

トマト植物に対するアンモニウム過剰の影響 : 第2 報 アンモニウム過剰下における呼吸の変動

脇本, 賢三
農林水産省中国農業試験場

山田, 芳雄
九州大学農学部植物栄養・肥料学教室

<https://doi.org/10.15017/22170>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 39 (4), pp.115-120, 1985-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

トマト植物に対するアンモニウム過剰の影響

第2報 アンモニウム過剰下における呼吸の変動

脇本賢三*・山田芳雄

九州大学農学部植物栄養・肥料学教室

(昭和59年9月3日受理)

Effect of Ammonium Excess on Tomato plants

II. Changes of Respiration under Ammonium Excess

KENZO WAKIMOTO and YOSHIO YAMADA

Laboratory of Soil Fertility and Plant Nutrition, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-02 Fukuoka 812

緒言

著者らは第1報(脇本・山田, 1985)においてアンモニウム過剰下でのトマト幼植物の代謝変動の指標として、二・三の酵素活性を測定した結果、呼吸系の中でもエネルギー生成を伴わない系に関連しているカタラーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ活性がアンモニウムの蓄積に伴って高くなることを明らかにした。また根においてはエネルギー生成を伴う脱水素酵素系がアンモニウム過剰下で低下することを認めた。本報ではこれらの事実にもとづいて、アンモニウム過剰により代謝変動をおこしているトマト植物の呼吸速度を測定することにより、アンモニウム障害発現との関連を検討した。また呼吸阻害剤を作用させることにより呼吸の内容についても若干の検討を加えた。

材料および方法

1. 高濃度の $\text{NO}_3\text{-N}$ または $\text{NH}_4\text{-N}$ 溶液中への切断葉、切断根の浸漬処理後の呼吸

a) 酸素吸収量の測定およびその試料

トマト幼植物を $\text{NO}_3\text{-N}$ を含む培養液で第7葉の出葉期まで培養し、実験に供した。ワールブルグ容器に葉身の場合は直径7mmのディスクを200mg(新鮮重)、根の場合は長さ15mmの切断根を400mg(新鮮重)入れ、 30°C の蒸留水、硝酸ナトリウム溶液、硫酸アンモニウム溶液(いずれもNで1,000ppm)に

それぞれ1~6時間浸漬処理し、検圧法により酸素吸収(30°C , 1時間)を測定した。

b) 組織中の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量の測定

酸素吸収測定後組織を充分水洗し、ろ紙で水を除き秤量後蒸留水5mlを加えて乳鉢で磨砕し、ホモジネートの遠心分離上澄液についてコンウェイ法(高井・伊藤, 1963)で $\text{NH}_4\text{-N}$ を定量し、新鮮物1g当たりの μg で表わした。

2. $\text{NO}_3\text{-N}$ または $\text{NH}_4\text{-N}$ を含む培養液で培養した場合のトマト幼植物の呼吸

a) 酸素吸収量の測定およびその試料

第7葉展開時まで $\text{NO}_3\text{-N}$ 50ppmを含む水耕培養液で前培養したトマト植物を、引き続き $\text{NO}_3\text{-N}$ 50, 100, 200ppm, $\text{NH}_4\text{-N}$ 50, 100, 200ppmを含む培養液で培養を続け、3日目と6日目に試料として葉身と根を採取し、ワールブルグ検圧計で前述のように 30°C で1時間の酸素吸収量または二酸化炭素放出量を測定した。

b) 組織中の $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量の測定

上記の方法で培養した植物から新鮮物で2gの葉身および根を採取し、蒸留水とともに乳鉢中で磨砕し、そのホモジネートの上澄液についてコンウェイ法(高井・伊藤, 1963)により $\text{NH}_4\text{-N}$ を定量し新鮮物1g当たりの μg で表示した。

3. 酸素吸収におよぼす阻害剤の影響

a) $\text{NO}_3\text{-N}$ 50ppmの場合

第7葉展開時まで $\text{NO}_3\text{-N}$ を含む培養液で培養し

* 現農林水産省中国農業試験場

た植物を実験に供した。マロン酸，ナトリウムアザイド，ヒドロオキシキノリンを用い， $1.0 \times 10^{-3} M \sim 100 \times 10^{-3} M$ までの濃度範囲でトマト幼植物の葉身および根の酸素吸収阻害をワールブルグ検圧計を使って調べた。阻害剤溶液の pH はいずれも 6.0 に調整し， $30^\circ C$ ，1 時間の酸素吸収を測定した。

b) NO_3^-N , NH_4^-N 100 ppm の場合

第 7 葉展開時まで NO_3^-N 50 ppm を含む培養液で前培養したトマト幼植物を引き続き NO_3^-N 100 ppm または NH_4^-N 100 ppm を含む培養液で培養し，4 日目に葉身および根を採取し，阻害実験に供した。阻害剤は pH 6.0 に調整し，濃度はマロン酸 $1 \times 10^{-1} M$ ，ナトリウムアザイド $5 \times 10^{-3} M$ ，ヒドロオキシキノリン $5 \times 10^{-3} M$ とした。

実験結果

1. 高濃度の NO_3^-N または NH_4^-N 溶液に浸漬処理したトマト幼植物の切断葉または切断根の酸素吸収

切断葉を蒸留水， NO_3^-N 溶液または NH_4^-N 溶液にそれぞれ浸漬し，経時的に酸素吸収を測定した結果（表 1），蒸留水に比べて塩類溶液中では初期には酸素吸収がやや増加した。その後時間の経過と共に蒸留水中の場合は酸素吸収がやや低下する傾向にあり，二つの塩類溶液中では低下は認められなかった。また NO_3^-N と NH_4^-N 浸漬処理間に差は認められなかった。切断根においては，蒸留水中では酸素吸収は初めから低下傾向をみせたのに対し，塩類溶液中では初期には増加しその後経時的に低下した。低下の程度は NH_4^-N 処理において大であった。それぞれの時点での体内の NH_4^-N 含量は表 2 に示したとおりで，

Table 1. The effect of nitrogen forms on O_2 uptake by plants. O_2 uptake by excised leaves and roots which were soaked in water or in a solution containing NO_3^-N or NH_4^-N (1,000 ppm as N) was determined in an hour.

Time (hr)	O_2 uptake %					
	Leaf			Root		
	Cont.	NO_3^-N	NH_4^-N	Cont.	NO_3^-N	NH_4^-N
1	100	108	103	100	109	111
2	109	119	119	93	103	104
3	88	109	109	88	96	92
4	92	103	103	89	95	89
6	90	109	109	90	88	74

Table 2. NH_4^-N content in leaves and roots which were soaked in water or in a solution containing NO_3^-N or NH_4^-N (1,000 ppm as N).

Organ	N conc. in solution (ppm)	NH_4^-N content ($\mu g/g$ f. w.)	
		Time of soaking (hr)	
		3	6
Leaf	Cont.	30	26
	NO_3^-N 1,000	80	35
	NH_4^-N 1,000	870	1,135
Root	Cont.	52	87
	NO_3^-N 1,000	52	95
	NH_4^-N 1,000	743	760

NH_4^-N 溶液に浸漬すると切断葉，切断根共に NH_4^-N 含量が顕著に高まり，時間の経過と共に更に高濃度に集積した。

2. NO_3^-N または NH_4^-N を含む培養液で培養したトマト幼植物の呼吸

NO_3^-N 培養植物に比べて NH_4^-N 培養植物の葉身では（図 1），3 日目において培養液中のいずれの窒素濃度でも酸素吸収速度が大きく，培養液中の窒素濃度が高い程大きい傾向が認められた。6 日目でも同様の傾向が維持された。培養液中の窒素濃度が 50, 100 ppm の場合，3 日目の二酸化炭素放出量は NO_3^-N 培養植物よりも NH_4^-N 培養植物の方が大きく，6 日目には N 濃度が 100, 200 ppm の時に NH_4^-N 培養植物の方が大きく，また培養液中の NH_4^-N 濃度が高い程二酸化炭素放出も大きくなる傾向を示した。根においては（図 2），3 日目には酸素吸収速度に処理間で顕著な差が認められなかったが，6 日目には培養液中のいずれの窒素濃度でも NH_4^-N 培養植物の方が大きく，また培養液中の窒素濃度が高くなる程大きかった。二酸化炭素放出速度も酸素吸収の場合と同様の傾

Table 3. The effect of nitrogen sources in culture solution on NH_4^-N content in plants.

N conc. in culture solution (ppm)	NH_4^-N content in plants ($\mu g/g$ f. w.)				
	3 days		6 days		
	Leaf	Root	Leaf	Root	
NO_3^-N	50	24	24	40	36
	100	24	24	36	36
	200	88	32	40	36
NH_4^-N	50	88	48	88	104
	100	135	96	152	232
	200	320	176	416	360

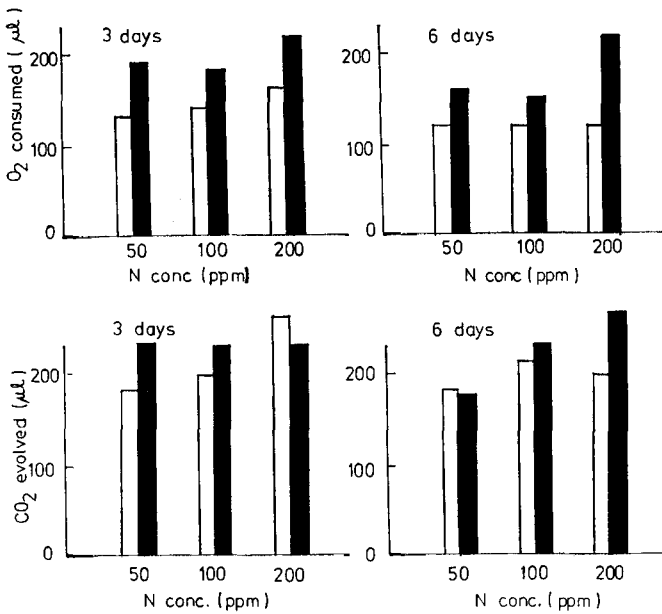


Fig. 1. The effect of nitrogen sources in culture solution on respiration of tomato leaves. Respiration rate was expressed as the volume (μl) of oxygen consumed or carbon dioxide evolved in an hour by 400 mg (f. w.) of leaf disks.

□: Cultured in NO₃-N
 ■: Cultured in NH₄-N

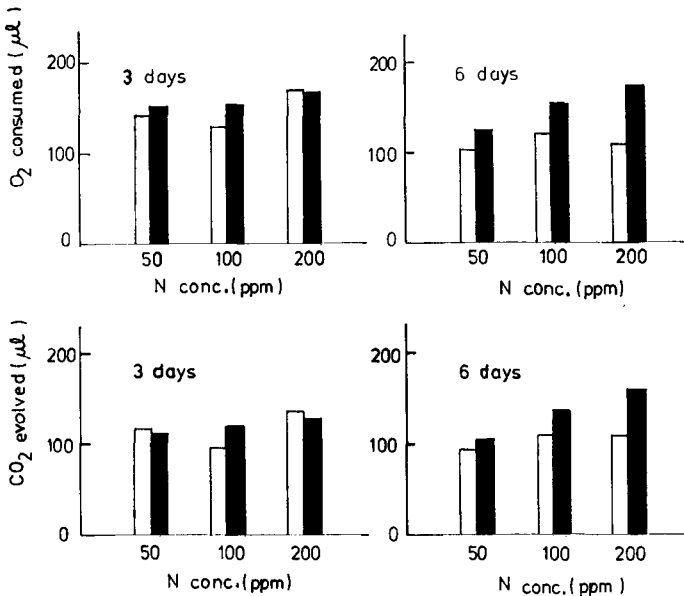


Fig. 2. The effect of nitrogen sources in culture solution on respiration of tomato roots. Respiration rate was expressed as the volume (μl) of oxygen consumed or carbon dioxide evolved in an hour by 400 mg (f. w.) of roots.

□: Cultured in NO₃-N
 ■: Cultured in NH₄-N

向であつた。表3はそれぞれの時点での植物体中の NH₄-N 含量の測定結果である。NO₃-N 処理では培養液中の窒素濃度を高めても体内 NH₄-N 含量は高くないが、NH₄-N 培養では急速に高まり、経時的に集積量は増大した。

図1, 2のとおり酸素吸収と二酸化炭素放出は NO₃-N 培養よりも NH₄-N 培養で大きくなつたが、その増加割合を比較するために RQ (CO₂/O₂) を算出した(表4)。葉身では NO₃-N 培養に比べ NH₄-N 培養の方が RQ 値は小さく、一方根では両方で顕著な差が認められなかつた。

3. NO₃-N または NH₄-N を含む培養液で培養したトマト幼植物の呼吸に及ぼす阻害剤の影響

阻害剤を用いた実験をするに当たり植物の葉身および根がいかなる濃度で、どの程度の呼吸阻害を受けるかを調べた(表5)。マロン酸は 100×10⁻³M, ナトリウムアザイド、ヒドロオキシキノリンは 5×10⁻³M の濃度で両器官の酸素吸収を約50%程度阻害することが認められたので、本実験ではこの条件を採用した。表6は NO₃-N または NH₄-N 100 ppm を含む培養液で4日間培養した植物について阻害剤による酸素吸収阻害率を示したものである。葉身ではマロン酸、ナトリウムアザイドで阻害した場合、NO₃-N 培養植物に比べ NH₄-N 培養植物で阻害程度が大であり、ヒドロオキシキノリンで阻害した場合には差は認められなかつた。

一方、根ではマロン酸、ナトリウムアザイドによる阻害には差は認められなかつたが、ヒドロオキシキノリンでは NH₄-N 培養植物で顕著に阻害された。

Table 4. The effect of nitrogen sources in culture solution on RQ values of leaves and roots

N conc. in culture solution (ppm)	3 days' culture		6 days' culture	
	Leaf	Root	Leaf	Root
NO ₃ -N 50	1.45	0.80	1.61	0.91
NH ₄ -N 50	1.21	0.75	1.23	0.78
NO ₃ -N 100	1.44	0.75	1.83	0.90
NH ₄ -N 100	1.24	0.76	1.56	0.92
NO ₃ -N 200	1.69	0.82	1.66	0.96
NH ₄ -N 200	0.99	0.78	1.25	0.92

Table 5. Relation between the concentration of inhibitors and the degree of inhibition of O₂ uptake by plants during one hour at a pH value of 6.0.

Concentration of inhibitor in solution	O ₂ uptake inhibition (%)					
	Malonate		Azide		HO-quinoline	
	Leaf	Root	Leaf	Root	Leaf	Root
1.0 × 10 ⁻³ M			0.8	17.6	31.0	11.5
2.5 × 10 ⁻³ M			10.1	25.2	40.3	20.0
5.0 × 10 ⁻³ M			32.6	58.8	50.4	44.6
2.0 × 10 ⁻² M	13.9	-11.0				
5.0 × 10 ⁻² M	25.8	24.4				
1.0 × 10 ⁻¹ M	46.5	53.3				

Table 6. The effect of inhibitors on respiration of leaves and roots. Tomato plants were cultured in a solution containing 100 ppm of NO₃-N or NH₄-N for 4 days and offered to experiment. O₂ uptake was determined during one hour at a pH value of 6.0.

Nitrogen conc. in culture solution (ppm)	Organ	Inhibition %		
		Malonate 0.1M	Azide 5 × 10 ⁻³ M	HO-quinoline 5 × 10 ⁻³ M
NO ₃ -N 100	Leaf	59.5	21.7	13.5
NH ₄ -N 100	Leaf	74.7	38.8	14.0
NO ₃ -N 100	Root	54.0	60.0	15.2
NH ₄ -N 100	Root	49.0	60.0	41.9

考 察

切断葉または切断根に NH₄-N を供与すると、切断根においては酸素吸収阻害現象が認められた。この事実から、短時間のうちに根の組織中に高濃度の NH₄-N を集積させると酸素吸収阻害をおこすことがわかる。しかし、葉身においては組織中に高濃度の NH₄-N が集積したにもかかわらず酸素吸収の低下は認め

られなかった。このことは根とちがつて葉身では何らかの機構で NH₄-N が呼吸に関与する系に直接作用しないように制御されているのではないかと推察される。NH₄-N による根の酸素吸収阻害は動物組織のホモジネートや分離ミトコンドリアを用いた実験 (Erecinska and Worcel, 1963; Recknagel and Potter, 1951; Targel and Slater, 1963) と同じ結果となった。その阻害機構は勝沼 (1965) の報告したアンモニウムの TCA サイクル阻害によるものかもしれない。一方 50~200 ppm の NO₃-N または NH₄-N を含む培養液でトマト植物を培養すると、葉身、根共に NO₃-N 培養に比べて NH₄-N 培養の方が呼吸速度が大であった。これは過剰吸収された NH₄-N を同化・解毒する系が NH₄-N の集積によって活性化されることによると推察される。

RQ値は表 4 に示すとおり葉身では NO₃-N 培養植物よりも NH₄-N 培養植物の方が低く、根では両者間に顕著な差が見られなかった。この事実から、葉身では呼吸基質が両者間で相違することが推察され、根では呼吸基質に相違はなくその代謝活性だけが高まっているものと推察される。葉身における呼吸基質の変動については、従来の知見 (戸荻ら, 1955) から考えて NO₃-N 培養植物では呼吸基質として有機酸の利用される割合が高いために 1 よりかなり高く、NH₄-N 培養植物ではアミノ酸合成のため有機酸レベルが低下し、基質として有機酸以外の化合物、例えば糖などがよりよく利用されるために低下することが考えられる。

阻害剤を用いた実験で葉身をマロン酸、ナトリウムアザイドで阻害した場合 NO₃-N 培養植物に比べ NH₄-N 培養植物で阻害効果が大であり、ヒドロオキシキノリンで阻害した場合には差は見られなかった。マロン酸は TCA サイクルの阻害剤であり、アジ化物は末端酸化酵素系の重金属酵素活性をおさえるものである。これらの作用から考えると、葉身では NH₄-N 培養植物の方が TCA サイクルの呼吸関与が大であり、末端酸化酵素の中で重金属を含む酵素 (チトクロームオキシダーゼなど) の関与が大であることが推察される。一方根ではヒドロオキシキノリンによる阻害が NH₄-N 培養植物で大であった。ヒドロオキシキノリンは銅系酵素の特異的阻害剤と考えられており、銅系酵素の一つであるポリフェノールオキシダーゼのような酵素の呼吸関与が NH₄-N 培養植物で大となっているものと推察される。

第 1 報で報告したように NH₄-N 培養植物の根ではポリフェノールオキシダーゼ活性が増大しており、阻

害剤を用いた本実験結果とよく一致している。石塚・高岸 (1962) はタバコを用いてカリ欠乏植物の呼吸を測定し、葉身における酸素吸収の増大を認め、その増大の原因としてエネルギー代謝と関係がないと考えられている銅系酵素による酸化作用のあることを指摘している。本研究では葉身での呼吸増大の内容はカリ欠乏症のそれと同様の結果とならなかつたが、根においては共通する面を有していた。

要 約

1. 切断葉または切断根を高濃度の $\text{NH}_3\text{-N}$ または $\text{NH}_4\text{-N}$ に浸漬し酸素吸収を測定した結果、根では6時間後に $\text{NH}_4\text{-N}$ による酸素吸収阻害が認められ、根中に高濃度の $\text{NH}_4\text{-N}$ が集積した。しかし葉身においては体内に高濃度の $\text{NH}_4\text{-N}$ が集積したにもかかわらず $\text{NH}_4\text{-N}$ による影響はみられなかつた。根においてはアンモニウムの影響は従来の動物組織のホモジネートや分離ミトコンドリアを用いた実験と同様の結果となりアンモニウムにより TCA サイクルが阻害されている可能性が指摘された。

2. $\text{NO}_3\text{-N}$ または $\text{NH}_4\text{-N}$ 50~200 ppm を含む培養液でトマト幼植物を培養したのち経時的に葉身および根の呼吸速度を測定した結果、両器官ともに $\text{NO}_3\text{-N}$ 培養植物よりも $\text{NH}_4\text{-N}$ 培養植物で呼吸が顕著に高まることが認められ、また培養液中の窒素濃度の高い程呼吸も高くなる結果が得られた。これらの事実から過剰吸収されたアンモニウムを活発に代謝するために代謝系が活性化されるものと推察した。

3. 呼吸内容の変動の指標として RQ 値を算出すると、葉身では $\text{NO}_3\text{-N}$ 培養植物に比べ $\text{NH}_4\text{-N}$ 培養植物でいずれの窒素レベルでも RQ 値は低下した。しかし、根においては顕著な差が見られなかつた。こ

のことは葉身と根とは呼吸内容を異にすることを示唆している。

4. 阻害剤を用いた実験から $\text{NH}_4\text{-N}$ 培養植物の根においては銅系酵素の一つであるポリフェノールオキシダーゼの呼吸に対する関与が大きいたことが認められた。

文 献

- Erecinska, M. and A. Worcel 1963 Reversal of the inhibitory action of ammonia on the respiration of rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 71: 305-310
- 石塚喜明・高岸秀次郎 1962 たばこ植物の加里欠乏症に関する研究 (第2報) 窒素源を異にした場合の欠乏症発現に伴う窒素及び炭水化物代謝。土肥誌, 33: 32-36
- 勝沼信勝 1965 アンモニアが関与する代謝の調節。蛋白質 核酸 酵素, 10: 627-635
- Recknagel, R. O. and Van R. Potter 1951 Mechanism of the ketogenic effect of ammonium chloride. *J. Biol. Chem.*, 191: 263
- 高井康雄・伊藤啓子 1963 水田土壤中のアンモニア拡散分析におけるアルカリ剤の検討。土肥誌, 34: 209-214
- Targel, J. M. and E. C. Slater 1963 Synthesis of glutamate from α -oxoglutarate and ammonia in rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 77: 227-245
- 戸苅義次ほか編 1955 作物の生理生態, 朝倉書店, 東京, 71頁
- 脇本賢三・山田芳雄 1985 トマト植物に対するアンモニウム過剰の影響 第1報 窒素給源の相違がトマト幼植物の二・三の呼吸関連酵素活性に及ぼす影響。九大農学芸誌, 39: 107-113
- Worcel, A. and M. Erecinska 1962 Mechanism of inhibitory action of ammonia on the respiration of rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 65: 27-33

Summary

In order to investigate the effect of $\text{NH}_4\text{-N}$ on respiration of tomato plants, the following two experiments were carried out.

a) Detached leaves or roots were treated with a high concentration of $\text{NH}_4\text{-N}$ solution for several hours.

b) Plants were cultured in solutions containing comparatively low levels of $\text{NH}_4\text{-N}$ (50-100 ppm) for a long period.

When detached roots were treated with a high level of $\text{NH}_4\text{-N}$, oxygen uptake was more decreased than that in the check. When plants were cultured in a solution containing a comparatively low level of $\text{NH}_4\text{-N}$, respiration was accelerated in both leaves and roots.

RQ (CO_2/O_2) values were lower in the leaves of $\text{NH}_4\text{-N}$ fed plants than in those of $\text{NO}_3\text{-N}$ fed ones. In roots, no difference in RQ values was found between the plants fed with these two nitrogen sources. The difference in RQ value in leaves was attributed to the fact that the oxygen uptake was greater than the carbon dioxide output in $\text{NH}_4\text{-N}$ fed plants. Consequently, there appears to be a qualitative difference between respiration by roots and leaves.

The degree of inhibition of O_2 uptake by malonate and azide were higher in leaves in $\text{NH}_4\text{-N}$ fed plants than in $\text{NO}_3\text{-N}$ fed ones, though no difference was found in inhibition by hydroxyquinoline. In roots, on the other hand, the degree of inhibition by hydroxyquinoline was remarkably higher in $\text{NH}_4\text{-N}$ fed plants than in $\text{NO}_3\text{-N}$ fed ones.

These facts suggest that in the leaves iron-containing enzymes play an important part as the terminal oxidase in $\text{NH}_4\text{-N}$ fed plants than in $\text{NO}_3\text{-N}$ fed ones, while in the roots copper-containing enzymes have an important role in $\text{NH}_4\text{-N}$ fed plants.