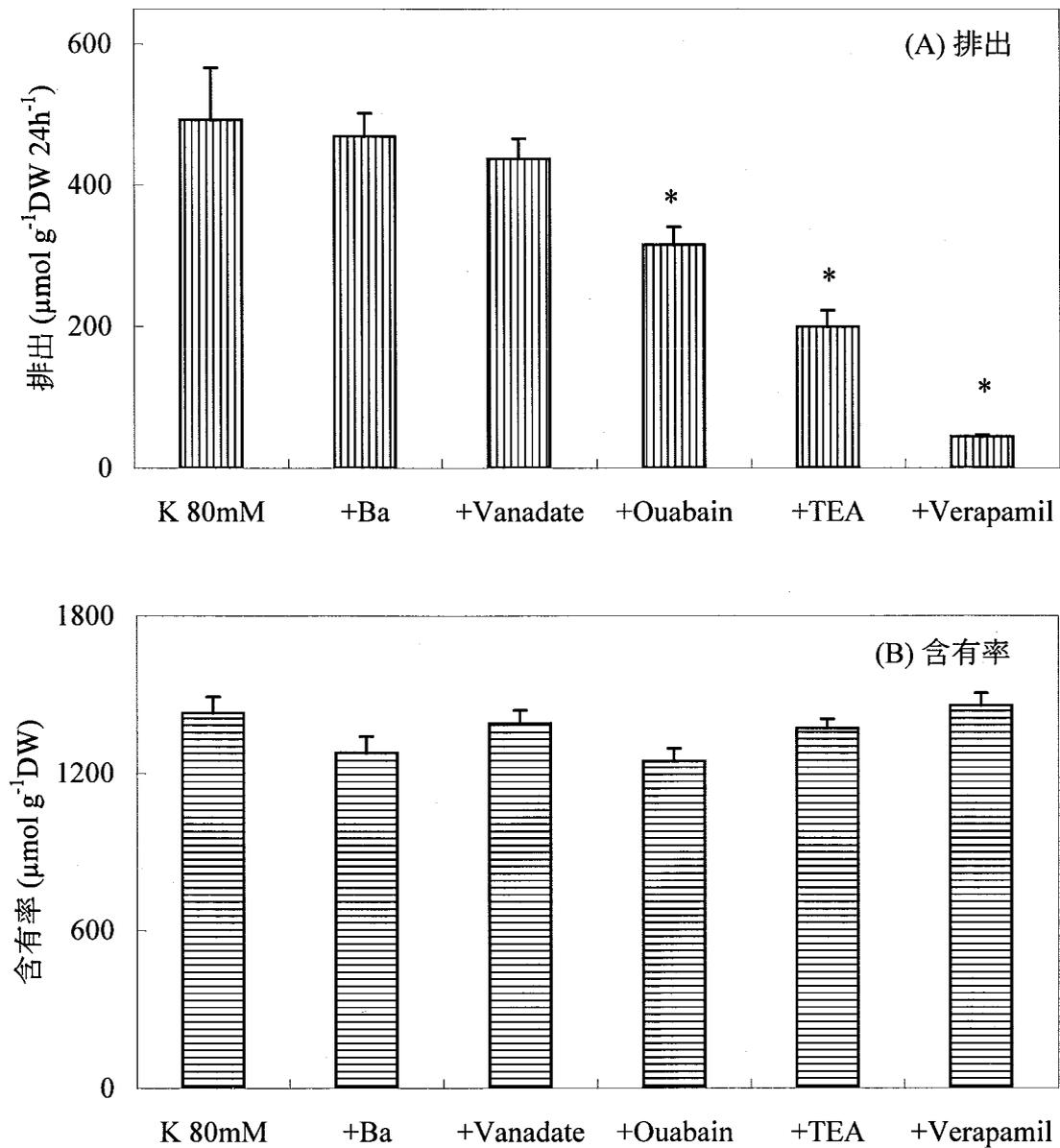


図 11. 塩化カリウム過剰条件下におけるカリウム排出(A)及び含有率(B)への阻害剤の影響

各値は、8サンプルの平均値±標準誤差を示す。

\* 5%水準でコントロールとの間に有意差あり(Dunnett法)。

蒸留水処理下での排出: $145 \pm 28 \mu\text{mol g}^{-1}\text{DW } 24\text{h}^{-1}$ , 含有率: $719 \pm 27 \mu\text{mol g}^{-1}\text{DW}$ 。

+Ba:  $\text{BaCl}_2$  4mM, +Vanadate:  $\text{K}_3\text{VO}_4$  1.6mM, +Ouabain: Ouabain 4mM,

+TEA: Tetraethylammonium chloride 18mM, +Verapamil: Verapamil 3mM

の濃度になるよう各種阻害剤を80mM KCl溶液に投与。

## 考察

本章の切断葉を用いた試験においても、塩類処理は処理塩に含まれるミネラルの含有率を増加させ(図 7)、この結果は第 2 章の植物体全体を用いた根部への塩類処理試験と一致していた。その一方で、植物体を用いた試験において認められた処理ミネラル以外のミネラルの排出及び含有率に対する塩類処理の有意な影響は、切断葉試験においては認められなかった。この結果は、第 2 章において得られた「塩化ナトリウム及び塩化カリウム処理による処理ミネラル以外のミネラルの含有率の減少は、根での吸収または地上部への移行の阻害に起因する」という結論を支持するものである。これらのことから、本章の切断葉試験の結果は、植物体全体を利用した第 2 章の試験とよく対応していると考えられた。

塩類腺からのナトリウム及びカリウムの排出は、それぞれ塩化ナトリウム及び塩化カリウムの処理濃度が上昇するにつれて増加した(図 7)。また、塩化ナトリウムと塩化カリウムを混合した場合には、ナトリウム排出は塩化ナトリウム単独処理との間に有意な違いは認められなかったが、カリウム排出は塩化カリウム単独処理よりも有意に減少した(図 9)。これらのことから、ローズグラス塩類腺はナトリウムとカリウムいずれも排出する能力を持つが、カリウムよりもナトリウムを排出しやすいことが考えられた。加えて、塩素排出は、同じ処理濃度であれば塩化ナトリウム処理の方が塩化カリウム処理よりも多い傾向があり(図 8)、陽イオンの排出能力は随伴する塩素の排出にも影響を与えると考えられた。

塩類腺からの塩類排出におけるナトリウムとカリウムの輸送機構について調査するためイオン輸送の阻害剤を投与したところ、プロトンポンプやトランスポーター、チャンネルなどの阻害剤において有意な影響が認められた(図 10, 11)。このことから、*Avicennia germinans* の多細胞型塩

類腺の場合(Dischida et al., 1992)と同様に、ローズガラスの塩類排出にも様々なポンプやトランスポーター、チャンネルが協同的に関与していることが考えられた。

加えて、ナトリウム排出とカリウム排出では、阻害剤による影響が異なるケースが認められた。ナトリウム排出においては、供試した Orthovanadate,  $Ba^{2+}$ , Ouabain, TEA, Verapamil全てが有意に排出を阻害したのに対し(図 10)、カリウム排出ではOrthovanadate,  $Ba^{2+}$ による有意な影響は認められなかった(図 11)。これらの結果は、Orthovanadateや $Ba^{2+}$ が阻害するイオン輸送機構はカリウム排出には関与していないが、ナトリウム排出には関与していることを示唆している。したがって、ナトリウム排出にはカリウム排出と異なる機構が関与しており、ローズガラス塩類腺のナトリウムに対する高い排出能力は、このナトリウム独自の輸送機構の働きに起因することが考えられた。

Orthovanadateは細胞膜 $H^+$ -ATPaseの阻害剤であり、細胞膜 $H^+$ -ATPaseは $Na^+/H^+$  antiporterと協働して、細胞外へのナトリウム輸送を行っていることが示されている(Horie and Schroeder, 2004; Mansour et al., 2003)。また、塩類腺からの塩類排出においても $H^+$ -ATPaseの関与は重要であるとされており、多細胞型、2細胞型いずれにおいても塩類腺を構成する細胞において高い $H^+$ -ATPase活性が報告されている(Balsamo and Thomson, 1996; Naidoo and Naidoo, 1999)。今回の試験において、「ローズガラス塩類腺はカリウムよりもナトリウムを排出しやすいこと」、及び「Orthovanadateはナトリウム排出を阻害するが、カリウム排出には影響を与えないこと」が明らかになり、ローズガラス塩類腺におけるナトリウムの高い排出能力には、 $H^+$ -ATPaseで作られたプロトン勾配を効率的に利用する系が関与していることが考えられた。

Ba<sup>2+</sup>は様々なチャネル及びトランスポーターを阻害することが知られているが(Garciadeblás et al., 2003; Maathuis and Amtmann, 1999; Véry and Sentenac, 2002)、塩類腺に対する影響を調査した研究は過去に行われていない。本研究において、Ba<sup>2+</sup>はナトリウム排出を阻害するが、カリウム排出には影響を与えないことが明らかになったが(図 10, 11)、同様の現象はイネの根におけるナトリウム及びカリウムの吸収で観察されており、この現象にはカチオントランスポーターの一つであるHKTトランスポーターが関与していることが示されている(Garciadeblás et al., 2003)。HKTトランスポーターは、細胞外へのナトリウム輸送にも役割を果たしているとされているが(Horie and Schroeder, 2004)、今回の結果から、ローズガラス塩類腺のナトリウム排出においてもHKTトランスポーターが関与している可能性が考えられた。

Ouabain, TEA, Verapamil はナトリウム排出に加えてカリウム排出も阻害した(図 10, 11)。とりわけ、Verapamil はカリウム排出を強く阻害し、ナトリウム排出に対する阻害は30%程度であったのに対し、カリウム排出についてはほぼ完全に阻害した(図 10, 11)。このことから、Verapamil によって阻害されるチャネルはナトリウム排出よりもむしろカリウム排出において重要な役割を果たしていることが考えられた。

以上の結果から、ローズガラス塩類腺の塩類排出にはミネラル間で選択性があり、ナトリウムがカリウムよりも排出されやすいことが確認された。さらに、ナトリウムとカリウムでは、塩類腺からの塩類排出における輸送機構が部分的に異なっており、ナトリウム排出においてはプロトンポンプを利用した輸送機構が関与しているのに対し、カリウム排出においては主にチャネルを中心とした輸送機構であることが考えられた。

## 摘要

ローズガラスの塩類腺における塩類排出機構について検討するため、切断葉に対して塩化ナトリウム処理及び塩化カリウム処理を行った。前章の植物体全体を使った試験と同様に、切断葉を用いた場合においても、塩化ナトリウム処理によるナトリウムの排出及び含有率の増加が、塩化カリウム処理によるカリウムの排出及び含有率の増加が認められた。また、切断葉に塩化ナトリウムと塩化カリウムを混合して処理した場合には、ナトリウム排出は単独処理の場合と有意な違いは生じなかったが、カリウム排出は単独処理の時よりも有意に減少しており、ローズガラス塩類腺はカリウムよりもナトリウムを排出しやすいことが考えられた。次に、ローズガラス塩類腺からの塩類排出におけるナトリウムとカリウムの輸送機構について調査するため、様々なイオン輸送阻害剤による処理を行ったところ、ナトリウム排出はOrthovanadate,  $Ba^{2+}$ , Ouabain, TEA, Verapamilにより阻害された。それに対し、カリウム排出はOuabain, TEA, Verapamilにより阻害されたが、Orthovanadate,  $Ba^{2+}$ では有意な影響が認められなかった。これらのことから、ローズガラス塩類腺からの塩類排出においては、ナトリウムとカリウムで輸送機構が少なくとも部分的に異なっており、この異なる機構がナトリウムに対する高い排出能力をもたらしていると考えられた。

#### 第4章 マグネシウム過剰条件下における塩類腺からの塩類排出

第2章及び第3章において、ローズグラス塩類腺からの塩類排出にはミネラルによって選択性があり、カリウムよりもナトリウムを排出しやすいことが明らかになった。このような結果は他のイネ科スズメガヤ亜科植物 *Aeluropus litoralis*, *Spartina anglica*, *Leptochloa fusca* における報告 (Pollak and Waisel, 1970; Rozema et al., 1981; Wieneke et al., 1987) と一致しており、スズメガヤ亜科植物の塩類腺からの塩類排出における共通の特徴であることが考えられた。しかしながら、ナトリウム及びカリウム以外のミネラルの排出に関しては、スズメガヤ亜科植物の塩類腺ではこれまであまり研究がなされておらず、カルシウム排出について一部で検討されているのみであり (Pollak and Waisel, 1970; Rozema et al., 1981)、マグネシウム排出に関してはこれまで検討されていない。しかしながら、第2章の試験において、ローズグラスへの塩化マグネシウム過剰処理はカリウム排出を大幅に増加させる、というこれまでに報告されたことのない現象が観察されており、マグネシウム過剰におけるローズグラス塩類腺の反応は、これまで知られていない特殊なものである可能性が考えられる。

そこで本章においては、ローズグラス塩類腺のマグネシウム過剰に対する反応について、より詳細に検討するため、第3章の知見及び手法を応用して調査を行った。

## 材料及び方法

栽培及び切断葉試験は第3章と同様の手法を用い、本章では①投与量試験、②阻害剤試験、③マグネシウム塩比較試験、④浸透濃度試験の4試験を行った。投与量試験においては、0, 20, 40, 60, 80mMの塩化マグネシウム溶液で処理を行った。阻害剤試験においては、40mMの塩化マグネシウム溶液にBa<sup>2+</sup> (BaCl<sub>2</sub>, 4mM), Ouabain (4mM), TEA (18mM), Verapamil (3mM)を投与して、影響を調査した。マグネシウム塩比較試験においては、40mMの塩化マグネシウム及び硝酸マグネシウム溶液で処理を行った。浸透濃度試験においては、0, 20, 40mMの塩化マグネシウム溶液に、0 または 3mMのVerapamilを投与した溶液で処理を行った。また、すべての切断葉試験において、コントロールとして蒸留水による処理を行った。

インキュベート終了後、排出された塩類を採集し、浸透濃度試験においてはサンプルをマイクロチューブに入れて液体窒素で凍結させ、その他の試験においては60°Cで72時間乾燥させた。体内成分の分析については、第2章と同様に、原子吸光光度計及びイオンクロマトグラフィーで測定した。葉身細胞液の浸透濃度 (leaf sap osmolality) に関しては、葉身サンプルを解凍した後、12,000rpm, 4°Cで25分間遠心して細胞液を採集し、Vapor pressure osmometer Wescor 5500 で分析した。

## 結果

ローズガラス塩類腺からのマグネシウム排出は、処理液中の塩化マグネシウム濃度の上昇に応じて増加したが、その排出は最も高い塩化マグネシウム濃度においても、ナトリウム及びカリウムの排出よりも少なかった（図 12A）。それに対し、マグネシウム含有率は、処理濃度 60mM 以上ではナトリウム及びカリウム含有率よりも多くなった（図 12B）。

また、塩化マグネシウム処理は、塩類腺からのカリウム排出を有意に増加させた（図 12A）。カリウム排出は、処理液中の塩化マグネシウム濃度が 40mM に達するまでは増加し、それ以上の濃度ではほぼ一定となった。カリウム排出の増加はマグネシウム排出の増加よりもはるかに多く、80mM 処理によるカリウム排出の増加量はマグネシウム排出の増加量の約 85 倍であった。また、カリウム含有率は処理液中の塩化マグネシウム濃度の上昇にしたがって減少した（図 12B）。ナトリウムの排出及び含有率に関しては、処理間で有意な違いは認められなかった。

塩化マグネシウム処理による塩類腺からのカリウム排出の増加が生理的な反応かどうか調べるため、イオン輸送阻害剤の投与を行った（図 13）。阻害剤を投与しなかった場合には、40mM の塩化マグネシウム処理はマグネシウム排出、マグネシウム含有率及びカリウム排出を有意に増加させ、カリウム含有率を有意に減少させた（ $P < 0.001$ 、 $t$  検定）。塩化マグネシウム処理下においてイオン輸送阻害剤を投与したところ、 $Ba^{2+}$  処理はカリウム排出に有意な影響を与えなかったが、Ouabain, TEA, Verapamil はカリウム排出を有意に減少させた（図 13, 表 7）。とりわけ Verapamil の影響は大きく、カリウムの排出及び含有率に対する塩化マグネシウム過剰の影響をほぼ完全に阻害した。また、すべての阻害剤は、マグネシウムの排出及び含有率には有意な影響を与えなかった（図 13, 表 7）。

マグネシウム及びカリウムの排出に対する共存アニオンの影響について調査するため、塩化マグネシウム処理と硝酸マグネシウム処理におけるイオン排出を比較した(表 8)。塩化マグネシウム処理は塩素排出及び含有率を大幅に増加させたが、硝酸排出及び含有率への影響は小さかった。また、硝酸マグネシウム処理の影響はその逆であり、硝酸排出及び含有率を大幅に増加させたが、塩素排出及び含有率への影響は小さかった。しかしながら、カリウム及びマグネシウムの排出及び含有率については、これらの塩類処理間で有意な差は認められなかった。

塩化マグネシウム処理下での塩類腺からのカリウム排出による、植物体内の浸透圧調節への影響を調査するため、Verapamilの投与によってカリウム排出が阻害された場合の葉身細胞液の浸透濃度 (leaf sap osmolality) を調査した(図 14)。Verapamilを処理した場合及び処理しなかった場合いずれにおいても、塩化マグネシウムの処理濃度と葉身細胞液の浸透濃度の間には直線関係が認められた。そこで、塩化マグネシウム濃度をx、葉身細胞液の浸透濃度をyとする直線回帰を行ったところ、Verapamil処理下では $y = 6.615x + 519.43$  ( $R^2 = 0.858$ ,  $P < 0.001$ )、Verapamil無処理下では $y = 3.985x + 474.1$  ( $R^2 = 0.829$ ,  $P < 0.001$ )となり、Verapamil処理下で直線の傾きが有意に大きくなった ( $t = 2.92$ ,  $P < 0.01$ )。

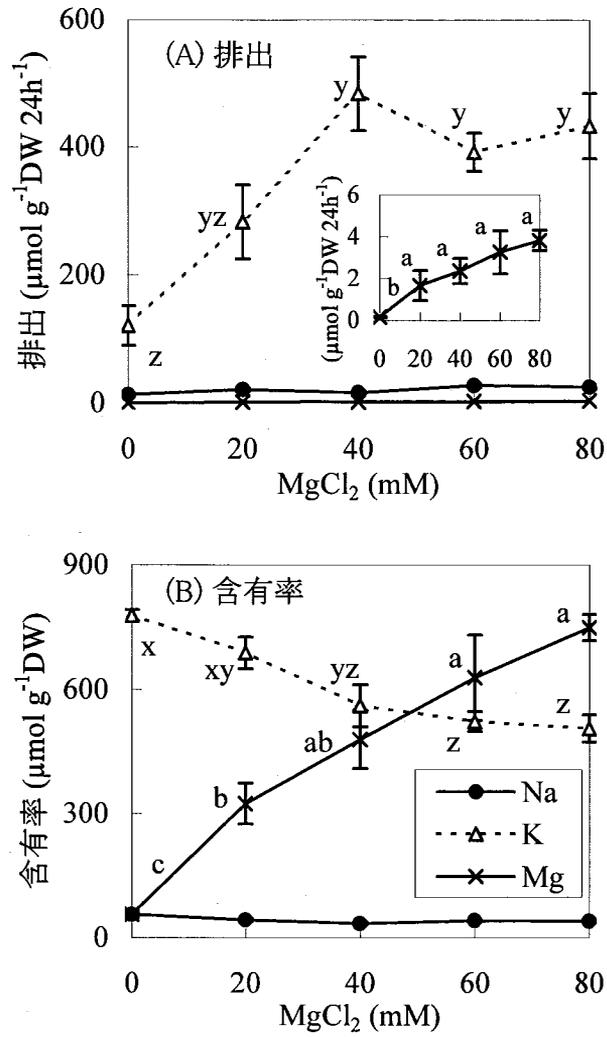


図 12. 塩化マグネシウム処理によるNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>の排出(A)及び含有率(B)への影響

(A)の中のグラフは、Mg<sup>2+</sup>の排出を示す。  
 各値は、4サンプルの平均値±標準誤差を示す。  
 異文字間に5%水準で有意差あり(Tukey法)。

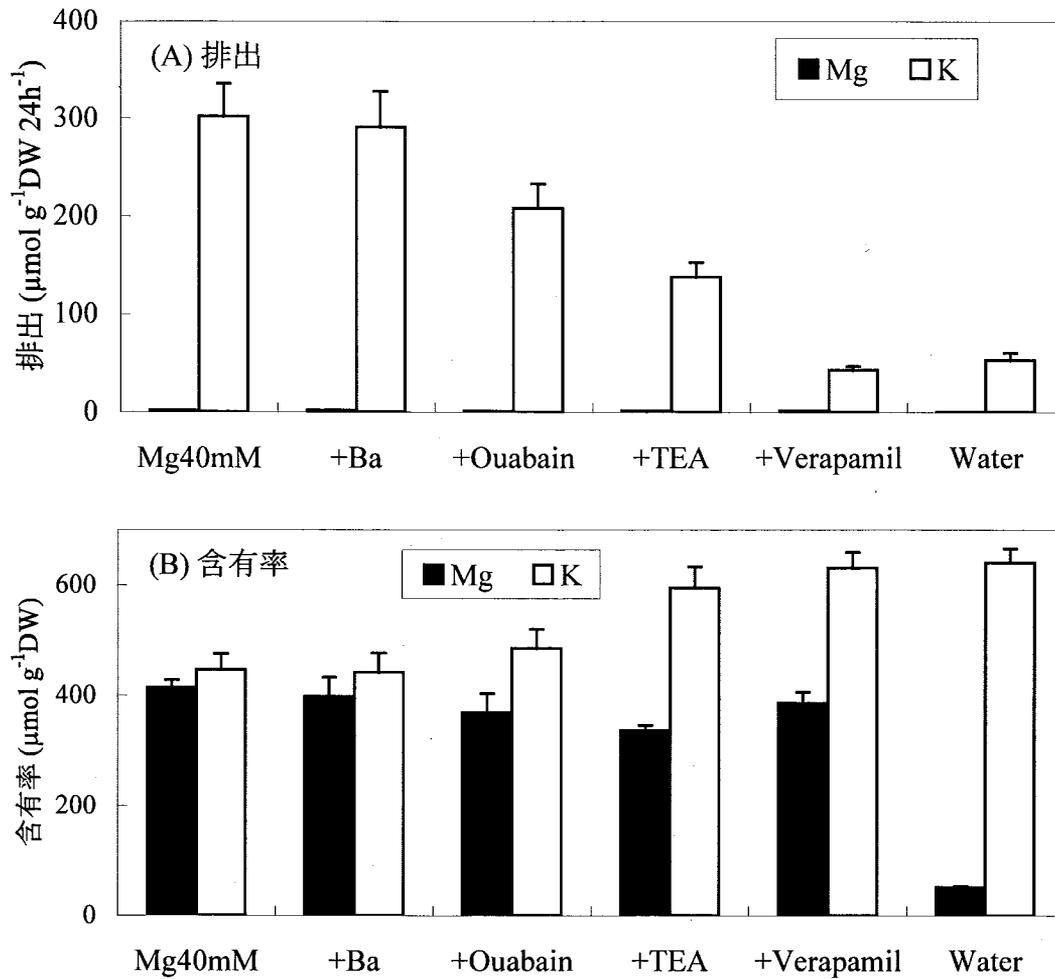


図 13. 塩化マグネシウム過剰条件下における各阻害剤のマグネシウム及びカリウムの排出(A)及び含有率(B)への影響

各値は、8サンプルの平均値±標準誤差を示す。

+Ba: BaCl<sub>2</sub> 4mM, +Ouabain: Ouabain 4mM, +TEA: Tetraethylammonium chloride 18mM, +Verapamil: Verapamil 3mM を、40mM MgCl<sub>2</sub>溶液に投与。

Water: 蒸留水によるコントロール (MgCl<sub>2</sub> 0mM)。

各阻害剤処理とコントロール (MgCl<sub>2</sub> 40mM及び蒸留水処理(Water))との有意差検定結果は表 7を参照。

表 7. マグネシウム及びカリウムの排出及び含有量に対する阻害剤の影響についての統計分析結果

	Mg <sup>2+</sup>		K <sup>+</sup>	
	排出	含有率	排出	含有率
vs Mg 40mM				
+Ba	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
+Ouabain	n.s.	n.s.	*	n.s.
+TEA	n.s.	n.s.	*	*
+Verapamil	n.s.	n.s.	*	*
vs Water				
+Ba	*	*	*	*
+Ouabain	*	*	*	*
+TEA	*	*	*	n.s.
+Verapamil	*	*	n.s.	n.s.

実際の排出及び含有率は、図 13 を参照。

\*は、コントロール (MgCl<sub>2</sub> 40mM処理または蒸留水処理) との間に 5%水準で有意差があることを示す (Dunnett法)。

n.s. は、コントロールとの間に 5%水準で有意差がないことを示す (Dunnett法)。

表 8. 塩化マグネシウム及び硝酸マグネシウム処理がイオン排出及び含有率に与える影響

	Control		MgCl <sub>2</sub>		Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	
排出 (μmol g <sup>-1</sup> DW 24h <sup>-1</sup> )						
Mg <sup>2+</sup>	0.2±0.1	b	2.7±0.7	a	2.7±0.9	a
K <sup>+</sup>	79±13	b	244±37	a	220±20	a
Cl <sup>-</sup>	7±1	c	205±28	a	16±2	b
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	n.d.		n.d.		100±25	
含有率 (μmol g <sup>-1</sup> DW)						
Mg <sup>2+</sup>	67±4	b	433±23	a	453±21	a
K <sup>+</sup>	546±12	a	421±23	b	423±24	b
Cl <sup>-</sup>	161±18	b	826±44	a	170±14	b
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	228±29	b	186±36	b	1050±86	a

各数値は、5 サンプルの平均値±標準誤差を示す。

異文字間に 5 %水準で有意差あり (Tukey 法)。

n.d. は、検出限界 (5 μmol g<sup>-1</sup>DW 24h<sup>-1</sup>) 以下であることを示す。

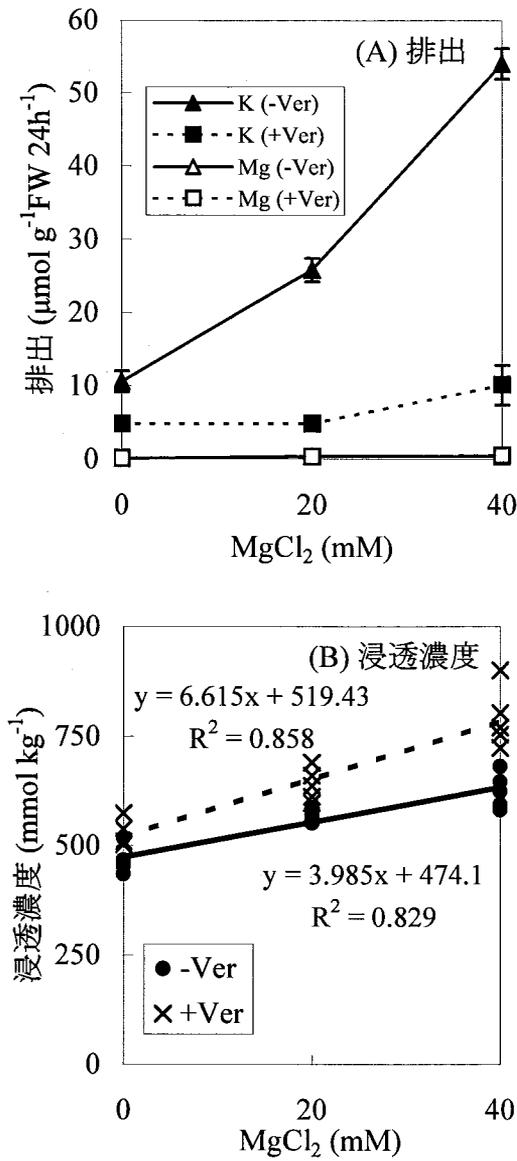


図 14. カリウム及びマグネシウムの排出 (A)と葉身細胞液の浸透濃度(B)へのverapamil 処理の影響

- Ver: 無処理、 + Ver: Verapamil (3mM) 処理  
 (A)の各値は、5サンプルの平均値±標準誤差を示す。  
 (B)の各値は、各サンプルの値を示す。

## 考察

第2章の植物体試験と同様に、切断葉試験においても、塩化マグネシウム処理はローズグラス塩類腺からのカリウム排出を有意に増加させ、かつカリウム排出の増加量はマグネシウム排出の増加量よりもはるかに大きかった(図 12A)。このような塩化マグネシウム処理によるカリウム排出の増加に関しては、生理的な反応ではなく、損傷を受けた細胞からのイオン漏出の結果である可能性が考えられる。この可能性について検証するため、イオン輸送タンパク質の阻害剤を切断葉に投与し、その影響を調査したところ、塩化マグネシウム処理による塩類腺からのカリウム排出の増加は、Ouabain, TEA, Verapamil によって阻害された(図 13, 表 7)。この結果は、第3章の塩化カリウム処理下でのカリウム排出の結果と一致している。加えて、供試したいずれの阻害剤もマグネシウムの排出及び含有率には有意な影響を与えなかった(図 13, 表 7)。これらのことから、イオン輸送阻害剤はマグネシウム吸収ではなくカリウム排出を阻害していることが考えられ、塩化マグネシウム処理によるカリウム排出の増加は、イオン輸送タンパク質を介した生理反応であると考えられた。

塩化マグネシウム処理によるカリウム排出の増加という現象は、ローズグラス塩類腺のマグネシウムとカリウムに対する排出能力の差異により説明が可能である。第2章で明らかになったように、ローズグラス塩類腺のマグネシウム排出能力は、ナトリウムやカリウムに対する排出能力と比べて非常に低い。加えて、ローズグラスの葉はカリウムを多く含有している(図 13B)。したがって、ローズグラス葉内にマグネシウムが蓄積した場合、より排出されやすく、また体内に豊富にあるカリウムをマグネシウムの代替として排出しているのではないだろうか。

このような塩処理による処理イオン以外の代替排出という現象は、これまでにいかなる植物種においても報告されていない。Boon and Allaway (1986) は、双子葉植物 *Avicennia marina* の切断葉に対する 1M の塩化マグネシウム処理の影響を調査しているが、マグネシウム排出の増加とナトリウム及びカリウム排出の減少が観察されている。この結果は、本研究でのローズグラスの結果と相反しているが、*Avicennia marina* では塩化亜鉛処理による亜鉛排出の増加が報告されている (MacFarlane and Burchett, 1999) など、塩類腺からの排出における陽イオン選択性が低いことが考えられ、この選択性の違いが原因となって、本研究とは異なる結果が生じたものと推測される。また、2 種のイネ科スズメガヤ亜科植物において、塩化カルシウム処理によるナトリウム及びカリウム排出の増加が報告されているが、そのうち *Aeluropus litoralis* においてはナトリウム及びカリウムの体内含有率も増加していたことから、これらのミネラルの根での吸収及び地上部への移行の増加に起因する可能性が指摘されている (Pollak and Waisel, 1970)。もう 1 種の *Leptochloa fusca* においては、処理濃度が低い ( $\text{CaCl}_2$  10mM) ためか、ナトリウム及びカリウム排出の増加量 (ナトリウム  $3.4 \mu\text{mol g}^{-1}\text{DW } 24\text{h}^{-1}$ , カリウム  $14.7 \mu\text{mol g}^{-1}\text{DW } 24\text{h}^{-1}$ ) は低く、カルシウム排出の増加量 ( $12.0 \mu\text{mol g}^{-1}\text{DW } 24\text{h}^{-1}$ ) と同程度であり、本研究で観察されたような代替イオンの大幅な排出増とはなっていない (Wieneke et al., 1987)。しかしながら、スズメガヤ亜科植物の塩類腺においては、排出の陽イオン選択性など性質が共通する部分が多く、報告間の差異も処理濃度等の実験条件の違いによる可能性が考えられるため、ローズグラス以外のスズメガヤ亜科植物を用いた研究や、マグネシウム以外の陽イオンを用いた研究が今後必要であろう。

それでは、塩化マグネシウム処理下でのカリウムの代替的排出はどの

ような生理的役割を果たしているのであろうか？この疑問に対する一つの可能性として、塩素イオン蓄積の回避ということが考えられる。Hill and Hill (1973)は、双子葉植物 *Limonium* の塩類腺においては塩素の輸送がエネルギーを消費して行われる能動的な活動であり、陽イオンは塩素イオンのカウンターイオンとして輸送されるという仮説を提唱している。しかしながら、ローズガラスの塩類腺においては、塩化マグネシウム処理だけでなく硝酸マグネシウム処理においてもカリウム排出の増加が生じたこと（表 8）から、マグネシウム処理下でのカリウムの代替的な排出は塩素排出の増加に対応する反応ではないことが考えられた。

もう一つの可能性として、葉内の浸透圧調節が考えられる。Verapamil 投与により塩類腺からのカリウム排出を阻害した場合には、投与しなかった場合に比べ、塩化マグネシウム処理によって生じる葉身細胞液の浸透濃度（leaf sap osmolality）の増加が有意に拡大した（図 14）。このことは、ローズガラス塩類腺からのカリウム排出が、マグネシウム処理下での浸透圧調節になんらかの役割を果たしている可能性を示唆している。しかしながら、このような浸透圧の調節が、ローズガラスの生育にとってどのような意義を持つのかということについては明らかになっていない。これまでに、スズメガヤ亜科植物においては、塩処理による細胞液の浸透濃度の上昇と耐塩性との間に負の相関があり、耐塩性の強い種ほど塩処理による浸透濃度の上昇が小さいことが報告されており (Marcum, 1999)、塩類過剰によって生じる浸透圧の変動が、ローズガラスを含むスズメガヤ亜科植物の生理反応に悪影響を及ぼす可能性が推測されるが、詳細に関しては不明な点が多く、今後更なる研究が必要であろう。

以上の結果から、結論として、ローズガラスの塩類腺はマグネシウム排出能力が非常に低く、マグネシウム過剰に遭遇した場合にはカリウム

を代替的に排出させることが明らかになった。また、このカリウムの代替的排出は、体内の浸透圧の調節に貢献していると考えられた。

## 摘要

ローズガラスの切断葉を用いて、マグネシウム過剰条件下での塩類腺の反応を調査した。塩化マグネシウム処理はマグネシウム排出を有意に増加させたが、その増加量は極めて小さかった。塩化マグネシウム処理はカリウム排出を有意に増加させ、その増加量はマグネシウム排出の増加量よりもはるかに大きかった。マグネシウム処理による塩類腺からのカリウム排出の増加は、イオン輸送阻害剤の投与により阻害されたことから、この現象は傷害を受けた細胞からの漏出ではなく、輸送タンパク質を介した生理的な排出であることが考えられた。また、塩類腺からのカリウム排出をほぼ完全に阻害する Verapamil を投与したところ、投与しなかった場合に比べ、塩化マグネシウム処理によって引き起こされる葉身細胞液の浸透濃度の増加幅が有意に拡大した。これらの結果から、ローズガラス塩類腺のマグネシウム排出能力は低く、マグネシウム過剰条件下では葉内の浸透圧を調節するためにマグネシウムの代替としてカリウムを排出する、という可能性が考えられた。

## 総合考察

マグネシウムはナトリウムに次いで海水に多く含まれる陽イオンであるが、塩化マグネシウム過剰処理によるローズグラスの生育への影響は、塩化ナトリウム過剰処理の影響よりも大きかった（第1章及び第2章）。また、複数種のイネ科牧草間においても塩化ナトリウム処理の影響と塩化マグネシウム処理の影響の間には相関が認められなかった（第1章）。これらのことから、ナトリウム過剰とマグネシウム過剰による植物の生理反応への影響は大きく異なっており、これらの過剰に対しては、それぞれに対応した耐性機構が存在することが考えられた。

本研究において、ローズグラス塩類腺からの塩類排出は、ナトリウム選択的であり（第2章・第3章）、また ATP を消費して行う能動的な反応であること（第3章）が明らかになり、ローズグラスの塩類腺はナトリウム過剰に対応した耐性機構であることが考えられた。実際に、イネ科スズメガヤ亜科植物においては、個体間及び品種間の塩化ナトリウム過剰耐性の強弱と塩類腺のナトリウム排出能力との間に有意な相関があることが明らかにされている (de Luca et al., 2001; Marcum et al., 1998; Marcum and Pessaraki, 2006)。また、スズメガヤ亜科植物の *Sporobolus virginicus* は、塩類腺を持たない *Kosteletzkya virginica* よりもカルス及びプロトプラストレベルでは塩化ナトリウム過剰耐性が弱いですが、個体レベルでは塩類腺の働きにより、*Kosteletzkya* よりも塩化ナトリウム過剰耐性が強いことが示されており (Li et al., 2006)、塩類腺を持つ植物においては、塩類腺からのナトリウム排出がナトリウム過剰耐性に大きな役割を果たしていると考えられている。本研究においても、塩類腺の働きにより、体内に蓄積される量と同程度のナトリウムが体外に排出されており

(第2章)、ローズグラスのナトリウム過剰耐性においても、塩類腺からのナトリウム排出が大きな貢献をしていることが考えられた。

その一方で、マグネシウム過剰においては、ローズグラス塩類腺はマグネシウムをほとんど排出しない上、排出能力の低いマグネシウムの代替としてカリウムの排出を大幅に増加させ、その結果カリウム含有率を減少させた(第2章・第4章)。これまでに、カリウムは植物体内で非常に移動しやすいことが明らかにされており、ローズグラスと同じイネ科スズメガヤ亜科の *Leptochloa fusca* においては、古い葉からカリウムが活発に転流されており、新しい葉や分げつに供給されるカリウムの約半分が再分配されたものであると推計されている(Jeschke et al., 1995)。したがって、マグネシウム過剰条件下で葉内の浸透圧調節の役割を果たしていると考えられるローズグラス塩類腺からのカリウム排出の増加(第4章)は、再分配されるカリウムの量を減少させることになり、結果として新葉等の生長抑制を引き起こす原因となっていることが考えられる。このことは、ナトリウム過剰耐性において重要な役割を果たしている塩類腺が、マグネシウム過剰条件下では生育悪化を引き起こす要因となっている可能性を示すものであり、非常に興味深いものである。このような塩類過剰耐性機構の対象塩類以外の過剰に対する反応に関しては、これまでほとんど研究がなされておらず、塩類腺以外の塩類過剰耐性機構においても同様の現象が生じるかどうかについては不明であり、今後更なる研究の蓄積が必要であろう。

以上は、今回得られた知見に対する植物栄養学並びに植物生理学的な観点に立った考察であるが、今回得られた知見の農業的な応用についても考えてみたい。ナトリウム過剰耐性において重要な役割を果たしている塩類腺であるが、これまで単子葉植物では、イネ科スズメガヤ亜科に

しか存在しないと考えられてきた。しかし近年になり、塩類排出能力は非常に低いものの、塩類腺と類似した突起状器官がイネやトウモロコシなどのイネ科作物で発見されている (Balakrishna, 1995; McWhorter et al., 1995; Ramadan and Flowers, 2004)。したがって、ローズグラス塩類腺における活発なナトリウム排出メカニズムを解明することができれば、その知見の応用によるこれらの重要なイネ科作物のナトリウム排出能力の強化、さらにはナトリウム過剰耐性の向上につながることを期待される。本研究において、ローズグラス塩類腺ではナトリウム排出を効果的に行うため、ナトリウム輸送に特化した機構が存在することが明らかになったことから、イネやトウモロコシの葉の突起状器官におけるイオン輸送機構を調査し、ローズグラス塩類腺のイオン輸送機構との比較を行うことで、これらの作物におけるナトリウム排出能力向上の手がかりが得られるかもしれない。

また、牧草としての視点からみると、マグネシウムによるカリウムの代替的排出は、畜産的に有用な現象となる可能性も考えられる。牧草の品質に影響を与える要因の一つとしてカリウム / (マグネシウム + カルシウム) 当量比があるが、この値が高い場合、反すう家畜にグラステタニー (低マグネシウム血症) という代謝異常を引き起こす可能性が高くなることが示されている (Jefferson et al., 2001; National Research Council, 2001)。本研究により、マグネシウム投与がマグネシウム含有率の増加のみならず、すでに体内に吸収されているカリウムの含有率を減少させることが明らかになったことから、マグネシウム含有率の増加と塩類腺からのカリウム排出を目的とした、「出穂期等の伸長が終了した段階でのマグネシウム投与」が、グラステタニーの危険性を減少させる技術として利用できると考えられる。

以上のように、本研究を通じて、ローズガラス塩類腺からの塩類排出に関して様々な知見が得られたが、その一方で、塩類排出機構に関してはまだ不明な点が多く残されている。また、得られた知見はいずれも基盤的なものであり、上で述べたような農業面への応用に結びつけるためには、まだ多くの課題が残っている。しかしながら、本研究の結果は、今後の応用研究、技術開発の方向性に一石を投じるものであり、応用的観点も踏まえたより一層の研究開発が期待される。

## 要旨

土壌の塩類集積は、海水流入や灌漑、肥料の過剰投入などによって生じ、作物の生育や生産性に悪影響を与える要因として世界的な問題となっている。土壌に集積する塩類の種類及び組成は、塩類集積の原因や環境条件などにより変化し、広く研究が行われている塩化ナトリウム以外にもカリウム、カルシウム、マグネシウム、硝酸、リン酸など様々なイオンが集積する。このうち、マグネシウムは、肥料や土壌改良資材として施用される植物の多量必須元素の一つであり、また海水中にナトリウムに次いで多く含まれる陽イオンでもあるため、不適切な施肥や海水流入などにより集積することが示されている。

イネ科スズメガヤ亜科に属するローズグラス(*Chloris gayana* Kunth)は世界的に広く栽培されている暖地型牧草であり、日本においても九州や沖縄などを中心に栽培され、暖地型牧草の中では最も栽培面積が広いとされている。ローズグラスは塩類腺という体内の過剰塩類を体外に排出する器官を葉に持つことが示されており、塩類集積地での栽培に適した牧草の一つであると考えられている。しかしながら、塩類腺の研究を含めてこれまで行われてきたローズグラスの耐塩性の研究は、ナトリウム過剰に関するものが中心であり、他のミネラルの過剰の影響についてはほとんど研究がなされていない。

そこで、本研究では、塩類腺からの塩類排出を中心に、ローズグラスに対するマグネシウム塩およびナトリウム塩による塩類過剰の影響を調査することにより、ローズグラスの異なる塩類過剰に対する耐性の比較と、これらの塩類過剰における塩類腺の働きについて検討することとした。

まず、ナトリウム過剰とマグネシウム過剰がローズグラスの生育に与える影響を他のイネ科牧草と比較するため、ローズグラスを含む12種のイネ科牧草に対し、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム過剰処理を行った。その結果、ローズグラスは塩化カルシウム過剰及び塩化ナトリウム過剰に対しては強い草種に分類されたが、塩化マグネシウム過剰に対しては弱い草種に分類された。また、各草種の $C_{50}$ 値（50%生育阻害濃度）を各塩類処理間で比較したところ、塩化カルシウム処理と塩化ナトリウム処理の間には有意な正の相関が認められたが、塩化マグネシウム処理については他の塩類処理との間に相関が認められなかった。これらのことから、塩化カルシウム過剰耐性と塩化ナトリウム過剰耐性の間には共通のメカニズムがあるが、塩化マグネシウム過剰耐性については他の2種類の塩類に対する耐性とはメカニズムが異なっていることが考えられた。

次に、ナトリウム過剰及びマグネシウム過剰に対する塩類腺の反応と体内ミネラル含有率に及ぼす影響について検討するため、ローズグラスの根部に塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム過剰処理を行った場合の地上部のミネラル含有率及び塩類腺からのミネラル排出量を調査した。塩化ナトリウム処理は、地上部のナトリウム含有率を増加させ、逆にカリウム含有率を減少させた。それに対し、塩化マグネシウム処理は、マグネシウム含有率を増加させ、ナトリウム含有率、カリウム含有率、カルシウム含有率を減少させており、ナトリウム過剰とマグネシウム過剰では、ミネラル含有率に与える影響が異なっていることが明らかになった。また、ミネラル含有率の変動には、ミネラルの根での吸収及び地上部への移行だけでなく、塩類腺からの塩類排出も影響しており、特に塩化マグネシウム過剰条件下でのカリウム含有率の減少は、

塩類腺からのカリウム排出の増加が原因であると考えられた。

続いて、塩類腺の塩類排出機構についてさらに検討するため、切断葉に対して塩化ナトリウム処理及び塩化カリウム処理を行った。塩化ナトリウム処理及び塩化カリウム処理は、それぞれナトリウム及びカリウムの排出及び含有率を増加させた。塩化ナトリウムと塩化カリウムを混合させた場合、単独処理に比べてナトリウム排出には有意な影響が認められなかったが、カリウム排出は有意に減少した。これらのことから、ローズグラス塩類腺は、ナトリウム及びカリウムいずれも排出する能力を持つが、ナトリウムをより排出しやすいことが明らかになった。さらに、様々なイオン輸送阻害剤による処理を行ったところ、ナトリウム排出は Orthovanadate,  $Ba^{2+}$ , Ouabain, Tetraethylammonium (TEA), Verapamil により阻害された。それに対し、カリウム排出は Ouabain, TEA, Verapamil により阻害されたが、Orthovanadate,  $Ba^{2+}$  では有意な影響が認められなかった。これらのことから、ローズグラス塩類腺からの塩類排出においては、イオン輸送機構がナトリウムとカリウムで少なくとも部分的に異なっており、この異なる輸送機構がナトリウムに対する高い排出能力をもたらしていることが考えられた。

このようなナトリウム及びカリウム排出機構についての知見を踏まえて、ローズグラス塩類腺におけるマグネシウム過剰条件下での塩類排出について、切断葉を用いて調査した。塩化マグネシウム処理はマグネシウム排出を有意に増加させたが、その増加量は極めて少なかった。また、塩化マグネシウム処理はカリウム排出を有意に増加させ、その増加量はマグネシウム排出の増加量よりもはるかに大きかった。マグネシウム処理下でのカリウム排出の増加は、イオン輸送阻害剤の投与により阻害されたことから、イオン輸送タンパク質を介した生理反応であること

が考えられた。また、カリウム排出をほぼ完全に阻害する Verapamil の投与により、塩化マグネシウム処理によって引き起こされる葉身細胞液の浸透濃度 (leaf sap osmolality) の増加が拡大した。これらの結果から、ローズガラス塩類腺のマグネシウム排出能力は低く、マグネシウム過剰条件下では、葉内の浸透圧を調節するため、マグネシウムの代替として、より排出されやすいカリウムが塩類腺から排出されていると考えられた。

以上の結果から、ローズガラスの生理反応に及ぼす影響はナトリウム過剰とマグネシウム過剰で大きく異なっており、ナトリウム過剰に対応した耐性機構である塩類腺はナトリウム過剰に対しては大きな効果を持つが、マグネシウム過剰においてはカリウム含有率を減少させ、生育悪化の要因の一つとなっていると考えられた。

## 略語一覧

C<sub>50</sub>: 50%生育阻害濃度

DW: Dry Weight (乾燥重量)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)

FW: Fresh Weight (新鮮重量)

TEA: Tetraethylammonium (テトラエチルアンモニウム)

## 謝辞

本論文の取りまとめにあたり、広島大学大学院正岡淑邦教授、藤田耕之輔教授、河野憲治教授、江坂宗春教授、実岡寛文准教授にはご校閲の労と貴重なご助言を賜りました。また、広島大学大学院陸域循環制御論研究室の皆様には、実験の実施にあたって様々なご支援をいただきました。近畿中国四国農業研究センター旧草地飼料作物研究室の佐藤節郎博士、高橋佳孝博士、井出保行博士には、研究内容について貴重なご意見をいただきました。ここに、厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

- Ammal U.B., Mahendran P.P., Arunachalam G. (1999) Identification of sea water intrusion in coastal belt of Tirunelveli district. *Madras Agric. J.* 86: 513-515.
- 安藤忠男、正岡淑邦、尾形昭逸 (1979) ローズグラスのナトリウム栄養 (第2報) ローズグラス、ダリスグラス、スイートソルゴの乾物生産と陽イオン組成に及ぼす培地 Na, K, Ca, Mg 濃度の影響 土肥誌 50: 205-210.
- Ashraf M., McNeilly T., Bradshaw A.D. (1989) The potential for evolution of tolerance to sodium chloride, calcium chloride, magnesium chloride and seawater in four grass species. *New Phytol.* 112: 245-254.
- Balakrishna P. (1995) Screening of salt-tolerant varieties of rice (*Oryza sativa*) through scanning electron microscopy and ion analysis. *Indian J. Agric. Sci.* 65: 896-899.
- Balsamo R.A., Adams M.E., Thomson W.W. (1995) Electrophysiology of the salt glands of *Avicennia germinans*. *Int. J. Plant Sci.* 156: 658-667.
- Balsamo R.A., Thomson W.W. (1996) Isolation of mesophyll and secretory cell protoplasts of the halophyte *Ceratostigma plumgaginoides* (L.): a comparison of ATPase concentration and activity. *Plant Cell Rep.* 15: 418-422.
- Ben-Hayyim G., Kafkafi U., Ganmore-Neumann R. (1987) Role of internal potassium in maintaining growth cultured Citrus cells on increasing NaCl and CaCl<sub>2</sub> concentrations. *Plant Physiol.* 85: 434-439.
- Berry W.L. (1970) Characteristics of salts secreted by *Tamarix aphylla*. *Am. J.*

- Bot.* 57: 1226-1230.
- Bhatti A.S., Sarwar G. (1993) Secretion and uptake of salt ions by detached *Leptochloa fusca* L. Kunth (Kallar grass) leaves. *Environ. Exp. Bot.* 33: 259-265.
- Boon P.I., Allaway W.G. (1986) Rates and ionic specificity of salt secretion from excised leaves of the mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Aqua. Bot.* 26: 143-153.
- Briskin D.P., Basu S., Assmann S.M. (1995) Characterization of the red beet plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase reconstituted in a planar bilayer System. *Plant Physiol.* 108: 393-398.
- Brown H.D., Jackson R.T., Dupuy H.J. (1964) Transport of sugar in *Allium*: Effects of inhibitors and ethylene. *Nature* 202: 722-723.
- Cox R.M., Hutchinson T.C. (1979) Metal co-tolerances in the grass *Deschampsia cespitosa*. *Nature* 279: 231-233.
- Davis R.F., Jaworski A.Z. (1979) Effects of ouabain and low temperature on the sodium efflux pump in excised corn roots. *Plant Physiol.* 63: 940-946.
- de Luca M., García Seffino L., Grunberg K., Salgado M., Córdoba A., Luna C., Ortega L., Rodríguez A., Castagnaro A., Taleisnik E. (2001) Physiological causes for decreased productivity under high salinity in Boma, a tetraploid *Chloris gayana* cultivar. *Aust. J. Agric. Res.* 52: 903-910.
- Dischida W.J., Platt-Alolia K.A., Thomson W.W. (1992) Epidermal peels of *Avicennia germinans* (L.) Stearn: A useful system to study the function of salt glands. *Ann. Bot.* 70: 501-509.
- Fageria N.K. (1983) Ionic interactions in rice plants from dilute solutions. *Plant Soil* 70: 309-316.

- Fahn A. (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol.* 108: 229-257.
- 藤井弘志、小田九二夫、柴田康志、森静香、今川彰教、安藤豊 (2006) 2004年台風 15 号の特徴と山形県における潮風害の実態 日作紀 75: 459-464.
- Garciadeblás B., Senn M.E., Bañuelos M.A., Rodríguez-Navarro A. (2003) Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J.* 34: 788-801.
- Grant C.A., Racz G.J. (1987) The effects of Ca and Mg concentrations in nutrient solution on the dry matter yield and Ca, Mg and K content of barley (*Hordeum vulgare* K.). *Can. J. Soil Sci.* 67: 857-865.
- Hill A.E., Hill B.S. (1973) The *Limonium* salt gland: a biophysical and structural study. *International Review of Cytology* 35: 299-319.
- Hoagland D.R., Arnon D.I. (1950) The water-culture method for growing plants without soil. California Agric. Exp. Stn. Circular 347.
- Hodson M.J., Smith M.M., Wainwright S.J., Öpik, H. (1981) Cation cotolerance in a salt-tolerant clone of *Agrostis stolonifera* L. *New Phytol.* 90: 253-261.
- 堀兼明、福永亜矢子、浦嶋泰文、須賀有子、池田順一 (2002) 有機栽培農家圃場の土壌の実態 近畿中国四国農業研究センター研究報告 1: 77-94.
- 堀兼明、浦嶋泰文、塩見文武、太田雅也 (2003) ホウレンソウの減化学肥料ビニルハウス栽培農家土壌の実態—京都府夜久野町の事例— 近畿中国四国農業研究センター研究報告 2: 67-82.
- Horie T., Schroeder J.I. (2004) Sodium transporters in plants. *Diverse genes*

- and physiological functions. *Plant Physiol.* 136: 2457-2462.
- Jefferson P.G., Mayland H.F., Asay K.H., Berdahl J.D. (2001) Variation in mineral concentration and grass tetany potential among Russian wildrye accessions. *Crop Sci.* 41: 543-548.
- Jeschke W.D., Klagges S., Hilpert A., Bhatti A.S., Sarwar G. (1995) Partitioning and flows of ions and nutrients in salt-treated plants of *Leptochloa fusca* L. Kunth. I. Cations and chloride. *New Phytol.* 130: 23-35.
- Kent L.M., Lauchli, A. (1985) Germination and seedling growth of cotton: salinity-calcium interactions. *Plant Cell Environ.* 8: 155-159.
- Kim Y.H., Shim I.S., Kobayashi K., Usui, K. (1999) Relationship between Na content or K/Na ratio in shoots and salt tolerance in several gramineous plants. *J. Weed Sci. Tech.* 44: 293-299.
- Kobayashi H., Masaoka Y., Sato, S. (2005) Effects of Excess Magnesium on the Growth and Mineral Content of Rice and *Echinochloa*. *Plant Prod. Sci.* 8: 38-43.
- Kumar A. (1996) Use of *Leptochloa fusca* for the improvement of salt-affected soils. *Exp. Agr.* 32: 143-149.
- Kurita Z. (1990) Screening for tolerance to magnesium chloride on Guayule, *Parthenium argentatum* Gray. *Japan. J. Trop. Agr.* 34: 84-91.
- Li X., Seliskar D.M., Gallagher J.L. (2006) Cellular responses to salinity of two coastal halophytes with different whole plant tolerance: *Kosteletzkya virginica* (L.) Presl. and *Sporobolus virginicus* (L.) Kunth. In: Khan M.A., Weber D.J., eds. *Ecophysiology of high salinity tolerant plants*. pp 187-200. Springer, Dordrecht.
- Lipshitz N., Shomer-Ilan A., Eshel A., Waisel Y. (1974) Salt glands on

- leaves of Rhodes grass (*Chloris gayana* Kth.). *Ann. Bot.* 38: 459-462.
- Liphschitz N., Waisel Y. (1982) Adaptation of plants to saline environments: salt excretion and glandular structure. In: Sens D.N., Rajpurohit K.S., eds. Tasks for vegetation science, vol. 2. pp 197-214. Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- Maathuis F.J. Amtmann, A. (1999) K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: the basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios. *Ann. Bot.* 84: 123-133.
- MacFarlane G.R., Burchett M.D. (1999) Zinc distribution and excretion in the leaves of the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Environ. Exp. Bot.* 41: 167-175.
- Mansour M.M.F., Salama K.H.A., Al-Mutawa M.M. (2003) Transport proteins and salt tolerance in plants. *Plant Sci.* 164: 891-900.
- Marcum K.B. (1999) Salinity tolerance mechanisms of grasses in the subfamily Chloridoideae. *Crop Sci.* 39: 1153-1160.
- Marcum K.B., Anderson S.J., Engelke M.C. (1998) Salt gland ion secretion: a salinity tolerance mechanism among five zoysiagrass species. *Crop Sci.* 38: 806-810.
- Marcum K.B., Pessaraki M. (2006) Salinity tolerance and salt gland excretion efficiency of bermudagrass turf cultivars. *Crop Sci.* 46: 2571-2574.
- Masters D.G., Norman H.C., Dynes R.A. (2001) Opportunities and limitation for animal production from saline land. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14 (special issue): 199-211.
- McWhorter C.G., Paul R.N., Ouzts J.C. (1995) Bicellular trichomes of Johnsongrass (*Sorghum halepense*) leaves: morphology, histochemistry, and function. *Weed Sci.* 43: 201-208.

- Munns R., Cramer G.R., Ball M.C. (1999) Interaction between rising CO<sub>2</sub>, soil salinity and plant growth. In: Luo Y., Mooney H.A., eds. Carbon dioxide and environmental stress. pp 139-167. Academic Press, London.
- 永田靖、吉田道弘 (1997) 統計的多重比較法の基礎 サイエンティスト社 東京.
- Naidoo Y., Naidoo G. (1999) Cytochemical localization of adenosine triphosphatase activity in salt glands of *Sporobolus virginicus* (L.) Kunth. *S. Afr. J. Bot.* 65: 370-373.
- National Research Council (2001) Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th revised edition, the National Academies Press, Washington, DC.
- 尾形昭逸、安藤忠男、正岡淑邦 (1979) ローズグラスのナトリウム栄養 (第1報) ナトリウム集積作用について 土肥誌 50: 200-204.
- 大泉久一、高崎康夫、金成善一、野島博、島田典司、佐藤幸夫、芦原昭一 (1979) 施設栽培土壌の塩類集積対策としてのイネ科飼料作物の利用 第1報 塩類濃度を異にする土壌における夏期短期栽培イネ科飼料作物の生育 千葉大園芸学部研究報告 26: 9-13.
- Pollak G., Waisel Y. (1970) Salt secretion in *Aeluropus litoralis* (Willd.) Parl. *Ann. Bot.* 34: 879-888.
- Qadir M., Qureshi R.H., Ahmad N., Ilyas M. (1996) Salt-tolerant forage cultivation on a saline-sodic fields for biomass production and soil reclamation. *Land Degradation & Development* 7: 11-18.
- Ramadan T., Flowers T.J. (2004) Effects of salinity and benzyl adenine on development and function of microhairs of *Zea mays* L. *Planta* 219: 639-648.
- Royo A., Aragüés R. (1993) Validation of salinity crop production functions

- obtained with the triple line source sprinkler system. *Agron. J.* 85: 795-800.
- Royo A., Aragüés R. (1999) Salinity-yield response functions of barley genotypes assessed with a triple line source sprinkler system. *Plant Soil* 209: 9-20.
- Rozema J., Gude H., Pollak G. (1981) An ecophysiological study of the salt secretion of four halophytes. *New Phytol.* 89: 201-217.
- 澤井晃、白山竜次、南公宗、小松敏憲、鶴見義朗、山方誠、土井修、長谷健、上野敬一郎 (1996) ローズグラスの新品種「アサツユ」の育成とその特性 鹿児島県農業試験場研究報告 25: 47-52.
- Shah S.H., Wainwright S.J., Merrett M.J. (1993) Cation cotolerance in callus culture of *Medicago sativa* L. tolerant to sodium chloride. *Plant Sci.* 89: 81-84.
- Suttie J.M. (2000) Hay and straw conservation - For small-scale farming and pastoral conditions. FAO Plant Production and Protection Series No. 29. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Szabolcs I. (1994) Soils and salinisation. In Handbook of Plant and Crop Stress. Pessarakali M. ed. pp 3-11, Marcell Dekker, New York.
- Taleisnik E., Peyrano G., Arias C. (1997) Response of *Chloris gayana* cultivars to salinity. 1. Germination and early vegetative growth. *Trop. Grassl.* 31: 232-240.
- van Genuchten M.Th., Hoffman G.J. (1984) Analysis of crop salt tolerance data. In Shainberg I. and Shalhevet J. eds., Soil Salinity under Irrigation: Process and Management. Pp 258-271. Springer Verlag, Berlin.
- Véry A-A., Sentenac H. (2002) Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane. *Trends Plant Sci.* 7: 168-175.

- Wieneke J., Sarwar G., Roeb M. (1987) Existence of salt glands on leaves of Kallar grass (*Leptochloa fusca* L. Kunth.). *J. Plant Nutr.* 10: 805-820.
- Wu L. (1981) The potential for evolution of salinity tolerance in *Agrostis stolonifera* L. and *Agrostis tenuis* Sibth. *New Phytol.* 89: 471-486.
- 山本晴彦、岩谷潔、鈴木賢士、早川誠而、鈴木義則 (2000) 1999 年台風 18 号による九州・山口地方の農業災害の概要と水稻塩害の実態 日作紀 69: 424-430.