

ヒ素と鉄で処理した水耕で栽培したオオムギの根または根のアポプラストのリン、鉄、ヒ素の定量分析

Molla Shaibur Rahman、河合成直、世良耕一郎*

岩手大学連合農学研究科
020-8550 岩手県盛岡市上田 3-18-8

*岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

1. はじめに

少量のヒ素が植物の生育や栄養的価値を損ない、植物は地上部や根の生理的応答を変えてヒ素過剰に対応することが知られている。また、過剰に対する根の反応の一つは赤い根の形成であり、根の表面の赤色化はヒ素処理条件下での鉄プラークによる。鉄プラークは根圏への根による酸素やオキシダントの放出の結果であり^{1,2)}、一般にイネのような水生植物の根に形成される。鉄プラークは結晶性鉄の混合物よりなり^{2,3)}、水酸化鉄または酸化鉄の皮膜である。

植物生理において、ヒ素と鉄との関係もよく知られている。たとえば、水酸化（酸化）鉄は土壌又は溶液のヒ酸への高い親和性を持ち^{4,5,6)}、ヒ酸は Fe^{3+} とイネの根の表面で反応し不溶性のヒ酸鉄を作る⁷⁾。イネの根の鉄プラークのヒ素濃度はヒ酸処理した条件下で生育するイネの根のほうが亜ヒ酸で処理した条件下のそれと比べて有意に高い。よって、イネの根は亜ヒ酸よりヒ酸に対し高い親和性を持つことが示唆されている⁸⁾。また、プラークの形成は生育培地のリン酸濃度に支配され⁹⁾、リン欠条件ではヒ酸処理されたイネにおいてプラークの形成は一般に高い⁹⁾。たとえば、 $6.7 \mu\text{M}$ のヒ酸で処理されたイネはリン欠培地で24時間後に赤い根となる⁹⁾。ヒ素の種類、植物の種類、培地の組成によって、リンは植物によるヒ素の吸収を増減させる^{10,11)}ことも知られている。また、リンは化学的にヒ素と似ているので相互に競合し、ヒ酸はリンのトランスポーターによって吸収され¹²⁾、亜ヒ酸はケイ素のトランスポーター¹³⁾とアクアポリン¹⁴⁾により吸収される。湛水条件下、ヒ酸と亜ヒ酸は土壌溶液中に共存する^{15,16)}。

また、アポプラストは植物の細胞膜と根圏の間にあり土壌溶液と接している¹⁷⁾。アポプラストが根の膜の外側であり、また、細胞壁の内側で、元素が自由に動ける空間であると考えられている。Zribiら¹⁸⁾は水耕栽培されたエンドウの根の鉄の約75%が細胞の外にあり25%が根の中にあると報告した。これらの知見が、私達を Bienfaitらの方法¹⁹⁾によりアポプラストの鉄を抽出し生理的研究を行うことへ導いた。さらに、私たちは鉄がアポプラストでヒ素と沈殿しているかもしれないと考え、また、鉄はアポプラストでリンと共に沈殿するか、根の膜のリン酸基に吸着しているかもしれないと考えた。これらに考えを明らかにするためにアポプラストのリン、鉄、ヒ素の関係が研究される必要がある。

以上の知見を踏まえ、この実験の主な目的は培地のリンを減少させた時の赤色の鉄プラークの外観を観察し、亜ヒ酸で処理したオオムギ根のアポプラストの鉄プラークの元素含量を測定することであった。

2 実験方法

2.1 植物種と品種

六条オオムギ品種ミノリムギ(*Hordeum vulgare* L. cv. Minorimugi)を実験植物とし、以下の手順で岩手大学の温室で水耕栽培した。

2.2 種子殺菌と発芽

2%さらし粉水溶液にミノリムギの種子を入れ、スターラーで攪拌(30 分間)しながら表面殺菌した後、1 時間以上流水ですすいだ。この種子を湿ったタオルで包み、バットに乗せ、ラップで全体を覆い、25°Cの恒温器に入れ、24 時間以上静置して発芽させた。

2.3 播種と育苗

熱湯消毒した 15 L のプラスチック容器に 1.0 mM CaCl₂ 溶液を入れ、その中に熱湯消毒済みのポリエチレン製ネットを水面に合わせて固定した。発芽した種子を並べ、土壌条件再現のため 3 日間アルミを覆って、生長を待った。播種から 7 日後、1/5 濃度の Hoagland & Arnon No.2 培地 (以降、+Fe 培地と呼ぶ。参照: 表 1)へ、播種したネットごと移し、植物が 1.2 葉期になるまで育苗した。この培地の pH はデジタル pH メーター (HORIBA カスタニー ACT pH メーター D-24) で毎日測定し、pH の調整は、1.0 M HCl または 1.0 M NaOH を加えて、pH を 5.5 に調節した。

表 1 . Hoagland & Arnon No2 培地 (+Fe) の組成

Element	Salt concentration (mM)
KNO ₃	6.0
Ca(NO ₃) ₂	4.0
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄	2.0
Fe-EDTA	2.0 × 10 ⁻²
H ₃ BO ₃	3.0 × 10 ⁻³
MnSO ₄	5.0 × 10 ⁻⁴
CuSO ₄	2.0 × 10 ⁻⁴
ZnSO ₄	4.0 × 10 ⁻⁴
H ₂ MoO ₄	5.0 × 10 ⁻⁴

2.4 移植

幼植物が 1.2 葉期になったとき、幼植物 3 個体を一株としてスポンジで包み、8 株を 1/2 濃度の +Fe 培地 (pH 5.5)が入ったポリバケツ (5L) に移植し、常時エアレーションポンプで通気した。植物は 10 μM As + 500 μM P、10 μM As + 250 μM P、10 μM As + 50 μM P、10 μM As + 0 μM P、0 μM As + 0 μM P で 16 日間栽培した。本実験は 10 μM のヒ素を含む培地で実験を行った。なぜなら、予備実験において 10 μM のヒ素はオオムギにおいて 10 μM の Fe³⁺-EDTA を含む培地において激しいヒ素害の症状を示さなかったからである。



図 1. Bienfait らの方法¹⁹⁾によるオオムギ根のアポプラストに存在するアポプラスト鉄の可溶化
Step 1 : 脱イオン水による根の洗浄 Step 2 : 0.5 mM CaSO₄による 10 分間の洗浄



図 2. Bienfait らの方法¹⁹⁾によるオオムギ根のアポプラストに存在するアポプラスト鉄の可溶化
Step 3 : アポプラスト鉄は MES 緩衝液中で Na₂S₂O₄ の添加により可溶化された。

2.5 アポプラスト鉄の可溶化と試料溶液調製

アポプラストに存在するアポプラスト鉄とその他の元素は Bienfait らの方法¹⁹⁾により可溶化した。その方法では、pH 5.5 の MES 緩衝液 (10 mM MES, 0.5 mM Ca(NO₃)₂, 1.5 mM 2,2'-Bipyridyl) が用いられた。最初に、植物は脱塩水で洗われた(図 1、Step 1)。洗浄後、根は 100 ml の 0.5 mM CaSO₄ に移され(図 1、Step 2)、さらに 100 ml の上記 MES 緩衝液の中に 5 分間おかれた (図 2、Step 3)。その後、5 ml の 250 mM Na₂S₂O₄ を加え 10 分間、時折、植物根を浸透しながら置いた。この過程でアポプラスト鉄は可溶化、抽出された。その後、植物根は 100 ml の 0.5 mM CaSO₄ へもどした。その後、植物を採取し、その地上部と根を分離し、脱衣温水で洗浄した。根の試料は 60 ± 5°C で 48 時間乾燥させ、硝酸—過塩素酸により分解した。分解溶液は 5 ml に濃縮し、最後に純水で 50 ml に定溶した。アポプラスト鉄を抽出した MES 緩衝液と植物体の分解液のリン以外の元素含量は水素化物発生装置付き原子吸光光度計(AA-6200; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)で分析した。リンは分光光度計(model UV mini 1240, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)を用いて、Imamul-Huq & Alam 2005 の方法²⁰⁾で 420 nm にて比色定量し、PIXE を用いて測定した。

3 結果及び考察

3.1 植物の症状

赤い色の強さは培地のリン濃度の減少に従い強くなった。根は 10 μM As + 0 μM P 区において 16 日目に明瞭に赤くなり (図 3)、赤色は鉄プラークの存在を示していた^{1,2,8,9)}。0 μM As + 0 μM P 区の根は他の区と比べ大変長く、あまり分岐しなかった。

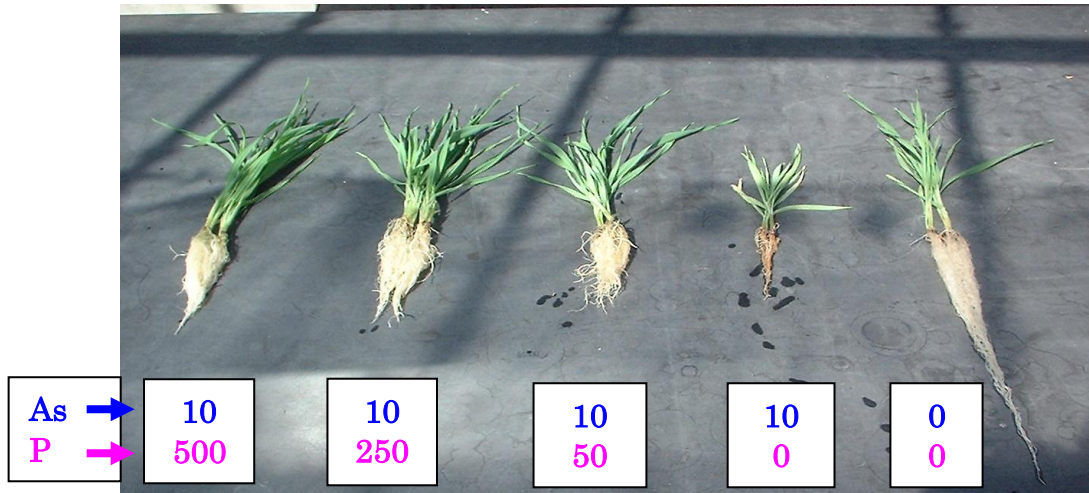


図3. ヒ素処理し、リン酸濃度を変えたオオムギ幼植物の写真(16日間処理)

3.2 根の乾物重

根の乾物重はリン濃度の減少に伴い減少し、ヒ素処理かつ無リン区で最小になった(図4)。根の乾物重はヒ素がなく無リン区においてはヒ素処理かつ無リン区より有意に高くなった。

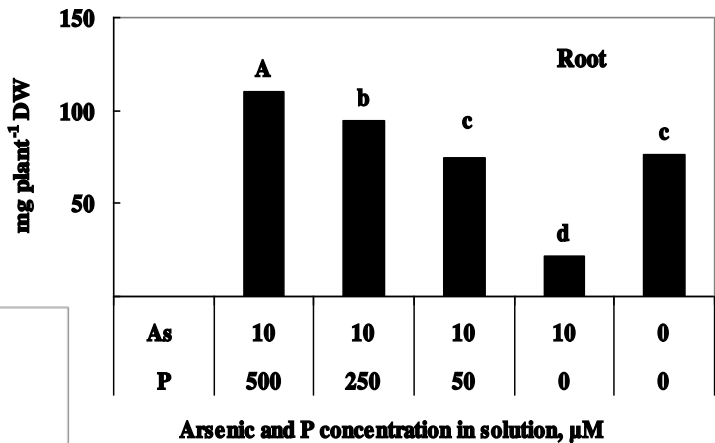


図4. 異なるリン濃度でヒ素処理したオオムギ幼植物の根の乾物重 異なるアルファベットをつけたデータは yan-Einot-Gabriel-Welsch multiple range test により有意差(p < 0.05)があることを示す。

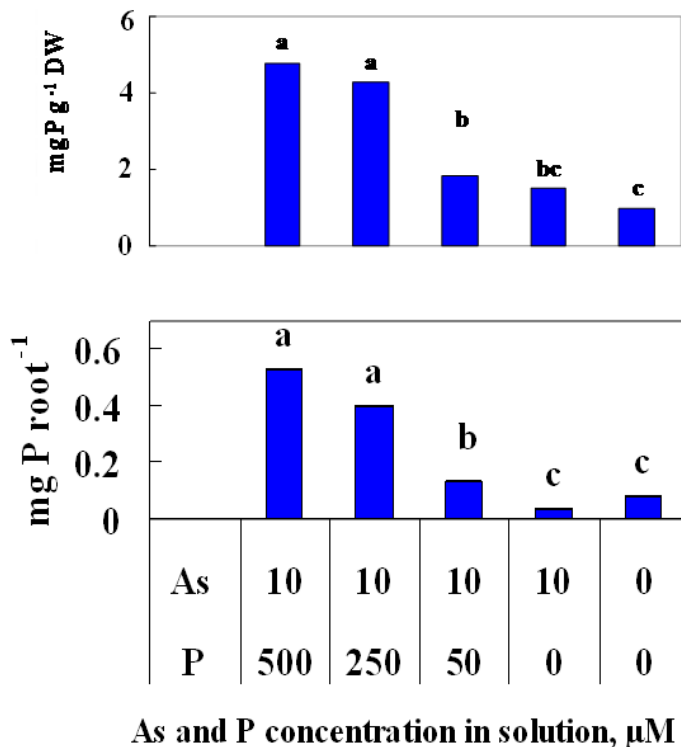


図5. 異なるリン濃度でヒ素処理したオオムギ幼植物の根のリン濃度と根のリン全量 異なるアルファベットをつけたデータは Ryan-Einot-Gabriel-Welsch multiple range test において有意差 (p < 0.05)があることを示す。

3.3 植物の元素含量

3.3.1 リン

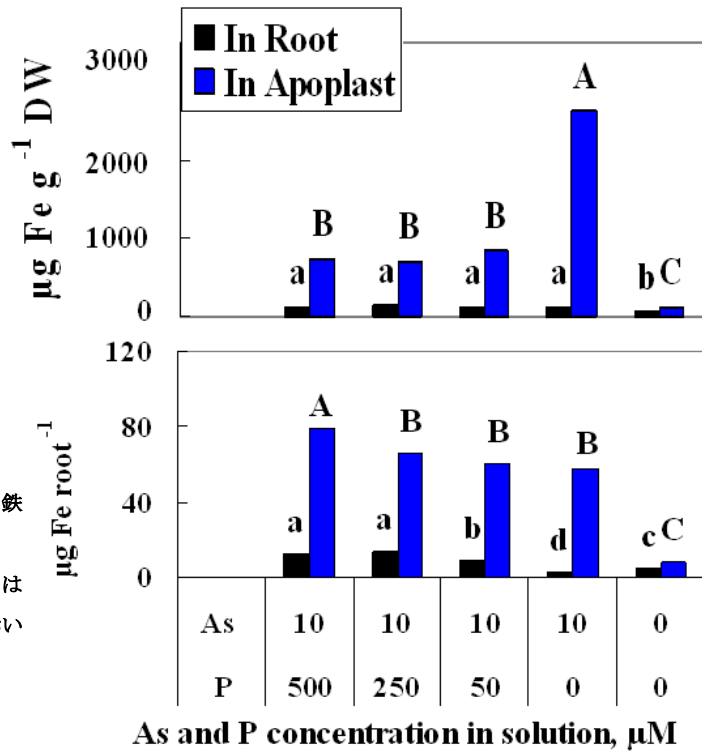
根のリン濃度 (mg/g DW) と集積量 (mg/ 個体) は培地のリン濃度の減少に伴い減少した。アポプラストのリンは PIXE によっても検出されなかった (データ示さず)。

3.3.2 鉄

リンを与えた条件下では根のアポプラストの鉄濃度はほぼ同じであった。しかし、リンを除いた条件下では、アポプラストの鉄濃度はリンを与えた条件に比べ非常に高かった(図6、表3)。根に存在する鉄は主にアポプラストに存在することがわかった。アポプラストの鉄の形成はヒ素とリンが存在しない条件(0 μM As + 0 μM P)では少なかった(図6)。

図6. 異なるヒ素とリン濃度で生育したオオムギの根の鉄濃度と根の鉄全量

異なるアルファベットを付けたカラムは Ryan-Einot-Gabriel-Welsch multiple range test において有意差($p < 0.05$)があることを示す。



3.3.3 ヒ素

リンを与えた条件では、根とアポプラスト鉄と結合したヒ素の濃度は培地のリン濃度の低下に伴い上昇し、10 μM As + 50 μM P 区で最高になった(図7)。無リン条件下では、根のヒ素含量は10 μM As + 50 μM P と比較して低くなったが、アポプラスト鉄中のヒ素は数倍高くなった。

アポプラスト鉄と結合したヒ素は、根の中のヒ素と比べ、リンを与えた条件では、大変低かったが、リンを除いた条件下では、2倍程度に高まった。植物根あたりの数値も同様の結果であった。

図7. 異なるヒ素とリン濃度で生育したオオムギの根のヒ素濃度と根のヒ素全量

異なるアルファベットを付けたカラムは Ryan-Einot-Gabriel-Welsch multiple range test において有意差($p < 0.05$)があることを示す。

nd : 検出されず。

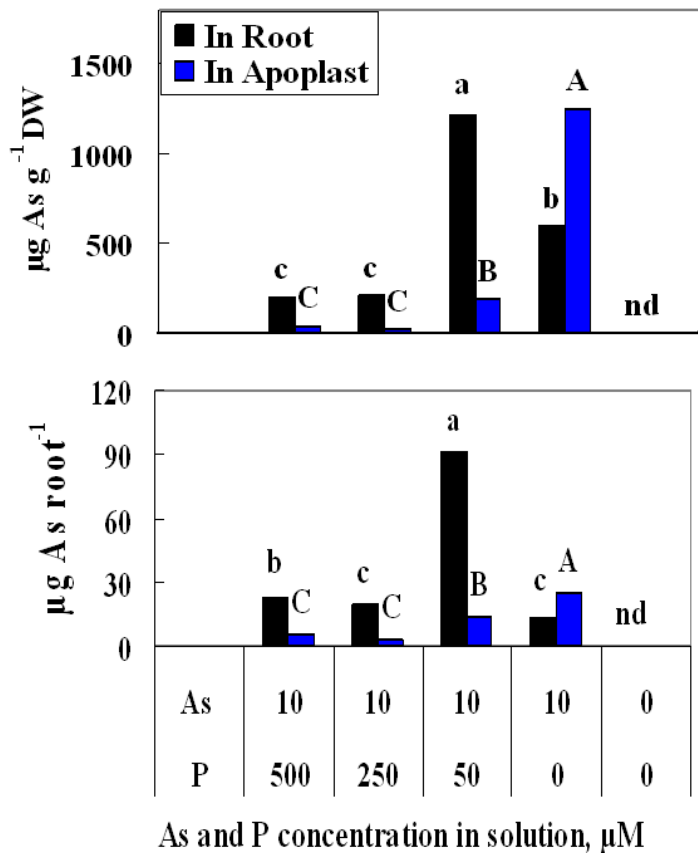


表2. 異なるリンとヒ素濃度で生育したオオムギの根の元素含量

Treatments (μM)		P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu
		-----mg g ⁻¹ DW -----				----- $\mu\text{g g}^{-1}$ DW -----			
As	P	Concentrations in roots							
10	500	4.64a	92.7b	1.79ab	2.89a	118.0a	9.02c	34.8b	12.7b
10	250	3.40b	88.7b	2.11a	2.57b	148.2a	14.4b	27.6c	15.7b
10	50	1.35c	72.3c	2.13a	1.36c	118.3a	25.0a	29.0bc	9.57c
10	0	0.88d	132.3a	1.39b	0.28d	116.6a	14.1b	23.1d	19.6a
0	0	0.84d	86.2b	1.89a	2.71ab	60.0b	25.3a	41.1a	13.6b
		Accumulation in roots							
10	500	0.51a	10.2a	0.197a	0.318a	13.0a	1.00c	3.84a	1.39a
10	250	0.32b	8.28a	0.199a	0.247b	13.9a	1.35b	2.62b	1.44a
10	50	0.09c	5.24b	0.158b	0.103c	9.01b	1.82a	2.17b	0.70c
10	0	0.02d	2.84c	0.030c	0.006d	2.56d	0.30d	0.50c	0.41d
0	0	0.07c	6.52b	0.143b	0.206b	4.02c	1.94a	3.13a	1.03b

異なるアルファベットを付けた平均値は Ryan-Einot-Gabriel-Welsch multiple range test で有意差があることを示す。

DW : 乾物重、 nd : 検出されず。

3.3.4 その他の元素

根とアポプラストの鉄に結合したマンガン濃度はリン濃度が低い場合は高かった。根の亜鉛濃度は培地のリン濃度の低下に伴い低下したが、ヒ素とリンがない条件では高まった。

表3 異なるリンとヒ素濃度で生育したオオムギの根のアポプラスト鉄と結合していた元素の含量

Treatments (μM)		P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu
		-----mg g ⁻¹ DW -----				----- $\mu\text{g g}^{-1}$ DW -----			
As	P	Concentrations in apoplast							
10	500	nd	3.84c	5.87c	0.095b	720c	2.21d	50.6c	1.36d
10	250	nd	4.63c	7.15bc	0.099b	714c	3.76c	110.0b	3.68c
10	50	nd	4.38c	6.61c	0.098b	827b	7.12b	129.9b	4.45c
10	0	nd	10.5a	24.2a	0.078c	2631a	22.9a	684.7a	41.3a
0	0	nd	6.16b	7.91b	0.126a	114d	9.67b	117.2b	9.81b
		-----mg plant ⁻¹ -----				----- $\mu\text{g plant}^{-1}$ -----			
		Accumulation in apoplast							
10	500	nd	0.42a	0.65a	0.010a	79.4a	0.24d	5.51c	0.15d
10	250	nd	0.43a	0.64a	0.009a	65.8b	0.33c	8.91b	0.32c
10	50	nd	0.31b	0.47c	0.007b	60.9b	0.50b	9.03b	0.32c
10	0	nd	0.23c	0.51b	0.002c	58.0b	0.49b	15.5a	0.95a
0	0	nd	0.46a	0.60ab	0.010a	8.57c	0.72a	9.36b	0.74b

異なるアルファベットを付けた平均値は Ryan-Einot-Gabriel-Welsch multiple range test で有意差があることを示す。

DW : 乾物重、 nd : 検出されず。

4 考察

無リンでヒ素を含む条件下で生育したオオムギの根が明瞭に赤色を示した(図3)。この結果は、リン濃度の低下に伴いヒ素が鉄ブラークに取り込まれやすくなることを示した。つまり、ヒ素存在下での鉄ブラークの形成はリン濃度に依存することを示した。近年、鉄ブラークの形成とリン栄養の関係が報告されている⁹⁾。

本実験ではアポプラスト鉄に結合したリンは検出されなかった。そのことは、リンがアポプラストで鉄と共に沈殿しないことを示唆した。このことはさらに確認される必要がある。Bienfait らの方法¹⁹⁾によってアポプラスト鉄を可能化した溶液中にリンが検出されないことは、還元剤を用いてアポプラストを可溶化する本実験の処理において細胞膜が破壊されないことを示していた。鉄ブラークがリンを固定するとの報告がある⁷⁾が、我々の結果はそれを支持しなかった。

ヒ素存在下において、アポプラスト鉄はリンの減少に伴い増加した。リン供給下において、アポプラスト鉄はほぼ同じであったが、リン欠条件下ではアポプラスト鉄の濃度は鉄供給条件下と比べかなり高かった。リン酸がヒ素存在下でのアポプラスト鉄の形成を抑制することが示唆された。アポプラスト鉄は根の中の鉄より 10 $\mu\text{M As} + 500 \mu\text{M P}$ 、10 $\mu\text{M As} + 250 \mu\text{M P}$ 、10 $\mu\text{M As} + 50 \mu\text{M P}$ 、10 $\mu\text{M As} + 0 \mu\text{M P}$ 、0 $\mu\text{M As} + 0 \mu\text{M P}$ 区において約 6、5、7、23、2 倍高かった。アポプラストが根の鉄の供給源になっていることが示唆された。アポプラスト鉄の最高値はヒ素存在、無リン条件下で示された。しかし、無ヒ素、無リン条件下ではアポプラスト鉄の形成は抑えられた。

根は 10 $\mu\text{M As} + 500 \mu\text{M P}$ 、10 $\mu\text{M As} + 250 \mu\text{M P}$ 、10 $\mu\text{M As} + 50 \mu\text{M P}$ 区において、アポプラストと比べ、約 5.37、9.01、6.47 倍高かった。そのことは、リン供給下ではヒ素は根の中ではアポプラストではなく根中に主に存在することを示していた。しかし、無リン条件下ではアポプラスト鉄と結合するヒ素は根の中のヒ素に比べ 2.09 倍高かった。ヒ素の吸収が、少なくともリンにより制御されることが示唆された。最近、リン酸と亜ヒ酸存在下で生育したイネの根において、ヒ素は大部分、根の中に存在することが報告された⁸⁾。しかし、リン欠、かつ、ヒ酸存在下で生育したイネにおいて、ヒ素は主に根の表面に存在すること、また、ヒ酸存在下、リン欠条件で生育したイネの鉄ブラークのヒ素濃度は、ヒ酸存在下、リン供給条件で生育した植物に比べ有意に高い (1180 mg kg^{-1}) ことが報告された⁹⁾。ヒ酸存在条件下で生育した duckweed (*Spirodella polyrhiza* L.)の根のヒ素の 56%が根中に存在し、44%が鉄ブラークに存在した²¹⁾。根の中、又は、根のアポプラスト中のヒ素の濃度はヒ素の形態(ヒ酸、亜ヒ酸)、植物の種類、培地のリン酸の有無に依存することが示唆された。

5 結論

鉄ブラークの形成は培地のリン濃度に強く依存していた。リン濃度が減少するほど鉄ブラークの量は上昇した。リンはアポプラストで鉄と共に沈殿しないのであろう。低リン条件下では、鉄は最も根のアポプラストに存在した。ヒ素処理した幼植物では、ヒ素の多くはアポプラストよりも根の中に存在した。鉄の一部がアポプラストでヒ素と沈殿したようだ。リンはアポプラストでのヒ酸鉄の沈殿形成を妨げると思われた。

参考文献

- 1) Armstrong W (1967) The oxidizing activity of roots in water-logged soils. *Physiologia Plantarum*, 20: 920-926.
- 2) Chen CC, Dixon JB, Turner FT (1980) Iron coatings on rice roots: Morphology and models of development. *Soil Science Society of America Journal*, 44:1113-1119.
- 3) Bacha RE, Hossner LR (1977) Characteristics of coating formed on rice roots as affected by Fe and Mn additions. *Soil Science Society of America Journal*, 41:931-935.
- 4) Meng XG, Korfiatis GP, Bang KW (2002) Combined effects of anions on arsenic removal by iron hydroxides. *Toxicology Letters*, 133:103-111.
- 5) Belzile N, Tessier A (1990) Interactions between arsenic and ironoxyhydroxides in lacustrine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 54:103-109.

- 6) Jain A, Raven KP, Loeppert RH (1999) Arsenite and arsenate adsorption on ferrihydrite: surface charge reduction and net OH⁻ release stoichiometry, *Environmental Science and Technology*, 33:1179-1184.
- 7) Meharg AA (2004) Arsenic in rice-understanding a new disaster for South-East Asia. *Trends in Plant Science*, 9(9):415-417.
- 8) Liu WJ, Zhu YG, Smith FA (2005) Effects of iron and manganese plaques on arsenic uptake by rice seedlings (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture supplied with arsenate and arsenite, *Plant and Soil*, 277:127-138.
- 9) Liu WJ, Zhu YG, Smith FA, Smith SE (2004) Do phosphorus nutrition and iron plaque alter arsenate (As) uptake by rice seedlings in hydroponic culture? *The new Phytologist*, 162:481-488.
- 10) Tsutsumi M (1980) Intensification of arsenic toxicity to paddy rice by hydrogen sulphide and ferrous iron I. Induction of bronzing and accumulation in rice by arsenic. *Soil Science and Plant Nutrition*, 26:561-569.
- 11) Otte ML, Dekkers MJ, Rozema J, Broekman RA (1991) Uptake of arsenic by *Aster tripolium* in relation to rhizosphere oxidation. *Canadian Journal of Botany*, 69:2670-2677.
- 12) Asher CJ, Reay PF (1979) Arsenic uptake by barley seedlings, *Australian Journal of Plant Physiology*, 6:459-466.
- 13) Ma JF, Yamaji N, Mitani N, Xu XY, Su YH, McGrath SP, Zhao FJ (2008) Transporter of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain, *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 105:0031-9935.
- 14) Meharg AA, Hartley-Whitaker J (2002) Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and non-resistant plant species, *The New Phytologist*, 154:29-43.
- 15) Smith E, Naidu R, Alston AM (1998) Arsenic in the soil environment: A review. In: *Advances in Agronomy*, ED DL Sparks, Academic Press, San Diego, CA, Vol. 64, pp.149-195.
- 16) Abedin MJ, Feldmann J, Meharg AA (2002) Uptake kinetics of arsenic species in rice plants, *Plant Physiology*, 128:1120-1128.
- 17) Strasser O, Kohl K, Romheld V (1999) Overestimation of apoplastic Fe in roots of soil grown plants, *Plant and Soil*, 210:179-187.
- 18) Zribi K, Gharsalli M (2002) Effect of bicarbonate on growth and iron nutrition of pea, *Journal of Plant Nutrition*, 25:2143-2149.
- 19) Bienfait HF, van den Briel W, Mesland-Mul NT (1985) Free space iron pools in roots: Generation and mobilization, *Plant Physiology*, 78:596-600.
- 20) Imamul-Huq SM, Alam MD (2005) *A Handbook on Analysis of Soil, Plant and Water*. Eds SM Imamul Huq and M Didar-ul-Alam, Momin Offset Press, 9 Nilkhet, Babupura, Dhaka-1205.
- 21) Rahman MA, Hasegawa H, Ueda K, Maki T, Rahman MM (2008) Arsenic uptake by aquatic macrophyte *Spirodela polyrhiza* L.: Interactions with phosphate and iron, *Journal of Hazardous Materials*, 160:356-361.

Quantitative analysis of phosphorus, iron, and arsenic in the roots or root apoplast of barley grown on water medium with arsenic and iron

M. R. Shaibur, S. Kawai and K. Sera *

Faculty of Agriculture, Iwate University
3-18-8 Ueda, Morioka, iwate 020-8550, Japan

*Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

Abstract

An experiment with arsenic (As) and barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Minorimugi) grown hydroponically was conducted to observe the effects of phosphorus (P) status on the formation of iron (Fe)-plaque. Plants were grown for 16 days treated with 10 μM As in presence or in absence of P. A set of treatment was without As and P. Phosphorus was used as ammonium phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) and As was used as sodium meta-arsenite (NaAsO_2). The $\frac{1}{2}$ -strength nutrient solution was used at pH 5.5. Plants were treated with 10 μM As + 500 μM P, 10 μM As + 250 μM P, 10 μM As + 50 μM P, 10 μM As + 0 μM P and 0 μM As + 0 μM P for 16 days. Iron-plaque with root reddish color was clearly visible in barley roots grown in As-treated and P-depleted condition. However, Fe-plaque with reddish color was not found in P-depleted and As containing medium, suggesting that As played a vital role in the formation of Fe-plaque in P-depleted condition. Intensity of reddish color intensity increased with decreasing P concentration in the medium. Apoplastic-Fe together with other elements were extracted by the method of Bienfait et al.. Contents of macro and microelements occurred as Fe^{3+} -complex in apoplast and in roots were determined. Particular emphasis was given on the concentration of P, Fe and As. Arsenic decreased root dry weight (DW) with decreasing P concentration in the medium. Detectable amount of P was not found in apoplastic portion in all treatments, indicating that P might not be complexed with apoplastic-Fe. Phosphorus may be present inside of roots as organic or inorganic phosphate. Iron was mostly concentrated in apoplast. However, As was mostly concentrated in roots and a little portion was found to be complexed with Fe^{3+} in the apoplast. Our result suggested that P might repress the formation of As-Fe complex in the apoplast, somehow.