

好塩性植物フダンソウ (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.) の
ナトリウム応答に関する研究
—ナトリウムが硝酸の吸収と代謝、および生育に及ぼす影響—

A study on the response of halophilic Swiss chard
(*Beta vulgaris* var. *cicla* L.) to external sodium
—The effect of sodium on nitrate uptake,
nitrate metabolism, and growth—

蕪木 絵実

2015

目 次

第1章 緒言	1
第2章 フンダンソウの硝酸吸収におけるナトリウムとカリウムの効果	4
第1節 材料と方法	5
1. 栽培方法	
2. 導管液の採取方法	
3. 無機元素含有率と浸透圧の測定	
4. プロリンとアミノ酸の定量	
5. 統計処理	
第2節 結果	8
1. 異なる栄養塩が生育に及ぼす影響	
2. 葉と根の搾汁中無機元素濃度	
3. 葉と根における Cl^- と NO_3^- の関係	
4. 導管液中の無機元素濃度	
5. 葉と根におけるプロリンとアミノ酸含有率	
6. Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- 、アミノ酸、プロリンが葉と根の浸透ポテンシャルにもたらす推定寄与率	
第3節 考察	14
第4節 要約	17
第3章 培地のナトリウム濃度の上昇が、フンダンソウの硝酸吸収および硝酸還元酵素活性に及ぼす影響	19
第1節 材料と方法	20
1. 栽培方法	
2. 無機元素濃度の測定	
3. 全窒素(N)含有率の測定	
4. NR 活性の測定	
5. 統計処理	
第2節 結果	22

1. 新鮮重、乾物重、および水分含有率の変化	
2. 葉の搾汁中の無機元素濃度	
3. 葉の Na^+ 、 K^+ 、WC と NO_3^- 濃度の関係	
4. 全 N 含有率	
5. NR 活性	
第3節 考察	26
第4節 要約	30
第4章 ナトリウムによる硝酸の吸収促進が、フダンソウの生育および光合成に及ぼす影響	
	31
第1節 材料と方法	32
1. 栽培方法	
2. 採取方法	
3. 光合成速度の測定	
4. クロロフィルの定量	
5. 無機元素濃度および全 N 含有率の測定	
6. RuBPCase (Rubisco) の発現	
7. 統計処理	
第2節 結果	36
1. K 処理と Na 処理が生育と水分含有率に及ぼす影響	
2. 葉の搾汁中 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- 濃度	
3. 葉搾汁の Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- と NO_3^- 濃度との関係	
4. 葉の全 N 含有率	
5. 葉のクロロフィル含有率	
6. 最大展開葉の光合成速度	
7. Rubisco タンパク質の発現	
8. 葉搾汁の NO_3^- 濃度と生育との関係	
第3節 考察	42
第4節 要約	45
第5章 総合考察	47

第 6 章 摘要	50
第 7 章 SUMMARY	52
引用文献	55
謝辞	61
論文目録	62

第1章

緒論

世界の陸地面積の 7%に当たる 9.3 億ヘクタールが塩類集積の影響を受けており (Munns 2002)、多種の穀物の収量を大幅に低減させる原因となっている。さらに耕作地面積の 6%に当たる 7700 万ヘクタールの土壌が塩による影響を受けている (Munns 2002)。このような塩類集積土壌は、植物にイオンストレスや浸透圧ストレスを与える。塩類の中でも特に高濃度の NaCl は、水分や養分の吸収阻害、またナトリウム (Na^+) や塩素 (Cl^-) による直接害をもたらすことなどから、多くの中生植物において生育阻害因子となっている。そのため、植物が塩ストレスによるダメージを最小限に抑えるための耐塩性機構の解明に関する研究がこれまでに多くなされており、浸透圧調節、 Na^+ の排除、隔離、排出、希釈および細胞膜 Na^+/H^+ 対向輸送を利用した高カリウム (K^+)、低 Na^+ 吸収選択性などが挙げられる (Shi et al. 2002、Ottow et al. 2005)。一方で、スアエダサルサ (*Suaeda salsa* L.) やサリコルニア (*Salicornia bigelovii* Torr.)、フダンソウ (*Beta vulgaris* var. *cicla*) といったいくつかの植物種は高 NaCl 濃度下で最適な生育を示し、同時に多量の Na^+ を細胞内に蓄積させるという好塩性を備えている (Wang et al. 2001、Mori et al. 2006、Ohori and Fujiyama 2011、Yamada et al. in press)。さらに、海洋珪藻において、 Na^+ が硝酸 (NO_3^-) の共輸送体として利用されていること、また C_4 植物のハゲイトウ (*Amaranthus tricolor*) では、光合成において CO_2 を固定するホスホエノールピルビン酸の基質となるピルビン酸の輸送が Na^+ によって促進されるという報告がある (Murata et al. 1992、Boyd and Gradmann 1999)。これらは、 Na^+ がいくつかの植物種の生育において重要な役割を果たしていることを実証している。

窒素 (N) は必須元素の一つであり、高等植物や下等植物の生育において、アミノ酸やタンパク質、細胞膜脂質の合成などの重要な役割を果たす (Lam et al. 1996)。植物は NO_3^- かアンモニウム (NH_4^+) を与えた時の生育の良否から、好硝酸性植物と好アンモニウム性の植物に分類でき、多くの農作物で好硝酸性を示す (Britto and Kronzucker 2013)。しかしながら、高濃度の NaCl 培地では同じ一価の陰イオンである Cl^- が NO_3^- の吸収を拮抗的に阻害し、植物は N 欠乏を呈する。Debouba et al. (2006) は、この NO_3^- 吸収阻害が NO_3^- 同化経路における酵素の活性と関わっていると報告している。硝酸同化経路の第一段階である硝酸還元酵素 (NR) 活性は細胞内の NO_3^- によって誘導される酵素である (Abd-El Baki et

al. 2000)。そのため、NaCl 培地における植物の NR 活性は、高濃度の Cl^- による NO_3^- の吸収阻害を受けて低下し、様々な窒素化合物の合成が抑制され、やがて植物の生育は低下する (Flores et al. 2004)。このような NaCl 添加による NO_3^- 吸収や NR 活性の低下は、インゲン (Gouia et al. 1994)、トウモロコシ (Abd-El Baki et al. 2000)、トマト (Debouba et al. 2006) でも報告されている。一方、培地の NaCl 濃度の上昇に伴う生育促進、および全 N 含有率の上昇が好塩性を示すフダンソウとサリコルニアにおいて認められている (Yamada et al. Unpublished data)。しかしながら、この全 N 含有率の上昇が、生育の促進に起因するものなのか、それとも Na 添加による直接的な影響なのかは明らかとなっていない。

一般的に高等植物における NO_3^- の培地から根への取り込みは、細胞膜上に存在する NO_3^-/H^+ 共輸送体を介して行われる (Mistrik and Ullrich 1996)。そして根に取り込まれた NO_3^- は、導管に積載されて地上部へと運ばれる。Ivashikina and Feyziev (1998) は、この導管の NO_3^- 輸送において、 K^+ が NO_3^- の随伴陽イオンとして電荷のバランスを保つ役割を担っていると報告している。それと関連して、 K^+ の供給量が減少することによって、 NO_3^- の吸収が抑制されるなど、植物の細胞内における K^+ と NO_3^- の濃度が密接に関係していることを示す研究結果も多数報告されている (Pilbeam and Kirkby 1990、Wang et al. 2001)。

フダンソウは野菜類で、世界中で食品として用いられている。また、水耕栽培実験において、フダンソウを NaCl 80 mmol L^{-1} を含む溶液に曝すと、その生育は NaCl を含まない対照区の 146% も促進した (Yamada et al. Unpublished data)。また、土耕栽培においてもフダンソウは NaCl 添加区 (NaCl $21.2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ pot}^{-1}$) で対照区よりも高い生育を示すことが報告されている (Takahashi et al. 1997)。しかしながら、フダンソウのような C_3 植物の野菜類における、 Na^+ による生育促進、および N 吸収促進メカニズムは未だ明らかとなっていない。

そこで第 2 章では、フダンソウの葉への NO_3^- 輸送における Na^+ と K^+ の影響をそれぞれ明らかにすることを目的とした。生育促進による N 吸収・輸送促進の可能性を排除するため、7 日間の処理期間を設け、 Na^+ と K^+ をそれぞれ添加した時の NO_3^- の吸収・輸送に与える影響を調査した。さらに、葉、根、導管液における NO_3^- 濃度から、 Na^+ もしくは K^+ が根から葉への NO_3^- 輸送のどの段階で関わっているのかを検討した。

第 3 章では、吸収・輸送された NO_3^- が N 化合物合成のために正常に代謝されているのかを調べるため、 Na^+ が NR 活性に及ぼす影響を明らかにすることとした。さらに、 Na^+ が NO_3^- の吸収・輸送および NR 活性に与える影響が、好塩性植物と耐塩性植物で異なるのか

を明らかにするため、耐塩性強とされるオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) を比較植物として用い実験を行った。

好塩性植物 *Salicornia europaea* を NaCl 溶液に曝したところ、NaCl 200 mM の時に光合成速度が最も高い値を示した (森山 2009)。また、*Salicornia europaea* において塩処理下で特異的に発現する遺伝子を調べたところ、特に多くの光合成関連遺伝子が確認された (森山 2009)。これらのことから、*Salicornia europaea* の NaCl による生育促進は光合成速度の上昇によってもたらされている可能性があり、好塩性植物フダンソウでも同様のメカニズムが働いているのではないかと考えた。イネの葉に分配される N の 75% が葉緑体に局在している。さらにその葉緑体中において、N 化合物の 27% が光合成の CO₂ 固定反応を触媒する Rubisuco にみられる (Makino et al. 2003)。このことから、フダンソウでは Na⁺ 添加によって吸収・輸送が促進された NO₃⁻ は光合成、特に Rubisco 合成に積極的に利用されているのではないかと考えた。そこで第 4 章では、NO₃⁻ の吸収・輸送促進による光合成速度の上昇が、好塩性植物フダンソウの生育促進要因であるのかを検証することとし、Na⁺ がフダンソウの NO₃⁻ 吸収・輸送、光合成、クロロフィルの生合成、および生育に及ぼす影響を調査した。

第 2 章

フダンソウの硝酸吸収におけるナトリウムとカリウムの効果

過去の研究結果において、フダンソウ (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.) は培地の NaCl 濃度の上昇にともなって生育および全 N 含有率を上昇させ、茎葉の K/Na 含有率比と N 含有率との間に有意な正の相関関係を示すことが分かっている (Yamada et al. unpublished data)。そのため筆者らは、フダンソウにおける N 吸収は Na^+ に依存して行われていると結論付けている。しかし、NaCl 添加による N 吸収の促進が、生育促進に起因するものなのか、それとも Na^+ による直接的な影響であるのかは分かっていない。そこで、培地の変化が生育に変化をもたらす以前の Na^+ による影響を調査するため、7 日間の処理期間を設けた。また多くの植物種において、細胞内の K^+ 濃度と NO_3^- 濃度との間に正の相関を示す (Wang et al. 2001) という報告があることから、フダンソウにおいて K^+ と Na^+ のどちらがより NO_3^- の吸収・輸送促進に寄与するのかを比較検討した。さらに、 K^+ と Na^+ の添加が NO_3^- 吸収・輸送過程のどの段階に影響を及ぼしているのかを明らかにするため、葉、根、導管液中の NO_3^- 含有率を測定した。

第 1 節 材料と方法

1. 栽培方法

フダンソウをバーミキュライトに播種し、蒸留水を灌水した。播種から 10 日後、1 ポット当たり 5 個体となるように 4 L のプラスチックポットに移植し、基本培養液(表 1)で水耕栽培を行った。栽培ポットは常に通気し、1 週間に 1 度培養液を更新した。Na の混入量を最小限にするため、水耕液は蒸留水で作製した。

水耕栽培を開始して 30 日後、 K^+ と Na^+ の濃度がそれぞれ低濃度(5 mM)と高濃度(50 mM)となるよう調製した処理区(表 2)を設けた。各処理 4 反復とし、7 日間処理を行った。 Na^+ を含む処理液には、N 栄養として KNO_3 の代わりに $NaNO_3$ を添加した。処理液の微量元素は基本培養液と同じ組成とした。栽培は、鳥取大学農学部ガラス室内にて、2013 年の 4 月から 6 月にかけて行った。

処理開始から 7 日後に、1 ポット当たり 2 個体を葉と根に分けて採取した。新鮮重を測定し、70°C で 48 時間乾燥させた後、乾物重を測定し、水分含有率を算出した。また、1 ポット中の残りの 2 個体は、葉と根に分けて採取後速やかに液体窒素で凍結させ、-70°C の冷凍庫に保存した。凍結試料は無機元素、プロリン、およびアミノ酸の分析に使用した。

表 1 基本培養液の組成と使用塩

多量元素 (mol m^{-3})			微量元素 (g m^{-3})		
N	4.0	KNO_3	Fe	2.0	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$
		$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	Mn	0.5	$MnSO_4 \cdot 5H_2O$
		$NH_4H_2PO_4$	B	0.2	H_3BO_3
P	0.4	$NH_4H_2PO_4$	Zn	0.1	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
K	2.0	KNO_3	Cu	0.01	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$
Ca	1.0	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	Mo	0.005	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$
		$CaCl_2 \cdot 2H_2O$			
Mg	2.0	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$			

表 2 処理液の組成と使用塩

元素	処理 (mmol L ⁻¹)			
	K5	Na5	K50	Na50
Na	0	5	0	50
K	5	0	50	0
Ca	1	1	1	1
Mg	2	2	2	2
N	4	4	4	4
P	0.4	0.4	0.4	0.4
S	2	2	2	2
Cl	3.4	3.4	48.4	48.4

2. 導管液の採取方法

水耕栽培開始から 30 日後、フダンソウ 9 個体を同様に表 1 で示した処理液に曝した。処理開始から 0、2、4、6 時間後に茎基部を切除した。切り口から溢出した導管液を、毛細管現象を利用してマイクロチューブに詰めた綿で蓋をし、採取した(写真 1)。導管液は切除後 1 時間かけて二個体ずつ採取した。導管液を吸水した綿を、注射針で底に穴を空けたマイクロチューブに詰め、さらに別のマイクロチューブにはめた状態で、10,000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。回収された導管液の Na⁺、K⁺、Cl⁻、NO₃⁻濃度を測定した。



写真 1 導管液採取の様子

3. 無機元素濃度と浸透圧の測定

約 0.4 g の凍結させた葉と根をそれぞれ注射針で底に穴を空けた 0.5 mL 容マイクロチューブに詰めた。さらにこのマイクロチューブを 1.5 mL 容のマイクロチューブに入れ、10,000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。その後、マイクロチューブに回収された抽出液を用い、無機元素濃度および浸透圧の測定を行った。Na⁺と K⁺は原子吸光法(Z-6100 型偏光ゼーマン原子吸光光度計 HITACHI)で、また Cl⁻と NO₃⁻はイオンクロマトグラフィー(HIC-10Asuper, Shimadzu, Kyoto, Japan)で定量を行った。

抽出液の浸透圧は蒸気圧法浸透圧計(VAPRO Osmometer 5520, Wescor Inc., UT, USA)で測定した。浸透圧(Ψ_s)の算出には以下に示す van't Hoff の式を用いた。

$$\Psi_s = -cRT$$

このとき、 Ψ_s は浸透圧[Pa]、c は溶質濃度[mol L⁻¹]、R は気体定数 8.314[J K⁻¹ mol⁻¹]及び T は絶対温度 298[K]とした。

4. プロリンとアミノ酸の定量

凍結試料 0.2 g に 2 mL の 3%スルホサリチル酸溶液を加えて摩砕した。15,000 rpm で 15 分間懸濁液の遠心分離を行った後、上清を抽出液とし、プロリンとアミノ酸の定量を行った。

4-1. プロリンの定量

プロリンの定量は Magné(1992)らに従って行った。1.25 g のニンヒドリンを 30 mL の酢酸と 20 mL の蒸留水の混合液に加え、ニンヒドリン溶液とした。ニンヒドリン溶液 2 mL と 0.5 mL の抽出液を試験管内で混合し、沸騰湯浴中に入れて反応を開始した。1 時間後、試験管を冷水に浸けて反応を停止させ、5 mL のトルエンを加えた。15 秒間激しく混合させた後、溶液が上層と下層に完全に別れたら、上層部分の溶液を 520 nm の吸光度を測定した(V-630BIO, JASCO, Tokyo, Japan)。

4-2. アミノ酸の定量

0.2 M のクエン酸ナトリウムとクエン酸を混合しながら pH 4.6 になるように調製し、クエン酸緩衝液とした。1%のニンヒドリンと 0.03%のアスコルビン酸を混合してニンヒドリン溶液とし

た。その後、試験管に抽出液 0.1 mL とクエン酸緩衝液 3 mL、ニンヒドリン溶液 2 mL を加えて混合し、試験管を沸騰したお湯に入れ反応を開始した。15 分後、試験管を氷の入ったウォーターバスで冷やして反応を停止させ、3 mL の 60%エタノールを加えて適宜希釈した。10 分後 570 nm の吸光度を測定した。

5. 統計処理

GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)を用いて統計解析を行った。1 元配置の平均の分散 (ANOVA) は、Tukey の多重比較分析によって解析を行った。全てのエラーバーは標準誤差 (SE) を示す。

第 2 節 結果

1. Na 処理と K 処理が生育に及ぼす影響

7 日間という短期の処理期間では、生育および水分含有率において処理間に有意な差はみられなかった (表 3)。つまり、この実験での結果は全て生育に起因するものではない。

表 3 7 日間の K 処理と Na 処理が葉と根の乾物重 (DW) および水分含有率 (WC) に及ぼす影響。処理間において同一アルファベット間には 5%水準で有意差がない

処理	DW (g plant ⁻¹)		WC (g g ⁻¹ DW)	
	葉	根	葉	根
K 5	0.56 a	0.13 a	10.6 a	15.6 a
Na 5	0.52 a	0.12 a	12.6 a	15.4 a
K 50	0.53 a	0.14 a	12.3 a	14.6 a
Na 50	0.48 a	0.12 a	12.0 a	15.4 a

2. 葉と根の搾汁液中イオン濃度

葉と根どちらにおいても、Na 処理区であれば Na^+ が、K 処理区であれば K^+ が突出して高い濃度を示した(図 1a、b)。また処理濃度に比例して Na^+ および K^+ 濃度が高くなる傾向を示した。

葉および根の Cl^- 濃度は、低濃度区と高濃度区のどちらにおいても K 処理区で Na 処理区よりも有意に高い値を示した(図 1c)。葉の Cl^- 濃度は低濃度区と高濃度区ともに、K 区は Na 区の約 2 倍もの値を示した。同様に、根の Cl^- 濃度は K5 区では Na5 区の 1.7 倍、K50 区では Na50 区の 1.5 倍の値を示した。

一方 Cl^- とは異なり、葉の NO_3^- 濃度は Na5 区では K5 区の 2 倍、Na50 区では K50 区の 4 倍であり、Na 区において顕著に高い値を示した(図 1d)。反対に根の NO_3^- 濃度は、K 区で Na 区よりも高い値を示し、K5 区では Na5 区の 1.8 倍、K50 区では Na50 区の 1.7 倍であった。

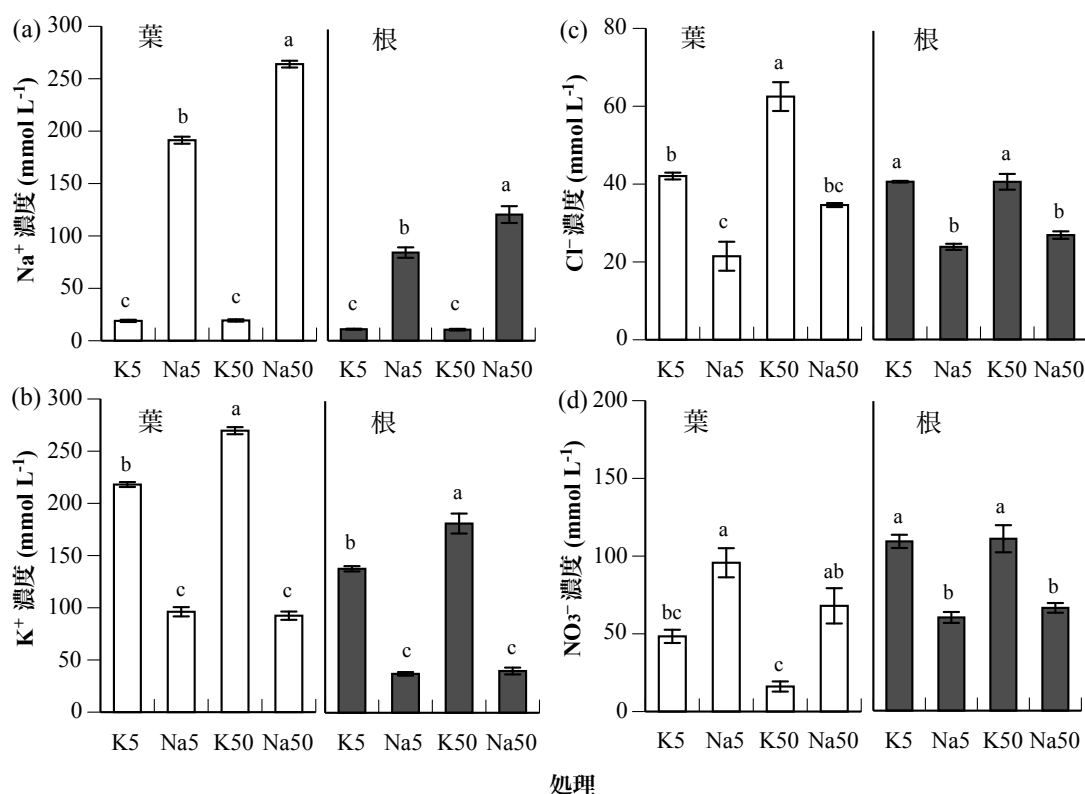


図 1 K 処理と Na 処理下における葉と根の搾汁中の Na^+ (a)、 K^+ (b)、 Cl^- (c)、 NO_3^- (d) 濃度。処理間において異なるアルファベットの間には 5%水準で有意差がある ($P < 0.05$; Tukey)

3. 葉と根の搾汁中における Cl^- と NO_3^- の関係

搾汁の NO_3^- 濃度における葉/根比は、Na 区で K 区よりも高く、特に Na5 区における NO_3^- 濃度は葉で根よりも 1.6 倍高かった(表 4)。一方、 Cl^- 濃度の葉/根比は、K 区で Na 区よりも高い傾向を示したものの、有意差はみとめられなかった。

葉における $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ 比は、Na 区で K 区よりも有意に高かった。一方根の $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ 比においては、処理間に有意な差はみとめられなかった。

表 4 K 処理と Na 処理下における Cl^- と NO_3^- 濃度の葉/根比、および葉と根における $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ 比の変化。処理間において異なるアルファベットの間には 5%水準で有意差がある ($P < 0.05$; Tukey)

	K5	Na5	K50	Na50
葉/根 比				
Cl^-	1.03 ab	0.83 b	1.59 a	1.25 ab
NO_3^-	0.46 c	1.59 a	0.24 d	1.02 b
$\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ 比				
葉	1.15 b	4.35 a	0.31 c	1.45 b
根	2.54 a	2.29 a	2.73 a	2.24 a

4. 導管液中のイオン濃度

導管液の Na^+ と K^+ 濃度は搾汁における結果と同様の傾向がみられ、また濃度は経時とともに上昇した(図 2a、b)。 Na^+ および K^+ をそれぞれ含まない区では処理期間を通じてほぼ一定の Na^+ 、 K^+ 濃度で推移した。

導管液中の Cl^- 濃度は、有意に K 区で Na 区よりも高い値を示し、処理開始から 6 時間後では、低濃度区と高濃度区ともに K 区は Na 区よりも約 2 倍も高かった(図 2c)。

導管液中の NO_3^- 濃度は、低濃度区においては K 区と Na 区の間に有意な差はみられなかった(図 2d)。しかしながら、Na50 区では処理期間を通して他の処理区よりも顕著に高い NO_3^- 濃度を示した。さらに、処理開始から 6 時間後の導管液中の NO_3^- 濃度は、Na50 区で K50 区よりも 1.4 倍と顕著に高い値を示した。

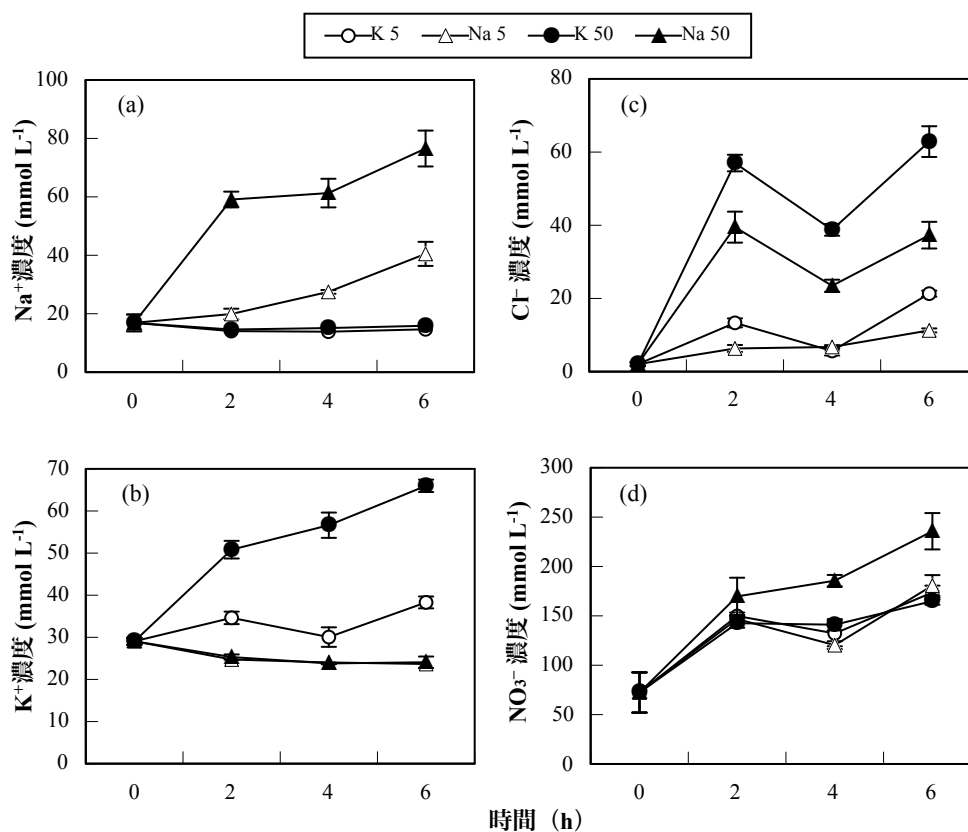


図 2 処理開始から 0、2、4、6 時間後に採取した導管液中の Na^+ (a)、 K^+ (b)、 Cl^- (c)、 NO_3^- (d) 濃度の変化。エラーバーは標準誤差 (SE) を示す

5. 導管液中の Na^+ および K^+ と NO_3^- との関係

導管液中の Na^+ と NO_3^- の間には高い正の相関関係がみとめられたのに対し、 K^+ と NO_3^- の間には有意な相関関係がみられなかった (図 3a、b)。

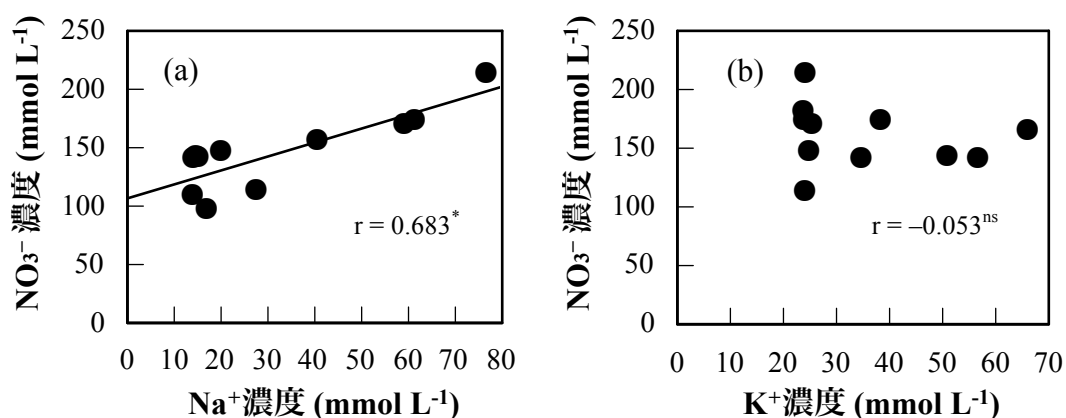


図 3 処理開始から 0、2、4、6 時間後に採取した導管液中の Na^+ (a) および K^+ (b) と NO_3^- 濃度の関係。ピアソンの相関係数を用いて解析を行った (r ; ns, not significant, $^*P < 0.05$)

6. 葉と根におけるプロリンとアミノ酸濃度

葉のプロリン濃度は K と Na 区ともに高濃度区において、低濃度区と比較して顕著に高い値を示した(図 4a)。しかし、葉のプロリン濃度において高濃度区と低濃度区ともに、K 区と Na 区 の間に有意な相違はみとめられなかった。根のプロリン含有率は Na50 区で最も高く、K5 区で最も低い値を示した。

葉のアミノ酸濃度は、K50 区で顕著に低い値を示したが、他の処理区間において有意な差はみられなかった(図 4b)。一方根のアミノ酸濃度は、Na50 区で他の処理区と比較して顕著に高い値を示した。

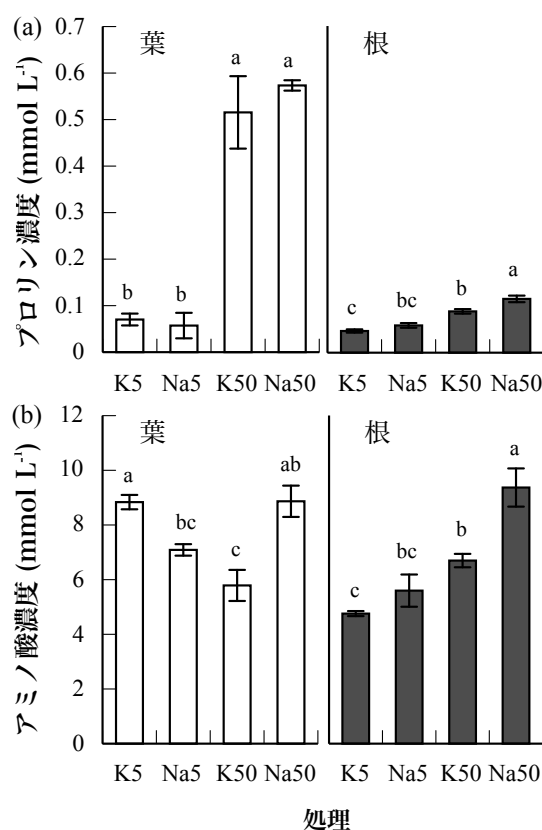


図 4 K 処理と Na 処理下における葉と根のプロリン濃度(a)とアミノ酸濃度(b)。処理間において異なるアルファベットの間には 5%水準で有意差がある($P < 0.05$; Tukey)

7. Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- 、アミノ酸、プロリンが葉と根の浸透ポテンシャル(Ψ_s)における推定寄与率

葉と根の Ψ_s における推定寄与率は、K 区であれば K^+ が、Na 区であれば Na^+ が、他の元素よりも最も高い値を示した(図 5)。特に K^+ の寄与率は K5 と K50 区ともに全浸透ポテンシャルの 50%を占めていた。

葉と根の Ψ_s にもたらす Cl^- の寄与率(C_{Cl})は、K5 と K50 区において Na 区よりも高い値を示した(図 5)。また、葉の C_{Cl} において、K 区と Na 区ともに低濃度処理と高濃度処理の間に有意な差はなかった。

葉の Ψ_s にもたらす NO_3^- の寄与率(C_{NO_3})は、Na5 区では K5 区の 2 倍、Na50 区では K50 区の 3.6 倍であった(表 5)。しかし K50 区と Na50 区の葉の C_{NO_3} はともに、K5 区と Na5 区の半分であった。根の C_{NO_3} は K 区で Na 区よりも高い値を示した。さらに根の C_{NO_3} は、K 区と Na 区ともに低濃度処理と高濃度処理の間に有意な差はなく一定の寄与率を保っていた。

葉と根の Ψ_s にもたらすプロリンの寄与率(C_{Pro})は全ての処理区で顕著に低かったが、高濃度処理区における C_{Pro} は低濃度処理区の C_{Pro} よりも 10 倍の寄与率を示した(表 5)。プロリンと同様に、葉と根の Ψ_s にもたらすアミノ酸の寄与率(C_{AA})も非常に低かった。

表 5 K 処理と Na 処理の葉と根の浸透ポテンシャル(Ψ_s)における Na^+ (C_{Na})、 K^+ (C_{K})、 Cl^- (C_{Cl})、 NO_3^- (C_{NO_3})、プロリン(C_{Pro})、アミノ酸(C_{AA})の推定寄与率。処理間において異なるアルファベットの間には 5%水準で有意差がある($P < 0.05$; Tukey)

	Ψ_s (MPa)	$C_{\text{Na}}(\%)$	$C_{\text{K}}(\%)$	$C_{\text{Cl}}(\%)$	$C_{\text{NO}_3}(\%)$	$C_{\text{pro}}(\%)$	$C_{\text{AA}}(\%)$
葉							
K 5	-0.99 a	4.8 c	53.4 a	10.0 ab	11.5 b	0.01 b	2.1 a
Na 5	-1.03 a	44.7 b	22.1 b	5.3 c	23.4 a	0.01 b	1.7 ab
K 50	-1.19 b	4.0 c	56.3 a	13.1 a	3.4 c	0.12 a	1.4 b
Na 50	-1.33 c	49.3 a	17.2 c	6.6 bc	12.5 b	0.12 a	1.9 ab
根							
K 5	-0.73 a	3.7 c	46.1 a	14.2 a	36.0 a	0.02 c	1.6 b
Na 5	-0.68 a	32.9 b	13.6 b	8.5 c	22.8 bc	0.02 bc	2.0 ab
K 50	-0.92 b	2.8 c	48.9 a	11.1 b	29.0 ab	0.02 b	1.8 b
Na 50	-0.86 b	34.5 a	11.6 b	7.8 c	19.4 c	0.03 a	2.6 a

第3節 考察

高等植物において、 NO_3^- はプロトンとの共輸送で根に取り込まれる(Meharg and Blatt 1995)。さらに根から地上部へと NO_3^- を輸送する際の導管を通る長距離輸送では主に K^+ が随伴陽イオンとして NO_3^- の輸送を促進することが報告されている(Casadesus et al. 1995)。吸収された NO_3^- は根や葉の硝酸同化経路を経てアミノ酸やタンパク質へと合成される。 NO_3^- 同化経路において NO_3^- が NO_2^- へ、 NO_2^- が NH_4^+ へと還元される過程で、 NH_4^+ の過剰な蓄積を避けるために、 NO_3^- の吸収・輸送抑制、液胞への蓄積などを行うことで NO_3^- を取り込む量が調整される。液胞に蓄積された NO_3^- は適宜細胞質へと送られて同化される他に、浸透圧調節物質としての役割も果たす(Blom-Zandstra and Lampe 1983、Song et al. 2006、Yuan et al. 2010)。これまでの研究で、フダンソウが NaCl を添加することで生育および全 N 含有率を上昇させることがわかっている(Yamada et al. in press)。しかし、N 含有率の上昇が生育促進によって引き起こされたのか、それとも NaCl 添加による直接的な影響なのかは分かっていない。そこで、 Na^+ の添加による NO_3^- 吸収・輸送促進の原因を明らかにするため、 K^+ と Na^+ の効果を比較し検討することとした。

葉の NO_3^- 濃度は低濃度区と高濃度区ともに、K 処理区よりも Na 処理区で有意に高い値を示した(図 1d)。また、導管液中の NO_3^- 濃度も処理後 2 時間で既に Na 区で K 区よりも有意に高い値を示していた(図 2b)。しかしながら、根の NO_3^- 濃度は K 区で Na 区よりも有意に高い値を示していた(図 1d)。そしてこれらの結果は、生育や水分含有率において処理間に差がみられなかったことから生育状態に起因して起こったことではない(表 3)。NRT1.5 は NO_3^- の導管輸送において、 NO_3^- を導管へと 積載する役割を担うトランスポーターである(図 5)。シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* L.)において、この NRT1.5 が塩処理下では下方制御され、根に NO_3^- を多く蓄積することで耐塩性を強化することが報告されている(Chen et al. 2012)。また NRT1.8 は主に根の柔細胞に存在し、導管から NO_3^- を排除するトランスポーターであるが、シロイヌナズナの NRT1.8 は塩ストレスによって上方制御され、根に NO_3^- を蓄積することで耐塩性に寄与している(Li et al. 2010、Chen et al. 2012)。このように、根への NO_3^- の蓄積と耐塩性との関係が報告されている一方で、本研究においてはこの報告とは真逆の、Na 処理下における NO_3^- の根での蓄積量は K 処理区のそれよりも有意に低く、Na 処理によって NO_3^- の葉への輸送が促進していた(表 4)。本研究結果からは

NRT1.5 がどのように働いているかまでは分からないが、導管における NO_3^- 濃度が Na 処理区で最も高かったことから、 Na^+ は NO_3^- の根から葉への輸送を促進させることが考えられた。

また、導管輸送の際の NO_3^- の随伴陽イオンとして、主に K^+ がその役割を担っていることが報告されている (Casadesus et al. 1995)。そのため、細胞内の K^+ と NO_3^- 濃度は密接に関わっており、どちらかが不足すると、もう一方の吸収も抑制される (Wang et al. 2001)。しかし、本研究では葉の搾汁中 ($r = -0.312$, $P > 0.05$) および導管液中 ($r = -0.053$, $P > 0.05$) の K^+ と NO_3^- 濃度の間には相関関係が認められず、むしろ Na^+ との間に搾汁 ($r = 0.749$, $P > 0.05$) および導管液 ($r = 0.6832$, $P > 0.05$) とも高い相関関係を示した (図 1、3)。これらのことから、フダンソウにとって K^+ よりも Na^+ がより NO_3^- の葉への輸送促進に寄与していることが示唆された。

Cl^- と NO_3^- は共に一価の陰イオンであり、これまでも高濃度の Cl^- による NO_3^- の吸収阻害は多くの研究で報告されている (Debouba 2006)。本研究結果では、 Na^+ と K^+ では Cl^- の吸収傾向は大きく異なり、K 処理においてより多くの Cl^- を葉と根に蓄積していた (図 1c)。 Cl^- の吸収メカニズムは主に陰イオンチャネル、 NO_3^- トランスポーターなどが挙げられ (Teakle and Tyerman 2010)、これらは Cl^- よりも NO_3^- に対する透過性が高い (Roberts 2006)。ヒトには、恒常性維持に不可欠な陽イオン (Na^+/K^+)/ Cl^- 共輸送トランスポーター (CCC) がある (Haas 1994)。そして CCC と同様の遺伝子で、根から葉への Cl^- の長距離輸送に関わる輸送体がシロイヌナズナで見つかっている (Colmenero-Flores et al. 2007)。さらに、イネ (*Oryza sativa* L.) では K^+/Cl^- 共輸送体がイオンの恒常性維持と生育に大きく関わっていることが報告されている (Kong et al. 2011)。イネでは KCl 処理で NaCl 処理よりも多くの Cl^- 含有率が示されており、本研究の結果とも一致する。このことから、フダンソウも K^+ によって Cl^- が特異的に吸収されるメカニズムを有している可能性がある。そのため、この K^+ による Cl^- の吸収促進が同時に、K 処理区における NO_3^- の吸収・輸送をより抑制していることも考えられる。

浸透圧調節は塩ストレスや乾燥ストレス下の植物にとって膨圧や含水率を維持するための主要な耐性応答の一つである (Greenway and Munns 1980)。塩生植物の多くは Na^+ と Cl^- を主な浸透圧調節物質として液胞に溜め込む (Hasegawa et al. 2000)。一方、NaCl 処理下の *Suaeda physophora* において、 NO_3^- 施肥量が増加すると細胞内の NO_3^- が上昇し、 Cl^- が等しい割合で低下することが分かっている。このことから、Song et al. (2006) は、 NO_3^- は N 化

化合物の基質となるだけでなく、液胞に溜め込むことで Cl^- に代わる浸透圧調節物質としての役割も果たすと結論づけている。本研究でも、葉の Ψ_s における NO_3^- の寄与率 (C_{NO_3}) は Na 処理下で K 処理下よりも上昇し、 Cl^- の浸透圧寄与率 (C_{Cl}) は Na 処理下で K 処理下よりも低下していた。しかしながら、葉の Cl^- 濃度の減少率と NO_3^- 濃度の上昇率が釣り合っていないかった。さらに、Na5 と Na50、および K5 と K50 区における C_{Cl} は処理濃度が上昇しても一定なのに対し、 C_{NO_3} は処理濃度の上昇とともに有意に低下した (表 5)。このことから、フダンソウにおいては Cl^- に代わる NO_3^- の浸透圧調節物質としての役割は低いことが考えられる。

プロリンは塩や乾燥ストレスに応答して合成され様々な酵素を保護するための役割と、液胞内外の浸透ポテンシャルを維持するための浸透圧調節物質としての役割を果たす (Di Martino et al. 2003)。本研究では、プロリン濃度は葉では K50 区と Na50 区で最大となった (図 4a)。このことから、フダンソウでは塩の種類に関係なく、濃度によってより多くプロリンを蓄積する傾向があることが分かり、高塩濃度の場合、高浸透圧の影響は K 処理区も Na 処理区も同様に受けていることが示唆された。

アミノ酸はタンパク質合成の基質となる他、ソースからシンクへの窒素輸送や窒素同化にも大きく関わっている (Gilbert et al. 1998)。本研究結果から遊離アミノ酸の濃度は K5、Na5、Na50 区で、根では Na50 区で最大となったが、 NO_3^- 吸収との関係性までは見られなかった (図 4b)。またプロリン同様、遊離アミノ酸についても乾燥や塩ストレスによってその濃度が上昇することが多くの研究でも報告されているが、本研究ではアミノ酸が浸透圧調節に及ぼす寄与率は 1.4~2.6% と非常に低かった (表 5)。

葉での NO_3^- 濃度が K 処理区よりも Na 処理区で高かったのに加えて、根の NO_3^- の蓄積量は Na 区よりも K 区で高く、また導管液中の NO_3^- 濃度が Na50 区で最も高かった。このことからフダンソウの葉への NO_3^- 輸送促進は K^+ ではなく Na^+ によって引き起こされ、 Na^+ の役割は主に導管輸送と関わっていることが示唆された。さらに、新たに分かったこととして K^+ によって Cl^- の吸収が促進されることが挙げられ、このことも NaCl 下におけるフダンソウの NO_3^- 吸収・輸送促進に影響を及ぼしていると考えられた。

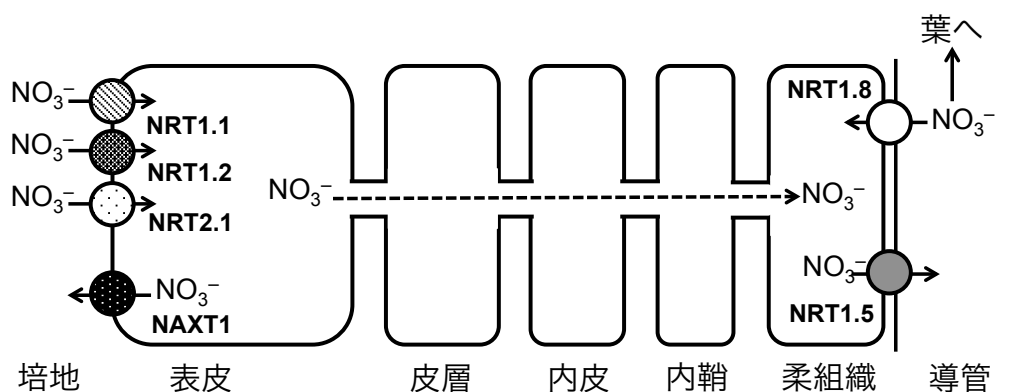


図 5 硝酸トランスポーターの模式図

第 4 節 要約

ヒユ科のフダンソウ (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.) では、培地 NaCl 濃度の上昇にしたがって生育が促進し、同時に全 N 含有率も上昇する。しかしながら、N 吸収の増加が生育促進による結果なのか、それとも NaCl 添加による直接的な影響なのかは明らかとなっていない。そこで本研究では、低濃度 (5 mM) と高濃度 (50 mM) のそれぞれ K 処理と Na 処理を加えた時の葉と根の NO_3^- 濃度及び導管液中の NO_3^- 濃度を測定し、 Na^+ による NO_3^- の吸収促進が Na^+ による直接的な効果であるのかを明らかにすることを目的とした。

基本培養液を用い、3 週間育苗を行った。その後、K5 (K5、Na0)、K50 (K50、Na0)、Na5 (K0、Na5)、Na50 (K0、Na50) の 4 処理を加えて 7 日間栽培し、葉および根の搾汁中の Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、および NO_3^- 濃度を測定した。また、処理開始からそれぞれ 0、2、4、6 時間後の導管液を採取し、 NO_3^- 吸収の経時的変化を調査した。

葉における NO_3^- 濃度は処理濃度に関係なく Na 処理区において K 処理区よりも有意に高い値を示した。一方、葉の Cl^- 濃度は処理濃度に関係なく K 処理区において Na 処理区よりも有意に高かった。 NO_3^- の葉/根比は K50 区で 0.24、Na50 区で 1.02 であったことから、K 処理下では NO_3^- を根に蓄積し、Na 処理下では NO_3^- を葉へと積極的に輸送していることが示唆された。また、導管液中の NO_3^- 濃度は処理開始 6 時間後には既に、Na50 区で有意に他の処理区よりも高い値を示しており、このことから、 Na^+ によって葉への NO_3^- 輸送が

促進していると言えた。シロイヌナズナでは NO_3^- を導管へと積載する NRT1.5 が NaCl 処理によって下方制御され、根に NO_3^- を蓄積させることで耐塩性を強化することが知られているが、フダンソウは葉に多く NO_3^- を輸送しており、非常に興味深い結果が得られた。以上の結果から、フダンソウの NO_3^- 吸収・輸送促進は Na^+ による直接的な効果であり、 NO_3^- の導管輸送に Na^+ が関与している可能性が示唆された。また Cl^- の吸収が K^+ によって促進され、 Na^+ によって低下することも塩処理下におけるフダンソウの NO_3^- 吸収・輸送に影響を及ぼしていると考えられた。

第 3 章

培地のナトリウム濃度の上昇が、フダンソウの硝酸吸収および 硝酸還元酵素活性に及ぼす影響

植物にとって N は最も重要な必須元素であり、その吸収が生育に大きく影響する。吸収した NO_3^- をタンパク質へと合成するための NO_3^- 同化経路の第一段階が NO_3^- を NO_2^- へと還元する硝酸還元酵素 (NR) である。インゲン (*Phaseolus vulgaris* L.)、トウモロコシ (*Zea mays* L.)、トマト (*Solanum lycopersicum* L.) の NR 活性は、培地に NaCl を添加することで著しく低下する (Gouia et al. 1994、Abd-El Baki et al. 2000、Debouba et al. 2006)。NR は NO_3^- によって誘導されることから、Flores et al. (2004) は NaCl による NR 活性の低下が、高濃度の Cl⁻ による NO_3^- 吸収阻害にあるとしている。

一方第 2 章において、フダンソウ (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.) における NO_3^- の葉への輸送に Na^+ が K^+ よりも寄与していることを明らかにした。また導管液の NO_3^- 濃度から、 Na^+ 添加によって短時間で多くの NO_3^- を吸収し、葉へと輸送していることが分かった。

そこで第 3 章では、培地の NaCl 濃度の上昇がフダンソウの NR 活性に及ぼす影響を明らかにする。さらに、耐塩性の強い植物と、好塩性植物における NO_3^- 吸収・輸送と NR 活性に及ぼす影響の違いを比較検討するため、耐塩性が強とされるオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) を供試し、耐塩性と好塩性の違いをより明確にしようとした。

第 1 節 材料と方法

1. 栽培方法

オオムギ (*Hordeum vulgare* L. cv. ファイバースノウ) とフダンソウ (*Beta vulgaris* var. *cicla* L. cv. 西洋白茎) の種子をバーミキュライトに播種し、適宜灌水を行った。播種から 3 週間後、20 L 容コンテナに植物種ごとに 1 コンテナ当たり 150 個体となるように移植し、基本培養液 (表 6) で水耕栽培を行った。水耕液の pH は 5.0 に調整した。コンテナには常に通気し、1 週間に 1 度培養液を更新した。水耕液は約 4 mmol L⁻¹ の NaCl が含まれた水道水で作製した。

水耕栽培開始から 1 週間後、各植物種をそれぞれ NaCl 濃度が 0、40、60、80、100 mmol L⁻¹ となるように調製した 4 L 容プラスチックポットに 1 ポット当たり 5 個体となるように移植し、処理を開始した。各処理 4 反復とし、7 日間栽培を行った。栽培は、鳥取大学農学部ガラス室内にて、4 月から 6 月にかけて行った。

処理開始から 7 日後に、1 ポット当たり 2 個体の葉を採取した。新鮮重を測定し、70℃で 48 時間乾燥させた後、乾物重を測定し、水分含有率を算出した。また、1 ポット中の残りの 2 個体は、葉と根に分けて採取後速やかに液体窒素で凍結させ、-70℃の冷凍庫に保存した。凍結試料は無機元素と NR 活性の測定に使用した。

表 6 基本培養液の組成と使用塩

多量元素 (mol m ⁻³)			微量元素 (g m ⁻³)		
N	4.0	KNO ₃	Fe	2.0	FeSO ₄ ·7H ₂ O
		Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	Mn	0.5	MnSO ₄ ·5H ₂ O
		Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	B	0.2	H ₃ BO ₃
P	0.4	KH ₂ PO ₄	Zn	0.1	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
K	2.0	KNO ₃	Cu	0.01	CuSO ₄ ·5H ₂ O
		KH ₂ PO ₄	Mo	0.005	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O
Ca	1.0	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O			
		CaCl ₂ ·2H ₂ O			
Mg	2.0	Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O			
		MgSO ₄ ·7H ₂ O			

2. 無機元素濃度の測定

分析方法は第 2 章と同様である。

3. 全 N 含有率の測定

試料の分解は、ガニング変法によって行った。粉碎した乾燥試料を 0.05 g 程度秤取り、分解用試験管に入れた。サリチル酸 10 g を濃硫酸 300 mL に溶解したサリチル酸-硫酸 1 mL を試験管に加えてよく攪拌した。試験管にチオ硫酸ナトリウム約 50 mg を加えて発砲することを確認した後、アルミニウム製ブロックヒーターに試験管をセットし、温度を室温から 100°C まで上げた。その後、100°C で 1 時間、150°C で 30 分、最後に 200°C まで温度を上昇させ、白煙を発するようにになったらブロックヒーターから試験管を取り出した。試験管が室温まで戻ったら、0.3 mL の過酸化水素を加え、再度 200°C のブロックヒーターに戻して 30 分間加熱した。試料液が透明になるまで過酸化水素水を加えながら加熱する作業を繰り返した。

透明になった試料液を適宜希釈し、インドフェノール法を用いて全 N の定量を行った。

4. NR 活性の測定

凍結試料 0.5 g に 2 mL の 7.5 mM シス테인と 1 mM EDTA を含む 100 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.5) を加え、1% の PVPP とともに摩砕した。懸濁液を 15,000 rpm で 15 分間、4°C で遠心分離を行った後、上清を粗酵素液とした。

粗酵素液 0.2 mL に、20 mM KNO_3 含有 100 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.5) 0.7 mL と、2 mM NADH 液 0.05 mL を加えてよく攪拌した。その後、インキュベーターにて 30°C で 15 分間反応させた。抽出からの一連の操作は 4°C 以下で行った。

15 分後、試料に 0.05 mL の 0.5 M 酢酸亜鉛を加えて反応を停止させた。その後 5.8 mM スルファニルアミド含有 1.5 M HCl 溶液 1 mL と、0.8 mM ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩 1 mL を加えて発色させた。20 分後に 540 nm の吸光度で測定した (V-630BIO, JASCO, Tokyo, Japan)。

NR 活性は、新鮮重 0.5 g が 1 時間で亜硝酸に還元された量 (μmol) で示した。

5. 統計処理

GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)を用いて統計解析を行った。1 元配置の平均の分散 (ANOVA) は、Tukey の多重比較分析によって解析を行った。また二つの変数の相関関係を検定するため、ピアソンの相関係数を用いた。全てのエラーバーは標準偏差 (SD) を示す。

第 2 節 結果

1. 新鮮重 (FW)、乾物重 (DW)、および水分含有率 (WC)

オオムギの FW と DW は 処理間で有意な差はみられなかった (表 7)。フダンソウにおいては、有意差はなかったものの、培地の NaCl 濃度が上昇するにしたがって FW も増加する傾向が見られ、80 mM 区で最大となった。しかし他の処理区と比較して 100 mM 区の FW は有意に減少した。一方 FW とは異なり、フダンソウの葉の DW は NaCl による影響を受けおらず、処理間に有意差はみられなかった。

オオムギの葉の水分含有率 (WC) は、塩濃度の上昇とともに低下する傾向はみられたが、NaCl 80 mM 区のみ他の処理区よりも有意に低かった。一方フダンソウの WC は、処理間に有意な差はなかった。

表 7 異なる NaCl 濃度下におけるオオムギとフダンソウの葉の新鮮重 (FW)、乾物重 (DW)、水分含有率 (WC)、および搾汁中の Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- 濃度。処理間において異なるアルファベットの間には 5% 水準で有意差がある ($P < 0.05$; Tukey)

2. 葉の搾汁中の無機元素濃度

	NaCl (mmol L ⁻¹)	FW (g plant ⁻¹)	DW (g plant ⁻¹)	WC (g g ⁻¹ DW)	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻
					(mmol L ⁻¹)			
オオムギ	0	0.69 a	0.094 a	6.32 ab	17 d	337 a	111 c	606 a
	40	0.64 a	0.087 a	6.41 a	190 c	252 a	195 b	513 b
	60	0.67 a	0.094 a	6.15 ab	231 b	233 bc	233 a	491 b
	80	0.59 a	0.087 a	5.78 c	249 ab	228 c	249 a	441 c
	100	0.61 a	0.089 a	5.88 b	260 a	217 c	251 a	452 c
フダンソウ	0	14.8 ab	1.06 a	13.0 a	53 d	122 a	31.2 b	40.6 c
	40	17.4 ab	1.01 a	16.5 a	129 c	109 a	68.3 a	72.8 b
	60	18.2 a	1.11 a	15.4 a	155 b	115 a	63.8 a	71.2 b
	80	18.3 a	1.21 a	14.2 a	166 b	104 a	68.9 a	95.1 a
	100	12.9 b	0.87 a	13.9 a	184 a	114 a	65.2 a	99.5 a

オオムギの葉の搾汁中の K^+ 濃度は、培地の $NaCl$ 濃度の上昇とともに有意に低下した(表 7)。オオムギとは異なり、フダンソウの葉の搾汁中の K^+ 濃度は培地の $NaCl$ 濃度が上昇しても処理間に有意な変化はなかった。

オオムギでは、培地の $NaCl$ 濃度の上昇とともに、葉の Cl^- 濃度は上昇し、 NO_3^- 濃度は有意に低下した。一方フダンソウでは、葉の Cl^- 濃度は 0 mM 区より $NaCl$ 処理区で有意に高い値を示したものの、培地の $NaCl$ 濃度が上昇しても Cl^- 濃度に影響はなかった。さらに、フダンソウの葉の NO_3^- 濃度は、培地の $NaCl$ 濃度の上昇とともに上昇した。

3. 葉搾汁の Na^+ 、 K^+ 、WC と NO_3^- 濃度の関係

オオムギでは、葉の Na^+ 濃度と NO_3^- 濃度との間には有意な負の相関関係があり(図 6A)、 K^+ 濃度と NO_3^- 濃度との間には有意の正の相関関係があった(図 6B)。しかし、オオムギの葉の WC と NO_3^- 濃度との間に相関関係は見られなかった(図 6C)。一方フダンソウの葉では、 Na^+ 濃度と NO_3^- 濃度との間に有意な正の相関関係がみられた(図 6D)。しかし、フダンソウの葉の K^+ 濃度と NO_3^- 濃度との間には有意な負の相関関係があり(図 6E)、また水分含有率と NO_3^- 濃度との間には相関関係はみられなかった(図 6F)。

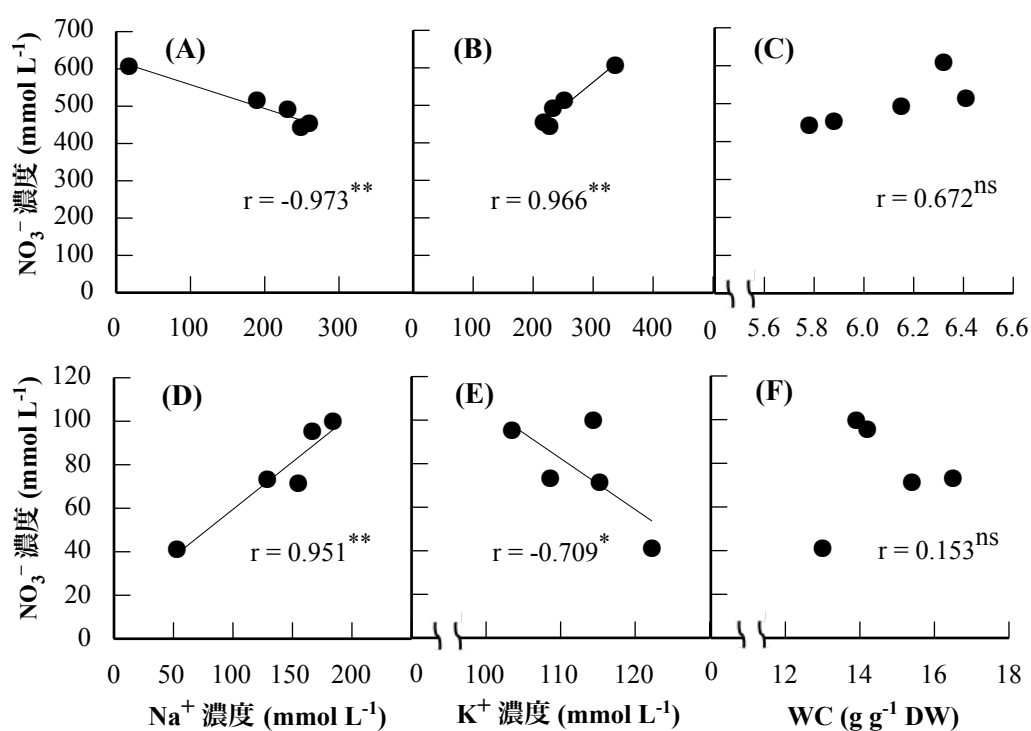


図 6 (A-C)オオムギと(D-F)フダンソウの葉搾汁の(A,D) Na^+ 濃度、(B,E) K^+ 濃度、(C,F)水分含有率(WC)と、 NO_3^- 濃度との関係。近似曲線は(A) $y = -0.639x + 621.57$ ($R^2 = 0.94$)、(B) $y = 1.312x + 168.23$ ($R^2 = 0.93$)、(D) $y = 0.435x + 15.992$ ($R^2 = 0.90$)、(E) $y = -2.344x + 340.22$ ($R^2 = 0.50$)。ピアソンの相関係数を用いて解析を行った(r ; ns, not significant, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$)

4. 全 N 含有率

オオムギの葉の全 N 含有率は、培地の NaCl 濃度の上昇とともに有意に低下し、100 mM 区で顕著に低かった(図 7A)。一方フダンソウの葉の全 N 含有率は、処理間に有意な差はみとめられなかった(図 7B)。

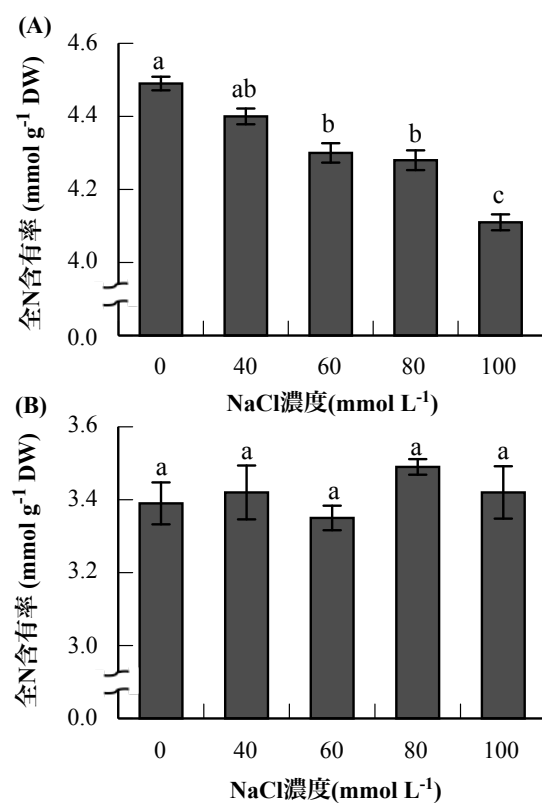


図 7 培地の異なる NaCl 濃度が(A)オオムギと(B)フダンソウの全窒素(N)含有率に及ぼす影響。処理間において異なるアルファベットの間には 5%水準で有意差がある ($P < 0.05$; Tukey)

5. NR 活性

オオムギの葉の NR 活性は、培地の NaCl 濃度の上昇に伴って有意に低下した(図 8A)。フダンソウの葉の NR 活性は、培地の NaCl 濃度の上昇にともなって徐々に上昇する傾向がみられたが、80 mM 区でのみ 0 mM 区よりも有意に高かった(図 8B)。さらに、100 mM 区の NR 活性のみ他の処理区と比較して有意に低い値を示した。

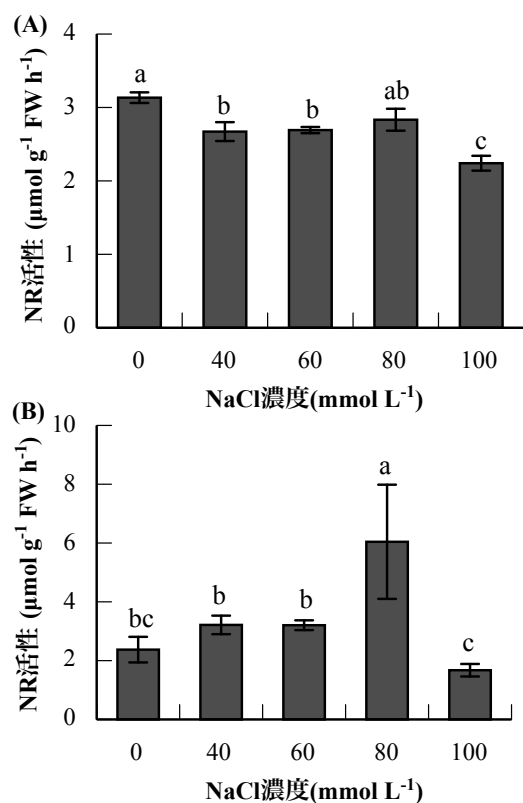


図 8 培地の異なる NaCl 濃度が (A) オオムギ (B) フダンソウの硝酸還元酵素 (NR) 活性に及ぼす影響。処理間において異なるアルファベットの間には 5% 水準で有意差がある ($P < 0.05$; Tukey)

第 3 節 考察

1. NaCl が生育に及ぼす影響

細胞伸長の原動力は、細胞外液と細胞内液の水ポテンシャル差に基づく吸水によって生じた膨圧である (Serpe and Matthews 2000)。NaCl 培地において、多くの塩生植物では、液胞膜に存在する H^+ -ATPase の活性を上昇させることで液胞に Na^+ を蓄積し膨圧が維持されている (Taiz 1992、Apse et al. 1999、Ahmed et al. 2013)。そのため、好塩性植物にみられる Na^+ による生育促進効果は、液胞に多くの Na^+ を蓄積することができるためであるとされている (Ayala and O'Leary 1995、Lv et al. 2012)。本研究において、オオムギの DW と WC はともに NaCl による影響を受けておらず処理間に有意差はなく (表 7)、この結果は、オオムギが NaCl 100 mM までなら 7 日の処理期間でも生育を維持することのできる耐塩性強

の植物であることを示している。フダンソウも、DW において有意な処理間差はみられなかったものの、NaCl 60~80 mM で生育が最大となる傾向がみられた。しかしながら、フダンソウにおいて DW と WC の間には有意な相関関係がみられなかった ($r < 0.03$, $p > 0.05$)。そのため、膨圧維持による細胞の伸長が必ずしも好塩性植物の生育促進に寄与する唯一の原因ではないと考えられた。

2. NaCl が細胞内 Na^+ と K^+ 濃度に及ぼす影響

Na^+ と K^+ は同じ一価の陽イオンであり、互いに拮抗関係にあるため、高濃度の Na^+ は植物の K^+ 欠乏を引き起こす (Benlloch et al. 1994, Khan et al. 2000)。植物細胞の細胞質において Na^+ が高濃度になると、通常は K^+ を結合して機能を持つ酵素に、 Na^+ が結合することにより、様々な酵素の活性が低下する。さらに、タンパク質合成の過程において、tRNA をリボソームに結合させる際に高濃度の K^+ を必要とするが、 Na^+ が高濃度になることによってこの過程が阻害されることが知られており、植物の生育は著しく低下する (Tester and Davenport 2003, Shabala et al. 2010)。

オオムギにおいて、NaCl による生育への影響はなかったものの、搾汁中の Na^+ 濃度の上昇に伴って K^+ 濃度は有意に低下した (表 7)。オオムギは耐塩性の強い植物であり、NaCl 処理によって液胞の体積が急激に増加することが明らかになっている (Mimura et al. 2003)。また、オオムギは茎葉において葉肉細胞ではなく、表皮細胞に多くの Na^+ を隔離する (Fricke et al. 1996)。これらのメカニズムを有しているため、オオムギは生理活性の盛んな葉肉細胞への Na^+ の蓄積を防ぐことで Na^+ 害を軽減し、生育を維持しているものと考えられる。一方フダンソウは、葉の Na^+ 濃度が上昇したにも関わらず、 K^+ 濃度はほぼ一定の値を保っていた (表 7)。この結果は好塩性植物の *Suaeda physophora* に見られた結果と一致する (Yuan et al. 2010)。酵母において、培地の塩に応答したカルシニューリンが K^+ トランスポーターを高親和性に切り替えることで Na^+ の流入を抑制し、 K^+ の取り込みを制御している (Mendoza et al. 1994)。一方本研究では、フダンソウの葉の K^+ 濃度は一定の値を維持していたが、 Na^+ 濃度は上昇しており、吸収は抑制されていなかった。フダンソウが Na 処理下でも安定した K^+ 吸収を維持することができるのはなぜか、今後メカニズムを解明していく必要がある。

3. NO_3^- 吸収は Na^+ によって促進される

根から地上部へと運ばれた NO_3^- は、葉でアミノ酸やタンパク質へと変化する。この根から地上部にかけての NO_3^- の導管輸送は、主に K^+ を随伴陽イオンとしてイオンバランスが維持されている (Lin et al. 2008、Wang et al. 2012)。そのため、細胞内の K^+ 濃度は NO_3^- 輸送と密接に関係しており、 K^+ 濃度の低下に伴う NO_3^- 濃度の低下が多く報告されている (Pilbeam and Kirkby 1990、Wang et al. 2001)。

オオムギの NO_3^- 濃度は Cl^- 濃度の上昇に伴って低下した (表 7)。このことは、 K^+ と NO_3^- 濃度の間に正の相関関係がみられたことから、オオムギの NO_3^- 濃度低下は Na^+ による K^+ の吸収阻害によって引き起こされたものと考えられる (図 6B)。また、 Cl^- によって NO_3^- の吸収が拮抗的に阻害されたことも一因であると考えられる。一方、フダンソウでは、培地の NaCl 濃度の上昇に伴う Cl^- 濃度の上昇は見られなかったが、 NO_3^- 濃度は処理濃度の上昇とともに上昇した (表 7)。一般的に、 NO_3^- の吸収は K^+ の吸収量に関係しているといわれている。本研究結果から、フダンソウの葉の NO_3^- 濃度は Na^+ 濃度との間にのみ高い正の相関関係を示し、 K^+ とは負の相関関係を示した (図 6D、E)。これらの結果は第 2 章で示した結果と一致し、フダンソウの NO_3^- 吸収は細胞内 Na^+ 濃度との間に強く関係していると言える。Subbarao et al. (2003)らは細胞内の K^+ 濃度が欠乏状態にある場合、 Na^+ を導管における NO_3^- 輸送の随伴陽イオンとして利用すると報告している。しかしながら本研究では、葉の K^+ 濃度は NaCl 処理の影響を受けず一定の値を保っていた。海洋珪藻 (*Marine diatom*) では $\text{Na}^+/\text{NO}_3^-$ 共輸送体が (Boyd and Gradmann 1999)、アマモ (*Zostera marina*) でも Na 依存的に NO_3^- を吸収するシステムが報告されている (Rubio et al. 2005)。しかしこのような NO_3^- 吸収システムは高等植物では見つかっていない。

オオムギとフダンソウはともに高濃度の Na^+ を体内に蓄積することができる。しかし、本研究結果から、 NaCl 培地におけるこれら 2 植物種の NO_3^- 吸収システムは全く異なっていた。そのため、 NO_3^- 吸収・輸送システムの違いが、好塩性植物と耐塩性強の植物の NaCl 下における生育を決定する原因になるのではないかと考えられた。

4. NaCl が全 N 含有率に及ぼす影響

体内で最も多い N 含有物質はタンパク質であり、タンパク質の 80~90%が N である (Novoa and Loomis 1981)。タンパク質は細胞の主成分として植物体の維持、成長に不可欠である。そのため植物の生育と細胞内 N 含有率は非常に密接に関係しており、高濃度の

NaCl 下では Cl^- による吸収阻害を受けて植物の N 吸収は生育の低下とともに低下する。本研究において、オオムギの全 N 含有率は NaCl 処理濃度の上昇に伴って有意に低下し (図 7A)、フダンソウの葉の全 N 含有率は処理間に有意な差がみられなかった (図 7B)。Gastal and Lemaire (2002) は、N 栄養は直接的な細胞の伸長よりも、細胞壁の構成要素に与える影響がより大きいとしている。このことから、一週間の処理では体内の N 含有率の変化が DW には反映されず、さらに長期間の処理を施した場合にオオムギの生育は低下し、フダンソウでは上昇することが示唆された。

5. NaCl が NR 活性に及ぼす影響

オオムギの NR 活性は培地の NaCl 濃度の上昇に伴って低下した (図 8A)。 NO_3^- は NR の発現や活性を制御するための重要な要素である (Abd-Elbaki et al. 2000、Flores et al. 2004)。そのため、NaCl 下における NR 活性の低下は NaCl によって直接的に引き起こされるものではない (Munns 1993)。NaCl 処理による NR 活性の低下は、 Cl^- による間接的な影響、つまり Cl^- による NO_3^- の拮抗的な吸収阻害によって引き起こされることが、いくつかの植物で示されている (Flores et al. 2000、Debouba et al. 2006)。そのため、オオムギの NR 活性の低下は、 Cl^- による NO_3^- 吸収阻害によるものであると考えられる。

一方フダンソウの葉の NR 活性は、わずかではあるが培地の NaCl 濃度の上昇とともに上昇する傾向がみられ、80 mM 区では有意に最も高い活性を示し、100 mM 区では有意に低下した (図 8B)。このフダンソウの NaCl 処理による NR 活性の上昇は、 NO_3^- の吸収・輸送促進に起因するものであると考えられる。しかしながら、100 mM 区の NO_3^- 濃度は最も高い値を示しながら、NR 活性は最も低かった。フダンソウの FW は 100 mM 区で他の処理区よりも有意に小さかったことから、細胞内の NO_3^- 濃度に関係なく、NaCl 100 mM がフダンソウにとって NR 活性を低下させるほど過剰であったと考えられる。

本研究結果から、オオムギでは NaCl によって NO_3^- 吸収・輸送および NR 活性が有意に低下した。一方、フダンソウでは NaCl によって NO_3^- の吸収・輸送が促進され、またそれに伴い NR 活性も上昇し、好塩性植物と耐塩性強の植物では異なる NO_3^- 吸収システムを有していることが明らかとなった。また、第 2 章から新たに、培地 Na^+ 濃度の上昇に伴って NO_3^- の吸収・輸送が促進されることが明らかとなった。

第4節 要約

高濃度の培地 NaCl は、植物の吸水阻害や Na^+ によるイオンバランスの不均衡を引き起こし、作物の生産性を低下させる。また、多量の Cl^- は NO_3^- の吸収を拮抗的に阻害するため、植物は N 欠乏を呈する。一方で塩生植物にとって Na^+ は良好な生育を維持するための重要な要素となっている。また我々のこれまでの研究において、ヒユ科のフダンソウ (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.)では K 処理下よりも Na 処理下で NO_3^- の培地からの吸収が促進されることが分かった (Kitagawa and Fujiyama 2014, Kaburagi et al. 2015)。そこで第3章では、培地の NaCl 濃度を上昇させた時の、好塩性植物フダンソウと耐塩性強のオオムギ (*Hordeum vulgare* L.)の、 NO_3^- 吸収・輸送および硝酸還元酵素 (NR) 活性に与える影響を比較調査した。

基本培養液を用い、3 週間育苗を行った。その後 5 段階の NaCl 処理 (0、40、60、80、100 mmol L⁻¹)を 7 日間行い、葉を採取した。葉搾汁中の Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- 濃度、葉の全 N 含有率、および NR 活性を測定した。

両植物種とも、乾物重に処理間差はなかった。オオムギの葉搾汁中の NO_3^- 濃度は K^+ 濃度と正の相関関係を示し、 Na^+ 濃度とは負の相関関係を示した。一方、フダンソウの葉搾汁中の NO_3^- 濃度は、 Na^+ と高い正の相関関係があった。また、オオムギの NR 活性は NaCl 濃度の上昇とともに有意に低下したが、フダンソウの NR 活性は NaCl 80 mM 区で最大となった。

NO_3^- は NR の基質となることが分かっている。そのため、フダンソウにおける NR 活性の上昇は、NaCl 添加による NO_3^- 吸収・輸送促進に起因するものだと考えられた。本研究において、好塩性のフダンソウと耐塩性強のオオムギとでは全く異なる NO_3^- 吸収・輸送システムを有していることが示唆された。また、フダンソウにおいて、培地の NaCl 濃度の上昇に伴って NO_3^- 吸収・輸送を促進させることが新たに明らかとなった。

第 4 章

ナトリウムによる硝酸の吸収促進が、 フダンソウの生育および光合成に及ぼす影響

植物に吸収された NO_3^- はタンパク質やアミノ酸の合成に用いられる。第 2 章および第 3 章で、 Na^+ がフダンソウの NO_3^- 吸収・輸送を促進させることが分かった。さらに細胞内の Na^+ 濃度の上昇と細胞内 NO_3^- 濃度との間に正の相関がみとめられ、この結果は耐塩性強のオムギとは全く異なっていた。そのため第 2 章と第 3 章から、 Na^+ による NO_3^- の吸収・輸送促進が、フダンソウの生育促進の一因であると考えられる。そこで第 4 章では、 Na^+ 添加によるフダンソウの NO_3^- 吸収・輸送促進と生育促進との関係をより明らかにすることとした。

C_3 植物のイネでは葉に分配される N の 75% が葉緑体に存在している。さらに、葉緑体中の N 化合物の 27% が単一タンパク質である Rubisco に含まれる (Makino et al. 2003)。また、フダンソウと同じ好塩性植物の *Salicornia europaea* は、 NaCl 処理によって Rubisco を含む光合成と関係のある遺伝子を特異的に発現させる (森山 2011)。そのため、 Na^+ が光合成速度、および Rubisco の合成に及ぼす影響を明らかにし、それらが生育促進とどのように関わっているのかを明らかにした。

第 1 節 材料と方法

1. 栽培方法

バーミキュライトに播種し、適宜灌水を行った。播種から 1 週間後、20 L 容コンテナに植物種毎に 1 コンテナ当たり 150 個体となるように移植し、第 2 章と同様の基本培養液(表 1)で水耕栽培を行った。水耕液の pH は 5.0 に調整した。栽培ポットは常に通気し、5 日に 1 度培養液を更新した。水耕液は、Na⁺の影響を最小限にするため、蒸留水で作製した。

水耕栽培開始から 2 週間後、各植物種を基本培養液に加えて KCl と NaCl の濃度がそれぞれ 2 mM、10 mM、80 mM となるよう調製した処理液(表 8)に曝した。4 L 容プラスチックポット 1 ポット当たり 6 個体となるように移植し、処理を開始した。各処理 4 反復とし、20 日間栽培を行った。栽培は、鳥取大学農学部のガラス室内で行った。

表 8 処理の概要

処理	組成		
K 2	基本培養液	+	2 mM KCl
K 10	基本培養液	+	10 mM KCl
K 80	基本培養液	+	80 mM KCl
Na 2	基本培養液	+	2 mM NaCl
Na 10	基本培養液	+	10 mM NaCl
Na 80	基本培養液	+	80 mM NaCl

2. 採取方法

処理開始から 20 日目に植物体の採取を行った。リーフパンチを用い、最大展開葉から直径 1 cm のリーフディスク 3 枚を採取し、直ちに液体窒素で凍結させた。リーフディスクはクロロフィル含有率測定、および Rubisco タンパク質の発現確認に使用した。リーフディスクを抜いた葉の新鮮重を測定し、直ちに液体窒素で凍結させた後、無機元素の分析に使用した。さらに 2 個体の茎葉の新鮮重を測定し、70℃で 48 時間乾燥させた後、乾物重を測定し、水分含有率を算出した。

3. 光合成速度の測定

光合成速度が最大となるとされる朝 8 時頃に、携帯型光合成測定装置 (LCpro, ADC Bioscientific LTD. UK) を用いて収穫日の光合成速度を測定した。CO₂ 流量は 300 μmol s⁻¹、照射量は 1200 μmol m⁻² s⁻¹ に設定した。

4. クロロフィルの定量

Wellburn (1994) に従い、DMF 法を用いてクロロフィルの定量を行った。試験管に、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) 4 mL を注いだ。この時、DMF が気化しやすいことから、オートビュレットを使用した。採取したリーフディスク1枚を試験管に入れ、直ちにパラフィルムで封をした。その後、試験管をアルミホイルで遮光し、2 日間冷蔵庫で静置した。抽出されたクロロフィル濃度を下記の式により算出した。また、クロロフィルの吸収のない波長として 750 nm の吸光度を測定した。

$$\text{Chl_a } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 12 * A_{663.8} - 3.11 * A_{646.8}$$

$$\text{Chl_b } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 20.78 * A_{646.8} - 4.88 * A_{663.8}$$

$$\text{Chl_a+b } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 17.67 * A_{646.8} + 7.12 * A_{663.8}$$

$A_{663.8}$ 、 $A_{646.8}$ 、 $A_{480.0}$ はそれぞれ 663.8 nm、646.8 nm で測定された吸光度から 750 nm で測定された吸光度を引いた値を示す。

上記の式から算出した Chl_a、Chl_b、Chl_a+b を、下記に示した式によって葉面積あたりの量に変換した。

$$\text{例 } \text{Chl_a } (\mu\text{g cm}^{-2}) = \text{Chl_a } (\mu\text{g mL}^{-1}) \times [\text{溶媒の量 (mL)}] / [\text{葉面積 (cm}^2)]$$

5. 無機元素濃度および全 N 含有率の測定

分析方法は第 2 章、第 3 章と同様である。

6. RuBPCase (Rubisco) の発現

下記の抽出・泳動方法は、Makino et al. (1986)、Hikosaka (1996) らの方法に従い、SDS-アクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。

6-1. タンパク質の抽出

凍結させた直径 1cm のリーフディスク 2 枚を液体窒素中で摩砕し、さらに 100 mM リン酸バッファー (pH7.5) 2 mL を加えて摩砕した。リン酸バッファーは、ソルビトール (0.4 M)、アスコルビン酸 (10 mM)、MgCl₂ (2 mM)、NaCl (10 mM)、ヨード酢酸 (5 mM)、PMSF (フッ化フェニルメチルスルホニル) (1 mM) を混合し、括弧内の濃度が終濃度となるように調製した。摩砕液を 15,000 rpm で 4°C、30 分間遠心分離し上清を回収した。回収した上清 500 µL と抽出液 500 µL をマイクロチューブに入れて混合した。抽出液は、メルカプトエタノール 0.3 mL、20% LDS 3 mL、水 3 mL、0.1% ピロニン Y 0.7 mL、ソルビトール 0.638 g を混合して調製した。サンプルを保存する場合は、抽出液を混ぜた状態で -70°C のディープフリーザーに保存した。一連の操作は 4°C 以下で行った。

6-2. 電気泳動手順

SDS-PAGE には、ATTO 社製 AE-6530M/P 型ラピダス・ミニスラブ電気泳動、および ATTA 社製の AE-8450 パワーステーション 1000VC を用いて泳動を行った。

ガラス板、コーム、ゴムバンドを 100% エタノールで消毒してからセットした。分離ゲル (表 9) をガラス板の上から 2 cm まで静かに流し入れ、さらに 100% エタノール 500 µL を流し入れ、30 分間室温で静置し固めた。分離ゲルが固まったら超純水でエタノールを洗い流し、ろ紙で水分を取り除いた。固まった分離ゲルの上残り 2 cm に濃縮ゲル (表 9) を流し込み、コームを差し込んでゲルが固まるまで 30 分間静置した。この間に、ガラス板を市販の SDS-PAGE buffer で満たした機器にセットした。1 コームあたり 30 µL の試料を流し込んだ。初めに電圧 160 V、電流 40 mA で流し、試料が濃縮ゲルを完全に通過した後、電圧 100 V、電流 20 mA で約 150 分間泳動させた。電気泳動装置の模式図を以下に記した (図 9)。

泳動後、ゲルを CBB R-250 0.25%、メタノール 45%、酢酸 10% を含んだ CBB 染色液に浸し、染色するまで振盪した (室温で約 30~60 分間)。ゲルを染色液から除き、メタノール 20% と酢酸 7% を混合した脱色液に一晩浸した。ゲルをガラス版の水滴の上に置き、撮影した。一番濃いバンドが RuBPCase の大サブユニット (55 kDa)、二番目に濃いバンドが小サブユニット (10 kDa) である。

表 9 分離ゲルおよび濃縮ゲルの構成

分離ゲル(12%)		濃縮ゲル(5%)	
Milli-Q	6.8 mL	Milli-Q	6.93 mL
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	5 mL	1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.26 mL
10% SDS	200 μ L	10% SDS	100 μ L
30% アクリルアミド	8 mL	30% アクリルアミド	1.67 mL
10% APS	170 μ L	10% APS	76 μ L
TEMED	26 μ L	TEMED	20 μ L

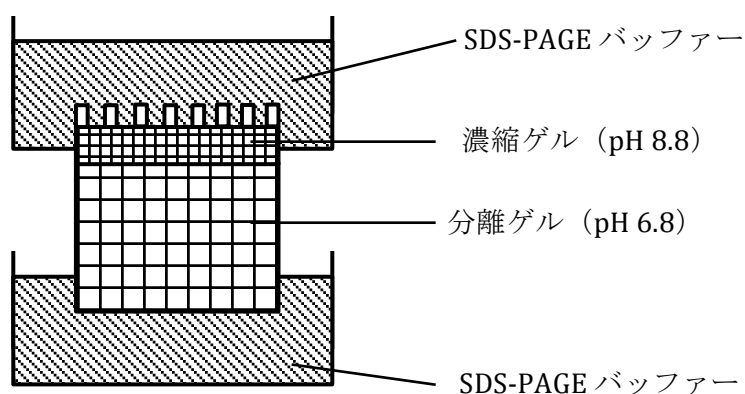


図 9 電気泳動装置の模式図

7. 統計処理

GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)を用いて統計解析を行った。1 元配置の平均の分散 (ANOVA) は、Tukey の多重比較分析によって解析を行った。また、二つの変数の相関関係を検定するため、ピアソンの相関係数を用いた。全てのエラーバーは標準誤差 (SE) を示す。

第 2 節 結果

1. K 処理と Na 処理が生育と水分含有率に及ぼす影響

FW、DW とともに K 処理区よりも Na 処理区で高い値を示した（図 10a、b）。水分含有率（WC）は K 処理区、Na 処理区ともに処理濃度の上昇にともなって上昇する傾向がみられ、Na80 区で最も高かった（図 10c）。

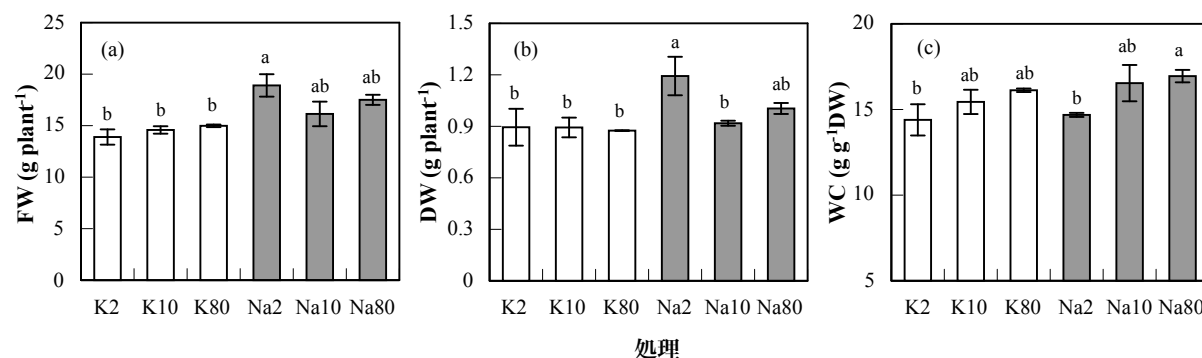


図 10 K 処理と Na 処理 20 日目のフダンソウの (a) 茎葉新鮮重 (FW)、(b) 茎葉乾物重 (DW)、(c) 茎葉水分含有率 (WC) に及ぼす影響。中抜きは K 処理、灰色は Na 処理を示す。処理間において異なるアルファベットの間には 5% 水準で有意差がある ($P < 0.05$; Tukey)

2. 葉の搾汁中 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- 濃度

葉の搾汁において、Na 処理区であれば Na^+ が、K 処理区であれば K^+ が顕著に高い濃度を示した（図 11a、b）。Na80 区の K^+ 濃度は、他の処理区に比べて著しく低かった。 Cl^- 濃度は K 処理区、Na 処理区ともに処理濃度の上昇に伴って上昇した（図 11c）。また、第 2 章と同様に、Na 処理区よりも K 処理区でより多くの Cl^- を蓄積する傾向がみられ、 Cl^- 濃度において K2 区は Na2 区の 1.4 倍、K10 区は Na10 区の 1.7 倍、K80 区は Na80 区の 1.2 倍であった。 NO_3^- 濃度は、 Cl^- 濃度の結果と異なり、K 処理区と Na 処理区ともに、処理濃度の上昇にともなって低下した（図 11d）。K 処理区、Na 処理区ともに 2 mM 区で NO_3^- 濃度が最も高かった。また、第 2 章と同様に、K 処理区よりも Na 処理区でより多くの NO_3^- を蓄積する傾向がみられた。

葉搾汁の $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ 比は Na2 区で顕著に高く、 Cl^- よりも NO_3^- を多く葉に蓄積した。一方、他の区では NO_3^- よりも Cl^- を多く葉に蓄積した（図 12）。

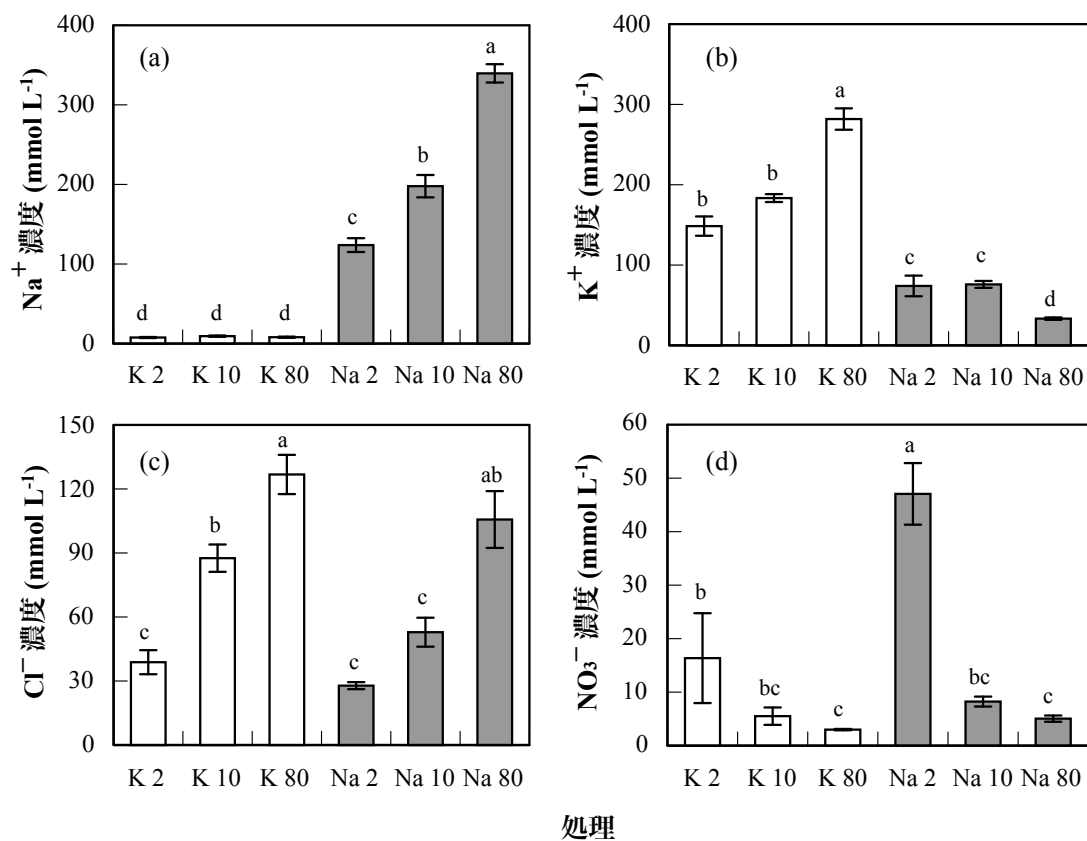


図 11 K 処理と Na 処理下における葉の搾汁中の Na⁺(a)、K⁺(b)、Cl⁻(c)、NO₃⁻(d)濃度。中抜きは K 処理、灰色は Na 処理を示す。処理間において異なるアルファベットの間には 5%水準で有意差がある ($P < 0.05$; Tukey)

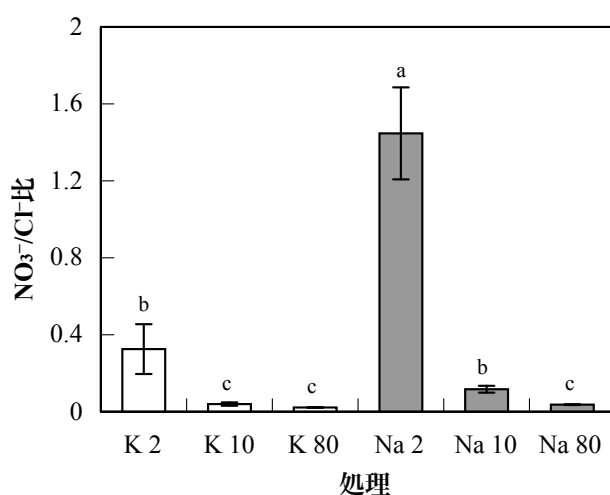


図 12 K 処理と Na 処理下における葉の NO₃⁻/Cl⁻比。中抜きは K 処理、灰色は Na 処理を示す。処理間において異なるアルファベットの間には 5%水準で有意差がある ($P < 0.05$; Tukey)

3. 葉搾汁の Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- と NO_3^- 濃度との関係

葉搾汁の Na^+ 濃度と K^+ 濃度ともに NO_3^- 濃度との間に有意な相関関係はみられなかった (図 13a, b)。一方、 Cl^- 濃度と NO_3^- 濃度の間には有意な負の相関関係がみとめられた (図 13c)。

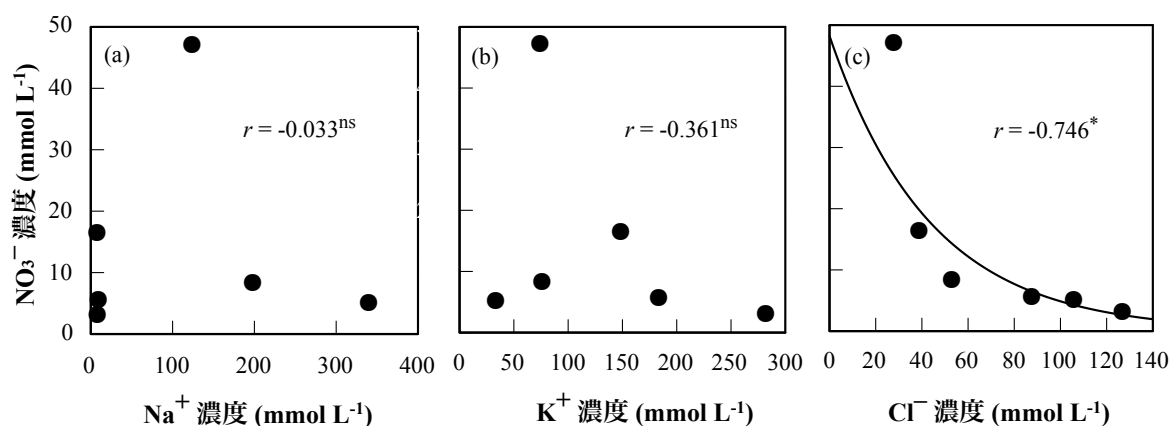


図 13 処理 20 日目の葉搾汁の Na^+ 濃度、 K^+ 濃度、 Cl^- 濃度と NO_3^- 濃度との関係。ピアソンの相関係数を用いて解析を行った (r ; ns, not significant, $^*P < 0.05$)

4. 葉の全 N 含有率

葉の全 N 含有率は Na 処理区でより高い値を示した (図 14)。また葉搾汁における NO_3^- 濃度の結果と同様、全 N 含有率は K 区よりも Na 区で高く、どの処理濃度においても Na 区は K 区の 1.1 倍であった。

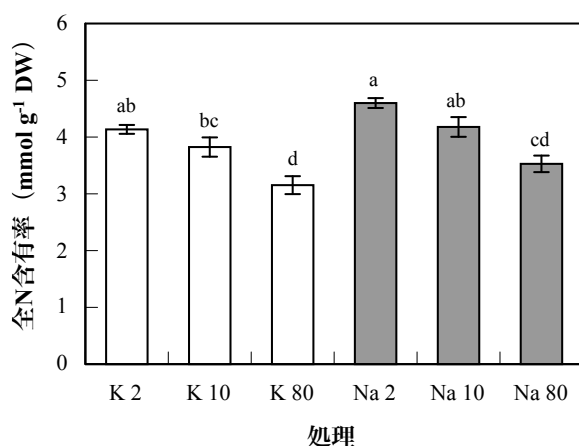


図 14 K 処理と Na 処理下における葉の全窒素 (N) 含有率。中抜きは K 処理、灰色は Na 処理を示す。処理間において異なるアルファベットの間には 5% 水準で有意差がある ($P < 0.05$; Tukey)

5. 葉のクロロフィル含有率

処理 20 日目における最大展開葉のクロロフィル含有率を SPAD および DMF 法を用いて測定した。

SPAD、DMF 法ともにクロロフィル含有率は Na 処理区で高い値を示した(図 15a, b)。

葉搾汁の NO_3^- 濃度とクロロフィル含有率との間に有意な正の相関関係がみられた(図 16a)。さらにクロロフィル含有率と DW にも有意な正の相関関係がみられた(図 16b)。

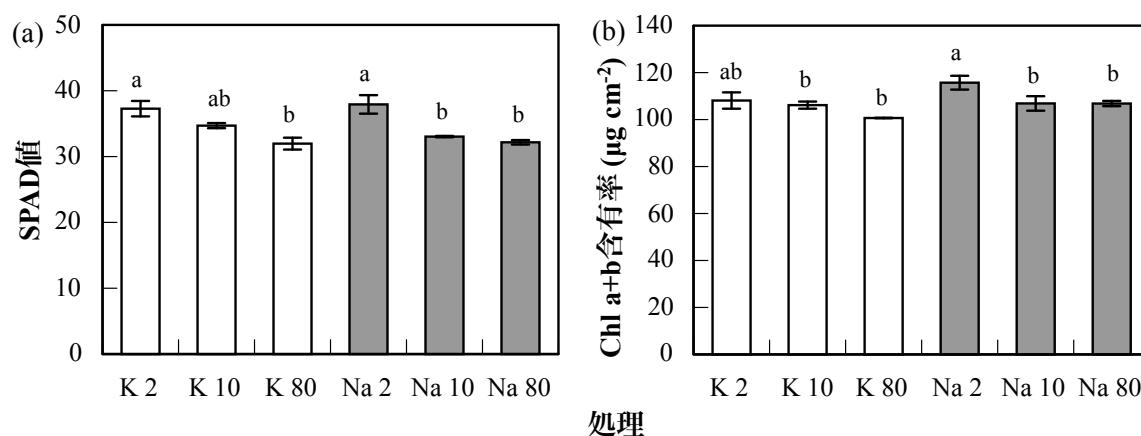


図 15 K 処理と Na 処理下での (a) SPAD と (b) DMF 法を用いて測定したクロロフィル含有率。中抜きは K 処理、灰色は Na 処理を示す。処理間において異なるアルファベットの間には 5%水準で有意差がある ($P < 0.05$; Tukey)

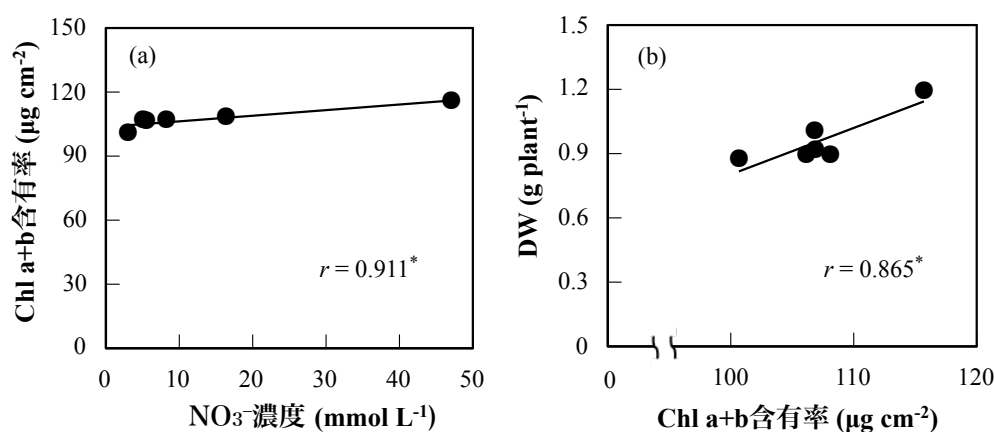


図 16 葉搾汁の (a) NO_3^- 濃度とクロロフィル含有率、(b) クロロフィル含有率と乾物重 (DW) との関係。ピアソンの相関係数を用いて解析を行った (r ; * $P < 0.05$)

6. 最大展開葉の光合成速度

光合成速度は K 処理区よりも Na 処理区で高い値を示し、Na2 区は他の区よりも顕著に高かった(図 17)。また、Na2 区の光合成速度は K2 区の 4 倍であった。

葉搾汁の NO_3^- 濃度と光合成速度との間に有意な相関関係はみとめられなかった(図 18a)。一方、光合成速度と DW の間には有意な正の相関関係がみられた(図 18b)。

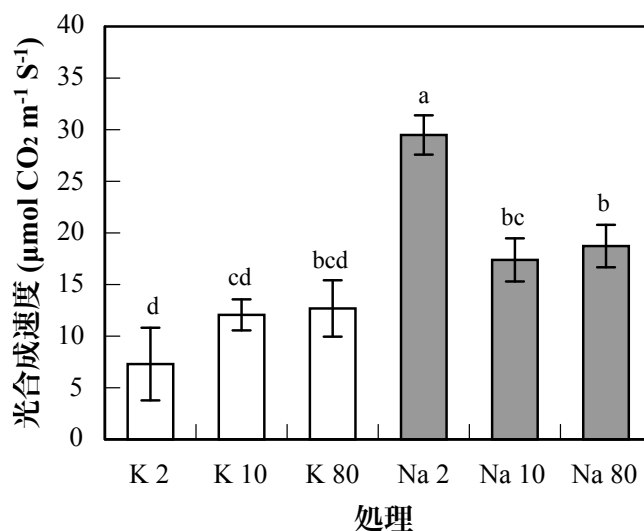


図 17 K 処理と Na 処理下における最大展開葉の光合成速度。中抜きは K 処理、灰色は Na 処理を示す。処理間において異なるアルファベットの間には 5%水準で有意差がある ($P < 0.05$; Tukey)

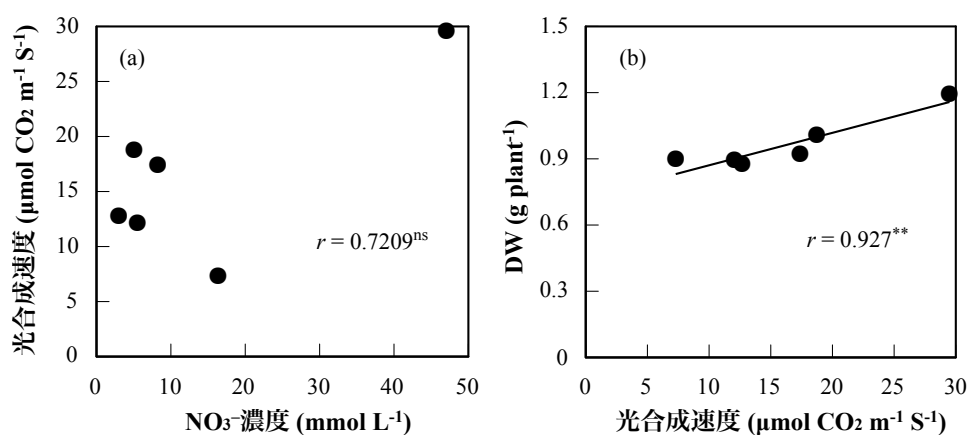


図 18 処理 20 日目の葉の (a) NO_3^- 濃度と光合成速度、(b) 光合成速度と乾物重 (DW) との関係。ピアソンの相関係数を用いて解析を行った (r ; ns, not significant, ** $P < 0.01$)

7. Rubisco タンパク質の発現

K 処理区、Na 処理区ともに 55 kDa 付近に濃いバンドが確認できたことから、Rubisco の大サブユニットタンパク質が発現していた(写真 2)。しかし K 処理と Na 処理における Rubisco の発現に明らかな違いはみとめられなかった。また、小サブユニット(10 kDa 付近)については、はっきりとした発現はみとめられなかった。

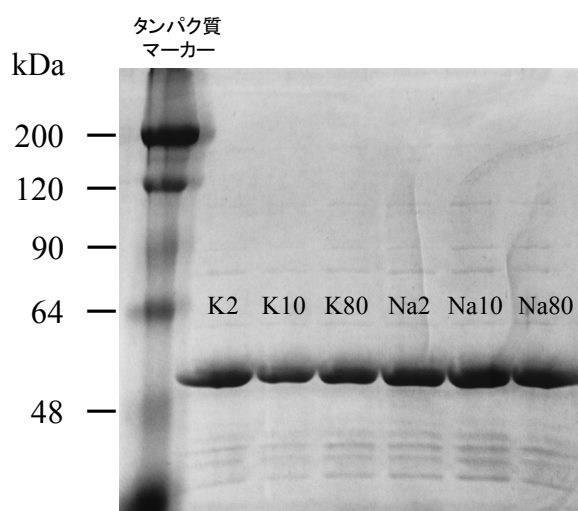


写真 2 最大展開葉における Rubisco の発現

8. 葉搾汁の NO_3^- 濃度と生育との関係

葉搾汁の NO_3^- 濃度と DW の間に有意な正の相関関係がみとめられた(図 19)。

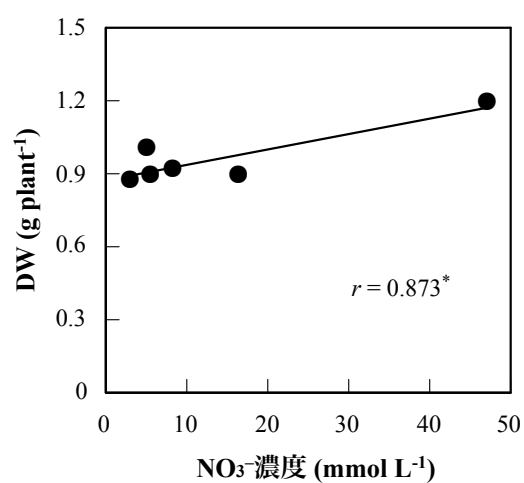


図 19 処理 20 日目における葉の NO_3^- 濃度と乾物重(DW)との関係。ピアソンの相関係数を用いて解析を行った(r ; $*P < 0.05$)

第3節 考察

第2章、第3章では短期(7日間)の処理期間を設け、生育に処理間差がない時の Na^+ と NO_3^- 吸収との関係を明らかにした。第4章では20日の処理期間を設け、フダンソウの Na^+ による NO_3^- 吸収促進と生育との関係を調べた。

1. K処理とNa処理が生育に及ぼす影響

Yamada et al. (2014)はフダンソウを7日間の異なるNaCl濃度処理に曝したところ、NaCl 80 mMの時に生育が最大となったと報告している。本研究ではK処理よりもNa処理で生育が良好となる傾向がみられた(図10a, b)。一方、WCはNa80区で最大値を示し、Na2区では有意に低く、むしろ水分状態が悪かった(図10c)。Ohori(2011)は、好塩性植物サリコルニアの、低NaCl濃度下における生育低下の原因は水分ストレスによるものだとしている。そのため、本研究のNa2区においても同様のことが考えられた。しかし、このことについては、今後さらに実験を重ねて明らかにしていく必要がある。

フダンソウと同じヒユ科のハウレンソウは、高NaCl培地(200 mM)において多量の Na^+ と Cl^- を液胞に蓄積することで浸透圧調節を行っている(Schröppel-Meier and Kaiser 1988)。また、好塩性が多く見られる塩生植物の細胞伸張の原動力は、吸水によって生じた膨圧であるという報告がある(Serpe and Matthews 2000)。そのため本研究のNa80区において高濃度のNaCl培地に20日間曝されたフダンソウは、多量の Na^+ と Cl^- を液胞に蓄積し膨圧を維持することで高いWCを保持し、細胞を伸張させたものと考えられる。このように、これまで仮説として考えてきた NO_3^- 吸収促進による生育促進の外に、高いWCを維持することが、Na80区のような高塩濃度下におけるフダンソウの生育促進に寄与した可能性が考えられ、さらに長期の処理期間と高いNaCl処理区を設けて確認する必要がある。

2. K処理とNa処理が葉の Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- 濃度に及ぼす影響

Na^+ 濃度および K^+ 濃度については第2章と同様の結果が得られた(図11a, b)。しかし、 K^+ と Na^+ が2 mMと同量添加されたNa2区の Na^+/K^+ 比が1.67であったことから、フダンソウは K^+ よりも Na^+ の吸収選択性が高いことがわかった。第3章では培地NaClが100 mMという高濃度であっても葉の K^+ 濃度は有意に低下しなかったが(表7)、本研究ではNa80区の K^+ 濃度は他の処理区よりも有意に低下した。第3章の処理期間は7日で、NaCl 80 mM

区の K^+/Na^+ 比は 0.6 であったのに対し、本研究の処理期間は 20 日で、Na80 区の K^+/Na^+ 比は 0.1 であった。このことから、処理後 7 日ではこれまでに吸収した K^+ によってイオン恒常性を維持できたが、処理後 20 日では処理開始前に吸収した K^+ が代謝され、 Na^+ による K^+ の拮抗的吸収阻害が葉 K^+ 濃度により顕著に現れたと考えられる。しかしながら、 K^+ が顕著に低い Na80 区でも Na2 区と変わらない生育を示した。これまでに様々な植物種で、 Na^+ による K^+ 代替機能が明らかになっており (Subbarao et al. 2003)、ヒユ科のレッドビートは培地 K^+ 濃度が欠乏している場合、 Na^+ を添加することで生育の低下を抑制する (Subbarao et al. 2000)。このことから、フダンソウにおいても高 NaCl 培地では Na^+ によって何らかの K^+ 代替機能が働いている可能性がある。

NO_3^- は Na 処理区で K 処理区よりも多く蓄積される傾向が見られ、これまでの結果と同様、フダンソウの NO_3^- 吸収・輸送には K^+ よりも Na^+ が有用であることが示された。

葉の NO_3^-/Cl^- 比から、Na 処理区の方で Cl^- よりも NO_3^- を多く葉に蓄積していた (図 12)。葉へと移行された NO_3^- は NO_3^- 同化経路を介して生育に欠かせない様々な N 化合物に合成されるため、葉における NO_3^- の確保は重要である (Lam et al. 1996)。本研究では NO_3^- 濃度と DW の間に有意な正の相関関係が示された (図 19)。さらに、葉の全 N 含有率も K 処理区よりも Na 処理区でより高い値を示したことから (図 19)、葉における高い NO_3^- 濃度、および N 含有率を維持したことが Na 処理下での生育促進につながったと考えられた。

しかしながら第 3 章において葉の NO_3^- 濃度は培地 NaCl 濃度の上昇とともに有意に上昇したが (表 7)、本研究では著しく低下した (図 11d)。このことは、培地の NO_3^- 濃度と Cl^- 濃度の比が関係していると考えられる。Na2 区では培地に NO_3^- が Cl^- よりも多かったため、 NO_3^- は Cl^- による吸収阻害を受けなかった。しかし、Na10 や Na80 区では、培地に NO_3^- よりも Cl^- が圧倒的に多かったため、 Cl^- によって NO_3^- の吸収が阻害され、さらに処理期間が 20 日だったことで葉の NO_3^- 濃度が著しく低下したと考えられ、実際に Cl^- 濃度と NO_3^- 濃度との間には有意な負の相関関係が示されていた (図 13c)。しかし、全 N 含有率は、処理濃度の上昇に伴う N 含有率の低下はそれほど大きいものではないことから、Na10 区や Na80 区でも生育に必要な量の NO_3^- が吸収できているものと考えられる (図 14)。

3. K 処理と Na 処理がクロロフィル含有率、および光合成に及ぼす影響

クロロフィルの減少幅がオオムギの品種間における耐塩性の指標とされている (Belkhodja et al. 1994)。一方 *Salicornia europaea* では、クロロフィル含有率は 100 mM

NaCl 処理区で無処理区よりも有意に高かった(森山 2009)。また、塩生植物においては微量の Na^+ がクロロフィルの合成に必要であるという報告もあり(高田 1974)、塩処理がクロロフィル含有率に及ぼす影響には種間差があると考えられる。本研究では、K 処理、Na 処理に関わらず低濃度区(2 mM)において最も高い値を示した(図 15)。また、葉の NO_3^- 濃度とクロロフィル含有率、そしてクロロフィル含有率と DW との間に正の相関関係があった(図 16a、b)。このことから、 Na^+ が直接的にクロロフィルの合成に関わっているのではなく、 Na^+ によって吸収が促進された NO_3^- がフダンソウのクロロフィル合成量決定要因であり、さらにはフダンソウの生育に影響を及ぼしていると示唆された。しかし、Na2 区と同様に K2 区においても高いクロロフィル含有率が示されたが、そのことが DW に反映されていないことから、クロロフィルの合成のみが生育促進に大きく寄与しているわけではないと考えられる。

塩処理下での光合成速度は照射量、 CO_2 濃度その他、気孔開度や葉肉組織内の光合成活性によって決定される(Downton et al. 1985、森山 2009)。また、高 NaCl 濃度により培地の N 濃度が制限されると、光合成に関わる様々な機能が抑制される(Seemann and Sharkey 1986)。本研究で、光合成速度は K 処理区よりも Na 処理区で高い値を示した(図 17)。さらに、光合成速度と DW との間には有意な正の相関関係がみとめられた(図 18b)。また、3 日間の NaCl 処理下と無処理下におけるフダンソウの気孔開度は、NaCl 処理をした葉で上昇するという報告がある(森川 2015)。これらのことから、 Na^+ によって NO_3^- が葉に多く供給され、さらに気孔開度が上昇したことで光合成速度が上昇し、Na 処理区での生育促進につながったと考えられる。

Seemann and Sharkey(1986)らは、塩ストレスによって植物の光合成速度が低下する原因は Rubisco の発現を制御する N 量が減少することにあるとしている。本研究では Rubisco の発現自体に明らかな処理間差を確認することはできなかった(写真 2)。しかし光合成速度は上昇していたことから、タンパク質自体に変化はないが活性が影響を受けている可能性が考えられる。また、より鮮明な発現パターンを確認するためにもタンパク質量当たりの Rubisco の発現量を調査していくことが今後の課題である。

4. まとめ

本研究では Na 処理区で最も良好な生育を示した。 Na^+ の添加によって葉に蓄積された NO_3^- は、クロロフィル含有率や光合成速度を上昇させ、DW とも高い正の相関関係を示した。このことからフダンソウでは Na^+ によって NO_3^- の吸収・輸送が促進し、そのことが要因となっ

てクロロフィル含有率や光合成速度が上昇し、Na 処理区における生育促進につながったと考えられた。一方 Na10 や Na80 区では、多量の NaCl を液胞に蓄積して膨圧を維持することで細胞伸張を行い、良好な生育を維持している可能性が考えられた。以上から、本研究によってフダンソウの NO_3^- 吸収、および生育促進における Na^+ の有用性が明らかとなり、葉での NO_3^- の蓄積による光合成活性の上昇と、 Na^+ の蓄積による細胞伸張という二つのプロセスがフダンソウの生育促進に関わっていることが示唆された。

第 4 節 要約

これまでの研究から、フダンソウでは Na^+ を添加することによって地上部への NO_3^- の移行が促進されることが明らかとなった(第 2 章、第 3 章)。また、7 日間の処理では培地 NaCl 濃度が 80 mM の時に生育が最大となるという報告もある(Yamada et al. 2014)。森山(2009)は、フダンソウと同じヒユ科で好塩性植物の *Salicornia europaea* が、NaCl 処理下において光合成に関わる様々な遺伝子の特異的に発現させることを確認している。そこで本研究ではフダンソウの Na^+ による NO_3^- 吸収・輸送促進と生育促進との関係を明らかにすることとし、特に NO_3^- がクロロフィル合成、光合成、および Rubisco の発現に及ぼす影響を調査した。

基本培養液を用い、3 週間育苗を行った。その後基本培養液に以下のように K^+ および Na^+ を添加した 6 つの処理区を設定した: K2 (KCl 2 mM、NaCl 0 mM)、K10 (KCl 10 mM、NaCl 0 mM)、K80 (KCl 80 mM、NaCl 0 mM)、Na2 (KCl 0 mM、NaCl 2 mM)、Na10 (KCl 0 mM、NaCl 10 mM)、Na80 (KCl 0 mM、NaCl 80 mM)。処理開始から 20 日後に収穫し、 Na^+ が葉の搾汁中元素含有率、クロロフィル含有率、光合成速度、Rubisco の発現に及ぼす影響を調査した。

DW は K 処理区よりも Na 処理区で高い値を示す傾向がみられた。一方、WC は Na10 区や 80 区で最も高く、Na2 区ではむしろ水分状態が悪かった。フダンソウと同じヒユ科のホウレンソウは高塩濃度下において NaCl を液胞に蓄積し、膨圧を維持する。そのため、フダンソウにおいても高 NaCl 濃度下では同様のメカニズムが働き、吸水の増加によって細胞伸張が起こり、生育促進につながったと考えられる。

葉の NO_3^- 濃度は Na 処理区の方で高い値を示した。しかし第 3 章とは異なり、処理濃度の上昇に伴って NO_3^- 濃度は低下し、Cl⁻ 濃度と NO_3^- 濃度との間には有意な負の相関関係

がみられた。このことは、培地の NO_3^- 濃度と Cl^- 濃度の比が関係しており、低濃度区では培地において NO_3^- が Cl^- よりも多かったため、 NO_3^- 吸収は阻害されなかったが、高濃度区では培地の Cl^- 濃度が NO_3^- 濃度よりも圧倒的に高く、 NO_3^- の吸収が阻害されたためであると考えられた。さらに、処理期間が 20 日であったため、 Cl^- による NO_3^- の吸収阻害がより顕著に現れたと考えられる。

クロロフィル含有率と光合成速度はともに、葉の NO_3^- 濃度と同様に Na 処理区でより高い値を示した。また、クロロフィル含有率と光合成速度ともに、DW との間に有意な正の相関関係があったことから、これらが Na 処理区における生育促進要因であると考えられた。Rubisco の発現に処理間差はみられなかったが、N 量が Rubisco の合成および活性を制御しているという報告があることから、今後 Rubisco 活性についても明らかにしていく必要がある。

本研究によって、フダンソウでは、 Na^+ 添加によって吸収・輸送が促進された NO_3^- を利用することで、クロロフィル含有率や光合成速度が上昇し、フダンソウの生育が促進すること、また、高 NaCl 濃度培地では NaCl を浸透圧調節に利用して細胞伸張を行っていること、という二つのプロセスがフダンソウの生育促進に関わっていることが示唆された。

第 5 章

総合考察

培地に NaCl が高濃度に存在すると、耐塩性の弱い植物は生育阻害を受ける。一方いくつかの植物種では、培地に Na があることで好塩性を示し、生育が促進することが分かっている。例えば、好塩性植物の *Salicornia bigerovii* Torr. では NaCl 200 mmol L⁻¹ 添加区で対照区 (NaCl 0 mM 区) の 245%、フダンソウ (*Beta vulgaris* var. *cical* L.) では NaCl 80 mmol L⁻¹ 添加区で対照区の 146%、生育が促進した (Yamada et al. in press)。しかし、これらの植物種に見られる Na による生育促進メカニズムは未だ不明な点が多い。Yamada et al. (unpublished) は、フダンソウにおいて Na⁺濃度の上昇に伴って全 N 含有率が上昇することを報告している。そこで、本研究では NaCl 添加と N 栄養との関係に着目し、それらが生育とどのように関わっているのかを明らかにした。

細胞内の K⁺と NO₃⁻濃度との間には正の相関関係がみとめられており、K⁺の供給量が減少すると NO₃⁻の吸収量も低下することが多くの植物で報告されている (Wang et al. 2001)。また、それは導管中の NO₃⁻輸送における電気的中性が陽イオンでは主に K⁺によって保たれているためとされる (Lin et al. 2008、Wang et al. 2012)。しかしながら本研究において、フダンソウの葉の搾汁中における NO₃⁻濃度は K⁺よりも Na⁺を添加することによって上昇することが分かった。そのため、一般的な植物種とは異なり NaCl によって生育が促進するフダンソウは、導管での NO₃⁻輸送における随伴陽イオンとして、K⁺ではなく Na⁺を選択的に利用していることが示唆された。そこで、Na⁺および K⁺添加後の導管液中の NO₃⁻輸送をより明確にするため、処理開始から 2 時間毎に導管液を採取した。すると、導管液中の NO₃⁻濃度はやはり Na 処理区で有意に高い値を示し、NO₃⁻の根から葉への輸送に Na⁺が関わっていることが明らかとなった (第 2 章)。導管における NO₃⁻の積載には NRT1.5 が、排出には NRT1.8 が関わっている。シロイヌナズナでは、NaCl 処理によって NRT1.5 は下方制御され、NRT1.8 は上方制御されることで根に NO₃⁻を蓄積し、耐塩性に関わる遺伝子の発現を増加させることが分かっている (Li et al. 2010、Chen et al. 2012)。つまり、地上部への NO₃⁻の輸送を抑制することと耐塩性との間に何らかの関わりがあるとしている。しかし本研究において、フダンソウでは NaCl によって NO₃⁻が導管を介して積極的に地上部へと輸送されることが明

らかとなった。そのため、今後 NRT1.5 や NRT1.8 の発現パターンを調査することによって、高 NaCl 培地において植物が良好な NO_3^- 吸収を維持するための手がかりを得ることが出来るかもしれない。また、フダンソウにおいて Na^+ の NO_3^- 吸収・輸送促進効果の外に、細胞内の K^+ と Cl^- の間に正の相関関係がみとめられた(第 2 章)。高 NaCl 培地における植物の NO_3^- 吸収低下は高濃度の Cl^- によってもたらされる(Debouba et al. 2006)。そのため、 Cl^- の吸収を制御することは NaCl 培地における NO_3^- の吸収を維持するうえで重要である。本研究結果からフダンソウでは Cl^- が K 処理区の方でより多く蓄積されたため、このことも Na 処理区における NO_3^- 吸収・輸送促進に関わりがあるかもしれない。

NO_3^- は最終的にタンパク質へと合成されることで植物における様々な生理作用を維持する役割を担っている。そのため、吸収された NO_3^- が Na^+ 存在下においても正常に代謝されているのかを明らかにする必要がある。葉へと輸送された NO_3^- はまず NO_3^- 同化経路の第一段階である NR によって NO_2^- へと還元される。多くの植物でこの NR 活性が NaCl を添加することによって低下することが報告されている(Gouia et al. 1994, Abd-El Baki et al. 2000, Debouba et al. 2006)。一方本研究において、培地 NaCl 濃度の上昇はフダンソウの葉の NO_3^- 濃度および NR 活性を上昇させた。Munns (1993) は Na^+ と NR 活性との間に直接的な関係性はないとしており、NR は細胞質の NO_3^- 濃度に応じて誘導されるため、フダンソウでは Na^+ 添加によって NO_3^- の吸収・輸送が促進し、NR 活性も上昇したものと考えられる。しばしば、フダンソウのような好塩性植物が NaCl によって生育を促進させる現象は、高い耐塩性を示している結果であるとして紹介される(Liu et al. 2013)。そこで、耐塩性強のオオムギとフダンソウを比較したところ、オオムギでは培地の NaCl 濃度の上昇に伴って葉の NO_3^- 濃度および NR 活性が有意に低下した。これらの結果から、NaCl 下における耐塩性強のオオムギと好塩性植物フダンソウの NO_3^- 吸収・輸送システムとその代謝過程は大きく異なっていることが明らかとなった(第 3 章)。

好塩性植物 *Salicornia europaea* を NaCl 100 mM の培地に曝したところ、光合成に関わる様々な遺伝子が特異的に発現した(森山 2009)。さらに葉に分配される N の多くが、単一タンパク質である Rubisco に存在しており、植物の光合成は吸収された N 量と密接に関わっている(Downton et al. 1985)。そのため、高 NaCl 濃度により培地の N 濃度が制限されると、光合成に関わる様々な機能が抑制されることが分かっている(Seemann and Sharkey 1986)。フダンソウを異なる濃度の KCl および NaCl 処理に 20 日間曝したところ、Na 処理

区で K 処理区よりも大きい DW を示した。WC も Na 処理区で高く、特に Na10 区と Na80 区で最も高かったが、Na2 区ではむしろ水分状態は悪かった。好塩性植物アッケシソウは低塩濃度かで水分ストレスを受けることが報告されていることから、Na2 区でも同様のことが考えられ、生長につれて膨圧を維持できなくなり、今後生育が低下する可能性がある。一方、塩生植物の多くは Na^+ と Cl^- を主な浸透圧調節物質として液胞に溜め込み、高い WC を保つことで膨圧を維持し、細胞を伸張させる (Hasegawa et al. 2000)。そのため、フダンソウにおいても高塩濃度下では同様の生育促進メカニズムによって生育が促進することが考えられた。 NO_3^- は Na 処理区でより多く葉に蓄積した。また、クロロフィル含有率、および光合成速度についても K 処理区よりも Na 処理区で高く、ともに DW との間に正の相関関係があった。これらのことから、 Na^+ によって NO_3^- の吸収・輸送が促進されたため、クロロフィルの合成や光合成活性が促進され生育促進につながったと考えられた。

本研究から、フダンソウにおける Na^+ の根から葉における NO_3^- の吸収・輸送促進効果が明らかとなった。そして、 Na^+ 添加によって積極的に葉に輸送された NO_3^- が NR 活性を上昇させ、さらにクロロフィルの合成や光合成を活性化させることによってフダンソウの生育が促進することが分かった。さらに、高 NaCl 濃度培地では NaCl を浸透圧調節に利用して細胞伸張を行っていることが示唆された。以上から、フダンソウの NO_3^- 吸収、および生育促進における Na^+ の有用性が明らかとなり、これらは K^+ ではなく、 Na^+ 特有の効果であると言えた。

第 6 章

摘要

フダンソウ (*Beta vulgaris* var. *cicla* L) は培地に Na^+ があることによって生育が促進する好塩性植物である。一般的な植物では、高 NaCl 培地において高濃度の塩化物イオン (Cl^-) が硝酸イオン (NO_3^-) 吸収を拮抗的に阻害するため、植物は窒素欠乏を呈し、生育が低下する。しかしフダンソウでは、高 NaCl 培地でも窒素 (N) 欠乏を呈することなく生育が促進する。そこで本研究では、高 NaCl 濃度条件下でフダンソウの生育が促進される原因を明らかにすることを目的とし、 NaCl の添加が NO_3^- の吸収・移行に及ぼす影響、および生育促進と NO_3^- 吸収・輸送との関係を調査した。

多くの植物種で NO_3^- の吸収・輸送と細胞内の K^+ 濃度との間には正の相関関係がみとめられており、特に導管を介した NO_3^- 輸送における電気的中性が主に K^+ によって維持されているという報告がある。そこで、 K^+ と Na^+ がそれぞれフダンソウの葉への NO_3^- 輸送に及ぼす影響を比較調査した。葉における NO_3^- 濃度は Na 区で高い値を示したが、根の NO_3^- 濃度は K 区で高い値を示した。 NO_3^- の葉/根比の結果から、Na 区において NO_3^- は葉の方に、K 区では根の方により多く蓄積された。導管液中の NO_3^- 濃度は Na 区の方で高く、導管液中の Na^+ 濃度と NO_3^- 濃度との間には有意な正の相関関係がみられた。しかし、導管液中の K^+ 濃度と NO_3^- 濃度との間に関係はなかった。このことから、好塩性植物フダンソウの導管を介する葉への NO_3^- 輸送は K^+ ではなく Na^+ によって促進されることが明らかとなった。

次に、培地の NaCl 濃度の上昇がフダンソウの NR 活性に及ぼす影響を調査し、 Na^+ によって吸収・輸送が促進された NO_3^- が正常に代謝されているのかを明らかにしようとした。さらに、耐塩性の強い植物と、塩を生育促進に利用する好塩性植物における NO_3^- 吸収・輸送と NR 活性に及ぼす影響を、耐塩性が強とされるオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) と比較検討した。フダンソウの葉の搾汁中における NO_3^- 濃度は、 Na^+ と高い正の相関関係があり、NR 活性は NaCl 80 mM 区で最大となった。NR は細胞質の NO_3^- 濃度に応じて誘導されるため、フダンソウでは Na^+ 添加によって NO_3^- の吸収・輸送が促進され、NR 活性も上昇したと考えられる。 NaCl によって、フダンソウのような好塩性植物の生育が促進する現象は、あくまでも植物の高い耐塩性によるものだとされるが、オオムギはフダンソウとは異なり、培地の

NaCl 濃度の上昇に伴って NO_3^- の吸収・輸送および NR 活性を有意に低下させた。これらの結果から、NaCl 下における好塩性植物フダンソウと耐塩性強のオオムギの NO_3^- 吸収・輸送システムとその代謝過程は大きく異なっていることが明らかとなった。

光合成が行われる葉緑体に分配された N の 27% が単一タンパク質である Rubisuco にみられる。さらに、好塩性植物の *Salicornia europaea* では、光合成に関わる遺伝子が NaCl 処理によって特異的に発現することが分かっている。このことから、 NO_3^- の吸収・輸送促進による光合成の上昇がフダンソウの生育を促進させる一因であると考え、 Na^+ が光合成に及ぼす影響を明らかにした。DW、葉の NO_3^- 濃度、クロロフィル含有率、および光合成速度は K 処理区よりも Na 処理区で高い値を示した。さらに、葉の NO_3^- 濃度はクロロフィル含有率、および DW との間に有意な正の相関関係を示した。これらのことから、フダンソウにおいて、 Na^+ によって葉に多く蓄積された NO_3^- がクロロフィルの合成や光合成速度を上昇させたことが、生育促進要因であると考えられた。また、高 Na^+ 濃度処理下では、高い WC を示し良好な水分状態を維持した。塩生植物の多くは、NaCl を液胞に蓄積して浸透圧調節を行い、高い WC を保つことで膨圧を維持し細胞伸張を行う。そのため、高塩濃度下ではフダンソウにおいても同様の生育促進メカニズムが働いている可能性がある。一方、高い生育を示した低 Na 濃度処理下ではフダンソウの DW は低く、水分状態は悪かった。そのため、生長につれて膨圧が維持できなくなり、今後生育が低下する可能性が考えられた。

本研究において、培地の Na^+ によってフダンソウの根から葉への NO_3^- 輸送が促進されることが明らかとなり、葉に蓄積された NO_3^- が NR 活性、クロロフィルの合成、光合成速度を上昇させ、それらが原因となってフダンソウの生育が促進することが分かった。また、培地の塩濃度が高いほど、良好な水分状態を維持しており、このことから、液胞に多量の NaCl を蓄積することで吸水量が増加し、その結果起こる膨圧の上昇によって細胞伸張をしていることが考えられた。以上から、フダンソウの NO_3^- 吸収・輸送、および生育促進には、 K^+ よりも Na^+ がより有用であることが示唆された。

第 7 章

Summary

Swiss chard (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.) is a halophilic plant, whose growth is increased by moderate salinity. At high levels of NaCl, nitrate (NO_3^-) uptake in many plant species is decreased due to the antagonistic effect of chloride (Cl^-) and their growth is inhibited by nitrogen (N) deficiency. However, Swiss chard doesn't present the N deficient symptoms when it is exposed to high levels of NaCl. Therefore in this study, I investigated the effect of NaCl on the relation between growth enhancement and NO_3^- uptake in order to elucidate the mechanisms of growth stimulation by NaCl in Swiss chard.

Many studies reported that the cellular potassium (K^+) and NO_3^- concentrations are closely related and the NO_3^- xylem transport is stimulated by K^+ due to maintain the electric charge balance. Here, we investigated whether NO_3^- uptake by Swiss chard was affected more by sodium (Na^+) than by K^+ . The leaf NO_3^- concentration was significantly enhanced in the Na treatments compared with the K treatments. NO_3^- was accumulated more in leaves under Na treatments whereas it was more accumulated in roots under K treatments. The NO_3^- concentration in the xylem sap was significantly higher in Na treatments and there were a significant correlation between xylem sap Na^+ and NO_3^- concentrations while there was no significant correlation between xylem sap K^+ and NO_3^- concentrations. These results suggest that Na^+ but not K^+ enhances NO_3^- uptake and transport to the leaves in Swiss chard and that its function may relate to xylem translocation of NO_3^- .

NO_3^- is the crucial in controlling the nitrate reductase (NR) activity to produce N compounds. Therefore in study 2, I investigated whether NO_3^- which is translocated to leaves was reduced properly under NaCl condition. In this study, I compared the effects of NaCl on NO_3^- uptake and NR activity in halophilic Swiss chard with those in salinity-tolerant barley

(*Hordeum vulgare* L.). In extracted leaf sap of Swiss chard, the Na^+ and NO_3^- concentrations were strongly and positively correlated and the NR activity was enhanced in 80 mM NaCl treatment. Enhancement of NO_3^- uptake by Na^+ may contribute to the increased NR activity in Swiss chard. On the other hand in barley, both NO_3^- uptake and NR activity were significantly decreased with increasing NaCl concentration. Both barley and Swiss chard are known to accumulate high levels of Na^+ and both species are often classified as salinity-tolerant plants. However, in this study, I found that these two plant species were completely differ on NO_3^- uptake systems and on its metabolic process.

In the previous studies, I assumed that the enhancement of NO_3^- uptake was one of the factors to stimulate the growth of Swiss chard under NaCl condition. In C_3 rice, 75 % of total N is allocated in leaf chloroplast and 27% of N in chloroplast is synthesized to Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco). Furthermore, specific genes, which are involved in photosynthesis, were expressed in *Salicornia europaea* when plant was exposed to the NaCl treatment. Therefore, I investigated the effects of Na^+ on photosynthesis in order to elucidate whether these factors relate to the growth stimulation of Swiss chard. DW, leaf NO_3^- concentration, chlorophyll concentration, and photosynthetic rate were higher in Na treatments than in K treatments. I also found that the leaf NO_3^- concentration was positively and significantly correlated with both chlorophyll concentration and DW. It is known that the various photosynthetic functions are inhibited when media N nutrition is limited. In this study, leaf NO_3^- concentration was higher in Na treatments and the photosynthetic rate was also higher in Na treatments. These results indicate that Na^+ may stimulate growth in Swiss chard through enhancing chlorophyll synthesis and photosynthesis by accumulating more NO_3^- in leaves. High WC was also found in high Na treatment, which means its water status is a decent. Halophyte plants are known to expand their cells to maintain turgor pressure high by accumulating Na^+ in vacuoles. Therefore, a similar cell expansion system (known as

growth stimulation) may exist in Swiss chard under high salinity conditions. On the other hand in low Na treatment, although DW was high, WC was lower, which means the water status was damaged. Therefore, it may be possible that the growth in lower Na treatment will decrease when the plant is not be able to maintain its turgor pressure by lack of Na in further growth stage.

In this study, I elucidated that Na^+ , but not K^+ , enhances root to leaf NO_3^- translocation in Swiss chard. In addition, we also found that those accumulated NO_3^- in leaves by Na^+ enhances NR activity, chlorophyll synthesis, and the photosynthetic rate and it may cause the growth stimulation of Swiss chard. Furthermore, maintaining high turgor pressure by accumulating Na in vacuoles may also cause cell expansion in Swiss chard when it is exposed to high salinity conditions. From these facts, I suggest that the Na^+ but not K^+ is beneficial for the NO_3^- translocation to leaves and the growth stimulation of Swiss chard.

引用文献

- Abd-El Baki GK, Siefritz F, Man HM, Weiner H, Kaldenhoff R, Kaiser WM 2000: Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. *Plant Cell Environ.*, **23**, 515–521.
- Ahmed MZ, Shimazaki T, Gulzar S, Kikuchi A, Gul B, Khan MA, Koyro HW, Huchzermeyer B, Watanabe KN 2013: The influence of genes regulating transmembrane transport of Na^+ on the salt resistance of *Aeluropus lagopoides*. *Funct. Plant Biol.*, **40**, 860–871.
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E 1999: Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, **285**, 1256–1258.
- Ayala F, O’Leary JW 1995: Growth and physiology of *Salicornia bigelovii* Torr. at suboptimal salinity. *Int. J. Plant Sci.*, **156**, 197–205.
- Belkhodja R, Morales F, Abadia A, Gomez-Aparisi J, Abadia J 1994: Chlorophyll Fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.*, **104**, 667–673.
- Benlloch M, Ojeda MA, Ramos J, Rodriguez-Navarro A 1994: Salt sensitivity and low discrimination between potassium and sodium in bean plants. *Plant Soil*, **166**, 117–123.
- Blom-Zandstra G, Lampe JEM 1983: The effect of chloride and sulphate salts on the nitrate content in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). *J. Plant Nutr.*, **6**, 611–628.
- Boyd CM, Gradmann D 1999: Electrophysiology of the marine diatom *Coscinodiscus wailesii*. III. Uptake of nitrate and ammonium. *J. Exp. Bot.*, **50**, 461–467.
- Britto DT, Kronzucker H 2013: Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. *Ann. Bot.*, **112**, 957–963.
- Casadesus J, Tapia L, Lambers H 1995: Regulations of K^+ and NO_3^- fluxes in roots of sunflower (*Helianthus annuus*) after changes in light intensity. *Physiol. Plant.*, **93**, 279–285.
- Chen CZ, Lv XF, Li HY, Yi HY, Gong JM 2012: Arabidopsis NRT1.5 is another essential component in the regulation of nitrate reallocation and stress tolerance. *Plant Physiol.*, **159**, 1582–1590.
- Chow WS, Ball MC, Anderson JM 1990: Growth and photosynthetic responses of spinach to salinity: Implications of K^+ nutrition for salt tolerance. *Funct. Plant Biol.*, **17**, 563–578.

- Colmenero-Flores JM, Martínez G, Gamba G, Vázquez N, Iglesias DJ, Brumós J, Talón M 2007: Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *Plant J.*, **50**, 278–292.
- Debouba M, Gouia H, Suzuki A, Ghorbel MH 2006: NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato “*Lycopersicon esculentum*” seedlings. *J. Plant Physiol.*, **163**, 1247–1258.
- Di Martino C, Delfine S, Pizzuto R, Loreto F, Fuggi A 2003: Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress. *New Phytol.*, **158**, 455–463.
- Downton WJS, Grant WJR, Robinson SP 1985: Photosynthetic and stomatal responses of spinach leaves to salt stress. *Plant Physiol.*, **78**, 85–88.
- Flores P, Botella MA, Martinez V, Cerdá A 2000: Ionic and osmotic effects on nitrate reductase activity in tomato seedlings. *J. Plant Physiol.*, **156**, 552–557.
- Flores P, Botella MA, Cerdá A, Martinez V 2004: Influence of nitrate level on nitrate assimilation in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants under saline stress. *Can. J. Bot.*, **82**, 207–213.
- Fricke W, Leigh RA, Tomos AD 1996: The intercellular distribution of vacuolar solutes in the epidermis and mesophyll of barley leaves changes in response to NaCl. *J. Exp. Bot.*, **47**, 1413–1426.
- Gastal F, Lemaire G 2002: N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *J. Exp. Bot.*, **53**, 789–799.
- Gilbert GA, Gadush MV, Wilson C, Madore MA 1998: Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress. *J. Exp. Bot.*, **49**, 107–114.
- Gouia H, Ghorbal MH, Touraine B 1994: Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on NO₃⁻ reduction rate within whole plants of salt-sensitive bean and salt-tolerant cotton. *Plant Physiol.*, **105**, 1409–1418.
- Greenway H, Munns R 1980: Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 149–190.
- Haas M 1994: The Na-K-Cl cotransporters. *Am. J. Physiol.*, **267**, C869–C885.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ 2000: Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**, 463–499.
- Hikosaka K 1996: Effects of leaf age, nitrogen nutrition and photon flux density on the

- organization of the photosynthesis apparatus in leaves of a vine (*Ipomoea tricolor* Cav.) grown horizontally to avoid mutual shading of leaves. *Planta*, **198**, 144–150.
- Ivashikina NV, Feyziev YM 1998: Regulation of nitrate uptake in maize seedlings by accompanying cations. *Plant Sci.*, **131**, 25–34.
- Kaburagi E, Yamada M, Fujiyama H 2015: Sodium, but not potassium, enhances root to leaf nitrate translocation in Swiss chard (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.). *Environ. Exp. Bot.*, **112**, 27–32.
- Khan MA, Ungar IA, Shoemaker AM 2000: Effects of sodium chloride treatments on growth and ion accumulation of the halophyte *Haloxylon recurvum*. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.*, **31**, 2763–2774.
- Kitagawa T, Fujiyama H 2014: Role of sodium in absorption and transportation of nitrate in salt-loving plant species. *Sand Dune Res.*, **61**, (in Japanese with English abstract).
- Kong XQ, Gao XH, Sun W, An J, Zhao YX, Zhang H 2011: Cloning and functional characterization of a cation-chloride cotransporter gene *OsCCCI*. *Plant Mol. Biol.*, **75**, 567–578.
- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM 1996: The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**, 569–593.
- Li JY, Fu YL, Pike SM, Bao J, Tian W, Zhang Y, Chen CZ, Zhang Y, Li HM, Huang J, Li LG, Schroeder JI, Gassmann W, Gong JM 2010: The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *Plant Cell*, **22**, 1633–1646.
- Lin SH, Kuo HF, Canivenc G, Lin CS, Lepetit M, Hsu PK, Tillard P, Lin HL, Wang YY, Tsai CB, Gojon A, Tsay YF 2008: Mutation of the *Arabidopsis* *NRT1.5* nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell*, **20**, 2514–2528.
- Liu L, Ueda A, Saneoka H 2013: Physiological responses of white Swiss chard (*Beta vulgaris* L. subsp. *cicla*) to saline and alkaline stresses. *Aust. J. Crop Sci.*, **7**, 1046–1052.
- Lv S, Jiang P, Chen X, Fan P, Wang X, Li Y 2012: Multiple compartmentalization of sodium conferred salt tolerance in *Salicornia europaea*. *Plant Physiol. Biochem.*, **51**, 47–52.
- Magné C, Larher F 1992: High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Anal. Biochem.*, **200**, 115–118.

- Makino A, Mae T, Ohira K 1986: Colorimetric measurement of protein stained with Coomassie Brilliant Blue R on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis by eluting with formamide. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1911–1912.
- Makino A, Sakuma H, Sudo E, Mae T 2003: Differences between maize and rice in N-use efficiency for photosynthesis and protein allocation. *Plant Cell Physiol.*, **44**, 952–956.
- Meharg AA, Blatt MR 1995: NO_3^- transporter across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: kinetic control by pH and membrane voltage. *J Membrane Biol.*, **145**, 49–66.
- Mendoza I, Rubio F, Rodriguez-Navarro A, Pardo JM 1994: The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 8792–8796.
- Mimura, T, Hotta MK, Tsujimura T, Ohnishi M, Miura M, Okazaki Y, Mimura M, Maeshima M, Nemoto SW 2003: Rapid increase of vacuolar volume in response to salt stress. *Planta*, **216**, 397–402.
- Mistrik I, Ullrich CI 1996: Mechanism of anion uptake in plant roots: quantitative evaluation of H^+/NO_3^- and $\text{H}^+/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ stoichiometries. *Plant Physiol. Biochem.*, **34**, 629–636.
- Mori S, Yoshiba M, Tadano T 2006: Growth response of *Suaeda salsa* (L.) Pall to graded NaCl concentrations and the role of chlorine in growth stimulation. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **52**, 610–617.
- Munns R 1993: Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.*, **16**, 15–24.
- Munns R 2002: Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.*, **25**, 239–250.
- Murata S, Kobayashi M, Matoh T, Sekiya J 1992: Sodium stimulates regeneration of phosphoenolpyruvate in mesophyll chloroplasts of *Amaranthus tricolor*. *Plant Cell Physiol.*, **33**, 1247–1250.
- Novoa R, Loomis RS 1981: Nitrogen and plant production. *Plant Soil*, **58**, 177–204.
- Ohori T, Fujiyama H 2011: Water deficit and abscisic acid production of *Salicornia bigelovii* under salinity stress. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **57**, 566–572.
- Ottow EA, Brinker M, Teichmann T, Fritz E, Kaiser W, Brosché M, Kangasjärvi J, Jiang X, Polle A 2005: *Populus euphratica* displays apoplastic sodium accumulation, osmotic adjustment by decreases in calcium and soluble

- carbohydrates, and develops leaf succulence under salt stress. *Plant Physiol.*, **139**, 1762–1772.
- Pilbeam DJ, Kirkby EA 1990: *The physiology of nitrate uptake*. In: Abrol AP (ed) Nitrogen in higher plants, pp. 39–64. Research Studies Press Ltd., New York.
- Roberts SK 2006: Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytol.*, **169**, 647–66.
- Rubio L, Linares-Rueda A, García-Sánchez MJ, Fernández JA 2005: Physiological evidence for sodium-dependent high-affinity phosphate and nitrate transport at the plasma membrane of leaf and root cells of *Zostera marina* L. *J. Exp. Bot.*, **56**, 613–622.
- Schröppel-Meier G, Kaiser WM 1988: Homeostasis in chloroplasts under salinity and mineral deficiency. *Plant Physiol.*, **87**, 822–827.
- Seemann JR, Sharkey TD 1986: Salinity and nitrogen effects on photosynthesis, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and metabolite pool sizes in *phaseolus vulgaris* L¹. *Plant physiol.*, **82**, 555–560.
- Serpe MD, Matthews MA 2000: Turgor and cell wall yielding in dicot leaf growth in response to changes in relative humidity. *Aust. J. Plant Physiol.*, **27**, 1131–1140.
- Shabala S, Shabala S, Cuin TA, Pang J, Percey W, Chen Z, Conn S, Eing C, Wegner LH, 2010: Xylem ionic relations and salinity tolerance in barley. *Plant J.*, **61**, 839–853.
- Shi H, Lee BH, Wu SJ, Zhu JK 2002: Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 81–85.
- Song J, Feng G, Tian CY, Zhang FS 2006: Osmotic adjustment traits of *Suaeda physophora*, *Haloxylon ammodendron* and *Haloxylon persicum* in field or controlled conditions. *Plant Sci.*, **170**, 113–119.
- Subbarao GV, Wheeler RM, Stutte GW, Levine LH 2000: Low potassium enhances sodium uptake in red-beet under moderate saline conditions. *J. Plant Nutri.*, **23**, 1449–1470.
- Subbarao GV, Ito O, Berry WL, Wheeler RM 2003: Sodium-A functional plant nutrient. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **22**, 391–416.
- Taiz L 1992: The plant vacuole. *J. Exp. Biol.*, **172**, 113–122.
- Takahashi E, Maejima K, Okazaki M 1997: Beneficial effects of sodium on the growth of soil-cultured leafy vegetables under different supply levels of potassium. *Jpn.*

- Soc. Soil Sci. Plant Nutr.*, **68**, 363–368. (in Japanese with English abstract)
- Teakle NL, Tyerman SD 2010: Mechanisms of Cl^- transport contributing to salt tolerance. *Plant Cell Environ.*, **33**, 566–589.
- Tester M, Davenport R 2003: Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Ann. Bot.*, **91**, 503–527.
- Wang YH, Garvin FD, Kochian LV 2001: Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiol.*, **127**, 345–359.
- Wang YY, Hsu PK, Tsay YF 2012: Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends Plant Sci.*, **17**, 458–467.
- Wellburn AR 1994: The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.*, **144**, 307–313.
- Yamada M, Kuroda C, Fujiyama H (in press): Growth promotion by sodium in Amaranthaceae plants. *J. Plant Nutri.*, (accepted on 26th July 2014)
- Yuan JF, Tian CY, Feng G 2010: Effects of sodium on nitrate uptake and osmotic adjustment of *Suaeda physophora*. *J. Arid Land*, **2**, 190–196.
- 高田 英夫 1974: 塩と生物. 創元社, 136.
- 森山 修 2010: 塩生植物アッケシソウの好塩性機構の解明-光合成に及ぼす NaCl の影響-. 鳥取大学大学院農学研究科修士論文
- 森川 祐実 2015: 好塩性植物の組織と細胞における Na の分布と役割. 鳥取大学大学院農学研究科修士論文

謝 辞

本研究を遂行し論文として取り纏めるにあたり、鳥取大学農学部 藤山英保教授には長い間多くのご支援とご指導を賜りました。鳥取大学農学部 山本定博教授、山田智准教授、島根大学 増永二之教授、広島大学 実岡寛文教授にはご校閲の労とご助言を賜りました。鳥取大学農学部 馬場貴志特任准教授、山田美奈研究員には本研究の遂行、論文作成にあたり有益なご助言、ご指導を賜りました。これまでに関わってきた鳥取大学農学部生物環境化学研究室の皆様には、研究内外において多くのご支援、またご意見をいただき、様々な面から研究生活を支えていただきました。ここに、厚く御礼申し上げます。

最後に、5 年半にわたる鳥取大学での研究生活を遠くから辛抱強く励まし、支援して下さった家族の皆様には心より感謝申し上げます。

論文目録

主論文

1. Emi KABURAGI, Hideyasu FUJIYAMA 2014: Growth and physiological responses of plants to osmotic and sodium stress. Sand Dune Research, **61** (2), 47–53.
2. Emi KABURAGI, Yumi MORIKAWA, Mina YAMADA, Hideyasu FUJIYAMA 2014: Sodium enhances nitrate uptake in Swiss chard (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.). Soil Science and Plant Nutrition, **60** (5), 651–658. (第3章)
3. Emi KABURAGI, Mina YAMADA, Hideyasu FUJIYAMA 2015: Sodium, but not potassium, enhances root to leaf nitrate translocation in Swiss chard (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.). Environmental and Experimental Botany, **112**, 27–32. (第2章)