

シソ科ハーブ類バジル (*Ocimum basilicum* L.) の  
耐塩性機構に関する研究  
— 養分吸収, 抗酸化応答および光合成の観点から —

Study of Salt Tolerance Mechanisms  
in Basil (*Ocimum basilicum* L.), Labiatae Herb  
– From the Viewpoint of  
Nutrient Uptake, Antioxidative Response and Photosynthesis –

田中 秀樹

Tanaka Hideki

2020



# 目次

第1章 緒論	1
第2章 塩ストレス条件下のシソ科ハーブ4種における養分吸収と抗酸化応答の比較	4
第1節 材料および方法	4
1. 供試作物	4
2. 栽培および処理方法	4
3. 植物体の採取	5
4. 植物体の分析	6
4-1. 乾物重と含水率	6
4-2. 葉身クロロフィル含有率	6
4-3. 葉身過酸化水素 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 含有率	6
4-4. 葉身マロンジアルデヒド (MDA) 含有率	7
4-5. 抗酸化酵素活性	7
4-5-1. 粗酵素液抽出	7
4-5-2. CAT 活性	7
4-5-3. APX 活性	8
4-5-4. GR 活性	8
4-5-5. SOD 活性	8
4-5-6. タンパク質定量	9
4-6. 無機元素分析	9
5. 統計解析	9
第2節 結果	10

1.	乾物重	10
2.	葉身含水率	11
3.	葉身クロロフィル (a+b) 含有率	12
4.	葉身 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 含有率	13
5.	葉身 MDA 含有率	14
6.	葉身抗酸化酵素活性	15
7.	無機元素含有率, 分配割合および Na/K 比	16
第3節	考察	19
第4節	要約	23
第3章	耐塩性バジルの養分吸収, 光合成能および抗酸化応答に関する特徴	24
第1節	材料および方法	24
1.	供試品種	24
2.	栽培および処理方法	24
3.	ガス交換およびクロロフィル蛍光測定	25
4.	植物体の採取	26
5.	植物体の分析	26
5-1.	乾物重	26
5-2.	含水率	26
5-3.	光合成色素	26
5-4.	光合成パラメーター	26
5-5.	クロロフィル蛍光パラメーター	27
5-6.	無機元素分析	27
5-7.	葉身 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 含有率	27
5-8.	葉身 MDA 含有率	27
5-9.	粗酵素液抽出	27

5-10. 葉身抗酸化酵素活性	27
5-11. タンパク質定量	28
6. 統計解析	28
第2節 結果	29
1. 乾物重	29
2. 含水率	30
3. 光合成色素	31
4. 無機元素含有率, 分配割合および Na/K 比	33
5. 光合成活性	38
6. クロロフィル蛍光	39
7. 葉身 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 含有率	40
8. 葉身 MDA 含有率	40
9. 葉身抗酸化酵素活性	40
第3節 考察	42
第4節 要約	46
第4章 バジルの耐塩性機構に及ぼす塩性アルカリストレスの影響	47
第1節 材料および方法	48
1. 供試品種	48
2. 栽培および処理方法	48
2-1. 播種および育苗	48
2-2. 生育および生理学分析用栽培	48
2-3. 光合成およびクロロフィル測定用栽培	48
3. ガス交換およびクロロフィル蛍光測定	49
4. 植物体の採取	49
5. 植物体の分析	50

5-1.	含水率	50
5-2.	光合成色素	50
5-3.	光合成パラメーター	50
5-4.	クロロフィル蛍光パラメーター	50
5-5.	無機元素分析	50
5-6.	葉身 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 含有率	50
5-7.	葉身 MDA 含有率	50
5-8.	粗酵素液抽出	50
5-9.	葉身抗酸化酵素活性	51
5-10.	タンパク質定量	51
6.	統計解析	51
第2節	結果	52
1.	乾物重	52
2.	葉身含水率	55
3.	無機元素含有率および Na に対する各無機元素の相関係数	56
4.	葉身 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 含有率	65
5.	葉身 MDA 含有率	65
6.	葉身抗酸化酵素活性	65
7.	光合成活性およびクロロフィル蛍光	67
8.	クロロフィル (a+b) 含有率	69
第3節	考察	70
第4節	要約	76
第5章	総合考察	77
第6章	摘要	80
第7章	Summary	82

謝辭	84
引用文献	85
公表論文	95



# 第 1 章

## 緒 論

塩害は作物生産における深刻な問題の一つである (Wahid and Ghazanfar, 2006) . 地球上の耕作適地は約 7,000 万 km<sup>2</sup> 存在し, そのうち 1500 万 km<sup>2</sup> が耕作面積として利用されているが, 内 23 % に当たる 340 万 km<sup>2</sup> が塩性化し, 37 % に当たる 560 万 km<sup>2</sup> がソーダ質化していると推定されており, 100 を超える国々でこのような塩類化が進行している (Tanji, 1990) .

塩類化によって植物は塩ストレスを被り, 水分吸収抑制, 代謝攪乱, 光合成阻害などが引き起こされる (Al-Karaki et al., 2001) . 塩性化では, 植物の細胞質中に塩が過剰に蓄積してイオンバランスが崩れ, 酵素タンパク質と膜機能に対してイオン毒を呈し, 光合成の明反応の一部である光リン酸化反応によるエネルギー生産 (ATP 生産) がほとんど停止してしまう (Tezara et al., 1999) . これが光合成速度を低下させる一因となり, 結果として乾物生産は減少する. またこれらストレス作用を受けた植物体は気孔が閉鎖した状態で強光下に暴露され続けると酸化ストレスが誘導される (Munné-Bosch and Peñuelas, 2003) . 酸化ストレスによってリン脂質や核酸, DNA などの生体物質が損傷することによる酸化傷害を受け, 最終的には枯死に至る.

一方, ソーダ質化により植物は高 pH によるアルカリストレスを被る. アルカリ条件下の培地では金属イオンが沈殿しやすくなり, 必須微量元素である鉄 (Fe) , マンガン (Mn) , 銅 (Cu) , 亜鉛 (Zn) などが不足する (Lynch and Clair, 2004) . また植物にとって非常に重要な窒素 (N) 吸収源である硝酸イオン (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) や, 核酸およびリン脂質などの形成に必須であるリン酸イオン (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) は, 陽イオンのプロトン (H<sup>+</sup>) との共輸送により吸収されるため (McClure et al., 1990; Preuss et al., 2011) , アルカリ培地ではこれら陰イオンが吸収されにくくなる (Yang et al., 2007) . またアルカリストレスは塩性ストレスよりも深刻なストレ

スであると報告されており (Yang et al., 2008) , 塩性ストレスとアルカリストレスを同時に被る場合, 影響はより深刻なものとなる (Shi and Sheng, 2005) .

植物は塩ストレスによって誘導される酸化ストレスに対処するための抗酸化応答システム (Antioxidative Response System: ARS) を有している. このシステムによって植物は酸化ストレスの原因となる活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) を毒性の呈さない程度の濃度に制御しており, それには非酵素的あるいは酵素的抗酸化応答が関与している (Abogadallah, 2010) . 植物の耐塩性は ARS と関係が深く (Amor et al., 2006) , 酵素的抗酸化応答は酸化ストレスに対する最も効率的な防御機構であると言われている (Farooq et al., 2008) . 抗酸化酵素は特定の活性酸素種を特異的に除去する酵素であり, スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) を過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) に変換するスーパーオキシドディスムターゼ (SOD), 還元型アスコルビン酸を消費して  $H_2O_2$  を水へと分解するアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) , 独立的に  $H_2O_2$  を分解するカタラーゼ (CAT) などが存在する. また APX による ROS の無毒化に当たって生成する酸化型アスコルビン酸を還元するデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (DHAR) やモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ (MDAR) , そしてこれらのプロセスによって生成される酸化型グルタチオンを還元するグルタチオンレダクターゼ (GR) が存在する (Lima et al., 2002) .

シソ科ハーブ類は優れた抗酸化能を有することが知られており (Chan et al., 2012) , バジルは機能性ハーブとして世界的に重要なハーブの一つとなっている. 日本においてはスイートバジルが最もよく知られた品種であるが, 味, 機能性, 形態的特徴をはじめ, 香気成分まで実に多様な品種が存在する (日本香料協会, 1989) . バジルはインド, パキスタン, イラン, タイなどのアジア地域原産の植物で, 伝統料理や古くから伝わる伝統医療など, 抗酸化物質を多く含有する原料として利用されており, 食用, 園芸, 医療など用途に合わせて様々なバジル品種が利用されている (Makri and Kintzios, 2007) . また他の代表的なシソ科ハーブ類として, タイムやセージ, オレガノなどが挙げられる. タイムとセージはフェノール含量が高く, ROS 除去活性が高いとされ (Roby et al., 2013) , またセージ

は抗酸化力の高いカルノシク酸, ロスマリン酸を主要な抗酸化物質として持つ (Cuvelier et al., 1996) . オレガノは 39 種類のハーブ類中で全フェノール含有率および酸素ラジカル吸収能 (Oxygen Radical Absorbance Capacity: ORAC) が最も高いハーブであったと報告されている (Zheng and Wang, 2001) .

Said-Al Ahl and Omer (2011) はハーブ類に及ぼす塩害の影響についてまとめているが, 上記のシソ科ハーブ類も含まれており, 土壌の塩類化が進行する現在, 今後さらなるシソ科ハーブ類への塩害が懸念される. しかしどのような特徴を有するシソ科ハーブが耐塩性に優れているのかははっきりしておらず, シソ科ハーブ類の耐塩性を種間比較した報告はあまり存在しない. バジルの耐塩性に関する報告は近年増えてきたが, 耐塩性レベルや耐塩性機構は報告によって様々であり, バジルの耐塩性機構は未だ不明瞭である. バジルには多様な品種 (50 品種以上) が存在し, 各々で形態学的, 生理学的機能が異なっていることからバジルの耐塩性の特徴を把握することは容易ではない. Murillo-Amador et al. (2013) は 20 品種のバジルの発芽試験および初期生育への塩ストレスの影響について調査し, 品種ナポレタノで最も耐塩性が高かったことを報告している. しかしこの品種がなぜ優れた耐塩性を有するのかについては明らかにされていない. またバジルは高塩, 高 pH あるいは高い交換性ナトリウム (Na) 率 (Exchangeable Sodium Percentage: ESP) に対する耐性を持つことから塩性アルカリ土壌の耕作放棄地の利用に適していると主張する報告もある (Sahay and Patra, 2014) . しかしながら高 pH 条件下における高 EC の影響については未だ研究が進んでおらず, 塩性アルカリストレス下のバジルがどのような塩応答を示し, またどの程度の高 EC まで耐塩性を発揮できるのかについては不明である.

以上の背景を踏まえ, 本研究においては以下 3 つの実験を行った.

1. 塩ストレス条件下のシソ科ハーブ 4 種における養分吸収と抗酸化応答の比較
2. 耐塩性バジルの養分吸収, 光合成能および抗酸化応答に関する特徴の把握
3. バジルの耐塩性機構に及ぼす塩性アルカリストレスの影響の調査

## 第 2 章

### 塩ストレス条件下のシソ科ハーブ 4 種における 養分吸収と抗酸化応答の比較

シソ科ハーブ類は比較的耐塩性が低いとされるが、シソ科ハーブ類は 3,000 種以上存在する一方で、耐塩性の種間比較を詳細に行った実験はほとんど報告されていない。よって本実験では代表的なシソ科 4 種の養分吸収および抗酸化応答について比較調査し、各々の耐塩性レベルおよびその機構について明らかにすることを目的とした。

#### 第 1 節 材料および方法

##### 1. 供試作物

代表的なシソ科ハーブ類である 4 種を使用し、スイートバジル (*Ocimum basilicum* L. 以下、バジル)、コモンセージ (*Salvia officinalis* L. 以下、セージ)、コモンタイム (*Thymus vulgaris* L. 以下、タイム)、オレガノ (*Oreganum vulgare* L. 以下、オレガノ) を供試作物とした。

##### 2. 栽培および処理方法

育苗は鳥取大学農学部の温室内 (北緯 35°30' 52", 東経 134°10' 13") にて、バーミキュライトを使用して各種を播種し、適宜灌水を行った。灌水は最大で 0.37 mmol L<sup>-1</sup> (約 8.6 ppm) の Na<sup>+</sup>が含まれる水道水で行った。発芽後、バジル、セージ、タイム、オレガノの苗を Tab. 2-1 のような基本培養液で充填したバット (30 L) に、90 莖を移植した。pH は 3.6 N の硫酸 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) を用いて 6.5 に調整し、1 週間に一度培養液を更新した。育苗した苗から生育が中程度に一樣な苗 20 莖をそれぞれ選抜し、30 L 容バットに Tab. 2-1 に示した培養液を充填して移植した。移植培養後、塩処理として培養液に塩化ナトリウムで 50mM NaCl となるように添

加した Na50 区と、無添加の標準栽培区（対照区；C）を用意した。バジル、セージ、タイムについては塩処理期間を約 2 週間とし、オレガノにおいては塩処理による影響が早くみられたため塩処理期間を 1 週間とした。培養液交換は 1 週間に 1 度行い、4 反復で栽培した。

**Table 2-1** Composition of basic nutrient solution and salt forms

Element (mM)	Composition	Concentration (mM)	Salt form
N (1.65)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.55	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.35	KNO <sub>3</sub>
		0.75	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O
P (0.15)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.15	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
K (0.5)	K <sup>+</sup>	0.15	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		0.35	KNO <sub>3</sub>
Ca (0.375)	Ca <sup>2+</sup>	0.38	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O
Mg (0.5)	Mg <sup>2+</sup>	0.50	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
Fe (0.018)	EDTA-Fe	1.80 × 10 <sup>-2</sup>	Fe(III)-EDTA
Mn (0.00455)	Mn <sup>2+</sup>	4.55 × 10 <sup>-3</sup>	MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O
Zn (0.00075)	Zn <sup>2+</sup>	0.75 × 10 <sup>-3</sup>	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
Cu (0.00008)	Cu <sup>2+</sup>	0.80 × 10 <sup>-4</sup>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O
Mo (0.00026)	Mo <sup>6+</sup>	2.60 × 10 <sup>-4</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O
B (0.0095)	B <sup>3-</sup>	0.95 × 10 <sup>-2</sup>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>

### 3. 植物体の採取

処理期間終了後、植物体を採取した。栽培バット中の 20 茎の中から、生育が中程度のものを 8 茎選択し、葉身、茎、根の 3 部位に分けて新鮮重 (FW) を測定した。また酵素測定用のために栽培バット中から残りの 12 茎を採取し、黄色がかった老化葉を除いた後、無作為に選んだ少量の葉身試料（約 5 g）を直ちに液体窒素で凍結させ、-80 °C 設定の超低温フリーザ（MDF-U73VS6, SANYO DENKI, Osaka, Japan）にて保存し、生理学分析時に使用した。

#### 4. 植物体の分析

##### 4-1. 乾物重と含水率

新鮮重を測定した試料（葉身、茎、根）を 70 °C の乾燥機に 72 時間熱乾燥させた後、乾物重（DW）を測定した。また葉身については含水率  $(FW - DW) / DW$  ( $g\ g^{-1}$ ) を算出した。

##### 4-2. 葉身クロロフィル含有率

酵素用の新鮮葉から 5 枚を無作為に選び、賽の目状に切った葉断片を約 0.2 g 量り取りアルミニウムで包んだ後、冷暗所に保存し、翌日クロロフィル分析に使用した。乳鉢に葉身試料を入れ、少量の石英砂とエタノール（99.5 %）を加えて摩砕した。ろ紙（No.5C）を用いて抽出液をろ過し、ろ液をエタノールを用いて 50 mL に定容した。分光光度計（U-1800, HITACHI, Tokyo, Japan）で波長 665 nm と 649 nm の吸光度（A）を測定し、クロロフィル含有率は以下の式より算出した（Went and Went, 1949）。

$$\text{Chl } a+b \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = (6.10 \times A_{665} + 20.04 \times A_{649}) \times 50/1000 \times 1/\text{g DW of sample}$$

なお試料の乾物重（DW）は試料（FW）と乾物率との積により算出した。

##### 4-3. 葉身過酸化水素（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）含有率

超低温フリーザ（同上）で保存していた葉身試料約 0.5 g を葉さじで乳鉢にとり、液体窒素を少量加えた後、乳棒で磨砕した。アセトン 5 mL を加えてさらに磨砕し、マイクロチューブに 2 mL の上清をとり、遠心機（CF15RX II, HITACHI, Tokyo, Japan）で 3,000 g, 4 °C で 10 分間遠心分離を行った。遠心分離した試料上清 1 mL を別のチューブに移しとり、17 M（28 % w w<sup>-1</sup>）アンモニアを 0.23 mL 加え、アルカリ条件にした後、20 %（w v<sup>-1</sup>）塩化チタンを 0.1 mL 加えて沈殿させ、よく攪拌させた。再び 3,000 g, 4 °C で 10 分間遠心分離を行い、上清は捨てて沈殿物にアセトンを 1 mL 加えてよく攪拌し、3,000 g, 4 °C で 10 分間遠心分離を行った。沈殿がすべて白くなるまでそれを繰り返した（2~4 回）。1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 mL を加え、沈殿を溶解させた。翌日、分光光度計（同上）にて 410 nm の吸光度を測定

し、 $\text{H}_2\text{O}_2$  含有率 ( $\text{mg g}^{-1}\text{DW}$ ) を算出した。検量線用の標準液は 30 % ( $\text{w v}^{-1}$ )  $\text{H}_2\text{O}_2$  を用いた。

#### 4-4. 葉身マロンジアルデヒド (MDA) 含有率

葉身 MDA 含有率は Ghanem et al. (2008) の TBARs 法に従って測定した。超低温フリーザ (同上) で保存していた凍結試料約 0.25 g に氷冷した 5 % ( $\text{w v}^{-1}$ ) トリクロロ酢酸 (TCA) を加え、乳鉢内で磨砕後、遠心機 (同上) で遠心分離した ( $4\text{ }^\circ\text{C}$ , 12,000 g, 15 min) 。上清 1.5 mL に 0.67 % ( $\text{w v}^{-1}$ ) 2-チオバルビツール 1.5 mL を加え、加熱し ( $100\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 min) , 直後にアイスバス内 ( $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) にて冷却した後、更に遠心分離を行った ( $4\text{ }^\circ\text{C}$ , 1,000 g, 1 min) 。上清 1 mL を分光光度計 (同上) で 532 nm, 600 nm の波長を測定し、532 nm での吸光度から 600 nm での吸光度を減じた後、ミリモル吸光係数 (1 cm の厚みをもつ  $1\text{ mol L}^{-1}$  の溶液中で光が通過したときの光の強さの比の逆数)  $155\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  を用いて MDA 含有率 ( $\text{nmol g}^{-1}\text{DW}$ ) を算出した。

#### 4-5. 抗酸化酵素活性

##### 4-5-1. 粗酵素液抽出

超低温フリーザ (同上) で冷凍保存しておいた葉身試料約 0.3-0.4 g を乳鉢内において液体窒素で磨砕し、ポリビニルポリピロリドン (PVPP) を加えて 5 mL のアスコルビン酸を含む 50 mM K-P Buffer (pH7.8) でさらに磨砕した。2 mL をマイクロチューブに移し、遠心機 (同上) で 1,492 g,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  で 30 分間遠心分離し、上澄み液を抗酸化酵素 (CAT, APX, GR, SOD) 活性測定用とした。

##### 4-5-2. CAT 活性

1M K-P Buffer (pH7.8)  $100\text{ }\mu\text{L}$ , 0.5 M  $\text{H}_2\text{O}_2$   $40\text{ }\mu\text{L}$ , 蒸留水  $840\text{ }\mu\text{L}$  を加えよく混合し、粗酵素抽出液  $20\text{ }\mu\text{L}$  を加え、さらに混合し、分光光度計 (同上) で吸光度 (230 nm) の減少を経時的に 2 分間測定した。測定した吸光度減少と、過酸化水素のミリモル吸光定数  $0.04\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  より、1 分間の CAT による過酸化水素

分解量 ( $\text{mmol min}^{-1}$ ) を算出した。

#### 4-5-3. APX 活性

1 M K-P Buffer  $100 \mu\text{L}$ , 10 mM L-アスコルビン酸  $50 \mu\text{L}$ , 蒸留水  $780 \mu\text{L}$ , 粗酵素抽出液  $20 \mu\text{L}$  を加え, さらに 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$   $50 \mu\text{L}$  を加えて混合し, 分光光度計 (同上) で吸光度 (290 nm) の減少を経時的に 2 分間測定した. 測定した吸光度減少と, アスコルビン酸のミリモル吸光定数  $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  より, 1 分間の APX による  $\text{H}_2\text{O}_2$  依存アスコルビン酸酸化量 ( $\text{mmol min}^{-1}$ ) を算出した。

#### 4-5-4. GR 活性

0.5 M K-P Buffer in 1 mM EDTA  $100 \mu\text{L}$ , 蒸留水  $810 \mu\text{L}$ , 粗酵素抽出液  $50 \mu\text{L}$ , 10 mM NADPH in 10 mM K-P Buffer  $20 \mu\text{L}$  を加え, さらに 10 mM GSSG in 10 mM K-P Buffer  $20 \mu\text{L}$  加えてよく混合し, 分光光度計 (同上) で吸光度 (340 nm) の減少を経時的に 2 分間測定した. 測定した吸光度減少と, NADPH のミリモル吸光定数  $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  より, 1 分間の NADPH 酸化量 ( $\text{mmol min}^{-1}$ ) を算出した。

#### 4-5-5. SOD 活性

粗酵素抽出液 1 mL を透析膜に入れ, これを低温室内 ( $4^\circ\text{C}$ ) で 10 mM K-P Buffer の中で 12 時間透析した. K-P Buffer は 3 時間に 1 回交換した (計 4 回). 石英セルに 0.5 M K-P Buffer in 1 mM EDTA (pH7.8)  $100 \mu\text{L}$ , 1 mM キサンチン  $100 \mu\text{L}$ , 0.1 mM チトクロム c  $100 \mu\text{L}$ , 蒸留水  $630 \mu\text{L}$ , 透析済み粗酵素抽出液  $50 \mu\text{L}$  を加え, さらに 0.8 units / mL キサンチンオキシダーゼ in 2.3 M 硫酸アンモニウム in 1 mM EDTA を  $20 \mu\text{L}$  加え, よく混合し, 分光光度計 (同上) で吸光度 (550 nm) の上昇を経時的に 2 分間測定した。

コントロールとして, 粗酵素抽出液の代わりに蒸留水を加えたものを同様に測定し, コントロールの吸光度増加を  $V$ , 粗酵素抽出液の吸光度増加を  $v$  とした.  $v/V=0.5$  となった時を 1 unit (U) とし, 1U の SOD 活性を  $U = V/v - 1$  として計算した. また, その時の必要粗酵素抽出液量を用いて 1 mL 中 SOD 活性値 (Unit

min<sup>-1</sup>) に換算した.

#### 4-5-6. タンパク質定量

抗酸化酵素活性測定に用いた粗酵素抽出液および透析済み粗酵素抽出液のタンパク質量をブラッドフォード法 (Bradford, 1976) により分光光度計 (同上) で定量した. 検量線用の標準試料は, 牛血清アルブミンを用いた. 求めたタンパク質から各酵素の活性をタンパク質あたりに換算した (mmol あるいは Unit mg<sup>-1</sup> protein min<sup>-1</sup>) .

#### 4-6. 無機元素分析

ナトリウム (Na), カリウム (K) およびマグネシウム (Mg) は混酸; 硝酸 (HNO<sub>3</sub>) : 過塩素酸 (HClO<sub>4</sub>) : 硫酸 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) = 10 : 4 : 1 で酸分解をした後, 原子吸光分光光度計 (Z-2310, Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて, Na, K および Mg を原子吸光法で測定した. Na/K 比は Na 含有率から K 含有率を除することで算出し, Na および K 分配割合 (%) は各部位の各元素量 (mg) から植物体全体の当該元素量 (mg plant<sup>-1</sup>) で除することにより算出した.

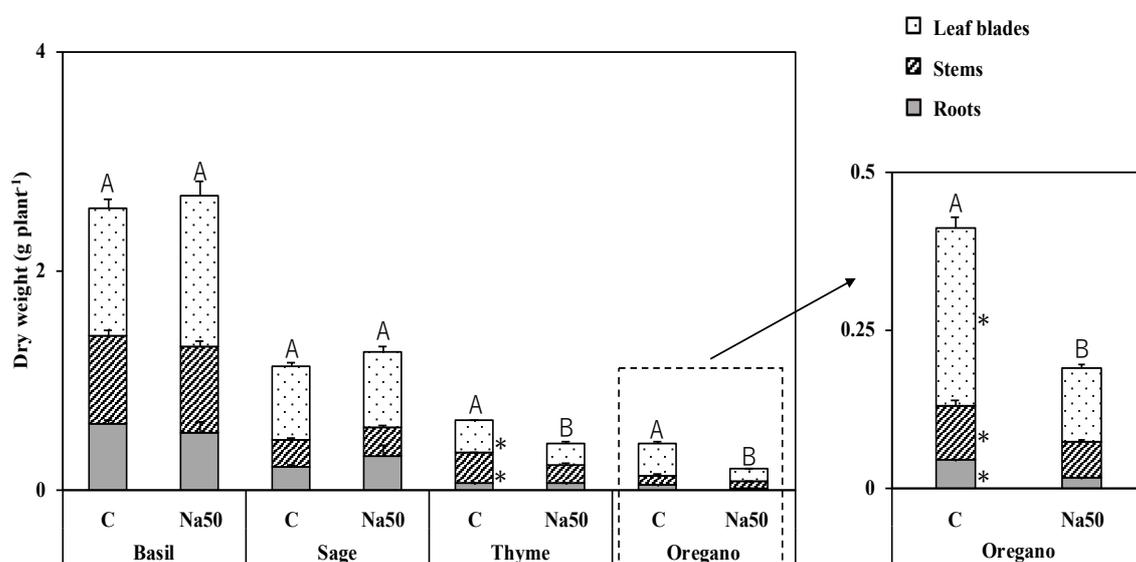
#### 5. 統計解析

結果の値は 4 反復の平均値であり, 対照区と塩処理区間での統計処理は Student's *t*-test で 5 % 水準を満たすものを有意とした. また葉身, 茎, 根の器官間での平均の比較は, SPSS statistics 25.0 (IBM) 統計ソフトを用いて一元配置分散分析を行い, 処理間の差は多重比較検定 (Duncan) において 5 % 水準を満たすものを有意とした.

## 第2節 結果

### 1. 乾物重

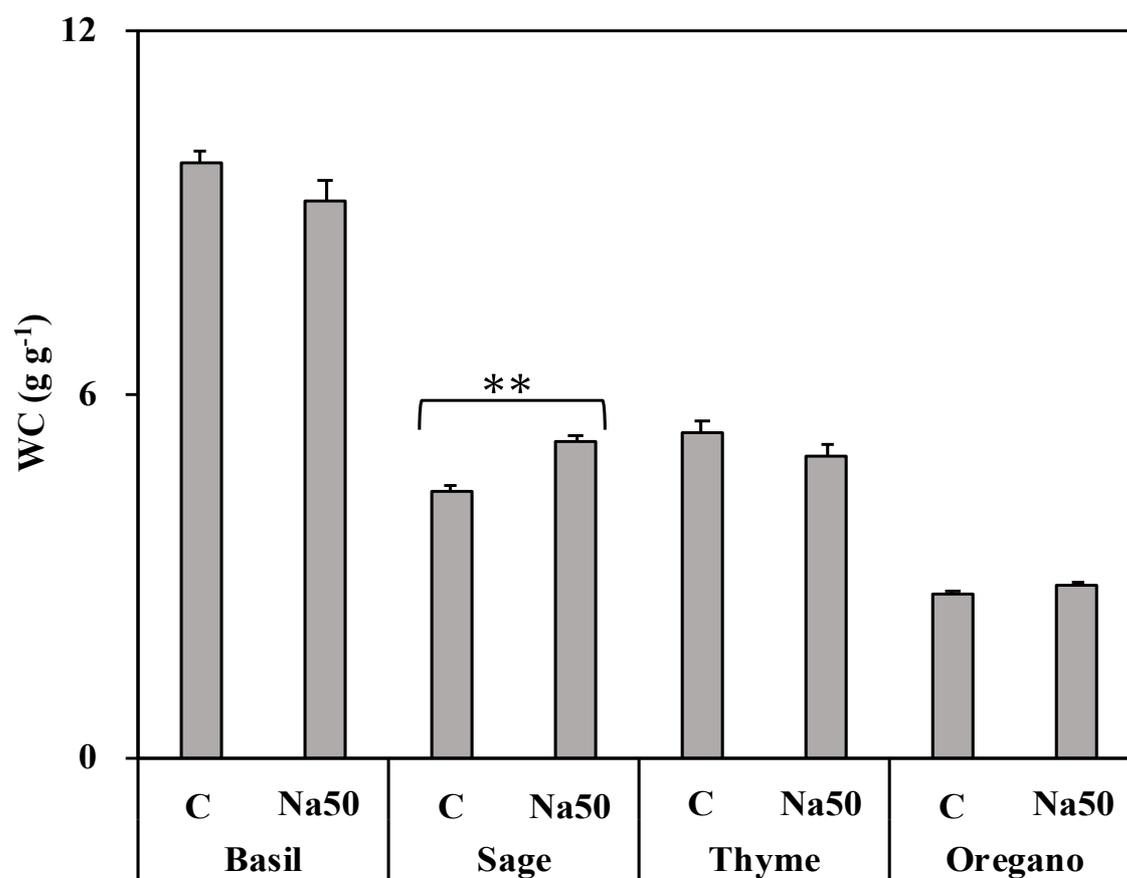
塩処理はバジルとセージの乾物重に有意な影響を及ぼさなかった。しかしタイムの葉身および茎、並びにオレガノのすべての部位において乾物重が有意に減少した (Fig. 2-1)。



**Figure 2-1** Effect of salinity treatment on dry weight in basil, sage, thyme and oregano. Different large alphabetic letters and \* indicate significant differences in total dry weight and dry weight in each part between control and salinity treatment in the same species (*t*-test;  $P < 0.05$ ), respectively. C; standard nutrient solution (Control), Na50; standard nutrient solution containing 50 mM NaCl (Salinity treatment). Error bars in the figure indicate standard errors of four replications.

## 2. 葉身含水率

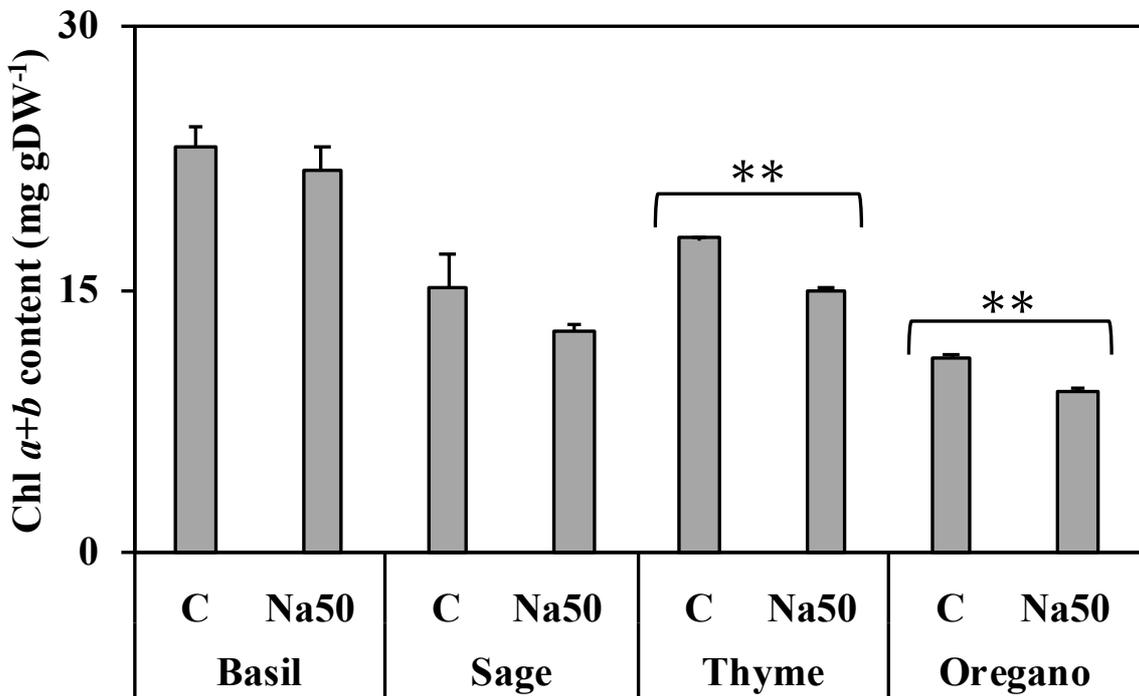
塩処理はバジル、タイム、オレガノの葉身含水率に影響を及ぼさなかったが、セージにおいてはわずかであるが塩処理区において有意に上昇した (Fig. 2-2) .



**Figure 2-2** Effect of salinity treatment on leaf water content in basil, sage, thyme and oregano. \*\* indicates significant differences between control and salinity treatment in the same species (*t*-test;  $P < 0.01$ ). C; standard nutrient solution (Control), Na50; standard nutrient solution containing 50 mM NaCl (Salinity treatment). Error bars in the figure indicate standard errors of four replications.

### 3. 葉身クロロフィル (*a+b*) 含有率

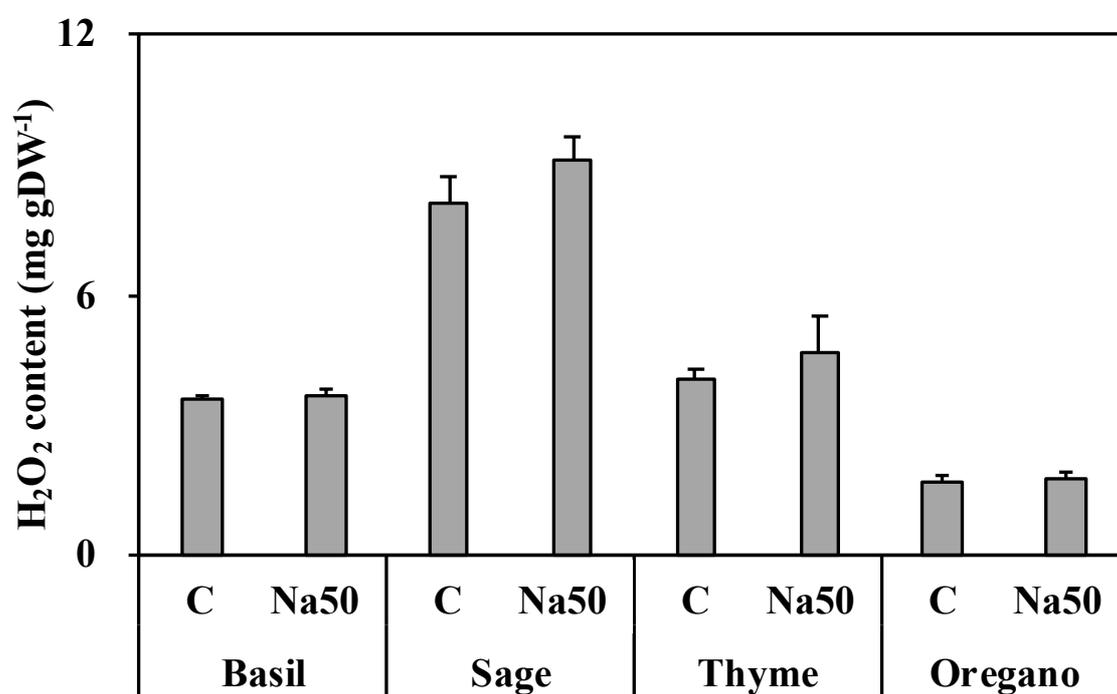
塩処理はバジルにおけるクロロフィル含有率に影響を及ぼさなかったが、セージにおいては有意ではないものの低下傾向を示し、タイムおよびオレガノにおいて有意に低下した (Fig. 2-3) .



**Figure 2-3** Effect of salinity treatment on leaf chlorophyll (*a + b*) content in basil, sage, thyme and oregano. \*\* indicates significant difference between control and salinity treatment in the same species (*t*-test;  $P < 0.01$ ). C; standard nutrient solution (Control), Na50; standard nutrient solution containing 50 mM NaCl (Salinity treatment). Error bars in the figure indicate standard errors of four replications.

#### 4. 葉身 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有率

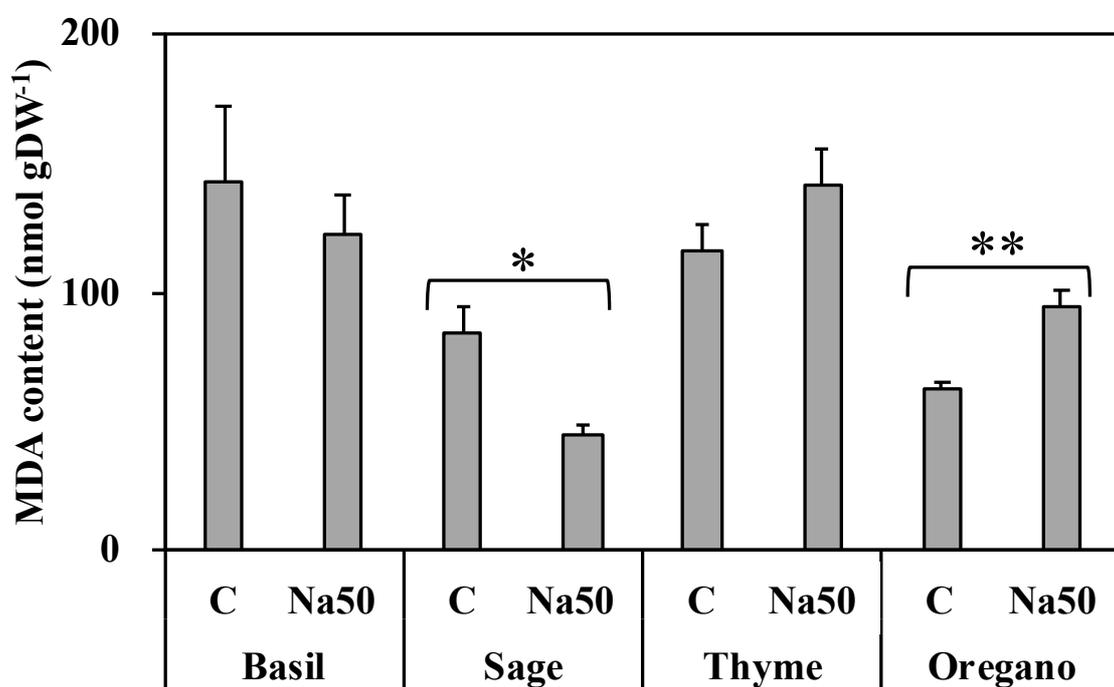
塩処理はいずれの種においても有意な影響を及ぼさなかったが、他のいずれの種よりもセージの両区において H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有率が約 2 倍以上高い値となった (Fig. 2-4) .



**Figure 2-4** Effect of salinity treatment on leaf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in basil, sage, thyme and oregano. There was no significant difference (*t*-test;  $P < 0.05$ ) between control and salinity treatment in the same species. C; standard nutrient solution (Control), Na50; standard nutrient solution containing 50 mM NaCl (Salinity treatment). Error bars in the figure indicate standard errors of four replications.

## 5. 葉身 MDA 含有率

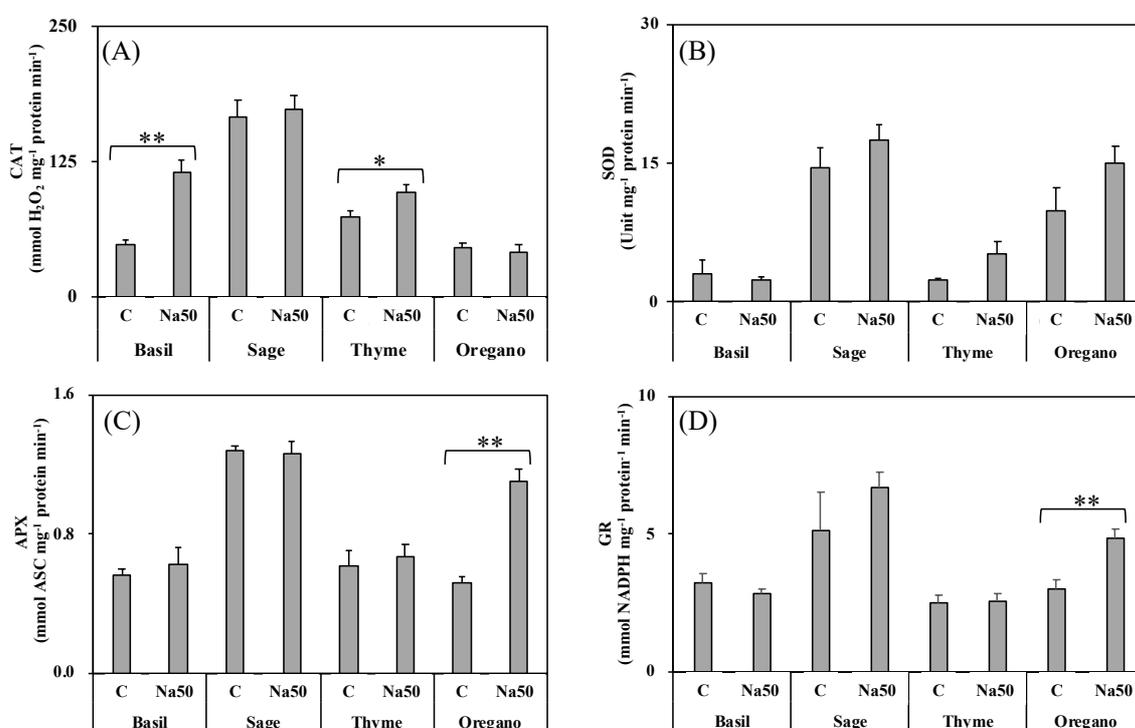
塩処理はバジルにおける MDA 含有率に影響を及ぼさなかったが、セージにおいて有意に低下させ、タイムにおいては有意ではないもののわずかに上昇させ、オレガノにおいては有意に上昇させていた (Fig.2-5) .



**Figure 2-5** Effect of salinity treatment on leaf MDA content in basil, sage, thyme and oregano. \* and \*\* indicate significant differences between control and salinity treatment in the same species (*t*-test;  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ). C; standard nutrient solution (Control), Na50; standard nutrient solution containing 50 mM NaCl (Salinity treatment). Error bars in the figure indicate standard errors of four replications.

## 6. 葉身抗酸化酵素活性

CAT 活性は塩処理下のセージとオレガノにおいて影響されなかったが、バジルおよびタイムにおいては有意に上昇した (Fig. 2-6A) . いずれの種においても SOD 活性は塩処理で有意に上昇せず、セージ, タイム, オレガノにおいてわずかに上昇傾向を示した (Fig. 2-6B) . APX 活性は塩処理下のバジル, セージ, タイムで影響されなかったが, オレガノにおいて有意に上昇した (Fig. 2-6C) . GR 活性は塩処理下のバジルおよびタイムにおいて影響されなかったが, オレガノにおいて有意に上昇した (Fig. 2-6D) .



**Figure 2-6** Effect of salt treatment on leaf antioxidative enzyme activities in basil, sage, thyme and oregano. (A); catalase activity (CAT), (B); superoxide dismutase activity (SOD), (C); ascorbate peroxidase activity (APX), (D); glutathione reductase activity (GR). \* and \*\* indicate significant differences between control and salinity treatment in the same species (*t*-test;  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ). C; standard nutrient solution (Control), Na50; standard nutrient solution containing 50 mM NaCl (Salinity treatment). Error bars in the figure indicate standard errors of four replications.

## 7. 無機元素含有率, 分配割合および Na/K 比

### 【バジル】

対照区において, Na 含有率は根で  $10.93 \text{ mg g}^{-1}$  となり, 根 Na 分配割合は 92.6 % を占めていた. 葉身 Na 含有率は  $0.09 \text{ mg g}^{-1}$  となり, 葉身 Na 分配割合は 1.5 % であった (Tab. 2-2). 塩処理区において, 茎で  $35.74 \text{ mg g}^{-1}$ , 根で  $30.10 \text{ mg g}^{-1}$  とそれぞれ上昇したのに対し, 葉身では  $7.03 \text{ mg g}^{-1}$  までの上昇となり, Na 分配割合は 18 % 程度しか無く, 他の種と比較してかなり低い値となった. 茎と根における Na 含有率は大きく変化しなかったが, Na 分配割合は茎で 52.8 %, 根で 29.2 % となった. 一方で, K 含有率は塩処理区において茎および根において葉身よりもかなり低く, 葉身 K 分配割合は対照区と比較して 30 %ポイント高い値となった. それ故に, Na/K 比は葉身において低く, 根において高い値となった. また Mg 含有率は塩処理によりすべての部位において低下した.

### 【セージ】

対照区において, Na 含有率は根において  $7.55 \text{ mg g}^{-1}$  (根 Na 分配割合 ; 64.7%), 葉身において  $0.59 \text{ mg g}^{-1}$  (葉身 Na 分配割合 ; 16.2%) となった (Tab. 2-2). 塩処理区においては, 葉身 ( $21.63 \text{ mg g}^{-1}$ , 51.7%) と根 ( $27.52 \text{ mg g}^{-1}$ , 27.2%) の両方において著しく Na 含有率が上昇した. K 含有率は葉身においてあまり変化なかったが, 根においてはわずかながら有意に低下した. また K 分配割合は対照区と比較して葉身で上昇する傾向にあり, 茎および根で低下する傾向にあった. Na/K 比は塩処理においてバジルと同様に葉身で低く, 根で高い結果となった. Mg 含有率はわずかであるが, 有意に葉身と根の両方で低下した.

### 【タイム】

対照区において, Na 含有率は根において  $3.68 \text{ mg g}^{-1}$  (根 Na 分配割合 ; 22.1%), 葉身において  $1.46 \text{ mg g}^{-1}$  (葉身 Na 分配割合 ; 44.1%) となった (Tab. 2-2). Na 分配割合は対照区の葉身で根より高く, バジルやセージとは異なった. 塩処理区において, Na 含有率はすべての部位において上昇したが, 部位間での有意差

はなく、また Na 分配割合への影響はなかった。一方で、K 含有率はセージと異なりすべての部位において著しく低下したが、処理間での K 分配割合の変化はみられなかった。Na/K 比においても部位間で有意な変化はみられなかった。Mg 含有率はすべての部位において有意に低下し、特に葉身において低下していた。

#### 【オレガノ】

対照区において、Na 含有率は根において  $5.23 \text{ mg g}^{-1}$  (根 Na 分配割合 ; 27.6 %) となり、葉身においては  $1.89 \text{ mg g}^{-1}$  (葉身 Na 分配割合 ; 53.3 %) となった (Tab. 2-2) 。塩処理区において Na 含有率は顕著に上昇し、特に茎 Na 含有率 ( $67.0 \text{ mg g}^{-1}$ ) が今回の供試ハーブ 4 種の中で最も高い値となった。K 分配割合は茎において 43.4 % と割合が上昇し、一方で根においては 4.2 % と最も低い値であった。興味深い点としては、K 含有率が葉身で塩処理により 2 倍近く上昇し、根で著しく低下したことである。同様に K 分配割合も葉身で多くを占め、根では低かった。Na/K 比は塩処理区の葉身で茎および根においてよりも有意に低く、茎と根の間において有意差はなかった。Mg 含有率は塩処理区において対照区に対し、茎で有意に低下したが、葉身で有意に上昇した。

**Table 2-2** Effect of salinity treatment on nutrient contents in leaf blades, stems and roots of basil, sage, thyme and oregano

Species	Treatments	Parts	K (mg g <sup>-1</sup> DW)			Mg	Na/K	Na distribution rate (%)		K distribution rate (%)
			Na	K	Na			Na distribution rate	K distribution rate	
Basil	0 Na	leaf blades	0.09 ± 0.03 b	25.15 ± 0.46 b	9.51 ± 0.11 a *	0.004 ± 0.001 b	1.5 ± 0.50 c	40.8 ± 1.30 a		
		stems	0.52 ± 0.06 b	41.19 ± 2.12 a **	6.58 ± 0.50 b **	0.013 ± 0.002 b	5.9 ± 0.56 b	45.2 ± 2.17 a **		
		roots	10.93 ± 0.43 a	17.01 ± 0.93 c **	3.78 ± 0.18 c **	0.650 ± 0.053 a	92.6 ± 1.06 a **	14.1 ± 1.00 b **		
	50 Na	leaf blades	7.03 ± 1.02 b **	26.93 ± 1.81 a	7.26 ± 0.42 a	0.257 ± 0.023 b **	18.0 ± 2.43 b **	71.0 ± 1.84 a **		
		stems	35.74 ± 0.87 a **	16.53 ± 1.78 b	2.47 ± 0.24 b	2.243 ± 0.257 b **	52.8 ± 3.53 a **	25.0 ± 2.22 b		
		roots	30.10 ± 3.02 a **	3.97 ± 0.22 c	1.97 ± 0.16 b	7.757 ± 1.129 a **	29.2 ± 5.41 b	4.0 ± 0.65 c		
Sage	0 Na	leaf blades	0.59 ± 0.08 c	9.51 ± 0.54 a	6.34 ± 0.10 a *	0.063 ± 0.009 b	16.2 ± 1.72 b	64.3 ± 2.16 a		
		stems	1.90 ± 0.36 b	8.37 ± 0.98 ab	4.48 ± 0.29 b	0.223 ± 0.017 b	19.1 ± 2.04 b	20.9 ± 1.34 b		
		roots	7.55 ± 0.31 a	7.09 ± 0.53 b *	2.61 ± 0.10 c *	1.083 ± 0.094 a	64.7 ± 2.96 a *	14.8 ± 0.92 c		
	50 Na	leaf blades	21.63 ± 0.93 **	9.43 ± 0.16 a	5.42 ± 0.22 a	2.295 ± 0.107 b **	51.7 ± 5.91 a *	68.5 ± 3.14 a		
		stems	25.10 ± 1.29 **	6.99 ± 0.45 b	4.18 ± 0.31 b	3.658 ± 0.377 b **	21.2 ± 2.24 b	18.0 ± 1.39 b		
		roots	27.52 ± 6.15	4.40 ± 0.57 c	1.91 ± 0.05 c	6.307 ± 1.128 a *	27.2 ± 8.10 b	13.4 ± 2.99 b		
Thyme	0 Na	leaf blades	1.46 ± 0.17 b	36.95 ± 1.36 b **	5.07 ± 0.26 a **	0.040 ± 0.005 b	41.0 ± 1.67 a	44.1 ± 1.38 a		
		stems	1.56 ± 0.15 b	43.38 ± 1.50 a **	3.69 ± 0.20 b *	0.036 ± 0.003 b	36.8 ± 2.53 a	46.2 ± 1.37 a		
		roots	3.68 ± 0.35 a	39.70 ± 0.53 ab **	3.03 ± 0.08 c **	0.092 ± 0.008 a	22.1 ± 4.17 b	9.7 ± 0.66 b		
	50 Na	leaf blades	25.73 ± 2.61 **	19.38 ± 0.47 a	2.84 ± 0.11 a	1.337 ± 0.154 **	44.7 ± 1.53 a	48.5 ± 1.56 a		
		stems	26.71 ± 2.66 **	17.34 ± 0.92 ab	2.58 ± 0.13 ab	1.563 ± 0.193 **	41.7 ± 1.64 a	40.3 ± 1.74 b		
		roots	26.71 ± 0.28 **	15.99 ± 0.46 b	2.36 ± 0.10 b	1.673 ± 0.032 **	13.6 ± 2.07 b	11.2 ± 0.47 c		
Oregano	0 Na	leaf blades	1.89 ± 0.66 b	17.97 ± 0.25 b	3.66 ± 0.18	0.104 ± 0.035 b	53.3 ± 6.80 a	57.7 ± 0.44 a		
		stems	1.86 ± 0.27 b	28.47 ± 0.64 a **	4.03 ± 0.17 **	0.066 ± 0.010 b	19.0 ± 3.82 b	28.6 ± 0.39 b **		
		roots	5.23 ± 0.27 a	27.61 ± 0.59 a **	3.92 ± 0.11	0.190 ± 0.014 a	27.6 ± 5.88 b *	13.7 ± 0.52 c **		
	50 Na	leaf blades	39.21 ± 1.30 b **	33.06 ± 0.58 a **	4.29 ± 0.06 a *	1.189 ± 0.057 b **	52.4 ± 0.89 a	83.8 ± 1.50 a **		
		stems	67.00 ± 0.62 a **	11.95 ± 1.17 b	2.27 ± 0.11 b	5.783 ± 0.601 a **	43.4 ± 0.88 b **	14.6 ± 1.39 b		
		roots	24.13 ± 1.92 c **	4.55 ± 0.45 c	3.84 ± 0.55 a	5.459 ± 0.736 a **	4.2 ± 0.37 c	1.5 ± 0.22 c		

Each data represents a mean of four replications ± standard error. Different alphabets indicate significant differences among parts in the same species (Duncan;  $P < 0.05$ ). \* and \*\* indicate significant differences between control and salinity treatment in the same parts and species ( $t$ -test;  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ), respectively. C; standard nutrient solution (Control), Na50; standard nutrient solution containing 50 mM NaCl (Salinity treatment). No letter indicates no significant difference. For each part, Na or K distribution rate was calculated as a percentage of the total Na or K nutrient amount (mg plant<sup>-1</sup>) of the plant.

### 第3節 考察

本実験においては、4種の典型的なシソ科ハーブ類の耐塩性について乾物生産と生理学的プロセスとの関連性の観点から評価を行った。バジルとセージは乾物重の減少がみられなかったことから耐塩性があることが明らかとなった (Fig. 2-1)。一方でタイムとオレガノの乾物生産は著しく減少し、オレガノは最も塩感受性を示す種であった。いずれの種においても葉身含水率の低下はみられず (Fig. 2-2)、浸透圧ストレスによる脱水状態にはなっていなかったと考えられる。

養分吸収の観点から耐塩性について評価したところ、すべての種の全部位において、Na含有率は対照区と比較して塩処理区で高い値となっていた (Tab. 2-2)。したがってNaは植物体に吸収され、イオンストレスを引き起こしうる場所などへ輸送されていたと考えられるが、組織におけるNa濃度は種によって異なっていた。

バジルにおいて、Na含有率は塩処理下においても葉身で低く維持されており、茎および根においてNaが蓄積されていた (Tab. 2-2)。この結果からバジルは葉身へのNa輸送を抑制、あるいは光合成組織からのNa排出をしていたことが示唆され、根から輸送されてきたNaと葉身から排出されたNaを茎がNaシンクとして担っていた可能性が考えられる。この耐塩性機構は他の種においてはみられなかった特徴であった (Tab. 2-2)。Attia et al. (2009) は葉身へのNa輸送と塩感受性との関係を示しており、バジルは地上部から地下部へNaを再輸送していることを報告している。他の種と比較してバジルの葉身Na/K比が低いことはバジルが優れた葉身への選択的なK輸送を有していたことを意味する (Tab. 2-2)。

セージにおいてはバジルと異なり、対照区では根にNaが蓄積されていたが、塩処理下では葉身においてもNaが蓄積されていた (Tab. 2-2)。このことはセージの茎および根のNa保持能では50 mMのNa処理で吸収されるNaを保持できず、結果として葉身にまでNaが輸送されてしまっていたということで説明がつく。しかしながら葉身におけるK含有率は塩処理によっても維持され、根に

おける K 含有率の塩処理による低下から考えると、葉身への Na に対する K 選択性がセージで高いことが伺える。

一方で、タイムとオレガノは塩感受性を示し、地上部へ多量の Na 流入が同時にみられ、特にオレガノにおいて顕著であった (Tab. 2-2)。オレガノは Na を根に蓄積できず、茎を Na シンクとして機能させているようだった。しかし結果としては塩処理区で葉身 Na 含有率が他の 3 種よりも高くなってしまっており、葉身への Na 移行を制御できていなかった。一方でオレガノの葉身 K 含有率は対照区よりも 2 倍近く上昇していた (Tab. 2-2)。これは過剰な Na 流入に際してイオンバランスを最適な状態に維持しようとする能動的な K 輸送による塩応答であったと思われる (Maathuis and Amtmann, 1999)。タイムにおいて、塩処理は Na 分配割合を変化させなかったが、すべての部位において Na 含有率が上昇しており、光合成器官への過剰な Na 流入は乾物生産を抑制していたかもしれない。またタイムにおいてのみ葉身を含む全部位で K 含有率が有意に低下しており、K 分配割合に変化がなかったことから、他の器官から葉身へ選択的に K を輸送することができず、葉身で K 欠乏を起こしていた可能性が考えられる。

耐塩性を示したバジルとセージのクロロフィル含有率は塩処理による影響はなかったが、塩感受性を示したタイムとオレガノはクロロフィル含有率が有意に低下していた (Fig. 2-3)。この低下は必須元素である Mg の不足による可能性が考えられ、クロロフィルを合成するために Mg は必要であるが、培地中の過剰な Na との競合が原因でクロロフィル低下が起きたと考えられる (Gomes et al., 2011)。実際、タイムの葉身 Mg は塩処理区で有意に低い値であった (Tab. 2-2)。バジルとセージにおいても Mg 含有率の低下は認められたが、その程度はタイムほどではなかった。一方でオレガノの葉身 Mg 含有率は塩処理区で有意に上昇しており、オレガノのクロロフィル低下は Mg 低下による原因では説明がつかず、その他の原因として塩ストレス由来の酸化ストレスによる光合成色素の分解が考えられる。

MDA は脂質過酸化の指標であり、バジルおよびセージにおいてはわずかに塩処理下で低下傾向にあったが、タイムでは上昇傾向、オレガノでは有意に上昇

していた (Fig. 2-5) . これらの結果は, Hernández and Almansa (2002) がナシの葉身において塩処理による酸化ストレスが脂質過酸化を生じさせたことを報告しているように, 今回の塩感受性を示した 2 種においても塩誘導性酸化ストレスによるダメージを受けていた可能性が示唆される.

典型的な ROS である  $H_2O_2$  は  $CO_2$  固定を阻害するが (Kaiser, 1979) , ストレスシグナル物質としても知られている (Bhattacharjee, 2005) . 今回の実験においては  $H_2O_2$  を測定することで ROS の発生を把握しようとしたが, 予想と反して塩感受性を示したタイムおよびオレガノにおいても塩処理による有意な  $H_2O_2$  の上昇は認められなかった (Fig. 2-4) . その一方で MDA は塩処理区で上昇しており (Fig. 2-5) , おそらく  $H_2O_2$  の発生と抗酸化酵素による  $H_2O_2$  を水へと分解する働きとのバランスによって  $H_2O_2$  含有率が安定していたものと考えられる. 一方で ROS 分解の過程で  $H_2O_2$  を産生する SOD の活性はタイムおよびオレガノにおいて塩処理区で上昇する傾向にあったが (Fig. 2-6B) , タイムの CAT 活性およびオレガノの APX 活性, GR 活性は著しく塩処理区で上昇しており (Fig. 2-6A, C, D) , いずれも  $H_2O_2$  を分解するための抗酸化酵素である. したがって脂質過酸化は  $H_2O_2$  ではない他の ROS によって引き起こされていた可能性が考えられ, 例として一重項酸素 ( $^1O_2$ ) などが挙げられる.  $^1O_2$  は抗酸化酵素よりも主にカロテノイドによって分解される (Ramel et al., 2012) .  $^1O_2$  は  $H_2O_2$  よりも反応性が高く, ダメージを回避するためには直ちに分解されなければならない. つまり今回,  $^1O_2$  のような ROS が脂質過酸化を引き起こし, 結果として酸化ストレスを生じさせていたのかもしれない.

バジルの抗酸化応答は CAT が塩処理によって有意に上昇していたが, 他の抗酸化酵素に変化はみられなかった (Fig. 2-6) . つまりバジルにおいて CAT は塩応答として効率的に  $H_2O_2$  を除去し, 脂質過酸化を防ぐ重要な役割を担っていた可能性が考えられる (Fig. 2-4, Fig. 2-5) . 先行研究においてトウモロコシは塩応答として CAT が最も活性化されていたという報告もされており (Azevedo Neto et al., 2005) , 今回のバジルの CAT 活性化はバジルの耐塩性の一端を担っていたと推測できる. 一方でセージは他 3 種と比較して高い抗酸化酵素活性を有し (Fig.

2-6) , わずかに SOD 活性, GR 活性が塩処理によって上昇するのみで, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を分解する CAT, APX の活性は変化せず, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は塩処理区で上昇傾向にあった. セージの MDA 含有率が塩処理区で著しく低下していたことを考えると, セージ中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> はシグナル物質として機能 (Bhattacharjee, 2005) し, 抗酸化応答を誘導していた可能性が考えられる. Tounekti et al. (2011) も塩誘導性酸化ストレスはシソ科ローズマリー (*Rosmarinus officinalis* L.) において酸化的損傷をもたらすのではなく, 防御システムとして作用している可能性を主張しており, セージも同様の優れた抗酸化応答システムを有していると思われる. 塩感受性を示したタイムとオレガノにおいては, 塩処理によりタイムで CAT 活性が有意に上昇し, オレガノで APX 活性と GR 活性が有意に上昇していたが, 両種とも SOD 活性はわずかに上昇していた (Fig. 2-6) . これらの結果から両種は塩ストレスに応答して抗酸化酵素を活性化させていたことがわかるが, MDA の蓄積がみられていたことから全部位に過剰な Na が流入していくことにより発生した酸化ストレスの方がより深刻であったと考えられ (Tab. 2-2) , 結果として生育減退につながったと思われる (Fig. 2-1) .

結論として, 養分吸収と抗酸化応答の耐塩性への貢献は種によって変化し, バジルの高い耐塩性は養分吸収と抗酸化応答の両面によって支えられていたことがわかった. セージは主に抗酸化応答が優れていることによって耐塩性を獲得していたと考えられる. タイムの塩感受性は Na 競合による K と Mg の欠乏によるものであったと考えられ, クロロフィル合成に支障をきたしていたと考えられる. オレガノは過剰の Na が植物体内に流入することで塩誘導性酸化ストレスが発生し, ダメージを受けていたものと思われる. タイムおよびオレガノの Na 吸収制御に関する脆弱性が塩に対する感受性を高め, 抗酸化応答がなされても塩ストレスに対処しきれていなかったことが明らかとなった.

#### 第4節 要約

世界の乾燥地で広く栽培されているシソ科に属するハーブ類は、耐塩性が比較的弱く、塩ストレスによる収量の減退が懸念される。本研究では、シソ科ハーブ類における耐塩性機構の解明を目的とした。そのために代表的なシソ科ハーブ類であるバジル、セージ、タイムおよびオレガノを 50 mM NaCl 含有塩ストレス培養液で水耕栽培し、葉身、茎および根における成長量、Na, K および Mg 含有率、葉身におけるクロロフィル、MDA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有率および抗酸化酵素活性を測定した。

耐塩性は、バジル≧セージ>タイム>オレガノの順であった。バジルでは、茎根 Na 保持と葉身 K 維持による葉身の低い Na/K 比に加え、抗酸化酵素 CAT 活性上昇が、高い耐塩性を説明していたと考えた。セージでは、バジルよりも Na 保持と葉身 K 維持が劣るものの、葉身で Na/K 比を低く抑えることに加え、高い抗酸化酵素活性による脂質過酸化防止能が、強い耐塩性を説明していたと考えた。また、タイムでは、抗酸化酵素活性は CAT で有意に上昇するものの、全器官への Na 流入と K および Mg 流出により、特に茎葉重の減退につながったものと考えた。オレガノでは、APX や GR 活性の有意な上昇による抗酸化応答を示し、また葉身における K 蓄積能を発揮するものの、全器官への著しい Na 流入による塩誘導型酸化ストレスにより、全器官の成長減退を招いたと考えた。

このように同じシソ科に属するハーブ類であっても、その耐塩性は異なり、養分吸収と抗酸化応答の違いにより説明することができた。

## 第 3 章

### 耐塩性バジルの養分吸収, 光合成能および抗酸化応答に関する特徴

シソ科に属す代表的なハーブ類の中でもバジル (*Ocimum basilicum* L.) は塩ストレス下において抗酸化面 (CAT 活性化) と栄養面 (茎根 Na 保持および K 選択的輸送) の両面が耐塩性を支えていることがわかった (Tanaka et al., 2018) . しかしながら耐塩性の異なるバジル品種間で, 耐塩性機構がどのように異なるのかについては明らかになっていない. 本実験では感受性および耐塩性品種の養分吸収, 抗酸化応答, 光合成について調査し, 耐塩性バジルの有する特徴を明らかにしようとした.

#### 第 1 節 材料および方法

##### 1. 供試品種

実験 1 で使用したバジル品種 (*Ocimum basilicum* L. var. *Sweet*) (以下, スイート) に加え, より耐塩性が高いとされるバジル品種; *Napoletano* (以下, ナポレタノ) を供試品種とした.

##### 2. 栽培および処理方法

第 2 章の実験と同じ温室内にて, 2016 年 4 月 13 日にバーミキュライトを充填したセルトレーにバジルの種子を播種した. 5 月 22 日に Tab. 3-1 の基本培養液を充填した 15 L 容バットへ移植し, 水耕栽培 (前培養) を開始した. 6 月 1 日 (10 DAT ; 水耕移植後 10 日目) に育苗した一様な苗を 3.5 L 容ポットへ 3 茎ずつ移植し, 本栽培を開始した. バジル栽培の慣行方法に則って生育過程における倒伏防止, 収量増加のために第 3 葉が完全に展開した個体から上部位の摘心を行った. 6 月 13 日 (22 DAT) から塩添加を始め, 6 月 15 日 (24 DAT) から 0 mM NaCl (対照区) , 50 mM NaCl (Na50 区) , 100 mM NaCl (Na100 区) となるよう

に処理を施し、13日間塩処理を施した。実験は3処理4反復で試験を行い、塩処理濃度の決定には、Çamlica and Yaldiz (2017) のバジル耐塩性スクリーニングテストの結果を参考にした。栽培には最大で 8.6 ppm Na (0.37 mM Na) を含んでいる水道水を使用し、培養液の pH は 6.0-6.5 の範囲に調整した。

**Table 3-1** Composition of the nutrient solution and salt form for basil cultivation

Element (mM)	Composition	Concentration (mM)	Salt form
N (3.55)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.64	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
		0.32	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.32	KNO <sub>3</sub>
		1.27	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O
P (0.32)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.32	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
K (1.32)	K <sup>+</sup>	1.32	KNO <sub>3</sub>
Ca (0.64)	Ca <sup>2+</sup>	0.64	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O
Mg (0.85)	Mg <sup>2+</sup>	0.85	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
Fe (0.036)	EDTA-Fe	0.36 × 10 <sup>-1</sup>	Fe(III)-EDTA
Mn (0.011)	Mn <sup>2+</sup>	1.12 × 10 <sup>-2</sup>	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O
Zn (0.0017)	Zn <sup>2+</sup>	0.17 × 10 <sup>-2</sup>	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
Cu (0.00016)	Cu <sup>2+</sup>	0.16 × 10 <sup>-3</sup>	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O
B (0.016)	B <sup>3-</sup>	0.16 × 10 <sup>-1</sup>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>

### 3. ガス交換およびクロロフィル蛍光測定

処理開始 12 日目 (DAY12 ; 6 月 27 日) に光合成パラメーター ( $P$  : 光合成速度,  $g_s$  : 気孔コンダクタンス,  $E$  : 蒸散速度,  $C_i$  : 細胞間隙 CO<sub>2</sub> 濃度) およびクロロフィル蛍光パラメーター ( $\Phi$  PSII : 励起光下の実効量子収率,  $F_v'/F_m'$  : 励起光下の最大量子収率,  $q_p$  : 光化学的消光, ETR : 電子伝達速度) を測定した (測定条件詳細については下記 5-4 項に記載) .

#### 4. 植物体の採取

6月28日(DAT37)に各ポットから無作為に1個体を採取し、葉身、茎および葉柄、根の3部位に分け、新鮮重(FW)を測定した。また一部葉身(約0.2g)を無作為に採取し、クロロフィル含有率測定に使用した。残りの葉身は第2章同様に直ちに液体窒素で凍結し、後の生理学的分析のために超低温フリーザ(-80℃)にて保存した。

#### 5. 植物体の分析

##### 5-1. 乾物重

茎および根は72時間凍結乾燥機で凍結乾燥させた後、乾物重を測定した。葉身は生理学的分析に使用するため、sub-FWとして一部新鮮葉をあらかじめ量っておき、その葉身の乾物重をsub-DWとして量ることで乾物率(sub-DW/sub-FW)を計算し、全葉身新鮮重との積で全葉身乾物重を算出した。

##### 5-2. 含水率

3部位(葉身、茎および根)の含水率は $(FW-DW)/DW$  ( $g\ g^{-1}$ )として計算した。

##### 5-3. 光合成色素

クロロフィル含有率測定用の葉身試料を第2章と同様の手順で測定に使用した。ただし、クロロフィル*a*および*b*含有率は以下の式から算出した。

$$Chl\ a\ (mg\ g^{-1}DW) = \{13.70 \times (A_{665}) - 5.76 \times (A_{649})\} \times 50\ mL / 1000 / g\ DW\ of\ sample$$

$$Chl\ b\ (mg\ g^{-1}DW) = \{25.80 \times (A_{649}) - 7.60 \times (A_{665})\} \times 50\ mL / 1000 / g\ DW\ of\ sample$$

またクロロフィル*a*および*b*含有率の結果からクロロフィル*a/b*比を計算した。

##### 5-4. 光合成パラメーター

光合成活性測定は植物光合成総合解析システム(LI-6400, LI-COR, Nebraska, United States)を用いて各植物体の若い成熟葉をチャンバー内に設置し、測定し

た. すべての測定は光強度 ;  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 葉温度 ;  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 二酸化炭素濃度 ;  $400 \text{ ppm}$  の条件下で行った.

#### 5-5. クロロフィル蛍光パラメーター

光合成測定後, ただちに同じ葉身を用いてクロロフィル蛍光を測定した. 明期条件下の植物体の最小蛍光収率 ( $F_o'$ ), 最大蛍光収率 ( $F_m'$ ) そして定常状態の蛍光収率 ( $F'$ ) を測定し, 光化学系II最大量子収率 ( $F_v'/F_m' = (F_m' - F_o') / F_m'$ ), 光化学的クエンチング係数 ( $q_p = (F_m' - F') / (F_m' - F_o')$ ) を算出した. また実効量子収率 ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) は ( $F_v'/F_m'$ ) と ( $q_p$ ) との積で計算し, 光合成電子伝達速度 (ETR) は  $\Phi_{\text{PSII}} \times 0.5 \times \text{PFD} \times 0.8$  として算出した. このときの 0.5 は光化学系II と光化学系Iとの励起割合を 1:1 とした場合の値であり, PFD はそのときの光量子束密度, 0.8 は一般的な葉の吸収係数を表している. これらすべてのパラメーターを Murchie and Lawson (2013) の方法を参考にしてデータ解析を行った.

#### 5-6. 無機元素分析

第2章と同様に測定した.

#### 5-7. 葉身 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含有率

第2章と同様に測定した.

#### 5-8. 葉身 MDA 含有率

第2章と同様に測定した.

#### 5-9. 粗酵素液抽出

第2章と同様に抽出した.

#### 5-10. 葉身抗酸化酵素活性

第2章と同様に測定した.

#### 5-11. タンパク質定量

第2章と同様に測定した.

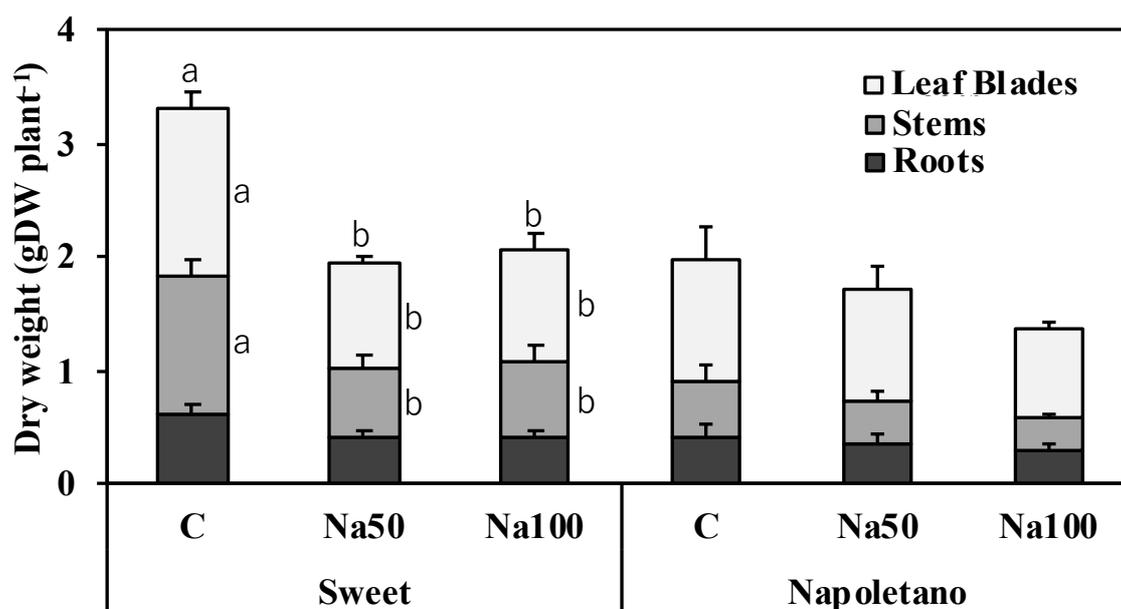
#### 6. 統計解析

結果の値は4反復の平均値であり, 各品種あるいは2品種間における3処理の各部位の平均の比較は, SPSS statistics 25.0 (IBM) 統計ソフトを用いて一元配置分散分析を行い, 処理間の差は多重比較検定 (Duncan) において5%水準を満たすものを有意とした.

## 第2節 結果

### 1. 乾物重

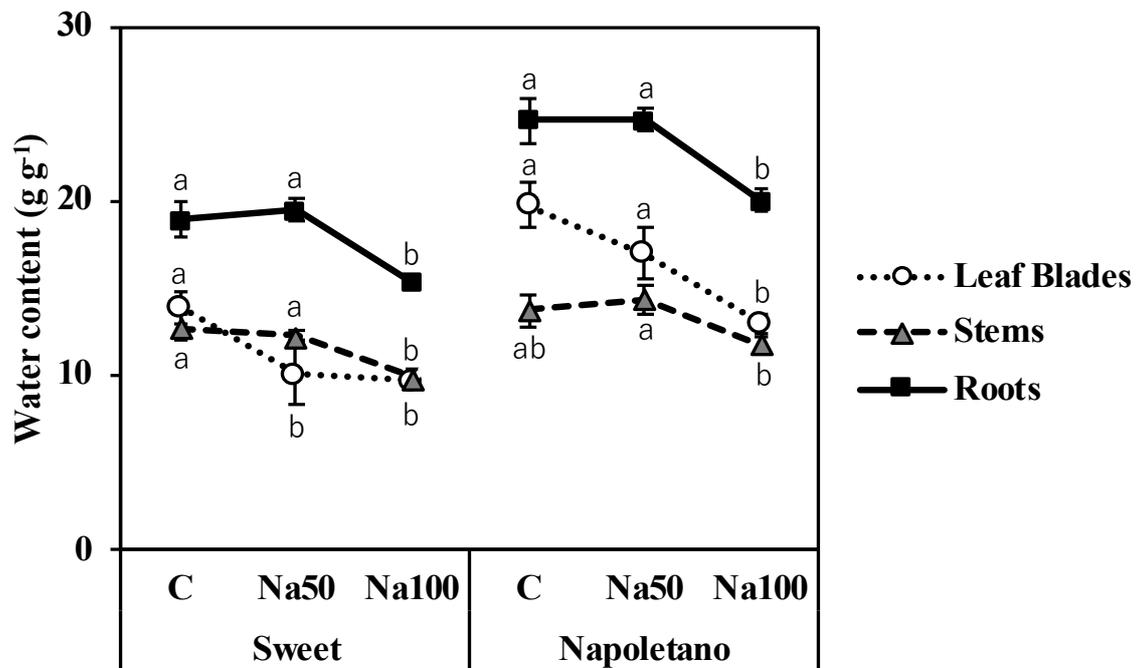
対照区においてスイートの全乾物重はナポレタノより大きかった (Fig. 3-1) . Na50 処理でスイートの全乾物重は有意に減少し, ナポレタノでは有意に減少することはなかった. Na100 ではスイートでさらなる有意な減少はみられなかったが, ナポレタノでは減少傾向を示した. スイートにおいて, Na50 で葉身および茎乾物重が有意に減少したが, Na100 によるさらなる減少はみられなかった. ナポレタノでは両塩処理による有意な減少はいずれの部位においてもみられなかった.



**Figure 3-1** Dry weight of two salt-treated basil varieties. Different lowercase letters indicate significant differences in total dry weight and dry weight of each plant part among the three treatments within each variety (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional NaCl (C, control), 50 mM NaCl (Na50), or 100 mM NaCl (Na100). Error bars indicate standard errors of the mean of four replications.

## 2. 含水率

スイートにおいて、Na50 は葉身含水率を有意に低下させたが、茎および根では有意に低下させなかった (Fig. 3-2) . Na100 で茎および根でも有意に低下したが、葉身でのさらなる有意な低下はみられなかった. ナポレタノにおいて、Na50 はいずれの部位の含水率に有意な影響を及ぼさなかったが、Na100 において葉身および根で対照区に対して有意に低下し、茎含水率は Na50 に対して有意に低下したが、対照区に対しては有意に低下しなかった.



**Figure 3-2** Water content in two salt-treated basil varieties. Different lowercase letters indicate significant differences in each plant part among the three treatments within each variety (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional NaCl (C, control), 50 mM NaCl (Na50), or 100 mM NaCl (Na100). Error bars indicate standard errors of the mean of four replications.

### 3. 光合成色素

両品種において、クロロフィル *a* および (*a+b*) 含有率は対照区に対して両塩処理で有意な低下はしなかった (Tab. 3-2) . Na100 によってナポレタノのクロロフィル *b* 含有率が対照区より有意に低下し, Chl *a/b* 比は両品種ともに有意な上昇を示した.

**Table 3-2** Leaf chlorophyll contents in two salt-treated basil varieties

Varieties	Treatments	Chl			Chl (a+b)	Chl a/b			
		a	b	mg gDW <sup>-1</sup>					
Sweet	C	13.87 ± 1.13	-	15.17 ± 0.75	BC	29.24 ± 1.72	ABC	0.91 ± 0.06	B
	Na50	11.32 ± 2.10	-	11.67 ± 1.99	C	23.15 ± 4.12	C	0.96 ± 0.02	AB
	Na100	12.01 ± 0.63	-	11.87 ± 0.53	C	24.05 ± 1.16	BC	1.01 ± 0.01	A
Napolitano	C	14.46 ± 0.55	-	19.14 ± 1.03	A	33.84 ± 1.49	A	0.76 ± 0.03	C
	Na50	13.41 ± 0.94	-	17.24 ± 1.35	AB	30.87 ± 2.30	AB	0.78 ± 0.01	C
	Na100	12.73 ± 0.60	-	14.15 ± 0.67	BC	27.07 ± 1.24	ABC	0.90 ± 0.02	B

Each value represents the mean of four replications ± standard error. Different uppercase letters indicate significant differences among the three treatments for each parameter across the two varieties (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional NaCl (C, control), 50 mM NaCl (Na50), or 100 mM NaCl (Na100). Hyphen indicates no significant difference.

#### 4. 無機元素含有率, 分配割合および Na/K 比

##### 【Na 含有率】

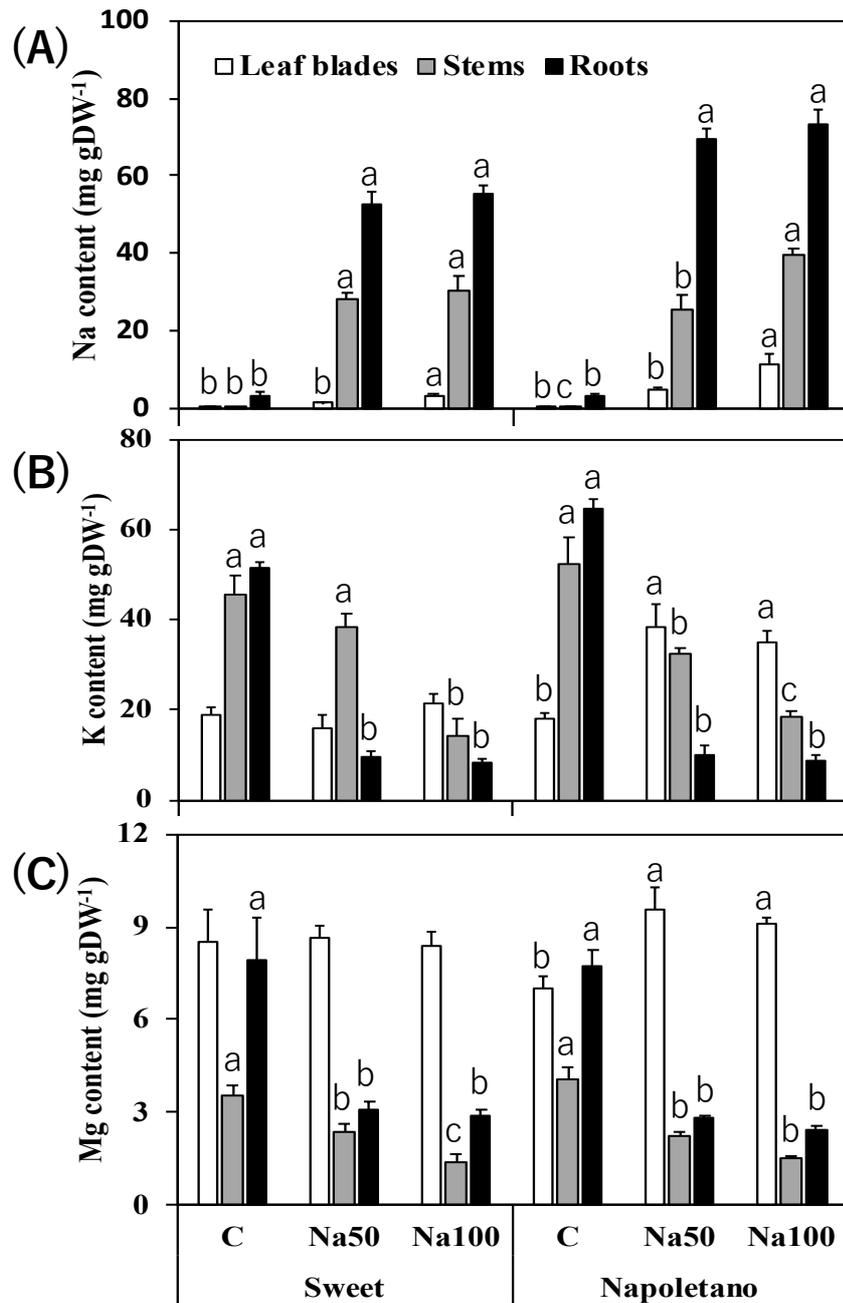
両品種において Na50 で葉身 Na 含有率は有意に上昇しなかったが, Na100 で有意に上昇した (Fig. 3-3A). Na50 で有意に茎 Na 含有率が両品種で上昇し, Na100 でナポレタノではさらなる有意な上昇をみせた. Na50 で有意に根 Na 含有率が両品種において上昇したが, Na100 でのさらなる上昇はみられなかった. 両塩処理において, 根 Na 含有率はスイートよりもナポレタノで高かった.

##### 【K 含有率】

スイートの葉身 K 含有率は対照区と塩処理間ではほとんど変化がみられなかった. 一方でナポレタノの葉身 K 含有率は対照区よりも塩処理下で有意に上昇し, 対照区の約 2 倍の値を示した. Na100 処理下でも Na50 処理下と同様な値となった. また茎および根における K 含有率は塩濃度の上昇に伴い低下した (Fig. 3-3B) .

##### 【Mg 含有率】

スイートの葉身 Mg 含有率は塩処理下であっても低下しなかったが, 茎および根において有意に低下した. 一方, ナポレタノの葉身 Mg 含有率は K 同様に塩処理下において有意に上昇し, 茎および根においては有意に低下した (Fig. 3-3C) .



**Figure 3-3** Nutrient contents in two salt-treated basil varieties. (A); Na content, (B); K content, (C); Mg content. Different lowercase letters indicate significant differences in each plant part among the three treatments within each variety (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional NaCl (C, control), 50 mM NaCl (Na50), or 100 mM NaCl (Na100). Error bars indicate standard errors of the mean of four replications.

### 【Na 分配割合】

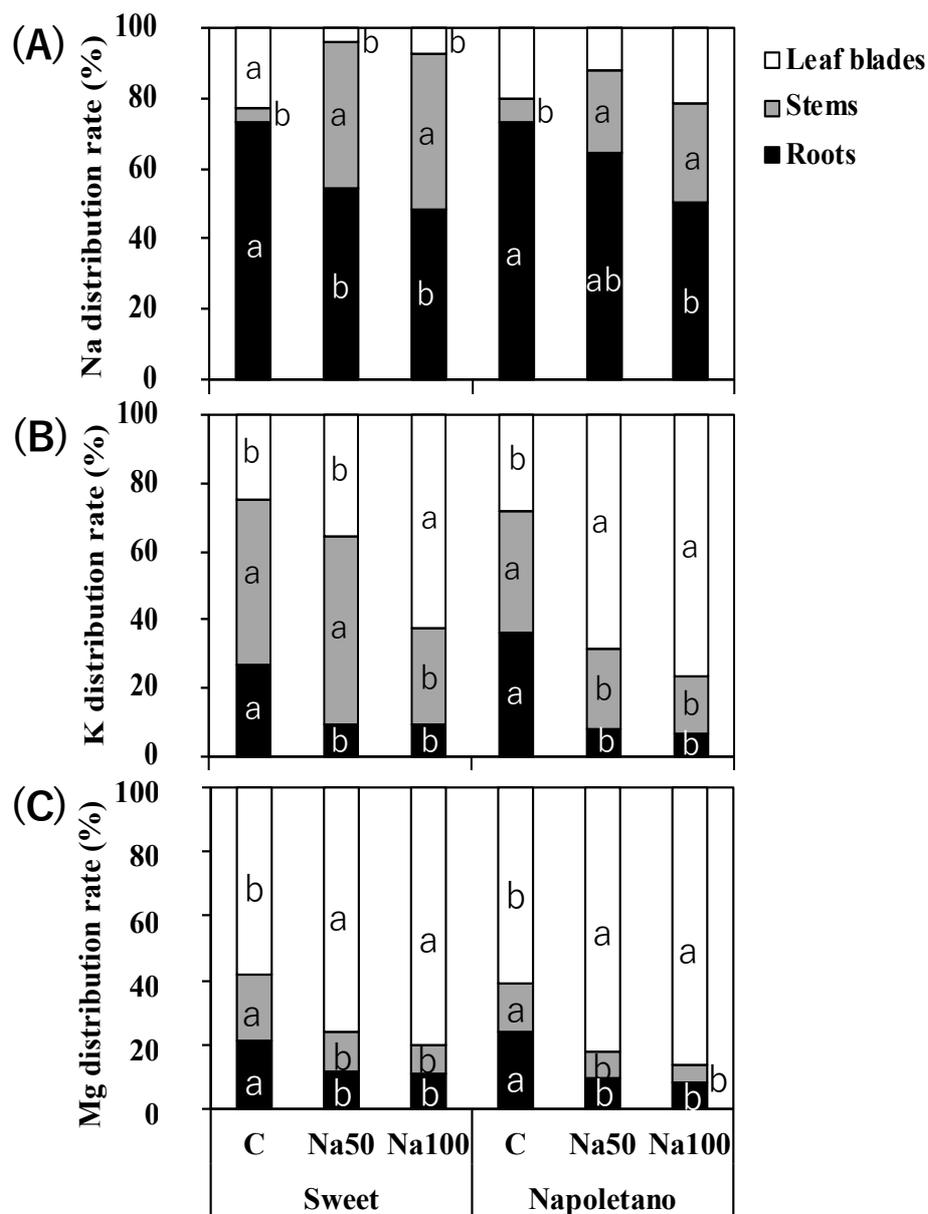
対照区におけるスイートの各部位における Na 分配割合は葉身で 23.0 %, 茎で 4.0 %, 根で 73.0 %であり, ナポレタノはそれぞれ 20.3 %, 6.9 %, 72.8 %と同様な傾向を示した. しかし Na50 のスイートはそれぞれ 4.0 %, 41.8 %, 54.2 %と葉身および根で有意に低下し, 茎で有意に上昇していた. 一方, ナポレタノにおいては 12.0 %, 23.4 %, 64.7 %と茎のみで有意に Na 分配割合が上昇した. また Na100 処理下ではスイートで 7.6 %, 43.9 %, 48.5 %と有意な変化は無く, ナポレタノでは 21.4 %, 28.5 %, 50.1 %と根における Na 分配割合が対照区に対して有意に低下した (Fig. 3-4A) .

### 【K 分配割合】

対照区におけるスイートの各部位の K 分配割合は葉身, 茎, 根で 24.9 %, 48.0 %, 27.1 %と茎において高い傾向にあり, ナポレタノにおいては 28.3 %, 35.2 %, 36.5 %と茎および根に多く分配されていた. しかし Na50 処理下ではスイートにおいて葉身, 茎, 根で 35.4 %, 55.0 %, 9.6 %と根における K 分配割合が有意に低下し, ナポレタノにおいては葉身, 茎, 根で 68.2 %, 24.0 %, 7.8 %と葉身に有意に上昇し, 茎および根において有意に低下した. Na100 処理下ではスイートは葉身, 茎, 根で 62.4 %, 28.0 %, 9.6 %と葉身において有意に上昇し, 茎で有意に低下した. ナポレタノにおいては葉身, 茎, 根で 76.8 %, 16.2 %, 7.0 %となった (Fig. 3-4B) .

### 【Mg 分配割合】

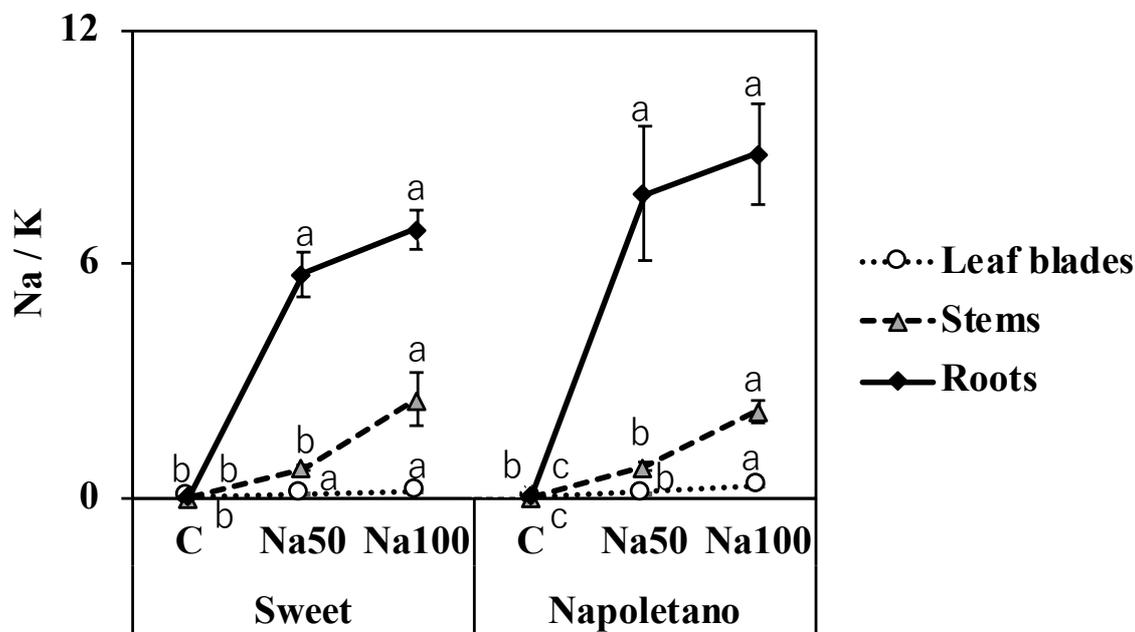
両品種の対照区における葉身 Mg 分配割合はスイートとナポレタノでそれぞれ 58.3 %, 60.7 %であったが, 塩処理 (Na50-Na100) によりそれぞれ 75.8 % ~ 79.7 %, 82.1 ~ 85.8 %となり, 葉身における Mg 分配割合が有意に上昇した. また茎および根における分配割合は塩処理により有意に低下した (Fig. 3-4C) .



**Figure 3-4** Nutrient distribution rates in two salt-treated basil varieties. (A); Na distribution rate, (B); K distribution rate, (C); Mg distribution rate. Different lowercase letters indicate significant differences in each plant part among the three treatments within each variety (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional NaCl (C, control), 50 mM NaCl (Na50), or 100 mM NaCl (Na100). Error bars indicate standard errors of the mean of four replications. Distribution rates were calculated as the percentage in each total Na, K and Mg amount in each plant part relative to that in the whole plant.

### 【Na/K 比】

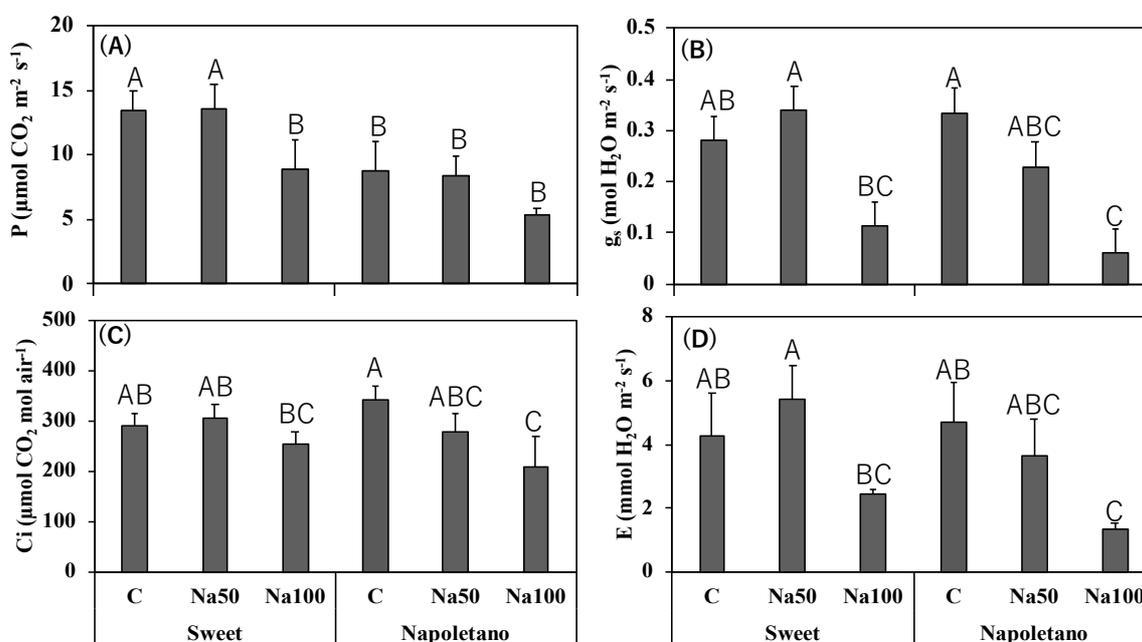
両品種共に Na/K 比は根で最も高く、葉身で最も低い結果となった (Fig. 3-5) . 葉身 Na/K 比は Na50 により対照区と比較して両品種で有意に上昇した. Na100 でさらなる上昇はスイートでみられなかったが, ナポレタノにおいては有意に上昇した. 茎 Na/K 比は Na50 ではスイートで有意に上昇しなかったが, ナポレタノでは有意に上昇し, Na100 で両品種とも有意に上昇した. 根 Na/K 比は Na50 および Na100 で両品種とも対照区に対し有意に上昇した.



**Figure 3-5** Na/K ratio in two salt-treated basil varieties. Different letters indicate significant differences in each plant part among the three treatments within each variety (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional NaCl (C, control), 50 mM NaCl (Na50), or 100 mM NaCl (Na100). Error bars indicate standard errors of the mean of four replications.

## 5. 光合成活性

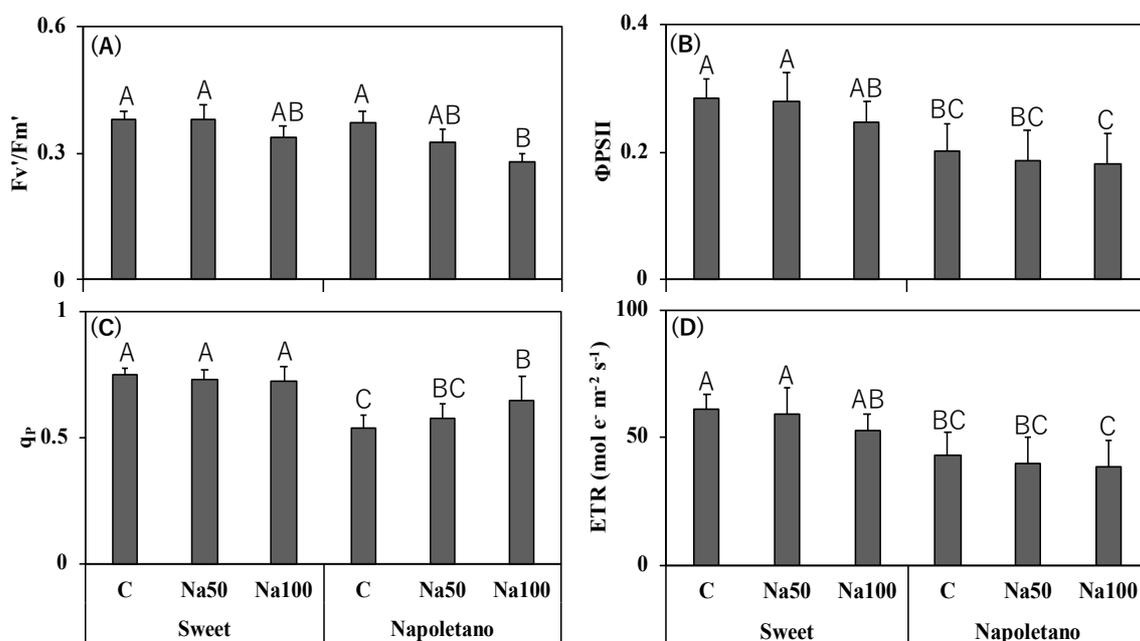
光合成速度 ( $P$ ) はスイートの対照区および Na50 において Na100 よりも高く、またナポレタノのいずれの処理区よりも高かった (Fig. 3-6A) . 気孔コンダクタンス ( $g_s$ ) は対照区および Na50 において両品種に有意な違いはなかった. Na100 はナポレタノの  $g_s$  を有意に低下させ、スイートで低下傾向を示した (Fig. 3-6B) . 細胞間隙  $\text{CO}_2$  濃度 ( $C_i$ ) はスイートにおいて両処理による影響はなかったが、ナポレタノにおいては Na100 で有意に低下した (Fig. 3-6C) . 蒸散速度 ( $E$ ) の傾向は  $g_s$  と類似した結果となった (Fig. 3-6D) . 両品種間のいずれの光合成パラメーターでも Na100 で有意な違いはみられなかった.



**Figure 3-6** Photosynthetic activity in two salt-treated basil varieties. (A); Photosynthetic rate ( $P$ ), (B); stomatal conductance to water vapor ( $g_s$ ), (C); intercellular  $\text{CO}_2$  concentration ( $C_i$ ), (D); transpiration rate ( $E$ ). All parameters were measured at 12 days after salinity treatment initiation. Different uppercase letters indicate significant differences in each photosynthetic parameter across the two varieties (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional NaCl (C, control), 50 mM NaCl (Na50), or 100 mM NaCl (Na100). Error bars indicate standard errors of the mean of four replications.

## 6. クロロフィル蛍光

$F_v'/F_m'$  (最大量子収率) は両品種ともに Na50 による影響を受けなかったが, Na100 によってナポレタノで対照区に対し, 有意に低下した (Fig. 3-7A) . 実効量子収率 ( $\Phi_{PSII}$ ) と電子伝達速度 (ETR) は両品種において塩処理による影響を受けなかったが (Fig. 3-7B, 3-7D) , ナポレタノの全処理区において常にスイートよりも低い結果となった.  $q_p$  はプラストキノン A (電子受容体  $Q_A$ ) のレドックス状態を表す指標であるが, スイートの両処理において影響はなく, ナポレタノの Na100 において有意な上昇がみられた. また処理に関わらず,  $q_p$  はスイートにおいてナポレタノよりも高い値を示した (Fig. 3-7C) .



**Figure 3-7** Chlorophyll fluorescence in two salt-treated basil varieties. (A); Maximum efficiency of PSII photochemistry in the light ( $F_v'/F_m'$ ), (B); quantum efficiency of PSII electron transport in the light ( $\Phi_{PSII}$ ), (C); photochemical quenching coefficient ( $q_p$ ), (D); electron transport rate (ETR). All parameters were measured at 12 days after salinity treatment initiation. Different uppercase letters indicate significant differences in each parameter across the two varieties (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional NaCl (C, control), 50 mM NaCl (Na50), or 100 mM NaCl (Na100). Error bars indicate standard errors of the mean of four replications.

## 7. 葉身 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有率

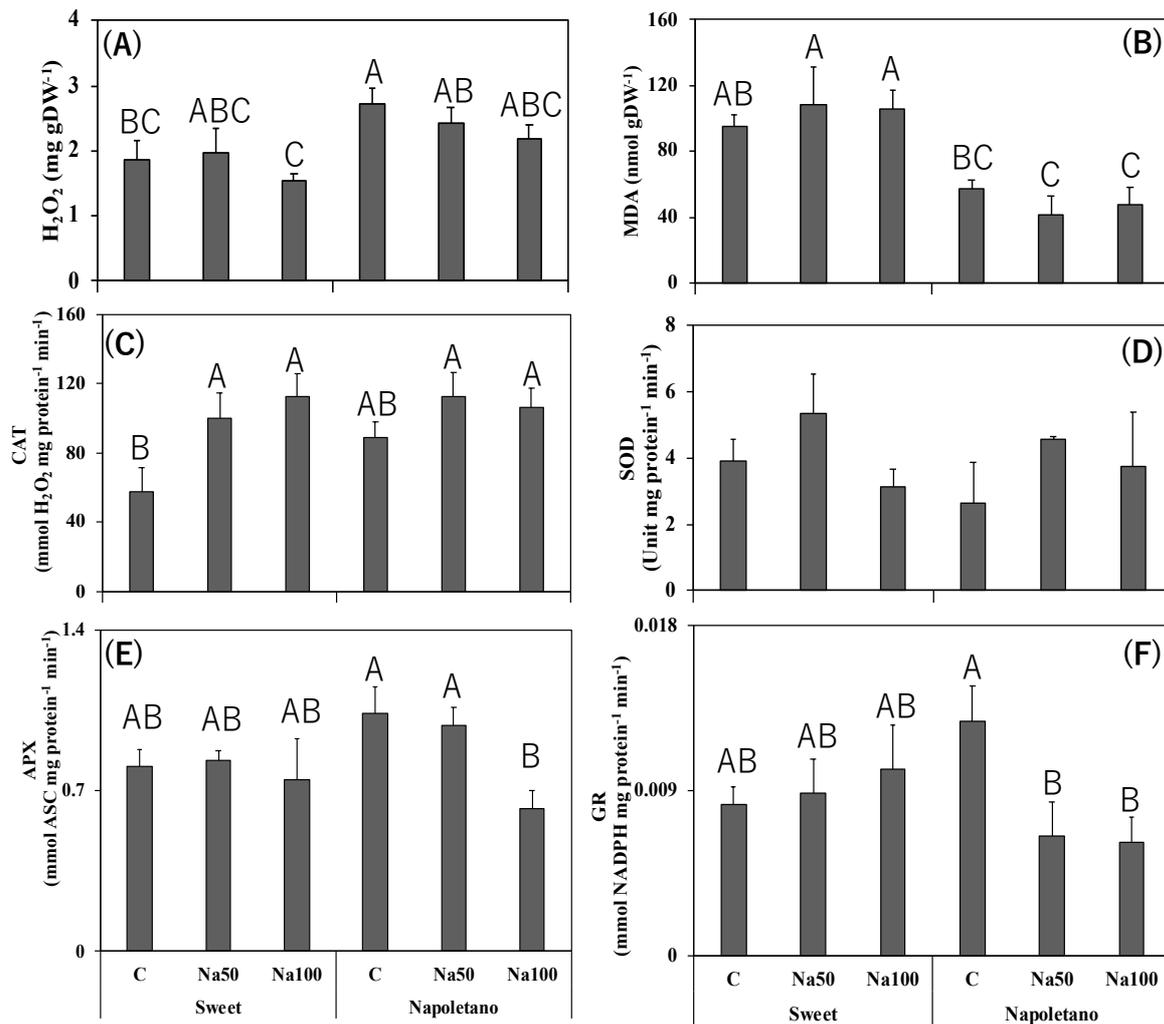
対照区において、ナポレタノはスイートよりも高い含有率を示したが、塩処理による有意な違いは品種間においてみられなかった (Fig. 3-8A) .

## 8. 葉身 MDA 含有率

いずれの品種、処理において有意差はみられなかったが、ナポレタノにおいて常にスイートよりも低い値を示していた (Fig. 3-8B) .

## 9. 葉身抗酸化酵素活性

CAT 活性はスイートにおいて Na50 で有意に著しく活性が上昇し、Na100 ではその活性を維持した。ナポレタノにおいては有意な活性上昇はしなかったが、両品種共に同等の活性値を示していた (Fig. 3-8C) . SOD 活性は両品種ともに塩処理による有意な変化および特徴的な傾向はみられなかった (Fig. 3-8D) . APX 活性はスイートにおいて大きな変化はみられなかったが、ナポレタノにおいては Na100 処理により対照区より有意に活性が低下した (Fig. 3-8E) . GR 活性はスイートにおいて有意差はないが、塩濃度の上昇に伴い活性が上昇していた。一方ナポレタノは Na50 によって有意に活性が低下し (Fig. 3-8F) , Na100 でさらなる低下はしなかった。



**Figure 3-8** Antioxidative enzyme activities in two salt-treated basil varieties. (A); Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) content, (B); malondialdehyde (MDA) content, (C); catalase (CAT) activity, (D); superoxide dismutase (SOD) activity, (E); ascorbate peroxidase (APX) activity, (F); glutathione reductase (GR) activity. Different uppercase letters indicate significant differences in each parameter across the two varieties (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional NaCl (C, control), 50 mM NaCl (Na50), or 100 mM NaCl (Na100). Error bars indicate standard errors of the mean of four replications.

### 第3節 考察

乾物重と葉身の含水率は両品種で一見関連しており、ナポレタノはスイートとは異なる傾向を示した (Fig. 3-1, Fig. 3-2) . Na50 での浸透圧ストレス下で、ナポレタノはスイートと比較して水分状態と乾物生産の維持に優れており、水分保持は塩ストレスへ対処するための重要な能力である (Parida and Das, 2005) . ナポレタノの Na50 処理における水分保持能は、スイートにはない耐塩性の特徴の一つであったと考えられる. しかしながら Na100 ではナポレタノも水分状態を維持できなかった.

Na50 では、葉身の Na 含有率は両品種で非常に低かった. ナポレタノは主に根に Na を蓄積したのに対し、スイートは根と茎に Na を蓄積し (Fig. 3-3A) , ナポレタノは主に根に Na を蓄積することにより、地上部への Na 輸送を抑制していたことが考えられた. Na100 では、ナポレタノの葉身 Na 分配割合が上昇したが、スイートでは Na50 と比較してそれほど変化していなかった (Fig. 3-4A) . 可能性として、Na100 でのナポレタノの根の Na 貯蔵容量が限界に達し、Na が葉身に侵入したことでイオンストレスを引き起こしたことが考えられた. スイートでは、Na が Na50 ですでに茎に侵入し、乾物重は大幅に減少していた. Na100 では Na が葉身にまで侵入したが、ナポレタノのそれと比べるとわずかであり、乾物重は Na50 と同等程度の減退にとどまった.

葉身 K 含有率は、対照区での両品種間で差はなかったが、Na50 処理によってナポレタノでは2倍になり、スイートでは変化しなかった (Fig. 3-3B) . リョクトウ (*Vigna radiata* L. Wilczek) では、浸透圧ストレス下での K 施与により、水分状態が大幅に改善されており (Kabir et al., 2004) , ナポレタノの葉身における高濃度の K が、浸透圧ストレス下で葉身の水分状態を維持するのに貢献していた可能性が考えられる. ナポレタノの葉身 K 分配割合の 39.9 %ポイントの増加 (28.3 %から 68.2 %) は、スイートの 10.5 %ポイント (24.9 %から 35.4 %) よりも大きく (Fig. 3-4B) , 品種間の重要な耐塩性機構の違いであったことが考えられる. K の分配割合の変化から判断して、根から葉身へ移行しているようであったが、さらなる調査が必要である.

Na/K 比は根または茎よりも葉身で顕著に低かったことから (Fig. 3-5) , 両品種ともに光合成環境は生理学的反応が行われるためには整った環境であったことが示唆される. 低い Na/K 比は, ナポレタノにおいては Na 含有率より K 含有率を上昇させることで, スイートにおいては Na の葉身への侵入を抑えつつ, K 含有率を維持することで実現させていたと思われる. どちらの戦略も効率的であるようであるが, Na の侵入を防ぐよりも, 葉身での K 獲得の方がより重要であった可能性が示唆された.

Mg はクロロフィルの合成成分であり, Rubisco による炭素固定に必要な元素である (Farhat et al., 2016) . 塩処理により, 両品種の茎と根の Mg 含有率が大幅に低下したが, 葉身の Mg 含有率はスイートで維持され, ナポレタノでは大幅な上昇を示した (Fig. 3-3C) . また塩処理により両品種の葉身 Mg 分配割合が上昇した (Fig. 3-4C) . クロロフィル含有率は両品種でわずかに低下したが (Tab. 3-2) , Mg 関連によるクロロフィル低下ではなかった.

両品種で Na50 での光合成活性への悪影響はみられなかったが, スイートでは乾物重が有意に減少していた (Fig. 3-1) . 同化された二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) は代謝やバイオマス成長にはすぐに使用されず, 浸透圧調節物質として利用され, 結果としてスイートの乾物重減少を引き起こした可能性が考えられる (Cheeseman, 1988) . Na50 はスイートの葉身含水率を大幅に低下させていたこともあり, 浸透圧調節はスイートにとって必須であった可能性が高い. Na100 でのスイートの光合成速度 ( $P$ ) の大幅な低下は, クロロフィル  $a/b$  比の大幅な上昇に関連していた可能性があり, 光合成装置の小型化と余剰電子の発生を避けるための光吸収抑制が行われていたことが示唆される. また, 本来, 能力的に光合成速度が高いオリーブ品種の光合成は塩ストレスに対してより敏感であるという報告があり (Loreto et al., 2003) , スイートの  $P$  (対照区) がナポレタノのそれよりも高く, そして塩処理下でより感受的であったことと一致していた.

光合成電子伝達は品種間で異なっていた. ナポレタノの  $Fv'/Fm'$  は, 対照区と比較して Na100 で有意に低下した. これは光化学系 II が影響を受けたことを意味している (Fig. 3-7A) .  $\Phi PSII$  と ETR は塩処理の影響を受けなかったが, ナポ

レタノの方がスイートよりも両パラメーターの値が低かった (Fig. 3-7B, D) . ETR が低いことで余剰電子の発生が少なくなり, ROS 生成リスクが減少するため, 耐塩性は高くなる可能性が考えられる.

塩ストレス応答において, 過度の水分損失を避けるために気孔が閉鎖されることが ROS 生成のきっかけとなる (Abogadallah, 2010) . Na50 での  $g_s$  値からいづれの品種も気孔は閉鎖されていなかったことを考えると (Fig. 3-6B) , ROS が生成されていた可能性は低い. その一方で, CAT 活性は Na50 下のスイートで有意に上昇しており (Fig. 3-8C) , 酸化還元状態が影響を受けていたことが示唆される. 塩ストレスは ROS 生成と抗酸化反応システム (ARS) とのバランスを乱したことで, スイートは生成した ROS から防御するために CAT を活性化し, 結果として 2 週間後 (処理終了時) には ROS 生成と ARS とのバランスは保たれ, 脂質過酸化が進行することはなかったと考えられる (Fig. 3-8A, B) . 環境ストレスによって  $P$  が低下し, ETR がそのまま変化しない場合, 電子は炭素固定ではなく, ROS を生成する Mehler 反応などに使用される (Silva et al., 2011) . Na100 ではこの組み合わせがスイートでみられたが (Fig. 3-6A, 3-7D) , 酸化還元状態は CAT によって十分に制御されているようであった (Fig. 3-8C) . 先行研究によると CAT 活性の上昇は塩処理濃度がより高い, あるいはより高い耐塩性を持つバジル品種で観察されている (Jakovljević et al., 2017; Tarchoune et al., 2013) . 我々の先行研究 (第 2 章) においてもバジルは塩処理によって CAT が活性化されていた (Tanaka et al., 2018) . 以上のことより両品種の高い CAT 活性はバジルの耐塩性機構として重要な特徴であった可能性が高い. しかしその一方で, 両品種間の耐塩性の違いは CAT 由来ではなかった. ただし MDA 蓄積は特に塩ストレス下においてスイートよりもナポレタノで常に小さく, ナポレタノは優れた ARS を有していた可能性が示唆された.

以上を結論としてまとめると, 養分吸収, 光合成能および抗酸化応答の調査から, どちらの品種も葉身 Na/K 比が低く維持されていたが, 葉身の水分状態を維持するためには, 葉身により多くの K を蓄積する能力が重要であったことが考えられた. ナポレタノは根に Na を蓄積することで Na50 処理下の地上部への

イオンストレスを抑制していたと思われる。両品種とも Na50 では光合成活性を維持し、スイートの *P* は Na100 で塩感受性を示したが、光合成低下が塩ストレスによる乾物生産減少の直接的な原因にはならなかった。またナポレタノの一貫して低い ETR は、酸化ダメージを未然に防ぐ耐塩性機構として貢献していた可能性が示唆され、CAT 活性が両品種の耐塩性機構として重要であった可能性は高いが、両者の耐塩性レベルの違いを説明する要因にはならなかった。

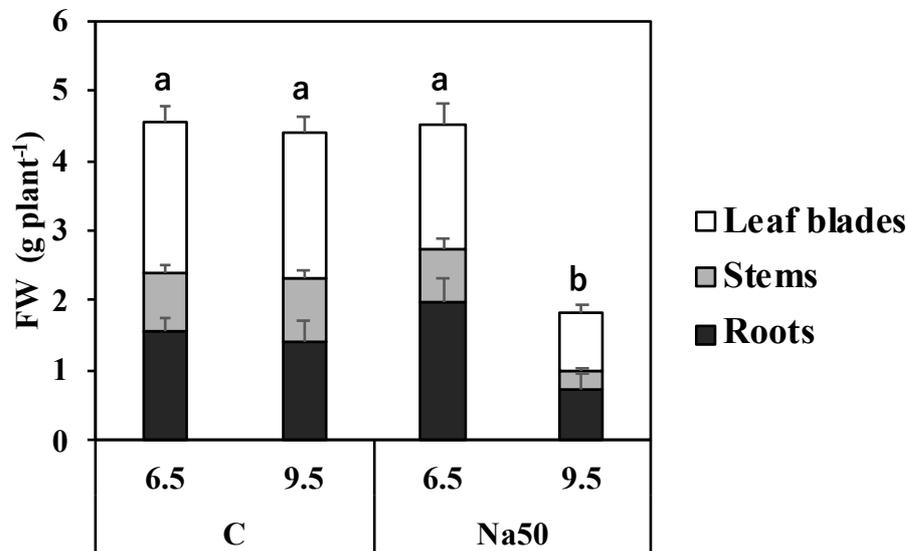
#### 第4節 要約

先行研究において、我々はバジル (*Ocimum basilicum* L.) の耐塩性を養分吸収および抗酸化応答の観点から説明した。本研究では、耐塩性を異にするバジル2品種（感受性；スイート，耐塩性；ナポレタノ）を対照区および塩処理区（50 mM NaCl；Na50, 100 mM NaCl；Na100）で13日間水耕栽培し、養分吸収と抗酸化応答に加え、光合成およびクロロフィル蛍光についても調査することにより、両品種間における耐塩性機構の違いを明らかにすることを目的とした。耐塩性は乾物生産の観点から特に Na50 ではナポレタノの方が高かった。これは葉身の K 含有率を高めつつ、根に Na を蓄積させることで葉身含水率を高く維持していたことによると思われる。光合成速度については Na50 下で両品種とも、Na100 下ではナポレタノでのみ影響を受けなかった。電子伝達速度はナポレタノの方でスイートよりも常に低い値を示したが、塩処理による影響はみられなかった。CAT 活性は両品種において重要でありそうだが、両者における耐塩性の違いの原因とはならなかった。また MDA はナポレタノにおいて常にスイートよりも低い値を示し、ナポレタノで優れた抗酸化応答を有していた可能性が考えられた。

## 第4章

### バジルの耐塩性機構に及ぼす塩性アルカリストレスの影響

第3章から耐塩性バジル品種の特徴を明らかにすることができたが、EC（塩類濃度）だけでなく pH も高い塩性アルカリ条件下におけるバジルの生理的応答に関する報告は未だ少ない。予備試験（Fig. 4-1）においてスイートを非塩処理あるいは塩処理条件、低 pH あるいは高 pH 条件の組み合わせで1週間生育させたところ、塩処理・高 pH 条件下においてのみ生育減少がみられ、塩性アルカリ条件下で耐塩性が失われる可能性が示唆された。よって本実験では、耐塩性を有するバジル品種を新たに追加した3品種に塩性アルカリ処理（炭酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウム 1:1 混合塩）を施すことで、塩性アルカリストレスがバジルの耐塩性機構にどのような影響を及ぼすか調査した。



**Figure 4-1** Effect of alkaline (pH 9.5) or saline (Na50) or saline-alkaline (Na50 + pH 9.5) stress on the fresh weight of Sweet. Different letters indicate significant differences among the four treatments (Duncan;  $P < 0.05$ ). Error bars indicate standard errors of the mean of four replications of each plant part.

## 第1節 材料および方法

### 1. 供試品種

第3章で使用したバジル品種（スイートおよびナポレタノ）と、耐塩性が高いとされるバジル品種（*Ocimum basilicum* L. var. *Thai Siam* ; 以下タイ）を新たに加えた3品種で実験を行った。

### 2. 栽培および処理方法

#### 2-1. 播種および育苗

第3章の実験と同じ温室内にて、2018年5月2日に2 cm<sup>3</sup>の立方体状スポンジに5 mm程度の切れ込みを十字に入れた後、切れ込みの中心にバジルの種を播種した。3品種のうち、スイートのみ発芽が悪かったので、5月14日に蒔き直しを行った。5月15日に水道水を充填した30 L容バットにナポレタノとタイを先行して移植し、追って同様の操作をスイートにおいても5月23日に行った。5月25日に第3章と同様のバジル用基本培養液（Tab. 3-1）を充填し、5月29日に培養液の更新を行った。

#### 2-2. 生育および生理学分析用栽培

5月31日に3.5 L容ポットへ4個体ずつ移植し、本栽培を開始した。第3章同様、倒伏防止と収量増加の為、第3葉が完全に展開した個体から上部位の摘心を行った。6月22日（移植後22日目）に培養液の更新を行い、6月25日（移植後25日目）を処理開始0日目として塩性アルカリ処理（6処理）を開始した。処理の一覧はTab. 4-1の通りである。6月29日（処理開始4日目）に培養液の更新を行い、7月3日（処理開始8日目）に植物体を収穫した。実験は3反復で行い、最大で8.6 ppm Na（0.37 mM Na）を含んでいる水道水を使用した。

#### 2-3. 光合成およびクロロフィル測定用栽培

光合成測定および光合成色素分析のために、ポット栽培とは別にバット栽培を同時に行った。ポット栽培用と同時に育苗した苗を30 L容バットに各品種10

個体ずつ移植した。6月12日（移植後12日目）時点で、栽植密度が高くなったため、10個体から5個体へ間引き作業を行い、ポット栽培と同じタイミング（6月25日）で塩性アルカリ処理（3処理）を開始した。処理の一覧はTab.4-1の通りである。ポット栽培同様、実験は3反復で行い、最大で8.6 ppm Na（0.37 mM Na）を含んでいる水道水を使用した。

### 3. ガス交換およびクロロフィル蛍光測定

測定方法は第3章に同じであるが、処理開始2日目、4日目、6日目のバット栽培バジル葉身の最大展開葉で測定を行い、経時的な変化を測定した。

### 4. 植物体の採取

採取したポット栽培の植物体は、葉身、茎（および葉柄）、根の3部位に分け、新鮮重（FW）を測定した。生理分析用の葉身は直ちに液体窒素で冷凍し、-80℃設定の超低温フリーザにて保存した。乾物重測定用の試料は70℃の熱乾燥機にて72時間以上乾燥させた後、乾物重（DW）を測定した。7月2日（処理開始7日目）にバット栽培から一部無作為に葉身を採取し、ハサミで1~2 cmのさいの目状にカットした後、約0.2 gをクロロフィル含有率測定に使用した。

**Table 4-1** List of saline-alkaline treatment of pot and vat cultivation

Pot cultivation	Treatment concentration (mM)	0	5	10	15	20	25
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mM)	0	2.5	5	7.5	10	12.5
	NaHCO <sub>3</sub> (mM)	0	2.5	5	7.5	10	12.5
	Total-Na (mM)	0	7.5	15	22.5	30	37.5
	pH	7.76	9.55	9.80	9.98	10.02	10.05
	EC (dS m <sup>-1</sup> )	0.18	0.51	0.81	1.18	1.5	1.81
Vat cultivation	Treatment concentration (mM)	0	10	20			
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mM)	0	5	10			
	NaHCO <sub>3</sub> (mM)	0	5	10			
	Total-Na (mM)	0	15	30			
	pH	7.21	9.86	10.02			
	EC (dS m <sup>-1</sup> )	0.19	0.77	1.3			

## 5. 植物体の分析

### 5-1. 含水率

第3章に同じ.

### 5-2. 光合成色素

第3章に同じ.

### 5-3. 光合成パラメーター

第3章に同じ.

### 5-4. クロロフィル蛍光パラメーター

第3章に同じ.

### 5-5. 無機元素分析

無機元素含有率は第3章と同様に行い, 測定元素は Na, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn とした. リン (P) の測定はバナドモリブデン酸黄色法 (Watanabe et al., 1998) に従い, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の測定は Cataldo 法 (Cataldo et al., 1975) に従って行った.

### 5-6. 葉身 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有率

生育および生理学分析用栽培6処理の内, 処理区 0, 10, 20 mM の3処理区の試料を使用し, 第3章と同様に測定した.

### 5-7. 葉身 MDA 含有率

生育および生理学分析用栽培6処理の内, 処理区 0, 10, 20 mM の3処理区の試料を使用し, 第3章と同様に測定した.

### 5-8. 粗酵素液抽出

第3章と同様に抽出した.

#### 5-9. 葉身抗酸化酵素活性

生育および生理学分析用栽培 6 処理の内, 処理区 0, 10, 20 mM の 3 処理区の試料を使用し, 第 3 章と同様に測定した.

#### 5-10. タンパク質定量

第 3 章と同様に測定した.

### 6. 統計解析

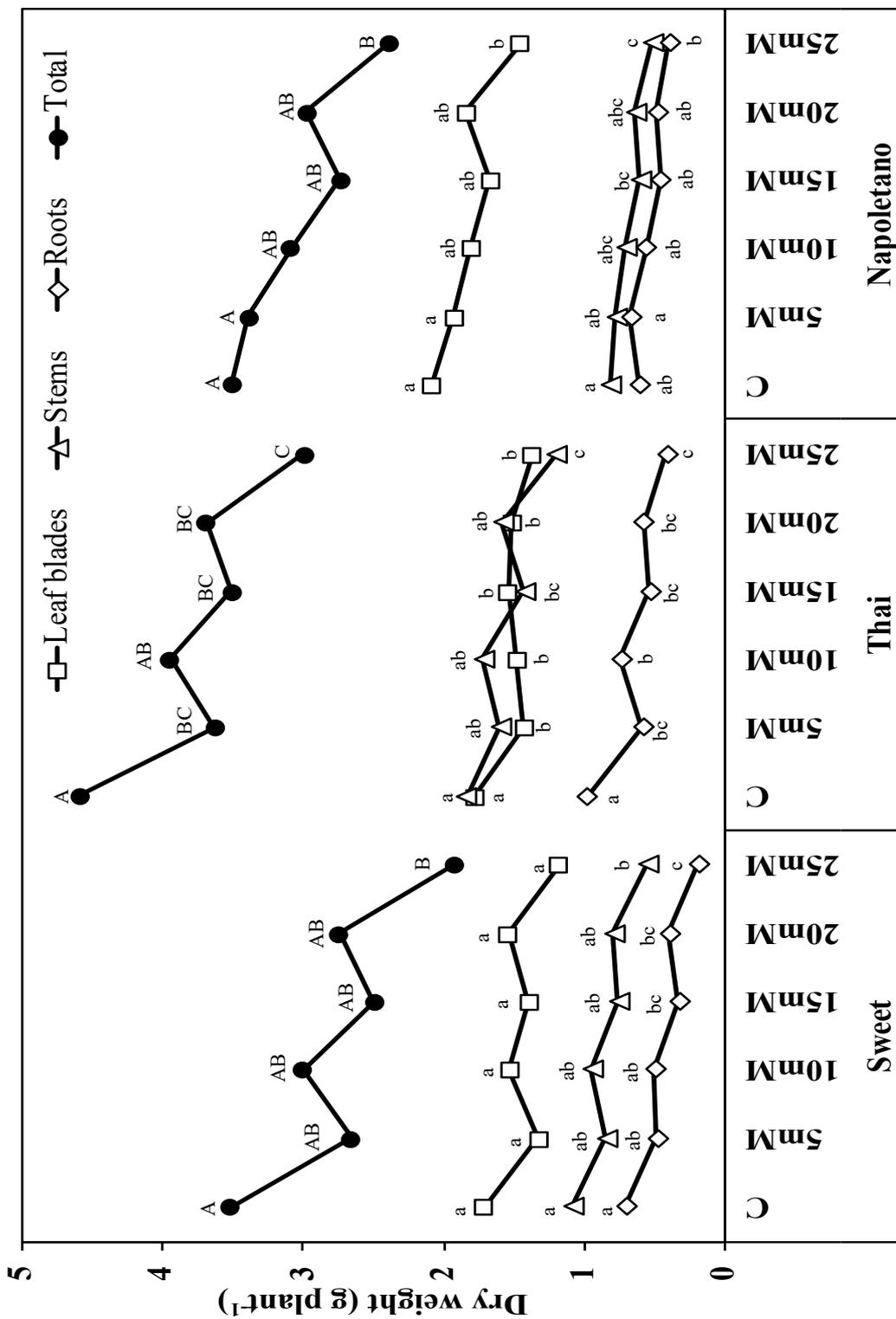
結果の値は 3 反復の平均値であり, 各品種あるいは 3 品種間における全処理区間 (6 処理あるいは 3 処理) の部位 (葉身, 茎, 根) ごとの平均の比較は, SPSS statistics 25.0 (IBM) 統計ソフトを用いて一元配置分散分析を行い, 処理間の差は多重比較検定 (Duncan) において 5%水準を満たすものを有意とした. 各品種の各部位 (葉身, 茎, 根) での Na に対する各無機元素の関係において, ピアソンの相関係数を用いて解析を行った.

## 第2節 結果

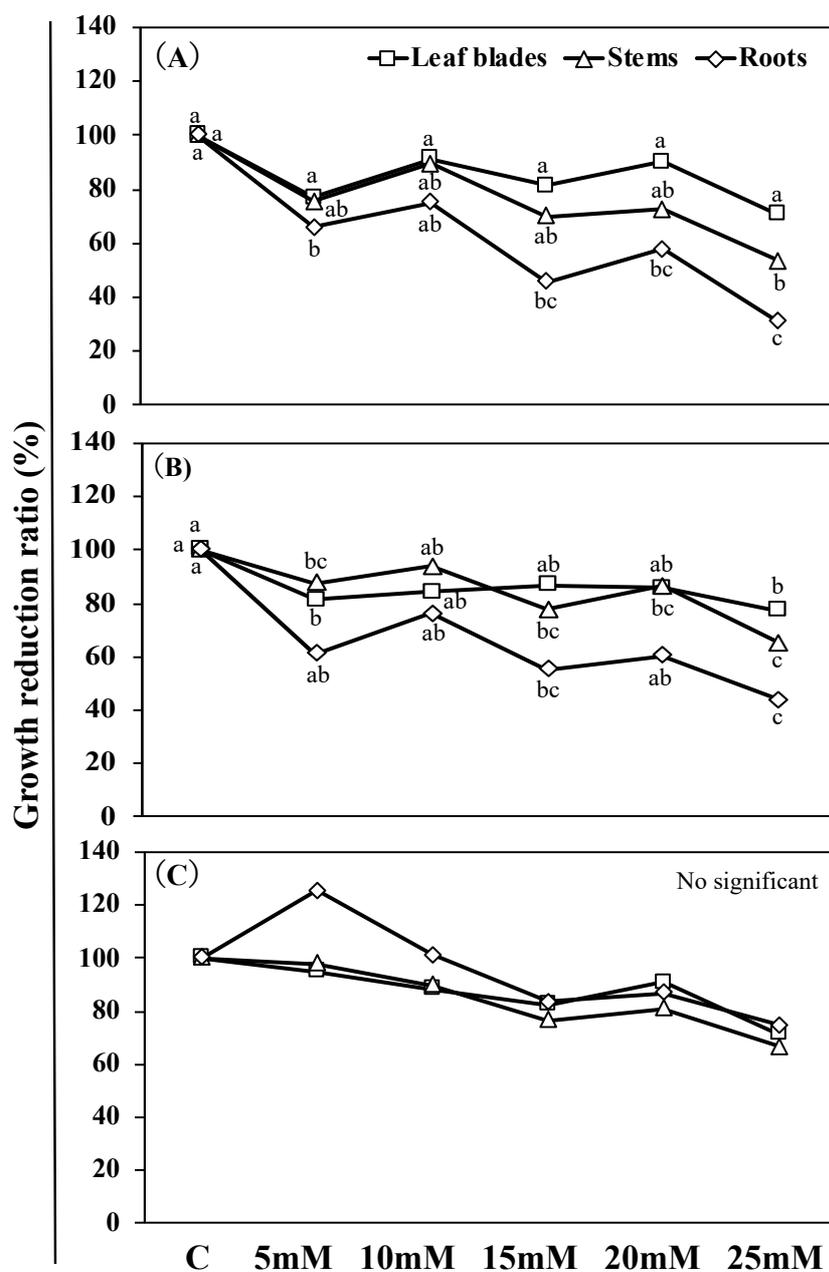
### 1. 乾物重

全品種とも処理による乾物重の減退はみられたが、品種および処理濃度による影響は異なった (Fig. 4-2) . 全乾物重においてスイートおよびタイは類似した傾向を示し、5 mM から生育が減少する傾向にあった。しかしスイートでは 25 mM で有意な減少となり、タイでは 5 mM から有意に減少した。一方、ナポレタノは 10 mM から生育が減少する傾向を示し、25 mM で有意に減少した。部位ごとにみると、葉身乾物重において、スイートはいずれの処理でも有意な減少を示さず、タイの葉身が 5 mM で有意に減少し、ナポレタノの葉身は 25 mM で有意に減少した。一方、茎乾物重において、スイートは 25 mM で有意に減少し、タイおよびナポレタノでは 15 mM で有意に減少した。また根乾物重においては、スイートで 15 mM から、タイで 5 mM から、ナポレタノでは 25 mM から有意に減少した。

各品種の対照区を 100%としてそれぞれの乾物重減退割合をみた時、ナポレタノはいずれの処理においても乾物重減退割合に有意差がみられなかった (Fig. 4-3) . 5 mM ではナポレタノのいずれの部位も 9 割以上乾物を維持し、いずれの処理においても根の乾物重減退割合は他 2 品種より常に小さかった。一方タイは茎の乾物重減退割合が 10 ~ 20 mM で他 2 品種より小さい傾向にあり、根への影響は 5 mM で他 2 品種よりも大きかった。しかしスイートで根への影響が 10 mM から他 2 品種より大きくなり、15 mM で半減 (46%) した。またいずれの品種 (スイート 5 mM を除く) も 20 mM までは葉身で 8 割、茎では 7 割以上の乾物を維持できていた。処理濃度が最も高い 25 mM では、スイートの葉身、茎、根でそれぞれ 71%, 53%, 31%, タイで 77%, 65%, 44%, ナポレタノで 71%, 67%, 75% となり、全乾物重減退割合  $\{(葉身+茎+根) / 3\}$  はスイートで 51.6%, タイで 62%, ナポレタノで 71% と、ナポレタノにおける乾物重減退割合が最も小さく、スイートで最も大きかった。



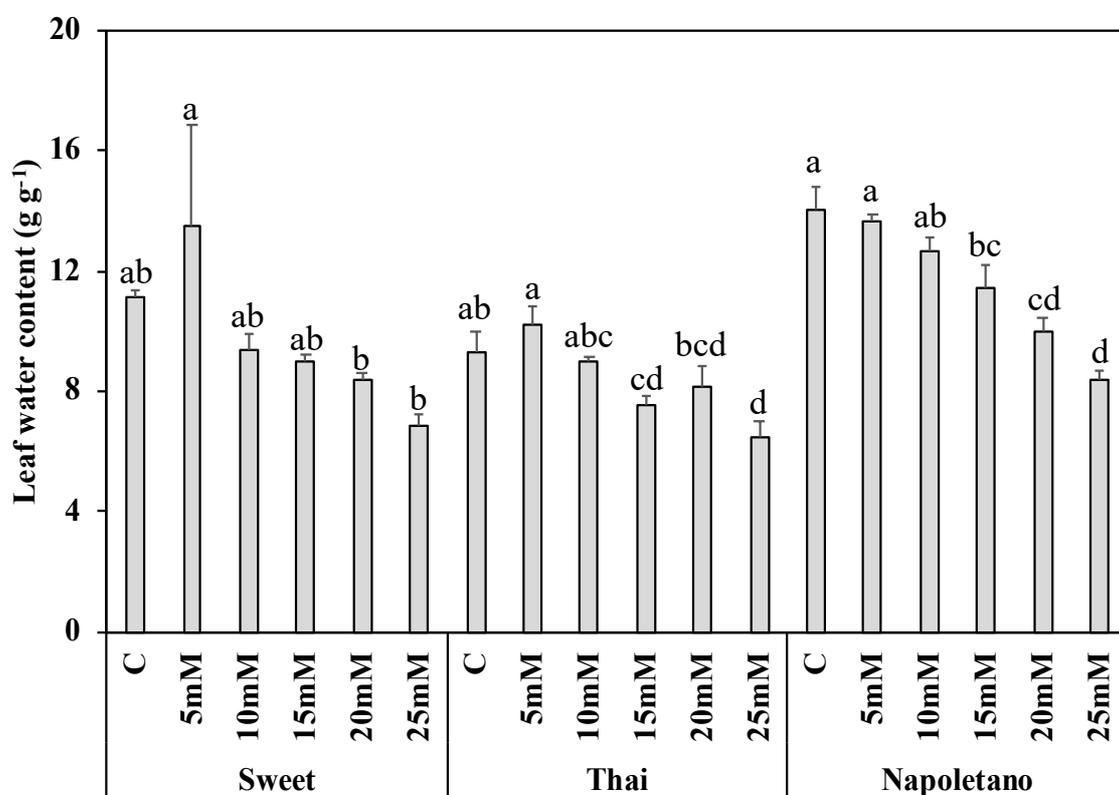
**Figure 4-2** Dry weight of three basil varieties under saline-alkaline conditions. Different letters indicate significant differences in total dry weight (uppercase) and each plant part (lowercase) among the six treatments within each variety (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional salt; C (control: EC 0.18 dS m<sup>-1</sup>; pH 7.76) or 5 ~ 25 mM NaHCO<sub>3</sub> : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = 1:1 (treatment: EC 0.51-1.81 dS m<sup>-1</sup>; pH 9.55-10.05).



**Figure 4-3** Growth reduction ratio (%) of three basil varieties under saline-alkaline conditions. (A); Sweet, (B); Thai, (C); Napoletano. Percentages (%) are calculated by DW of Treatment / DW of Control, in each plant part of each variety multiplied by 100. Different letters indicate significant differences in each plant part among the six treatments within each variety (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional salt; C (control: EC 0.18 dS m<sup>-1</sup>; pH 7.76) or 5 ~ 25 mM NaHCO<sub>3</sub> : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = 1:1 (treatment: EC 0.51-1.81 dS m<sup>-1</sup> ; pH 9.55-10.05).

## 2. 葉身含水率

スイートではいずれの処理下でも有意な低下はみられず、5 mM (EC 0.51 dS m<sup>-1</sup>) では異常値が生じた (Fig. 4-4) . タイは 15 および 25 mM (EC 1.81 dS m<sup>-1</sup>) で対照区に対して有意に低下し、ナポレタノは 15 mM (EC 1.18 dS m<sup>-1</sup>) から対照区に対して有意に低下した.



**Figure 4-4** Leaf water content of three basil varieties under saline-alkaline conditions. Different lowercase letters indicate significant differences among the six treatments within each variety (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional salt (EC 0.18 dS m<sup>-1</sup>; pH 7.76) or 5 ~ 25 mM NaHCO<sub>3</sub> : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = 1:1 (EC 0.51-1.81 dS m<sup>-1</sup> ; pH 9.55-10.05).

### 3. 無機元素含有率および Na に対する各無機元素の相関係数

#### 【Na 含有率】

対照区では 3 品種に共通して根で最も高く、茎および葉身において低い値を示した (Fig. 4-5A) . 5 mM では依然としていずれの品種も根で含有率が高かったが、ナポレタノの根のみで有意に上昇した。また茎においても 3 品種に共通して含有率が有意に上昇した。10 mM になると、スイートでのみ、根と茎の Na 含有率の高さが逆転し (茎 > 根) , 茎における含有率の方が高くなった。15 mM になると、タイおよびナポレタノにおいても茎と根の Na 含有率の高さが逆転した (茎 > 根) . またスイートの茎における含有率がさらに有意に上昇し、葉身においても有意に上昇した。20 mM では、スイートに変化はなかったが、タイおよびナポレタノの茎が有意に上昇し、スイートと同等レベルにまで達した。また葉身においてもタイとナポレタノで有意に上昇した。そしてタイのみ根と葉身の Na 含有率が逆転した (葉身 > 根) .

#### 【K 含有率】

対照区において、3 品種とも茎および根で類似した K 含有率組成を有していたが、タイでのみ葉身 K 含有率が著しく低かった (Fig. 4-5B) . 5 mM ではほとんど K 含有率に影響は生じなかったが、ナポレタノの根においてのみ有意に低下した。一方、タイの葉身で有意な上昇を示した。いずれの品種も 10 mM から茎で K 含有率が低下し始めたが、葉身における K 含有率は維持あるいは上昇していた。15 mM でも茎で K 含有率が低下する一方、葉身では維持され続け、20 mM になると茎の K 含有率は低下しなくなり、25 mM でも同様な結果となった。ただしタイについては 20 および 25 mM でさらに葉身 K 含有率が有意に上昇し、スイートおよびナポレタノと同様の葉身 K 濃度に達した。

#### 【Ca 含有率】

対照区では、3 品種とも類似した Ca 含有率を各部位で示し、葉身 > 茎 > 根の順に含有率が高かった (Fig. 4-5C) . 5 mM では 3 品種とも根において Ca 含有率が

有意に上昇する一方、茎での含有率がスイートおよびナポレタノで有意に低下した。また Ca 含有率の高さが 3 品種とも根>茎の順に逆転した。10 mM では 3 品種とも根でさらに上昇し、茎で低下、葉身ではスイートでのみ対照区に対して有意に低く、タイおよびナポレタノで低下傾向を示した。15 mM になると、スイートで根と葉身の Ca 含有率が逆転（根>葉身）し、20 mM において、タイおよびナポレタノでも同様に順序が逆転した。25 mM では、スイートおよびタイにおいては変化がなかったが、ナポレタノの根においてのみ Ca 含有率がさらに有意に上昇した。

#### 【Mg 含有率】

対照区において、スイートおよびタイは各部位で類似した傾向（葉身>根>茎）を示したが、ナポレタノにおいては根>葉身>茎と根で Mg 含有率が高い性質を示した (Fig. 4-5D)。いずれの品種も処理により、茎で低下傾向を示したが、スイートでのみ 15 mM で有意に葉身 Mg 含有率が低下し、根における Mg 含有率を下回った（根>葉身）。

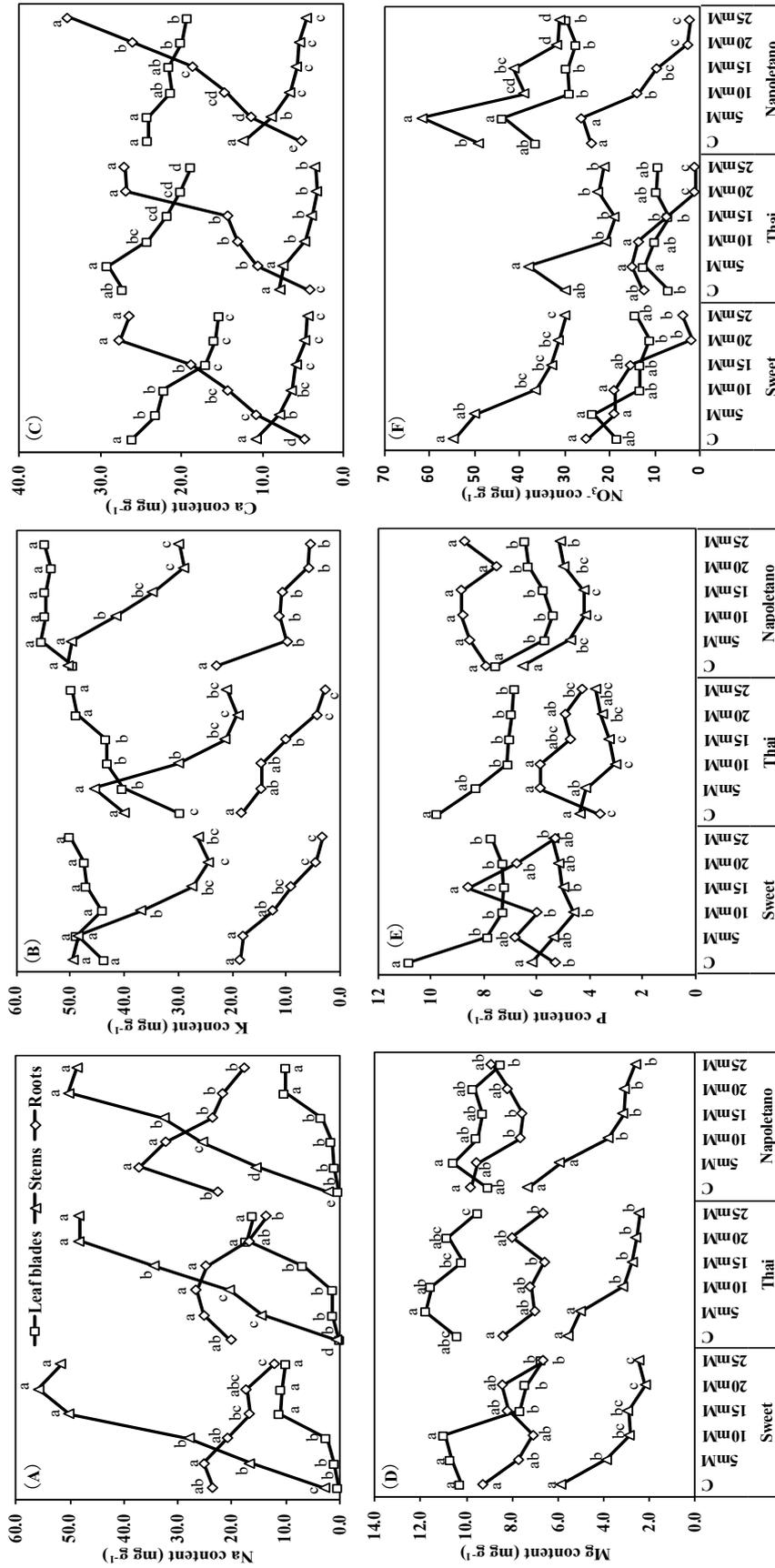
#### 【P 含有率】

対照区において、スイートとタイは類似した含有率の傾向（葉身>茎>根）を示し、ナポレタノでは根 $\geq$ 葉身>茎という順であった (Fig. 4-5E)。5 mM において、いずれも葉身 P 含有率が低下し、スイートで最も顕著に低下した。一方、根での P 含有率が上昇傾向を示したが、有意な上昇はタイのみであった。10 mM 以上の処理濃度では P 含有率に大きな変化はなかったが、スイートの根においてのみ 15 mM で有意に上昇後、25 mM で再び対照区と同等レベルとなった。

#### 【NO<sub>3</sub><sup>-</sup>含有率】

対照区において、スイートとタイで茎>根>葉身の順に含有率が高く、ナポレタノにおいては茎>葉身>根の順に高かった (Fig. 4-5F)。5 mM ではタイの葉身およびナポレタノの茎で有意に上昇した。10 mM においては 3 品種に共通して

茎の  $\text{NO}_3^-$  含有率が低下し、ナポレタノでは対照区に対して有意に低下した。またナポレタノの根でも対照区に対し有意に低下した。20 および 25 mM では根の  $\text{NO}_3^-$  含有率がタイおよびナポレタノで対照区に対して有意に低下した。



**Figure 4-5** Macro nutrient uptake; Na, K, Ca, Mg, P, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg gDW<sup>-1</sup>) of three basil varieties under saline-alkaline conditions. Different lowercase letters indicate significant differences in each plant part among the six treatments within each variety (Duncan; *P* < 0.05). Standard nutrient solution contained no additional salt; C (control: EC 0.18 dS m<sup>-1</sup>; pH 7.76) or 5 ~ 25 mM NaHCO<sub>3</sub> : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = 1:1 (treatment: EC 0.51-1.81 dS m<sup>-1</sup>; pH 9.55-10.05).

### 【Fe 含有率】

対照区において、いずれの品種も根>葉身>茎の順に Fe 含有率が高かった (Fig. 4-6A) . 処理下でその順序が変化することはなかったが、5 mM で 3 品種とも葉身 Fe 含有率が低下し、スイートとタイで有意な低下となった。特にスイートで顕著に低下した。10 mM 以上の処理濃度では葉身 Fe 含有率に有意な変化はみられなかったが、根 Fe 含有率は 5 mM でタイが有意に上昇し、スイートおよびナポレタノでは 10 mM で有意に上昇した。茎では基本的に低下傾向を示したが、ナポレタノの 20 mM で特異値を示し、タイの 20 および 25 mM で検出限界値となった。

### 【Mn 含有率】

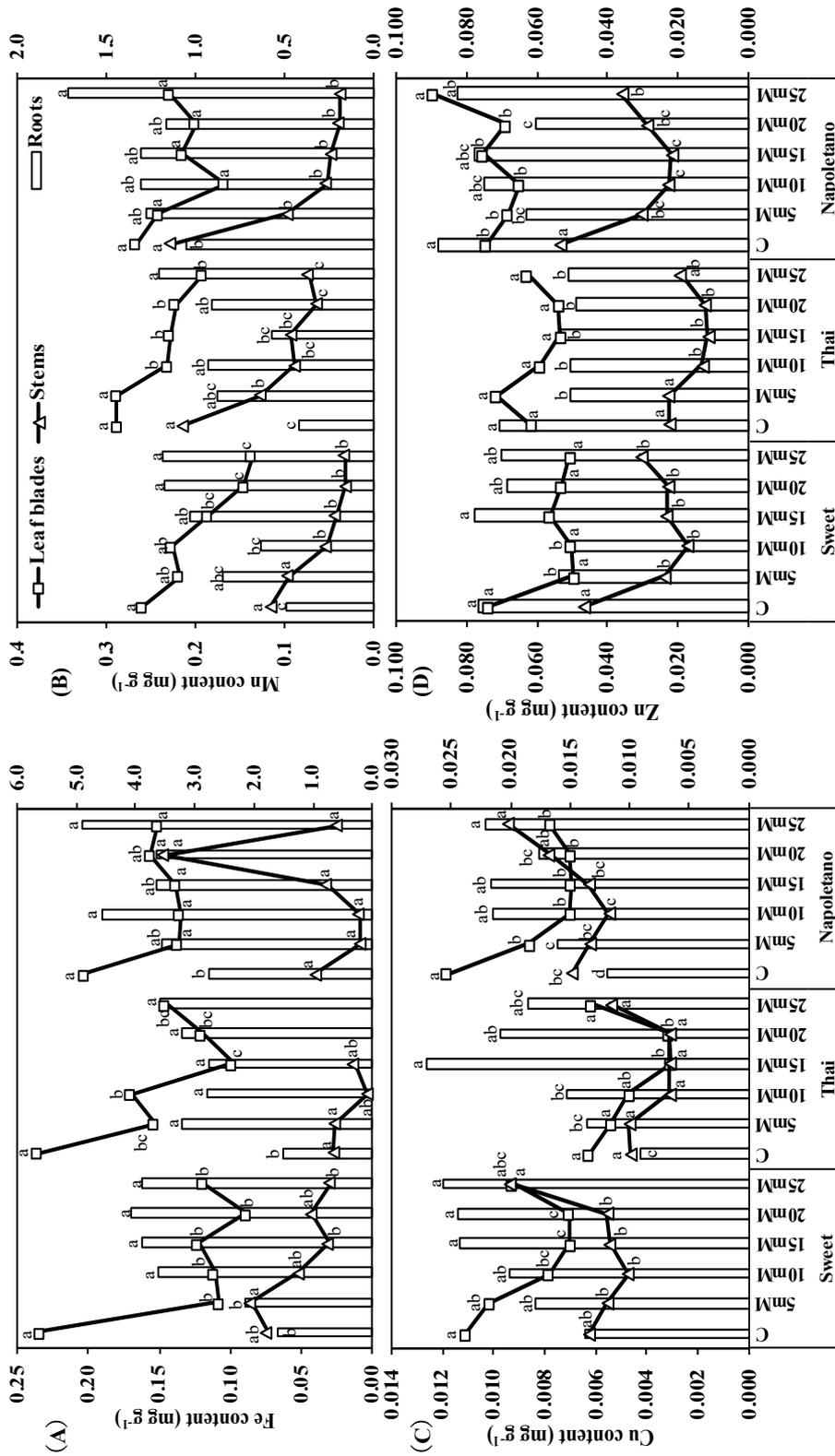
対照区では、3 品種とも根>葉身>茎の順に高かった (Fig. 4-6B) . ただし、タイとナポレタノは茎における含有率がスイートのそれよりも 2 倍以上高い値であった。葉身 Mn 含有率において、スイートは 15 mM から、タイは 10 mM から有意に低下したが、ナポレタノではいずれの処理下でも有意に低下しなかった。茎 Mn 含有率は、スイートで 10 mM から、タイおよびナポレタノでは 5 mM から有意に低下した。根 Mn 含有率は、葉身および茎とは異なり 3 品種とも処理によって上昇傾向を示したが、スイートでは 15 mM から、タイでは 10 mM から、ナポレタノでは 25 mM から有意に上昇した。

### 【Cu 含有率】

対照区において、スイートとタイは根>葉身>茎の順に Cu 含有率が高かったが、ナポレタノにおいては根≒葉身>茎となった (Fig. 4-6C) . 5 mM ではいずれも葉身で Cu 含有率が低下し、根で上昇傾向を示した。10 mM でも同様な傾向を示し、15 および 20 mM ではスイートおよびタイで有意な変化はみられなかったが、ナポレタノの茎においては 20 mM で上昇傾向を示した。25 mM になると、3 品種とも葉身および茎において Cu 含有率が上昇した。

### 【Zn 含有率】

対照区において、3 品種とも類似した傾向（根 $\geq$ 葉身 $>$ 茎）を示した（Fig. 4-6D）。5 mM では、スイートの 3 部位すべてにおいて有意に低下し、ナポレタノの茎および根で有意に低下した。一方でタイは根において有意に低下したが、葉身では上昇傾向、茎では変化しなかった。スイートの根（15 mM）を除き、10, 15, 20 mM では 3 品種において有意な変化はみられなかったが、25 mM では茎 Zn 含有率が 3 品種とも上昇する傾向を示した。



**Figure 4-6** Micro nutrient uptake; (A) Fe, (B) Mn, (C) Cu, (D) Zn (mg gDW<sup>-1</sup>) of three basil varieties under saline-alkaline conditions. Different lowercase letters indicate significant differences in each plant part among the six treatments within each variety (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional salt; C (control: EC 0.18 dS m<sup>-1</sup>; pH 7.76) or 5 ~ 25 mM NaHCO<sub>3</sub> : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = 1:1 (treatment: EC 0.51-1.81 dS m<sup>-1</sup> ; pH 9.55-10.05).

#### 【Na に対する各無機元素の相関係数】

葉身 Na 含有率に対し、スイートでは Ca, Mg, Cu において強い負の相関を示し、P, Mn においてやや負の相関を示した (Tab. 4-2)。タイでは K において強い正の相関、Ca, Mn において強い負の相関を示し、Fe においてやや負の相関を示した。ナポレタノでは Ca においてのみやや負の相関を示した。茎 Na 含有率に対し、スイートでは K, Ca, Mg, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Fe, Mn で強い負の相関を示した。タイでは K, Ca, Mg, Fe, Mn で強い負の相関を示し、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> でやや負の相関を示した。ナポレタノでは K, Ca, Mg, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Mn で強い負の相関を示したが、Fe は相関を示さなかった。また Cu でやや正の相関を示した。根 Na 含有率に対し、スイートでは K, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> で強い正の相関を示し、Ca, Fe, Cu で強い負の相関、Mn でやや負の相関を示した。タイでは K, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> で強い正の相関を示し、P でやや正の相関、Ca でやや負の相関を示した。ナポレタノでは NO<sub>3</sub><sup>-</sup> で強い正の相関を示し、Ca でやや負の相関を示した。

**Table 4-2** Correlation coefficients (r) between Na and the other elements (K, Ca, Mg, P, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Fe, Mn, Cu, Zn) in each part of three basil varieties under saline-alkaline conditions

	K	Ca	Mg	P	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Fe	Mn	Cu	Zn
<b>Leaf blades</b>									
Sweet	0.192	-0.872 **	-0.828 **	-0.570 *	-0.361	-0.419	-0.525 *	-0.614 **	-0.258
Thai	0.737 **	-0.703 **	-0.442	-0.373	0.065	-0.481 *	-0.608 **	-0.072	-0.128
Napolitano	0.2827	-0.589 *	-0.294	0.039	-0.420	-0.0554	0.0325	-0.394	0.420
<b>Stems</b>									
Sweet	-0.894 **	-0.875 **	-0.782 **	-0.354	-0.789 **	-0.665 **	-0.836 **	0.141	-0.462
Thai	-0.864 **	-0.865 **	-0.876 **	-0.374	-0.534 *	-0.661 **	-0.812 **	-0.106	-0.399
Napolitano	-0.897 **	-0.898 **	-0.869 **	-0.409	-0.750 **	0.315	-0.765 **	0.509 *	-0.465
<b>Roots</b>									
Sweet	0.757 **	-0.752 **	0.055	-0.092	0.733 **	-0.674 **	-0.531 *	-0.669 **	-0.405
Thai	0.622 **	-0.499 *	0.156	0.566 *	0.672 **	-0.197	-0.110	-0.241	-0.011
Napolitano	0.0025	-0.538 *	0.047	-0.077	0.648 **	-0.123	-0.137	-0.222	-0.389

\* and \*\* indicate significant correlation  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

#### 4. 葉身 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有率

対照区において、ナポレタノで最も含有率が高かった (Tab. 4-3) . いずれの品種においても、処理により過酸化水素含有率は低下傾向を示した. スイートにおいて、対照区に対し 10 mM で有意に低下し、ナポレタノでは 20 mM で有意に低下した. タイでは有意な低下はみられなかった.

#### 5. 葉身 MDA 含有率

対照区において、スイートおよびタイで含有率が高かったが、ナポレタノでは顕著に含有率が低かった (Tab. 4-3) . またスイートとタイは処理濃度の上昇に伴い、低下傾向を示し、20 mM では有意に低下したが、ナポレタノでは処理に関わらず含有率に変化はなかった.

#### 6. 葉身抗酸化酵素活性

CAT 活性は対照区において、タイで最も高い活性を示し、続いてナポレタノ、スイートという順に高かった (Tab. 4-3) . しかし処理濃度の変化による有意な差は今回みられず、スイートおよびタイにおいては処理濃度の上昇に伴い低下傾向を示した. SOD 活性はいずれの品種、いずれの処理においても有意な差および傾向はみられなかった. APX 活性はすべての処理に渡って、ナポレタノで活性が高い結果となったが、いずれの品種も処理による有意な変化はみられなかった. GR 活性はいずれの品種、いずれの処理においても有意な差および傾向はみられなかった.

**Table 4-3** Antioxidative response of three basil varieties under saline-alkaline conditions

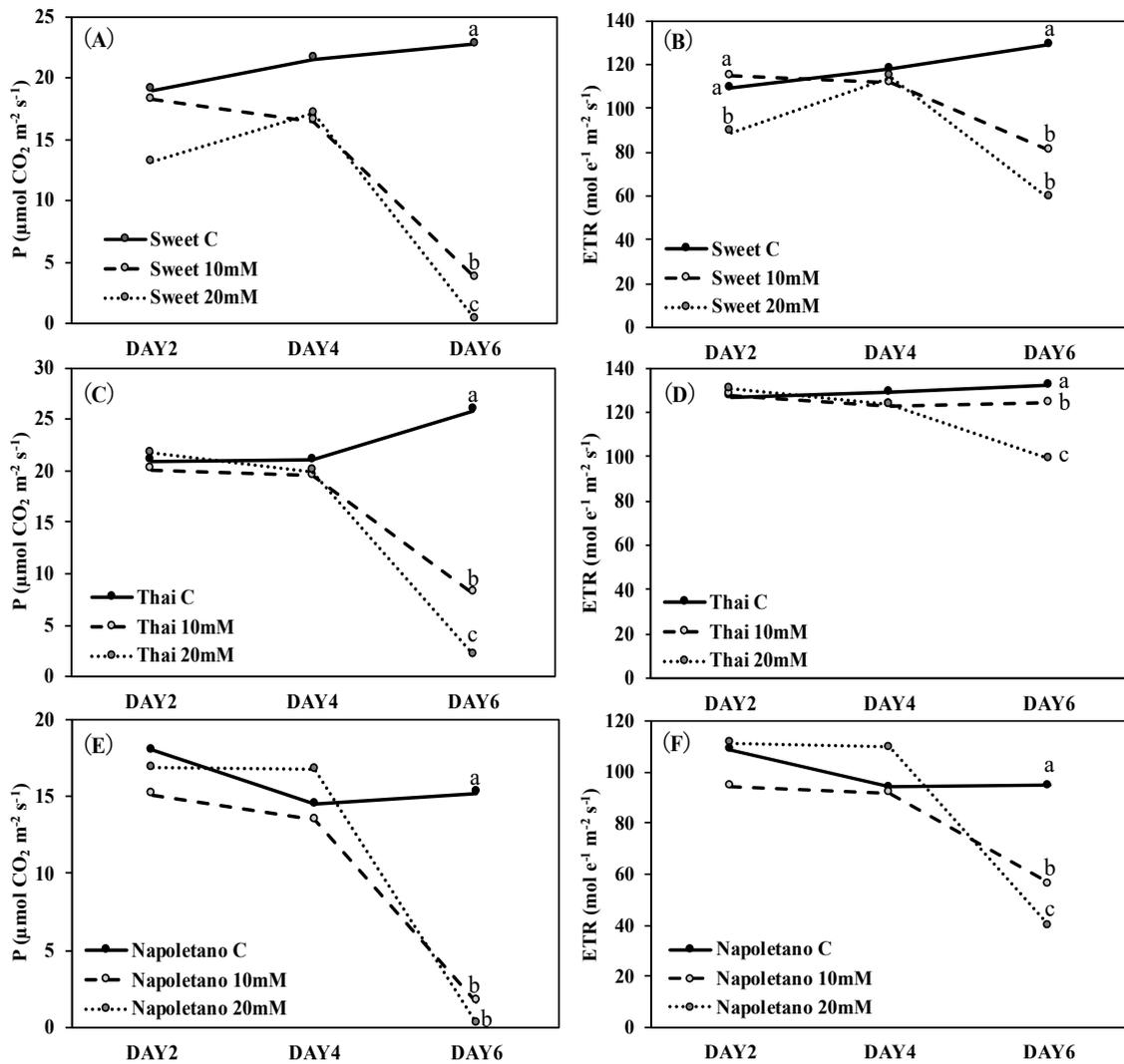
Varieties	Saline-alkaline treatment	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MDA	CAT activity	SOD activity	APX activity	GR activity
		(mg gDW <sup>-1</sup> )	(mmol gDW <sup>-1</sup> )	(mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mg protein <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	(Unit mg protein <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	(mmol ASC mg protein <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	(mmol NADPH mg protein <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
Sweet	C	3.978 ± 0.312 BC	402.845 ± 90.120 A	62.136 ± 13.669 BCD	7.278 ± 1.3 -	0.238 ± 0.010 AB	0.008 ± 0.001 -
	10mM	3.175 ± 0.082 DE	302.443 ± 24.345 AB	53.841 ± 12.820 CD	6.265 ± 1.9 -	0.299 ± 0.076 AB	0.009 ± 0.003 -
	20mM	3.040 ± 0.081 E	229.117 ± 24.743 BC	42.694 ± 9.161 D	8.761 ± 3.1 -	0.287 ± 0.041 AB	0.008 ± 0.001 -
Thai	C	3.643 ± 0.346 CDE	425.431 ± 117.707 A	103.253 ± 10.930 A	4.333 ± 1.1 -	0.300 ± 0.023 AB	0.011 ± 0.002 -
	10mM	3.211 ± 0.250 DE	315.504 ± 16.643 AB	95.602 ± 4.531 AB	3.638 ± 0.8 -	0.171 ± 0.061 B	0.010 ± 0.003 -
	20mM	3.116 ± 0.130 DE	229.637 ± 15.502 BC	80.973 ± 4.626 ABCD	8.587 ± 2.2 -	0.167 ± 0.024 B	0.013 ± 0.002 -
Neapolitano	C	4.964 ± 0.034 A	110.736 ± 11.090 C	87.785 ± 25.325 ABC	9.563 ± 1.8 -	0.438 ± 0.097 A	0.007 ± 0.001 -
	10mM	4.480 ± 0.273 AB	117.167 ± 13.865 C	103.543 ± 6.133 ABC	6.821 ± 0.8 -	0.433 ± 0.171 A	0.006 ± 0.003 -
	20mM	3.749 ± 0.148 CD	94.695 ± 3.304 C	68.834 ± 5.051 ABCD	7.115 ± 2.3 -	0.477 ± 0.032 A	0.012 ± 0.005 -

Each value represents the mean of three replications ± standard error. Different uppercase letters indicate significant differences across the three varieties for each parameter (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional salt; C (control: EC 0.18 dS m<sup>-1</sup>; pH 7.76), or NaHCO<sub>3</sub> : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = 1:1; 10 mM (EC 0.81 dS m<sup>-1</sup>; pH 9.80), 20 mM (EC 1.5 dS m<sup>-1</sup>; pH 10.02).

## 7. 光合成活性およびクロロフィル蛍光

光合成速度 ( $P$ ) について、対照区ではタイ>スイート>ナポレタノの順に光合成速度が高かった。3品種いずれも処理2日目および4日目において有意な変化はみられなかったが、6日目になると著しく低下し、20 mM で最も低下した (Fig. 4-7A, C, E) 。しかし比較的、タイは処理下で光合成速度を維持した。

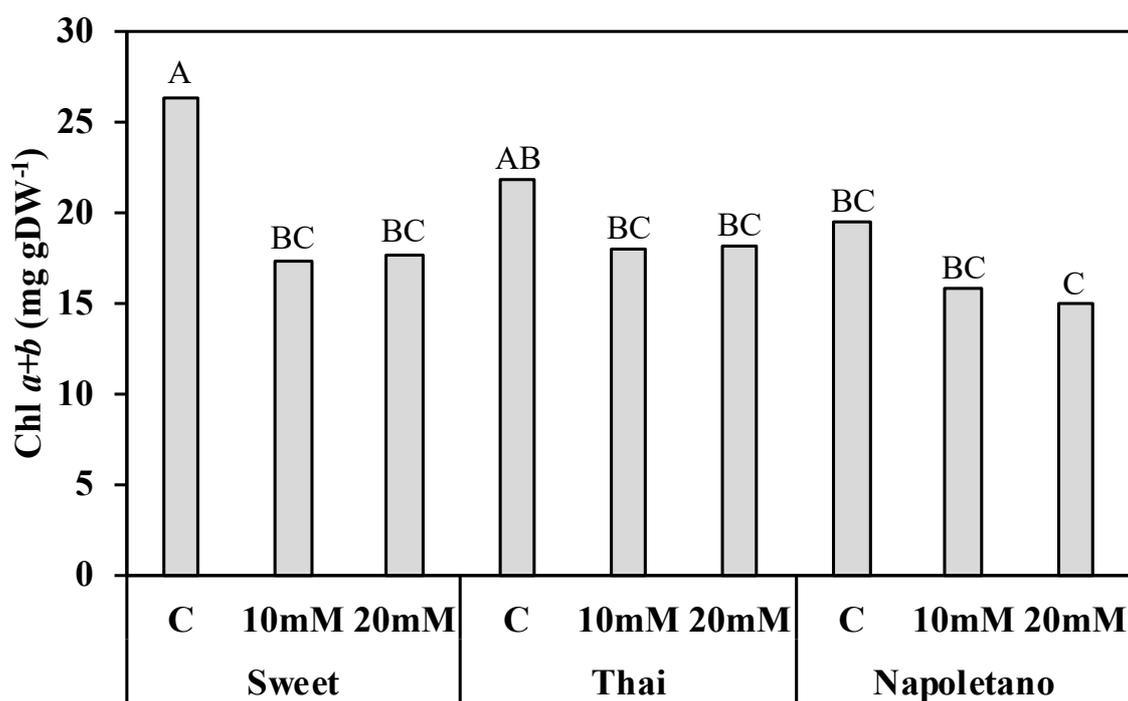
電子伝達速度 (ETR) について、対照区ではタイ>スイート>ナポレタノと光合成速度同様の順序となった (Fig. 4-7B, D, F) 。処理開始後、2日目にスイートの 20 mM で有意な低下を示したが、4日目には対照区と同じになった (Fig. 4-7B) 。6日目になるといずれの品種においても ETR が有意に低下したが、タイにおける低下の程度が最も小さかった (Fig. 4-7F) 。



**Figure 4-7** Variation with time in photosynthetic rate ( $P$ ) and electron transport rate (ETR) of three basil varieties under saline-alkaline conditions. Photosynthetic rate of (A); Sweet, (C); Thai, (E); Napoletano and, Electron transport rate of (B); Sweet, (D); Thai, (F); Napoletano were measured at DAY2, 4 and 6 after treatments were initiated. Different lowercase letters indicate significant differences in each parameter in the same day among the three treatments. All measurements were performed with three replications. Standard nutrient solution contained no additional salt; C (control: EC  $0.19 \text{ dS m}^{-1}$ ; pH 7.21), or  $\text{NaHCO}_3 : \text{Na}_2\text{CO}_3 = 1:1$ ; 10 mM (EC  $0.77 \text{ dS m}^{-1}$ ; pH 9.86), 20 mM (EC  $1.3 \text{ dS m}^{-1}$ ; pH 10.02).

## 8. クロロフィル (*a+b*) 含有率

いずれの品種においても、処理によって含有率が低下傾向を示したが、有意な低下を示したのはスイートのみであった (Fig. 4-8) . ただし 10 および 20 mM 区間における差はみられなかった.



**Figure 4-8** Chlorophyll (*a+b*) content of three basil varieties under saline-alkaline conditions. Different uppercase letters indicate significant difference across the three varieties (Duncan;  $P < 0.05$ ). Standard nutrient solution contained no additional salt; C (control: EC 0.19 dS m<sup>-1</sup>; pH 7.21), or NaHCO<sub>3</sub> : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = 1:1; 10 mM (EC 0.77 dS m<sup>-1</sup>; pH 9.86), 20 mM (EC 1.3 dS m<sup>-1</sup>; pH 10.02).

### 第3節 考察

乾物重および乾物重減退割合の結果からすると、塩性アルカリストレスに対する耐性はナポレタノ>タイ>スイートの順であった (Fig. 4-2, 4-3) . 耐性の低かったスイートにおいて、根の乾物重減退割合が3品種で最も大きく、タイについても5 mM から根において低下していた (Fig. 4-3) . つまり塩性アルカリストレスは根に大きな影響を及ぼしていたことがわかる. 一方、耐塩性が高かったナポレタノについては根の乾物重減少が葉身および茎のそれと同等であり、根への大きな影響はみられなかった. Nayak et al. (2008) はバジルをソーダ質土壌で栽培し、収量の高かった品種は根密度 ( $\text{mg m}^{-3}$ ) も高かったことを観察しており、今回のナポレタノの根乾物重維持と一致している.

葉身含水率の結果は、処理により低下傾向がみられたことから、葉身中の脱水状態が引き起こされていたと考えられる (Fig. 4-4) . 耐性が最も高かったナポレタノで葉身含水率への影響が最も大きかったが、常にナポレタノは葉身含水率が他2品種より高く、葉身の水分状態は比較的良好であったと考えられる.

養分吸収については各々興味深い結果であった. Na含有率について、第3章ではバジルは塩処理下 (Na50 および Na100) で Na を根 (あるいは茎) に蓄積させることで葉身への Na 移行を防いでいることを確認したが (Fig. 3-3A, 3-4A) , 今回の実験で最も感受性を示したスイートは15 mM で明白に葉身へ Na が流入したことから (Fig. 4-5A) , 10 ~ 15 mM の処理濃度で根の Na 蓄積が限界に達し、一方でタイおよびナポレタノは20 mM で茎および葉身へ Na が顕著に流入したことから、15 ~ 20 mM の処理濃度で根の Na 蓄積が限界に達する事が示唆された. Yang et al. (2008a) も *Suaeda glauca* (Bge.) で塩処理 (150 mM) に高 pH (9.93-9.97) が加わることで地上部 Na 含有率がさらに上昇したことを観察している. 今回、感受性品種のスイートで限界濃度がより低かったことから、塩性アルカリ耐性は根の Na 制御機能と深く関係していると考えられる.

Na が流入することによって物理化学的類似性を有する K は欠乏しやすくなる (Maathuis and Amtmann, 1999) . しかし第3章からバジルは塩処理下でも K を葉身へ選択的に輸送できることを確認しており (Fig. 3-3B, 3-4B) , そして今回

驚くことにアルカリ条件, 高 EC (25 mM) 下においても葉身 K 含有率は高く維持され, その K 輸送機能は失われなかった (Fig. 4-5B) . コムギやヒマワリにおいては, 地上部へ Na が流入すると同時に K 吸収が阻害されており, 塩性アルカリストレスは K を低下させる (Yang et al., 2008b; Shi and Sheng, 2005) . 一方で塩性アルカリ耐性を有する *Suaeda glauca* (Bge.) は塩性アルカリ条件下でむしろ地上部 K 含有率が上昇し (Yang et al., 2008a) , ソルガムの耐性品種は K 含有率の維持に優れた (Huang, 2018) . よって今回, 塩性アルカリ条件下でのバジルの葉身 K 含有率の維持は, 塩性アルカリストレスに対する耐性機構の一つであったと考えられる.

一方で, Ca は 3 品種ともに Na に対して明らかに反対の動態をみせた. 処理濃度に応じて葉身および茎 Na 含有率が上昇すると, 同部位の Ca 含有率は低下し, 根 Na 含有率が低下すると, 根 Ca 含有率は上昇した (Fig. 4-5A, C) . 実際, 3 品種すべての部位において Na 含有率と Ca 含有率との間に負の相関がみられ (Tab. 4-2) , Na と Ca は明らかな競合関係にあった. Ca はストレスシグナルにおいてセカンドメッセンジャーの役割を担う重要な元素であり, 植物が環境ストレスにさらされると根の細胞質 Ca イオン濃度が直ちに上昇し (Wilkins et al., 2016) , 波状のように Ca イオンが各部位へ伝播する (Xiong et al., 2014) . そして Ca を受容したタンパク質複合体はストレス応答 (Na 排出, Na/K 比調整, Na 区画など) を開始する (Manishankar et al., 2018) . 今回 3 品種とも根 Ca 含有率は処理が厳しくなるにつれ上昇し, 特にナポレタノで 25 mM でもさらに上昇していた (Fig. 4-5C) . つまり塩性アルカリストレスが厳しくなるにつれ, よりストレスシグナルを強く発信しようとしていた可能性が考えられ, ナポレタノは最も厳しい処理 ; 25 mM (EC 1.81 dS m<sup>-1</sup>, pH 10.05) でもストレスに応答しようとしていたのかもしれない.

また Mg 含有率も品種間差がみられ, スイートの葉身において 15 mM から明らかに Mg 含有率が低下し, Na との競合が考えられた (Fig. 4-5D) . Mg は Rubisco が CO<sub>2</sub> を固定する際に重要な役割を果たす元素であり (Andersson, 2008) , クロロフィルの中心元素でもある. よって Mg 欠乏がスイートの光合成に影響を与

えていた可能性が考えられる。

Pは処理(5 mM)下の3品種すべての葉身において低下していた(Fig. 4-5E)。Pは植物体内において様々な生理的機能を担う重要な元素であり、光合成反応を進行させるためにはリン酸の安定供給が必須である(Facchinelli and Weber, 2011)。よって今回、葉身へのリン酸供給が十分でなかった可能性を考えると、光合成反応が遅延していた可能性が考えられる。しかしながら葉身 P 含有率は処理濃度には依存せず、アルカリ条件下で対照区に対し一定の低含有率を示していた(Fig. 4-5E)。つまり塩濃度(EC)変化による影響はなく、アルカリによる影響で葉身 P 含有率が低下し、生育に影響を及ぼしていたと考えられる。しかし処理濃度の上昇に伴い減少した乾物重については、P が要因になっていたとは考えにくい。またそれは品種間で共通していたことから、品種間の耐塩性の違いに関係はしなかったと思われる。

植物生育に欠かせない N 源である  $\text{NO}_3^-$  は  $\text{H}^+$  が少ないアルカリ条件下では植物体内へ共輸送されにくくなる(McClure et al., 1990)。しかし3品種に共通して葉身  $\text{NO}_3^-$  含有率は処理による影響がなく、その分、根および茎  $\text{NO}_3^-$  含有率が低下傾向を示していた(Fig. 4-5F)。このことから培地からの  $\text{NO}_3^-$  吸収は確かに抑制されつつも、根および茎から輸送される  $\text{NO}_3^-$  によって葉身中での N 欠乏は生じていなかったと考えられる。

アルカリ条件において不可給化してしまう Fe 含有率は、3品種とも処理濃度の増加に伴い根 Fe 含有率が上昇する傾向にあった(Fig. 4-6A)。つまりバジルは不可給化されているはずの Fe を根内には吸収できていたことを意味する。アルカリストレス下で根 Fe 含有率が高くなることは他でも報告されており、高 pH によって根アポプラストがアルカリ化され、根シンプラストに Fe を取り込めないことで地上部への Fe 供給が低下し、地上部 Fe 含有率が低下する(Mengel, 1994)。おそらく同様なことが今回のバジル3品種でも起きていたと考えられる。ただし、耐性を有したナポレタノで葉身 Fe 含有率は有意には低下しておらず(Fig. 4-6A)、クロロフィル含有率の低下の程度もスイートのそれと比較して小さい(Fig. 4-8)。つまりナポレタノはスイートより Fe を地上部へ供給する能

力が高かったと考えられる。本来、植物は葉身が Fe 欠乏を感知すると、根にシグナルが発信され、根での Fe 吸収応答が発現される (Enomoto and Goto, 2008) 。しかしそこにアルカリストレスが加わると葉身からの Fe 欠シグナルが伝達されなくなり、結果として高 pH を伴う Fe 欠条件下では十分な Fe 欠乏応答ができない (Hsieh and Waters, 2016) 。今回、根保護に優れたナポレタノは高 pH による根アポプラストのアルカリ化を抑え、地上部への Fe 供給を比較的維持できていたのかもしれない。ただし、葉身 Fe 含有率は処理濃度の増加に依存しなかったため、Fe は処理濃度の増加に伴う乾物重減少の原因ではなかった。

アルカリ条件下によって不可給化が懸念される Mn で品種間差がみられた。Mn は細胞壁の主要成分の一つであるリグニン合成に必要な元素であり (Chen et al., 2019) , Mn 欠乏を呈する植物の根リグニン含有率は低下することが知られている (Brown et al., 1984) 。スイートおよびタイで処理濃度の上昇に伴い葉身および茎 Mn 含有率が低下したが、根 Mn 含有率は上昇していた (Fig. 4-6B) 。その一方、ナポレタノでは葉身 Mn 含有率に有意な変化はなく (10 mM を除く) , 茎において顕著に低下するも、根においては 25 mM で最も高い Mn 含有率を示していた。リグニンはアルカリに可溶性であり (Chen et al., 2017) , 細胞壁の内側に存在する細胞膜はタンパク質とリン脂質で構成されているためアルカリによって変性してしまう。よってアルカリによる根の損傷を抑えるために根 Mn 含有率を高めようとした可能性が考えられる。また、ナポレタノの根乾物重の減少が他 2 品種より小さかったのは、根 Mn 含有率をより高められたことでリグニン合成を促進して細胞壁構造を維持し、根の細胞膜を保護した結果であったのかもしれない。

また Zn もアルカリ条件 (pH 7.7 以上) になると水酸化亜鉛となり不可給化するが、今回葉身 Zn 含有率がスイートでのみ処理によって有意に低下した (Fig. 4-6D) 。Zn は様々な酵素の構成要素として含まれ、窒素代謝、炭水化物代謝、タンパク質合成など重要な生理反応に関与している (Hafeez et al., 2013) 。他 2 品種では葉身 Zn 含有率の低下がみられなかったことから塩性アルカリストレスに対する品種間差の一つであったかもしれない。

抗酸化応答においては、葉身  $\text{H}_2\text{O}_2$  および MDA 含有率が処理によって有意に低下する結果となり、酸化傷害は認められなかった (Tab. 4-3) . 第 3 章の塩処理下では葉身  $\text{H}_2\text{O}_2$  および MDA 含有率に変化はなかったことから (Fig. 3-8A, B) , 今回の塩性アルカリ処理で抗酸化応答がより活性化されていた可能性が考えられる. しかし今回, 処理濃度の上昇に伴い (ナポレタノ 10 mM を除く) , CAT 活性は低下してしまっていた (Tab. 4-3) . これは高 pH による影響が考えられるが, Zhang and Mu (2009) も高 pH 条件下で CAT 活性が低下したことを報告している. CAT は  $\text{H}_2\text{O}_2$  を  $\text{H}_2\text{O}$  へと分解する抗酸化酵素であるが, この反応は Fe が触媒しており, 今回葉身 Fe 含有率が低下していたことを考慮すると, CAT は Fe 不足のために活性が低下していたのかもしれない (Mohamed and Aly, 2004) . しかし MDA 蓄積はみられなかったことから脂質過酸化は生じておらず, 失活してしまった CAT に代わって別の抗酸化応答システムが機能していた可能性が示唆される. 他 3 種類の抗酸化酵素 (SOD, APX, GR) の活性には特徴的な傾向がみられなかったことから (Tab. 4-3) , 別の抗酸化酵素あるいは非酵素的抗酸化応答によって ROS の発生および酸化ストレスを未然に防いでいたのかもしれない.

光合成について, 処理開始から 4 日目まで光合成およびクロロフィル蛍光への影響はなく, 6 日目に影響がみられた (Fig. 4-7) . これは植物体内で徐々に生理的攪乱 (イオンストレス) が引き起こされた結果, 6 日目に光合成環境を維持するために適切な生理学的条件を満たせなくなったと推測される. クロロフィル含有率 (7 日目採取) は処理によりスイートで有意に低下し, タイとナポレタノで低下傾向を示していたことから (Fig. 4-8) , 光合成色素の低下も光合成速度低下の要因の一つになっていたと考えられる. しかし, タイは他 2 品種と比較して光合成速度および電子伝達速度への影響の程度が小さく, 塩性アルカリストレスに対して光合成機能を保護することに優れていた可能性が示唆される.

本実験の結論として, 塩性アルカリストレスは非アルカリ条件下の塩性ストレスによって発揮されるバジルの耐塩性機構を部分的に機能不全に陥らせることがわかった. 高 pH による影響は特に根で顕著であったが, 優れた耐性を発揮したナポレタノではその限りでなく, 高 pH, 高 EC 下でも根 Mn を高めること

で、ある程度根を保護できていた可能性が示唆された。3 品種に共通して根での Na 蓄積、葉身への Na 移行抑制機能が高 pH 高 EC 下で失われ、感受性品種ほど、より低い EC から影響が生じ始めると考えられた。バジルの耐塩性において重要な葉身 K 輸送は高 pH による影響を受けず、高 EC 下でもその機能が維持された。一方、Ca は塩濃度上昇に伴い地上部への移行が抑制されたが、最も根 Ca を蓄積したナポレタノでは葉身 Ca を比較的維持し、厳しいストレス下でも Ca ストレスシグナルによってより塩応答を発現していたのかもしれない。また Mg および Zn はスイートでのみ低下し、耐塩性の違いに関与していたかもしれない。その他無機元素は高 pH 下で吸収低下がみられたが、高 EC による影響はみられず、品種間の塩性アルカリ耐性の違いを説明する要因とはならなかった。また光合成および抗酸化応答においても品種間差と塩性アルカリ耐性との関係性はみられず、主に養分吸収および輸送能の違いが品種間の塩性アルカリ耐性の違いを生んでいると考えられた。

#### 第4節 要約

耐塩性を異にするバジル3品種（スイート；感受性，タイおよびナポレタノ；耐塩性）に塩性アルカリ処理（0～25 mM, pH 7.76～10.05）を施し，先行研究の塩処理下（Na50 および 100）で発揮されたバジルの耐塩性機構が高 pH 下でどのような影響を受けるのか調査した．光合成速度および電子伝達速度は栽培期間中の処理開始 2, 4, 6 日目に測定し，7 日目にクロロフィル含有率を測定．8 日目に全植物体を採取し，成長および水分状態（FW, DW, 含水率），無機元素（Na, K, Ca, Mg, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, P, Fe, Mn, Cu, Zn），抗酸化応答（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA, 抗酸化酵素 4 種；CAT, SOD, APX, GR）の分析を行った．乾物重の結果から，ナポレタノ＞タイ＞スイートの順に耐性が高かった．塩性アルカリ処理は根に大きな影響を及ぼしたが，最も耐性を示したナポレタノは他 2 品種と比較して根の乾物減少が小さかった．細胞壁の構成要素の一つであるリグニンの生合成に必要な Mn がナポレタノの根で高かったことから，アルカリ条件下での根保護に Mn が関与したかもしれない．またバジルは根あるいは茎で Na を蓄積し，葉身への Na 移行を防いでいるが，高 pH による影響でその機能が失われ，感受性を示したスイートで低塩濃度から葉身への Na 流入が生じていた．一方，葉身 K 含有率は 3 品種に共通して低下せず，K 吸収は高 pH による影響を受けないことがわかったが，3 品種の耐性の違いを生む要因ではなかった．また葉身 P, Fe, Mn, Zn 含有率は高 pH 下で一定濃度低下するものの，処理濃度による変化はなく，高 EC 下の乾物重減少をこれらの養分吸収からは説明することができなかった．Ca は Na とすべての部位において負の相関関係があり，Na と Ca は明らかな競合関係にあった．根 Ca の蓄積はナポレタノで最も高く，Ca によるストレスシグナルをより強く地上部へ伝えていた可能性が考えられた．またスイートでのみ葉身 Mg が高 pH, 高 EC 下で低下しており，光合成色素合成や Rubisco 活性への影響が考えられた．また塩性アルカリ条件下で CAT は不活性化したが，3 品種とも ROS 発生および脂質過酸化はむしろ抑えられており，別の抗酸化応答システムの存在が示唆された．しかし品種間の耐塩性の違いに抗酸化応答はあまり関与していないようであった．主に養分吸収および輸送の差が塩性アルカリ耐性に関与していると考えられる．

## 第 5 章

### 総合考察

世界の耕作面積の内、23 %が土壌塩性化、37 %が土壌ソーダ質化による塩類化の影響を受けている。塩害は作物生産において深刻な収量減少を引き起こしており、不適切な灌漑や土壌管理により塩類化が進むと今後さらなる影響が懸念される。よって塩ストレス（塩性およびアルカリストレス）に対する各種植物の応答および生育への影響の把握と、耐塩性に優れる植物の各々の耐塩性機構の解明は急務である。耐塩性機構の解明によって、塩害に強い候補作物の選定方法や塩ストレスに強い種および品種の育種技術を発展させることができる。

よって本研究においては、高い抗酸化能を有し、様々な分野で需要のあるシソ科ハーブ類の耐塩性について第 2 章で種間比較し、耐塩性機構の解明を試みた。本実験においてどのような特徴を持つシソ科ハーブが耐塩性を有し、また塩に感受性を示すのか明らかにした。この実験ではバジル、セージ、タイム、オレガノを代表的なシソ科ハーブ類として耐塩性を調査し、最も耐塩性を示したバジルは栄養面（茎根 Na 保持および葉身 K 輸送）と抗酸化面（CAT 活性化）の両面から耐塩性を発揮していた。また感受性を示したタイムおよびオレガノはそれぞれ抗酸化応答を示したが、葉身への多量な Na 流入に伴う養分欠乏あるいは塩誘導型酸化ストレスによって乾物生産が著しく減少したと考えられた。

第 3 章では、第 2 章で明らかとなったバジルの耐塩性機構を耐塩性の異なるバジル品種（感受性品種；スイート、耐塩性品種；ナポレタノ）間で比較調査し、耐塩性バジル品種が持つ特徴を明瞭化した。耐塩性品種（ナポレタノ）は Na50 処理下で顕著に耐塩性を発揮し、第 2 章で明らかとなっていた葉身への K 輸送がより優れていた。また根における Na 蓄積が耐塩性品種でより顕著であり、葉身含水率の維持に大きく貢献していたと考えられた。一方、乾物生産を担う光合成について、乾物重への影響と光合成速度への影響は傾向が一致しておらず、

光合成速度が維持されても乾物重は減少することが確認された。つまり塩処理による乾物重への影響は光合成速度変化と直接的な関係性になかった。考えられる要因としては浸透圧調節物質の合成など、生育する代わり生存するために光合成同化産物を利用し、結果として乾物生産は減少した可能性が挙げられる。また耐塩性品種は全体として電子伝達速度、MDA（脂質過酸化の指標）が低く、CAT は処理により感受性品種で著しく活性化した時と同等以上の活性を示したことから、優れた抗酸化応答が耐塩性を高めていた可能性が示唆された。

第4章では、第3章で明らかにしたバジルの耐塩性機構が高 pH および高 EC 下でどのような影響を受けるのかについて調査した。この実験では耐塩性に優れた耐塩性品種（タイ）を加えた3品種間で調査を行い、耐塩性品種および感受性品種間の違いがより明確になるようにした。耐性の順序は乾物生産の観点から、ナポレタノ>タイ>スイートとなり、耐性のある品種ほど根の乾物重維持に優れていた。細胞壁の構成成分はアルカリに可溶であり、細胞壁の損傷は細胞膜への直接的なダメージを意味する。よって根を保護する機能はアルカリ耐性の一つとして考えられる。今回の実験ではどのように根機能を保護していたかまでは調査しなかったが、細胞壁の構成成分であるリグニンを生合成する際に必要な Mn の根含有率が耐塩性品種で高かったことと関連している可能性がある。第3章の実験で葉身 Na 含有率は低い値を示し、第4章の高 pH、低 EC 下と同様な Na 含有率を示していたが、高 pH、高 EC になると Na は葉身へ流入し、感受性品種でより低い濃度から顕著に流入することがわかった。一方、葉身 K 含有率は一貫して3品種とも塩性アルカリストレスによって低下せず、高 pH 下で塩性ストレスを受けても K 吸収あるいは葉身への K 輸送機能は失われないことが明らかとなった。高 pH によって不可給化してしまう元素群のうち、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、P、Fe、Zn は葉身において一定濃度含有率が低下するものの、EC 変化による影響はなく、高 EC 下の乾物重減少の説明要因にはならなかった。一方 Ca は Na とすべての部位において負の相関関係があり、Na と Ca は明らかな競合関係にあった。しかしながら根 Ca は3品種で上昇しており、25 mM のナポレタノで最も高く、Ca によるストレスシグナルを強く地上部へ伝えることでストレス応答をより発

現していた可能性が示唆された。また Mg についてスイートの葉身含有率のみ高 pH 下で一定濃度有意に低下し、第 3 章の塩性ストレス（非アルカリ処理）下では葉身 Mg 含有率は維持されていたことから、これはアルカリストレスによる影響であり、3 品種間の品種間差であったと考えられる。Mg と関係のあるクロロフィル含有率はスイートでのみ有意に低下し、クロロフィル合成の観点から Mg 欠乏がスイートの光合成速度に影響していた可能性が考えられる。抗酸化応答について第 2 章、第 3 章で重要性が示唆された CAT 活性はアルカリ条件下では全く異なる傾向を示した。塩性ストレス（非アルカリ条件）下では高い CAT 活性がみられたが、アルカリ条件における塩性ストレス下ではその活性が著しく低下した。これは一つに CAT がタンパク質で構成されている抗酸化酵素であるが故にアルカリによって酵素タンパクが変性し、失活した可能性や、 $H_2O_2$  の分解の際に触媒として必要な Fe がアルカリ条件下では含有率が低下したため、CAT 活性が低下した可能性が考えられる。その一方で  $H_2O_2$  や MDA は処理下で低下傾向を示し、失活してしまった CAT とは別の抗酸化応答システムにより抗酸化応答がなされていた可能性が考えられた。

以上をまとめると、バジルは代表的なシソ科ハーブ類の中で耐塩性に優れ、根（あるいは茎）で Na を蓄積させて葉身に K を積極的に輸送させる養分吸収と塩誘導性酸化ストレスに対して CAT 活性を著しく高める抗酸化応答が耐塩性を支えていた。そしてその両面の耐塩性機構は耐塩性品種においてより顕著に機能しており、根における Na 蓄積、葉身への K 輸送が葉身含水率を維持させ、著しく CAT を活性状態にさせることが塩ストレス下の重要な耐塩性機構であると明らかになった。これらの耐塩性機構は塩性アルカリ条件にさらされると、感受性品種ほど根 Na 蓄積機能が高 EC 下で失われやすいことがわかり、耐塩性品種（ナポレタノ）のように根への高 pH 傷害を抑えることが、アルカリ条件下での高 EC に対する耐性を高めることにつながると考えられる。バジルの耐塩性品種間差は光合成能や抗酸化応答よりも主に養分吸収の違いによって耐塩性が異なっている可能性が高い。

## 第 6 章

### 摘要

塩害は世界の作物生産において重大な影響をもたらしており、耕作面積として利用されている面積の内、23 %が塩性化し、37 %がソーダ質化していると推定されている。生育環境の塩性化によって植物は塩ストレス（浸透圧ストレスおよびイオンストレス）を被り、ソーダ質化による高 pH によってアルカリストレスを被る。また高 EC、高 pH 環境では同時に双方のストレス（塩性アルカリストレス）の影響を受け、深刻な生理障害がもたらされる。植物はこれら環境ストレスに対して様々な塩応答を示すが、抗酸化応答は耐塩性と深い関係にあると言われており、中でもシソ科ハーブ類は優れた抗酸化能を有する。しかしながら塩害によるシソ科ハーブ類の収量減退が懸念されており、どのような特徴を有するシソ科ハーブが耐塩性に優れているのかを調査した種間比較は意外にも少ない。そこでまず始めに代表的なシソ科ハーブ 4 種（バジル、セージ、タイム、オレガノ）の種間比較を行い、養分吸収および抗酸化応答の観点からシソ科ハーブ類の耐塩性機構の理解を試みた。

結果としてバジル $\geq$ セージ $>$ タイム $>$ オレガノの順に耐塩性が高く、バジルは優れた養分吸収および抗酸化応答を有していた。セージは抗酸化応答に優れ、感受性を示したタイムおよびオレガノは抗酸化応答は示すものの、養分吸収における脆弱性（葉身 Na 流入）が耐塩性を低くしていたことがわかった。

次に最も耐塩性に優れたバジルの耐塩性機構をより詳細に調査するため、耐塩性を異にするバジル品種間（スイートおよびナポレタノ）で養分吸収、抗酸化応答、そして光合成活性についても測定解析を行い、耐塩性バジル品種が有する耐塩性機構をより明瞭なものとした。バジルが有する根 Na 蓄積能は耐塩性品種でより顕著であり、また葉身 K 含有率は感受性品種の 2 倍近く高く、優れた K 輸送能を有していた。またこれらの働きによって葉身含水率が維持されていた

と考えられた。一方で Na50 下の光合成活性は両品種間で低下しなかったにも関わらず、感受性品種でのみ有意な乾物重減少がみられ、葉身含水率の低下もみられていたことから、光合成によって得られた同化産物は生育に使われず、浸透圧調整物質の合成などストレス環境に適応するための生理反応に利用されていた可能性が考えられた。また両品種において塩処理下の CAT は著しい活性化あるいは高い活性を示し、塩誘導性酸化ストレスによる傷害は受けていないようであったが、両品種間における耐塩性の差を説明する要因にはならなかった。

上記で明らかとなったバジルの耐塩性機構（根 Na 蓄積，葉身 K 輸送，CAT 活性）が塩性アルカリ条件下でどのような影響を受けるのか調査するため，耐塩性を有するバジル品種（タイ）を新たに加えた 3 品種間で比較調査を行った。耐塩性の順は，ナポレタノ > タイ > スイートとなり，感受性品種ほど塩性アルカリストレス下で根 Na 蓄積機能が失われやすく，一方で耐塩性品種の根のバイオマス減少は小さかったことから根保護機能が塩性アルカリストレス耐性を高めていると示唆された。一方 K 輸送機能は高 pH，高 EC 下でも失われず，バジル 3 品種に共通する優れた耐性機構であったと考えられる。また高 pH によって吸収が抑制されやすい元素群（NO<sub>3</sub><sup>-</sup>，P，Fe，Zn）は 3 品種に共通して一定濃度低下したが，高 EC 下の 3 品種間の耐塩性差を説明する要因とはならなかった。一方で Ca と Na は全部位で負の相関がみられ，明らかな競合関係にあったが，根 Ca は上昇しており，ナポレタノで最も根 Ca 蓄積がみられ，葉身 Ca の低下程度も小さかったことから，Ca ストレスシグナルによりナポレタノは強く塩応答を発現していたのかもしれない。また光合成速度および抗酸化応答は塩性アルカリストレスによって低下したが，耐性の差とつながる品種間差はみられず，品種間の塩性アルカリ耐性の違いは主に養分吸収の違いによるところが大きいと考えられた。

## 第 7 章

### Summary

Salt damage has a significant impact on global agricultural production. Of the area used for cultivation, 23 % is estimated to be salinized and 37 % to be sodificated. Plants suffer from salt stress (osmotic stress and ionic stress) due to salinization, and from alkaline stress due to high pH by sodification. Also, the both stresses (saline-alkaline stress) simultaneously occur and cause serious physiological disorders. Plants show various salt responses to these environmental stresses, and the antioxidative response is said to be closely related to salt tolerance, in particular, Labiatae herbs have excellent antioxidative capacity. However, there is concern about the yield loss of Labiatae herbs due to salt damage, and surprisingly, there are few studies of interspecific comparison that what kind of characteristics in Labiatae herbs would contribute to high salt tolerance.

Therefore firstly, four typical Labiatae herbs (basil, sage, thyme, oregano) were compared, and salt tolerance mechanisms of Labiatae herbs from the viewpoint of nutrient uptake and antioxidative response were aimed to be understood. As a result, the salt tolerance was higher in the order; basil  $\geq$  sage > thyme > oregano. Basil had great nutrient uptake and antioxidative response, and sage showed high antioxidative response. Although thyme and oregano also showed antioxidative response, the vulnerability in nutrient uptake (Na inflow into leaves) reduced salt tolerance.

Secondly, in order to clarify the salt tolerance mechanism of salt-tolerant basil variety, analysis of nutrient uptake, antioxidative response, and photosynthetic activity between basil varieties (Sweet and Napoletano) with different salt tolerance were performed. The root Na accumulation capacity of basil was more prominent in salt-tolerant variety, and the leaf K content was nearly twice that of sensitive variety suggesting great K transport capacity. It was considered that the leaf water content was maintained by these actions.

On the other hand, the photosynthetic activity under Na50 did not decrease between the two varieties. Regardless, a significant decrease in dry weight was observed only in salt-sensitive variety, and a decrease in leaf water content was also observed. Possibly, Assimilation products obtained by photosynthesis were not used for growth, but for osmolyte synthesis to adapt to stress environment. In both varieties, CAT under salt treatment showed significant activation or high activity, and did not appear to be damaged by salt-induced oxidative stress. However, it did not explain the difference in salt tolerance between the two varieties.

Thirdly, in order to investigate how the salt tolerance mechanisms (root Na accumulation, leaf K transport, CAT activity) of basil are affected under saline-alkaline condition, A comparative survey was conducted between the three varieties including the other basil variety (Thai) with high salt tolerance. The saline-alkaline tolerance was in the order; Napoletano > Thai > Sweet. Sensitive varieties were more likely to lose a function of root Na accumulation under saline-alkaline stress. It was suggested that the root-protecting function increased the tolerance to salt-alkaline stress because the reduction of root biomass of the tolerant variety was small. On the other hand, the K transport function was not lost even under high pH and high EC in all varieties, suggesting a common saline-alkaline tolerant system among three varieties. Some elements ( $\text{NO}_3^-$ , P, Fe, Zn), whose uptake is supposed to be suppressed by high pH, decreased in certain concentrations in common to three varieties, however it did not explain the difference in salt tolerance between varieties. On the other hand, Ca and Na were negatively correlated at all parts, and there was a clear competitive relationship. However, root Ca was increased in three varieties, especially in Napoletano even under the toughest condition. Napoletano might have strongly expressed a salt response because of Ca stress signal. Photosynthetic rate and antioxidative response (CAT) were decreased by saline-alkaline stress in three varieties, but there was no difference between varieties that led to difference of salt tolerance level. We assume that the difference in salt tolerance between varieties was mainly due to the difference in nutrient uptake.

## 謝 辞

本研究を学位論文審査に推薦していただきました，鳥取大学農学部 山田智教授に心より御礼申し上げます。計画段階から惜しみないお力添えを頂き，本論文をとりまとめるにあたっては多大なるご指導を頂戴しましたこと，心から感謝致します。また学位審査会に先立ちまして本論文をご校閲頂き，ご指導を頂戴しました，鳥取大学農学部 山本定博教授に厚く御礼申し上げます。そして本研究を遂行するにあたり，大変多くの有益なご指摘とご助言を賜り，直接ご指導を頂きました，島根大学生物資源科学部 増永二之教授に心より感謝申し上げます。

本研究の重要項目である光合成測定において，機械装置の使用方法を炎天下の中ご指導下さいました，鳥取大学農学部 辻涉助教授に心より感謝致します。また本研究のテーマであるシソ科ハーブ類の耐塩性について親身にご指導くださいました，CIBNOR Bernardo Murillo-Amador 教授に心から感謝致します。そして本論文の執筆に際し，図表の示し方や表現方法について大変有益なご助言を頂戴し，親身にご指導を頂きました鳥取大学農学部 SATREPS プロジェクト研究員 山田美奈様に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり，試料分析の補助を快く引き受けてくれた植物栄養学研究室の皆様や，励ましの言葉で常に支えてくださった方々，応援し続けてくれた同窓生の皆様に，心から感謝申し上げます。

最後に，勉学に集中できるよう財政面から力強い支援をしてくださり，精神面においても，叱咤激励の言葉で背中を押してもらいながら，長年に渡り温かく見守ってくれた，父 一男，母 勢津子に心から感謝致します。

本当にありがとうございました。

## 引用文献

- Abogadallah, G. M. 2010. Insights into the significance of antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling & Behavior* 5(4): 369-374.  
<https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10873>
- Al-Karaki, G. N., R. Hammad, and M. Rusan. 2001. Response of two tomato cultivars differing in salt tolerance to inoculation with mycorrhizal fungi under salt stress. *Mycorrhiza* 11: 43-47.
- Amor, N. B., A. Jiménez, W. Megdiche, M. Lundqvist, F. Sevilla, and C. Abdelly. 2006. Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima*. *Physiologia Plantarum* 126: 446-457.
- Andersson, I. 2008. Catalysis and regulation in Rubisco. *Journal of Experimental Botany* 59(7): 1555-1568. doi:10.1093/jxb/ern091
- Attia, H., N. Karray, A. Ellili, N. Msilini, and M. Lachaâl. 2009. Sodium transport in basil. *Acta Physiol.* 31: 1045-1051.
- Azevedo Neto, A. D., J. T. Prisco, J. Enéas-Filho, J. V. R. Medeiros, and E. Gomes-Filho. 2005. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt- stress acclimation in maize plants. *Journal of Plant Physiology* 162: 1114-1122.
- Bhattacharjee, S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science* 89 (7): 1113-1121.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annu. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown, P. H., R. D. Graham, and D. J. D. Nicholas. 1984. The effects of manganese and nitrate supply on the levels of phenolics and lignin in young wheat plants. *Plant and Soil.* 81: 437-440.
- Çamlica, M., and G. Yaldiz. 2017. Effect of Salt Stress on Seed Germination, Shoot and Root Length in Basil (*Ocimum basilicum*). *International Journal of Secondary Metabolite* 4(3): 69-76. <https://doi.org/10.21448/ijsm.356250>
- Cataldo, D.A., M. Haroon, L. E. Schrader, and V. L. Youngs. 1975. Rapid, colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6(1): 71-80. DOI: 10.1080/00103627509366547
- Chan, E. W. C., L. Q. Kong, K. Y. Yee, W. Y. Chua, and T. Y. Loo. 2012. Antioxidant and antibacterial properties of some fresh and dried Labiatae herbs. *Free Radicals and Antioxidants* 2(3): 20-27. DOI: 10.5530/ax.2012.3.3
- Cheeseman, J. M. 1988. Mechanisms of Salinity Tolerance in Plants. *Plant Physiology* 87: 547-550. <https://doi.org/10.1104/pp.87.3.547>
- Chen, A., S. Husted, D. E. Salt, J. K. Schjoerring, and J. P. Persson. 2019. The Intensity of Manganese Deficiency Strongly Affects Root Endodermal Suberization and Ion Homeostasis. *Plant Physiology* 181: 729-742. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00507>
- Chen, W. J., S. Yang, Y. Zhang, Y. Y. Wang, T. Q. Yuan, and R. C. Sun. 2017. Effect of

- alkaline preswelling on the structure of lignins from Eucalyptus. *Scientific Reports* 7(45752): 1-10. DOI: 10.1038/srep45752
- Cuvelier, M. E., H. Richard, and C. Berset. 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73(5): 645-652.
- Enomoto, Y., and F. Goto. 2008. Long-distance signaling of iron deficiency in plants. *Plant Signaling & Behavior* 3(6): 396-397. DOI: 10.1007/s00425-007-0596-x.
- Facchinelli, F., and A. P. M. Weber. 2011. The metabolite transporters of the plastid envelope: an update. *Frontiers in Plant Science* 2(50): 1-18. doi: 10.3389/fpls.2011.00050
- Farhat, N., A. Elkhouni, W. Zorrig, A. Smaoui, C. Abdelly, and M. Rabhi. 2016. Effects of magnesium deficiency on photosynthesis and carbohydrate partitioning. *Acta Physiol Plant* 38: 145. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2165-z>
- Farooq, M., T. Aziz, S. M. A. Basra, M. A. Cheema, and H. Rehman. 2008. Chilling Tolerance in Hybrid Maize Induced by Seed Priming with Salicylic Acid. *J. Agronomy & Crop Science* 194: 161-168. doi:10.1111/j.1439-037X.2008.00300.x
- Ghanem, M. E., A. Albacete, C. Martines-Andujar, M. Acosta, R. Romero-Aranda, I. C. Dodd, S. Lutts, and F. Perez-Alfocea. 2008. Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Exp. Bot.* 59: 3039-3050.
- Gomes, M. A. C., M. S. Suzuki, M. Cunha, and C. F. Tullii. 2011. Effect of salt stress on nutrient concentration, photosynthetic pigments, proline and foliar morphology of

*Salvinia auriculata*. *Acta Limnologica* 23 (2): 164-176.

Hafeez, B., Y. M. Khanif, and M. Saleem. 2013. Role of Zinc in Plant Nutrition- A Review. *American Journal of Experimental Agriculture* 3(2): 374-391.

Hernández, J. A., and M. S. Almansa. 2002. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum* 115: 251-257.

Hsieh, E. J., and B. M. Waters. 2016. Alkaline stress and iron deficiency regulate iron uptake and riboflavin synthesis gene expression differently in root and leaf tissue: implications for iron deficiency chlorosis. *Journal of Experimental Botany* 67(19): 5671-5685. doi:10.1093/jxb/erw328

Huang, R. 2018. Research progress on plant tolerance to soil salinity and alkalinity in sorghum. *Journal of Integrative Agriculture* 17(4): 739-746.

Jakovljević, D. Z., M. D. Topuzović, M. S. Stanković, and B. M. Bojović. 2017. Changes in Antioxidant Enzyme Activity in Response to Salinity-induced Oxidative Stress during Early Growth of Sweet Basil. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 58(3): 240-246. <https://doi.org/10.1007/s13580-017-0173-6>

Kabir, M. E., M. A. Karim, and M. A. K. Azad. 2004. Effect of Potassium on Salinity Tolerance of Mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Journal of Biological Sciences* 4(2): 103-110. <http://dx.doi.org/10.3923/jbs.2004.103.110>

Kaiser, W. M. 1979. Reversible Inhibition of the Calvin Cycle and Activation of Oxidative Pentose Phosphate Cycle in Isolated Intact Chloroplasts by Hydrogen Peroxide. *Planta* 145: 377-382.

- Lima, A. L. S., F. M. DaMatta, H. A. Pinheiro, M. R. Totola, and M. E. Loureiro. 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany* 47: 239-247.
- Loreto, F., M. Centritto, and K. Chartzoulakis. 2003. Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. *Plant, Cell and Environment* 26: 595-601. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00994.x>
- Lynch, J. P., and S. B. S. Clair. 2004. Mineral stress: the missing link in understanding how global climate change will affect plants in real world soils. *Field Crops Research* 90: 101-115. doi:10.1016/j.fcr.2004.07.008
- Maathuis, F. J. M., and A. Amtmann. 1999. K<sup>+</sup> Nutrition and Na<sup>+</sup> Toxicity: The Basis of Cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> Ratios. *Annals of Botany* 84: 123-133. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.0912>
- Makri, O., and S. Kintzios. 2007. *Ocimum* sp. (Basil): Botany, Cultivation, Pharmaceutical Properties, and Biotechnology. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 13(3): 123-150. doi:10.1300/J044v13n03\_10
- Manishankar, P., N. Wang, P. Köster, A. A. Alatar, and J. Kudla. 2018. Calcium signaling during salt stress and in the regulation of ion homeostasis. *Journal of Experimental Botany* 69(17): 4215-4226. doi:10.1093/jxb/ery201
- McClure, P. R., L. V. Kochian, R. M. Spanswick, and J. E. Shaff. 1990. Evidence for Cotransport of Nitrate and Protons in Maize Roots. *Plant Physiology* 93: 281-289. <https://doi.org/10.1104/pp.93.1.281>

- Mengel, K. 1994. Iron availability in plant tissues- iron chlorosis on calcareous soils. *Plant and Soil* 165: 275-283. <https://doi.org/10.1007/BF00008070>
- Mohamed, A. A., and A. A. Aly. 2004. Iron Deficiency Stimulated Some Enzymes Activity, Lipid Peroxidation and Free Radicals Production in *Borage officinalis* Induced in vitro. *International journal of agriculture & biology* 6(1): 179-184. <http://www.ijab.org>
- Munné-Bosch, S., and J. Peñuelas. 2003. Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta* 217: 758-766. DOI 10.1007/s00425-003-1037-0
- Murchie, E. H., and T. Lawson. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* 64(13): 3983-3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Murillo-Amador, B., J. J. Reyes-Pérez, A. Nieto-Garibay, E. Troyo-Diéguez, I. M. Reynaldo-Escobar, E. O. Rueda-Puente, and J. L. García-Hernández. 2013. Salinity tolerance in varieties of basil (*Ocimum basilicum* L.) during the stages of germination, emergence and early growth. *Tolerancia a la salinidad en albahaca* 29(2): 101-112. [www.universidadciencia.ujat.mx](http://www.universidadciencia.ujat.mx)
- Nayak, A. K., R. K. Gautam, D. K. Sharma, V. K. Mishra, C. S. Singh, and S. K. Jha. 2008. Growth, Oil Yield, and Ion Partitioning in Basil Grown on Sodic Soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39: 833-844. DOI: 10.1080/00103620701880891
- 日本香料協会 1989. 香りの百科. 朝倉書店. 293-295.

- Parida, A. K., and A. B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>
- Pathak, V., A. Prasad, and P. Pospíšil. 2017. Formation of singlet oxygen by decomposition of protein hydroperoxide in photosystem II. *PLoS ONE* 12(7): e0181732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181732>
- Preuss, C. P., C. Y. Huang, and S. D. Tyerman. 2011. Proton-coupled high-affinity phosphate transport revealed from heterologous characterization in *Xenopus* of barley-root plasma membrane transporter, HvPHT1;1. *Plant, Cell and Environment* 34: 681-689. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02272.x
- Ramel, F., S. Bitrtic, S. Cuiné, C. Triantaphylidés, J. L. Ravanat, and M. Havaux. 2012. Chemical Quenching of Singlet Oxygen by Carotenoids in Plants. *Plant Physiology* 158: 1267-1278.
- Roby, M. H. H., M. A. Sarhan, K. A. H. Selim, and K. I. Khale. 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products* 43: 827-831.
- Sahay, R., and D. D. Patra. 2014. Identification and performance of sodicity tolerant phosphate solubilizing bacterial isolates on *Ocimum basilicum* in sodic soil. *Ecological Engineering* 71: 639-643.
- Said-Al Ahl, H. A. H., and E. A. Omer. 2011: Medicinal and aromatic plants production under salt stress. A review. *Herba Polonica* 57(2): 72-87.

- Shi, D., and Y. Sheng. 2005. Effect of various salt-alkaline mixed stress conditions on sunflower seedlings and analysis of their stress factors. *Environmental and Experimental Botany* 54: 8-21. doi:10.1016/j.envexpbot.2004.05.003
- Silva, E. N., R. R. Vasconcelos, S. L. Ferreira-Silva, V. R. Almeida, and S. J. A. Gomes. 2011. Salt stress induced damages on the photosynthesis of physic nut young plants. *Scientia Agricola* 68(1): 62-68. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162011000100010>
- Tanaka, H., S. Yamada, T. Masunaga, S. Yamamoto, W. Tsuji, and B. Murillo-Amador. 2018. Comparison of nutrient uptake and antioxidative response among four Labiatae herbs species under salt stress condition. *Soil Science and Plant Nutrition* 64(5): 589-597. <https://doi.org/10.1080/00380768.2018.1492334>
- Tanji, K. K. (ed.) 1990. Agricultural salinity assessment and management. *ASCE manuals and reports on engineering practice* 71: 3-4.
- Tarchoune, I., C. Sgherri, O. Baâtour, R. Izzo, M. Lachaâl, F. Navari-Izzo, and Z. Ouerghi. 2013. Effects of oxidative stress caused by NaCl or Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> excess on lipoic acid and tocopherols in Genovese and Fine basil (*Ocimum basilicum*). *Annals of Applied Biology* 163: 23-32. <https://doi.org/10.1111/aab.12036>
- Tezara, W., V. J. Mitchell, S. D. Driscoll, and D. W. Lawlor. 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* 401: 914-917. doi:10.1038/44842
- Tounekti, T., A. M. Vadel, M. Oñate, H. Khemira, and S. Munne-Bosch. 2011. Salt-induced oxidative stress in rosemary plants: Damage or protection? *Environmental and Experimental Botany* 71: 298-305.

- Wahid, A., and A. Ghazanfar. 2006. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *Journal of Plant Physiology* 163: 723-730. doi:10.1016/j.jplph.2005.07.007
- Watanabe, T., M. Osaki, and T. Tadano. 1998. Effects of nitrogen source and aluminum on growth of tropical tree seedlings adapted to low pH soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 44: 655-666.
- Wilkins, K. A., E. Matthus, S. M. Swarbreck, and J. M. Davies. 2016. Calcium-Mediated Abiotic Stress Signaling in Roots. *Frontiers in Plant Science* 7(1296): 1-17. doi: 10.3389/fpls.2016.01296
- Wintermans, J., and A. De Mots. 1965. Spectrophotometric characteristics of Chlorophyll a and b their pheophytins in ethanol. *Biochim. Biophys. Acta.* 109: 448-453.
- Xiong, T. C., E. Ronzier, F. Sanchez, C. Corratgé-Faillie, C. Mazars, and J. B. Thibaud. 2014. Imaging long distance propagating calcium signals in intact plant leaves with the BRET-based GFP-aequorin reporter. *Frontiers in Plant Science* 5(43): 1-13. doi:10.3389/fpls.2014.00043
- Yang, C., J. Chong, C. Li, C. Kim, D. Shi, and D. Wang. 2007. Osmotic adjustment and ion balance traits of an alkali resistant halophyte *Kochia sieversiana* during adaptation to salt and alkali conditions. *Plant soil* 294: 263-276. DOI 10.1007/s11104-007-9251-3
- Yang, C., D. Shi, and D. Wang. 2008a. Comparative effects of salt and alkali stresses on growth, osmotic adjustment and ionic balance of an alkali-resistant halophyte *Suaeda glauca* (Bge.). *Plant Growth Regul* 56: 179-190. DOI 10.1007/s10725-008-9299-y

Yang, C. W., P. Wang, C. Y. Li, D. C. Shi, and D. L. Wang. 2008b. Comparison of effects of salt and alkali stresses on the growth and photosynthesis of wheat. *Photosynthetica* 46(1): 107-114. DOI: 10.1007/s11099-008-0018-8

Zhang, J.T., and C. S. Mu. 2009. Effects of saline and alkaline stresses on the germination, growth, photosynthesis, ionic balance and anti-oxidant system in an alkali-tolerant leguminous forage *Lathyrus quinquenervius*. *Soil Science and Plant Nutrition* 55: 685-697. doi: 10.1111/j.1747-0765.2009.00411.x

Zheng, W., and S. Y. Wang. 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J. Agric. Food Chem.* 49(51): 5165-5170.

## 公表論文

1. Tanaka, H., S. Yamada, T. Masunaga, S. Yamamoto, W. Tsuji, and B. Murillo-Amador. 2018. Comparison of nutrient uptake and antioxidative response among four Labiatae herb species under salt stress condition. *Soil Science and Plant Nutrition* 64(5): 589-597. (第 2 章)
2. Tanaka, H., T. Masunaga, W. Tsuji, S. Yamamoto, B. Murillo-Amador, M. Yamada, and S. Yamada. 2019. Characteristics of nutrient uptake, photosynthesis, and antioxidative response in a salt-tolerant basil variety - Characteristics of salt-tolerant basil -. *Sand Dune Research* 67(1) (expected day of publication: April, 2020). (第 3 章)