

ナス科果菜の溢泌液中のサイトカニンに及ぼす窒素形態の影響

鐘 鈴鋒・加藤 徹

(農学部蔬菜園芸学研究室)

Influence of Nitrogen Form on Cytokinins in Xylem Exudate of Solanaceous Fruit Vegetables

Lingfeng ZHONG and Toru KATO

Laboratory of Vegetable Crop Science, Faculty of Agriculture

Abstract: Tomato cv. 'Fukuzyu No. 2', eggplant cv. 'Hayabusa' and sweet pepper cv. 'Shin-sakigakemidori' were grown in sand culture under vinylhouse conditions in order to clarify the species differences in the effect of various concentration ratios of $\text{NO}_3\text{-N}$ to $\text{NH}_4\text{-N}$ on cytokinins in xylem exudate as related to the top growth.

1. Tentative identification of cytokinins present in all xylem exudates using High Performance Liquid Chromatography revealed the presence of adenine, trans-zeatin, cis-zeatin, zeatin riboside, $\text{N}^6\text{-}[\Delta^2\text{-isopentenyl}]$ adenine (2 iP) and $\text{N}^6\text{-}[\Delta^2\text{-isopentenyl}]$ adenine riboside (2 iPA). It was shown that the concentrations of cis-zeatin and zeatin riboside in xylem exudate of eggplant and sweet pepper were higher than tomato, but trans-zeatin was the highest in tomato, followed by eggplant and sweet pepper.
2. The concentrations of cis-zeatin, zeatin riboside and 2 iPA were not affected in xylem exudate of plants grown under various concentration ratios of $\text{NO}_3\text{-N}$ to $\text{NH}_4\text{-N}$. However, when $\text{NH}_4\text{-N}$ was over 70% in the nitrogen ratio, adenine concentration increased and conversely concentrations of trans-zeatin and 2 iP decreased, especially in tomato.
3. There was found a significant positive correlation between the amount of trans-zeatin in xylem exudate and top dry weight while other cytokinins were not.
4. From these results, it may be yielded that the top growth is greatly affected by trans-zeatin in the xylem exudate from root.

緒 言

著者ら^{1,2)}はすでにナス科果菜の生育に及ぼす窒素形態の影響の差異について体内成分及び溢泌液中の化学組成の面から比較検討し、ナスはトマト、ピーマンに比べてアンモニア態窒素の同化能力が大で、耐アンモニア性があることを明らかにした。また窒素形態によって各作物とも溢泌速度が影響されるだけでなく、溢泌液中の化学組成も著しく異なることを報告した。

すでに木部溢泌液中にサイトカニンが含まれ、蒸散流に従って地上部へ移動し、地上部の生長発育に重要な役割を果たしていることが知られている³⁻⁸⁾。溢泌液中のサイトカニンの種類については、ペーパークロマトグラフィーによる分離及びカルス生物検定法によってゼアチンとゼアチンリボシドなどが報告されている^{5,6,9)}。最近、速液体クロマトグラフィー (HPLC) で多くの種類

のサイトカイニンを分離定量することが可能になっている^{10,11)}。本実験では高速液体クロマトグラフィーを使用し、溢泌液中のサイトカイニンの種類を試験的に調査し、それとともに窒素形態によってそれらにどう影響を及ぼすかをナス科果菜を供試し、検討したので報告する。

実験方法

既報²⁾と同じく窒素源として硝酸態窒素とアンモニア態窒素の濃度比率を10:0, 7:3, 5:5, 3:7と0:10の5処理区を設け、トマト(福寿2号)、ナス(はやぶさ)、ピーマン(新さきがけみどり)を定植後8週間にわたってビニルハウス内で砂耕によって栽培した。培養液濃度は窒素、リン、カリ各200、カルシウム80及びマグネシウム24ppmとし、鉄1、マンガン0.5、銅0.02、亜鉛0.05、ホウ素0.5並びにモリブデン0.05ppmを加えて日に3~5回かけ流して栽培した。実験終了時に溢泌液を採集して-20℃で貯蔵し、分析に供した。採集した溢泌液を供試し、Fig. 1に示すような手順で溢泌液中のサイトカイニン様物質を抽出した。LC-4A形島津高速液体クロマトグラフィーを使用し、サイトカイニンの標準物質としてアデニン(adenine)、トランスゼアチン(trans-zeatin)、シスゼアチン(cis-zeatin)、ゼアチンリボシド(zeatin riboside)、2iP(N^6 -[Δ^2 -isopentenyl] adenine)と2iPA(N^6 -[Δ^2 -isopentenyl] adenine riboside)を指標とし、リテンションタイムを考慮して溢泌液中のこれらのサイトカイニン含量を測定した。HPLCのキャリアとして1%酢酸アセトニトリルと1%酢酸蒸留水を使って波長254 nm¹⁰⁾及び265 nm¹¹⁾で測定した(Fig. 2)。ピーク面積の大きさ(Table 1)から見た検出感度はゼアチンリボシドと2iPAが両波長でほとんど変わらなかった。しかし、アデニンの検出感度が波長254 nmで著しく高く、逆にトランスゼアチン、シスゼアチン及び2iPの検出感度が波長265 nmで254 nmよりも高かった。一般に作物体内及び溢泌液中のサイトカイニン含量が非常に微量で、もしゼアチンを中心に分析するならば、波長265 nmを利用する方が検出しやすいと思われたので、本実験で溢泌液中のサイトカイニンの分析は波長265 nmで行った。Fig. 3に示すように、サイトカイニンの標準物質を指標としてリテンションタイムを考慮しながらサンプルのサイトカイニン濃度を測定した。なおサンプル中にサイトカイニンの標準物質を加えて混合し、ピークの確認も行った。

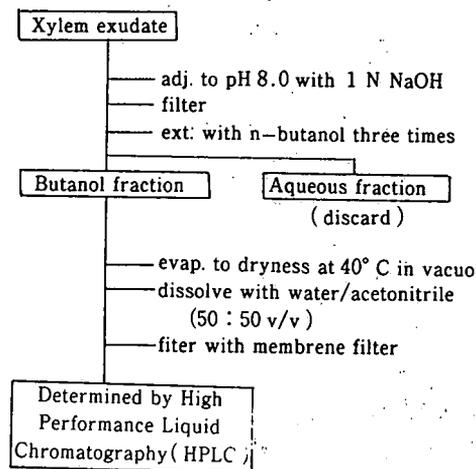


Fig. 1. Flow diagram for extraction and partition of cytokinin-like substances from xylem exudate.

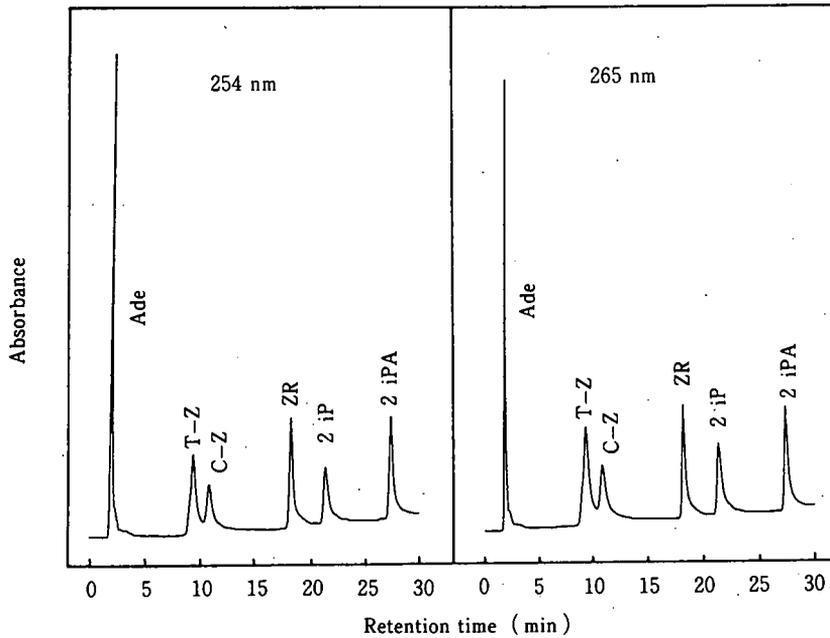


Fig. 2. Separation of standard cytokinins by reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Column : Shim-pack CLC ODS ; injected amount : 10 μ l of mixture solution containing that Ade, T-Z, C-Z, ZR, 2 iP and 2 iPA were 10 ppm, respectively ; solvent A was acetonitrile with 1 % acetic acid (v/v) and solvent B was distilled water with 1 % acetic acid (v/v) ; elution conditions : flow rate 1.6 ml/min with a 35 min gradient, starting with 4 % solvent A (in solvent B), 8 % solvent A until 10 min, ending with 33 % solvent A. Ade=adenine ; T-Z=trans-zeatin ; C-Z=cis-zeatin ; ZR=zeatin riboside ; 2 iP= N^6 - (Δ^2 -Isopentenyl) adenine ; 2 iPA= N^6 - (Δ^2 -isopentenyl) adenine riboside.

Table 1. Influence of wave length on detection sensitivity of standard cytokinins by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Cytokinin	Cytokinin content (μ g)	Peak area	
		254nm	265nm
Adenine	0.1	12248	8935
Trans-zeatin	0.1	6257	7708
Cis-zeatin	0.1	3986	4679
Zeatin riboside	0.1	5941	5923
2 iP	0.1	3740	4899
2 iPA	0.1	5625	5713

2 iP : N^6 - [Δ^2 -isopentenyl] adenine ;

2 iPA : N^6 - [Δ^2 -isopentenyl] adenine riboside

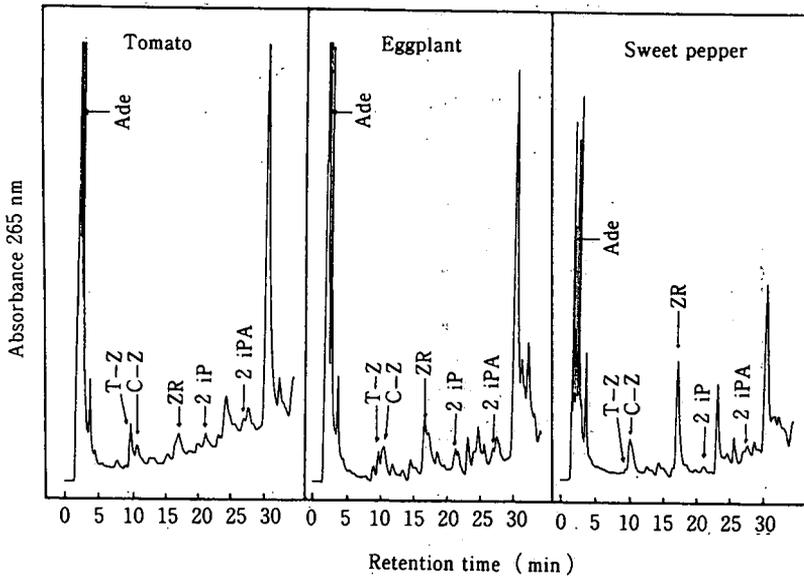


Fig. 3. Separation of butanol extracts in xylem exudate of solanaceous fruit vegetables by reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Column: shim-pack CLC ODS; injected amount: 10 μ l of sample solution; solvent A was acetonitrile with 1% acetic acid (v/v) and solvent B was distilled water with 1% acetic acid (v/v); elution conditions: flow rate 1.6 ml/min with a 35 min gradient, starting with 4% solvent A (in solvent B), 8% solvent A until 10 mins, ending with 33% solvent A. Ade = adenine; T-Z = trans-zeatin; C-Z = cis-zeatin; ZR = zeatin riboside; 2iP = $N^6-(\Delta^2\text{-isopentenyl})$ adenine; 2iPA = $N^6-(\Delta^2\text{-isopentenyl})$ adenine riboside.

結 果

1. サイトカイニン含量に及ぼす影響

溢泌液にサイトカイニン様物質が数多く見られたが、標準物質と対応した保持時間から、サイトカイニン濃度を Table 2 に示した。作物別に見ると、トマトでアデニンとゼアチンリボシド濃度が高く、次いでトランスとシスゼアチンの順で、2iP と 2iPA 濃度は低かった。ナスでは、ゼアチンリボシド、アデニンとシスゼアチン濃度が高く、逆に 2iP、2iPA およびトランスゼアチン濃度が低かった。ピーマンもナスと同様な傾向が見られた。窒素形態の影響について見ると、各作物とも硝酸態窒素とアンモニア態窒素の各濃度比率は溢泌液中のシスゼアチン、ゼアチンリボシド及び 2iPA 濃度にほとんど影響を与えなかった。しかし、アンモニア態窒素の高濃度比率でアデニン濃度が高められ、トランスゼアチンと 2iP 濃度が減少した。トマトではそれらの減少がより顕著であったが、ナスでは少なかった。

一方、既報²⁾の溢泌速度を利用して株当たり時間当りの溢泌液中のサイトカイニン含量を計算した。Table 3 に見られるように、トマトではトランスゼアチン、ナスではアデニン、シスゼアチン、ゼアチンリボシド、2iP と 2iPA がそれぞれ他作物に比べて多い傾向を示していた。ピーマンではシスゼアチンとゼアチンリボシドがトマトよりも多かったが、溢泌速度が小さいので、その他は

Table 2. Influence of concentration ratios of nitrate nitrogen to ammonium nitrogen on the cytokinin concentration of xylem exudate in solanaceous fruit vegetables

Crop	Ratios of NO ₃ -N : NH ₄ -N	Adenine	Trans- zeatin	Cis- zeatin	Zeatin riboside	2 iP	2 iPA
		μg / ℓ					
Tomato	10 : 0	14.31	12.23	10.30	16.50	8.92	5.60
	7 : 3	14.23	12.46	11.82	16.26	9.94	5.26
	5 : 5	15.63	13.01	10.85	17.45	8.83	5.23
	3 : 7	21.40	9.02	9.86	18.71	6.54	5.06
	0 : 10	26.20	7.20	10.06	17.21	4.10	5.15
Eggplant	10 : 0	42.40	6.10	20.96	49.26	15.21	9.85
	7 : 3	41.03	6.26	20.13	52.14	15.17	9.63
	5 : 5	45.23	5.98	19.85	48.65	16.64	9.24
	3 : 7	47.90	5.27	19.17	53.80	12.37	8.98
	0 : 10	55.40	5.01	19.40	50.72	10.30	9.52
Sweet pepper	10 : 0	15.33	3.10	28.30	59.33	7.91	3.91
	7 : 3	15.81	2.93	29.23	59.41	8.10	4.37
	5 : 5	15.52	2.82	27.21	58.22	7.65	4.85
	3 : 7	18.10	2.49	26.98	62.42	6.65	4.32
	0 : 10	24.76	2.52	28.64	62.44	6.52	4.04

2 iP : N⁶-[Δ²-isopentenyl] adenine ; 2 iPA : N⁶-[Δ²-isopentenyl] adenine riboside

Table 3. Influence of concentration ratios of nitrate nitrogen to ammonium nitrogen on the amounts of cytokinins of exudate xylem in solanaceous fruit vegetables

Crop	Ratios of NO ₃ -N : NH ₄ -N	Adenine*	Trans- zeatin	Cis- zeatin	Zeatin riboside	2 iP	2 iPA
		μg / 10hr/plant					
Tomato	10 : 0	0.966	0.826	0.695	1.114	0.602	0.378
	7 : 3	1.079	0.944	0.896	1.233	0.753	0.399
	5 : 5	1.052	0.876	0.730	1.174	0.594	0.352
	3 : 7	1.177	0.496	0.542	1.029	0.360	0.278
	0 : 10	1.187	0.326	0.456	0.780	0.186	0.233
Eggplant	10 : 0	1.751	0.252	0.866	2.034	0.628	0.407
	7 : 3	1.994	0.304	0.978	2.534	0.737	0.468
	5 : 5	1.931	0.255	0.848	2.077	0.711	0.395
	3 : 7	1.830	0.201	0.732	2.055	0.473	0.343
	0 : 10	1.873	0.169	0.656	1.714	0.348	0.322
Sweet pepper	10 : 0	0.391	0.079	0.722	1.513	0.202	0.100
	7 : 3	0.457	0.085	0.845	1.717	0.234	0.126
	5 : 5	0.402	0.073	0.705	1.508	0.198	0.126
	3 : 7	0.405	0.056	0.604	1.398	0.149	0.097
	0 : 10	0.463	0.047	0.536	1.168	0.122	0.076

* Concentration of cytokinin x amount of xylem exudate/10hr/plant.

2 iP : N⁶-[Δ²-isopentenyl] adenine ; 2 iPA : N⁶-[Δ²-isopentenyl] adenine riboside.

著しく少なかった。窒素形態の影響について見ると、アデニンは各作物ともアンモニア態窒素施用区が硝酸態窒素単用区よりも多かった。他のサイトカイニン含量は硝酸態窒素とアンモニア態窒素の濃度比率を7:3とした場合に多かったが、それよりもアンモニア態窒素の濃度比率の高まりで減少する傾向が見られた。

2. サイトカイニンと地上部生育の関係

既報²⁾の地上部乾物重を利用して溢泌液中のサイトカイニン含量との関係を検討してみると、Fig. 4に示すように、株当たり時間当りの溢泌液中のトランスゼアチンの含量と地上部の乾物重との間にはそれぞれ高い正の相関が認められたが、他のサイトカイニンでは見られなかった (Table 4)。

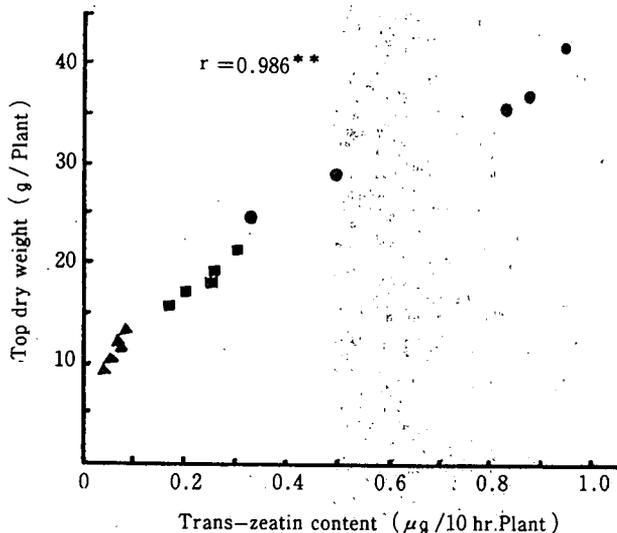


Fig. 4. Correlation between trans-zeatin content of the xylem exudate and top dry weight in solanaceous fruit vegetables.

● Tomato ; ■ Eggplant ; ▲ Sweet pepper.

** Significant at 1 % Level.

Table 4. Correlation between cytokinin content of the xylem exudate and top dry weight^a in solanaceous fruit vegetables

Cytokinin content (μg/10hr. plant)	Correlation coefficient
Adenine	0.228
Trans-zeatin	0.986**
Cis-zeatin	-0.151
Zeatin riboside	-0.363
N ⁶ -[Δ ² -isopentenyl] adenine	0.645
N ⁶ -[Δ ² -isopentenyl] adenine riboside	0.634

^a Top dry weight includes fruit weight in tomato plants.

** Significant at 1 % level.

考 察

1. 溢泌液中のサイトカイニンの種類

ゼアチンとゼアチンリボシドは溢泌液中存在し、ゼアチンリボシドは溢泌液中の主なサイトカイニンといわれている¹²⁾。しかし YOSHIDA ら⁹⁾はイネの溢泌液中のゼアチン含量がゼアチンリボシドよりも著しく高いと報告している。DAVEY ら⁵⁾はトマトの生育初期には溢泌液中のゼアチンリボシドが著しく高かったが、開花後ゼアチンとゼアチンリボシドがほとんど同レベルであると報告している。植物体内から 2iP と 2iPA を検出したことが報告されているし⁴⁾、根の溢泌液にも存在することが最近初めて報告されている¹³⁾。本実験ではトランスゼアチン、ゼアチンリボシド、2iP と 2iPA が見られたほかにシスゼアチンも溢泌液中に存在することを認めた (Table 2)。これはおそらくシスゼアチンのリテンションタイムがトランスゼアチンと非常に近いので、従来のペーパークロマトグラフィーで測定すると、検出しにくいのかも知れない。またアデニンはかなり高い濃度で溢泌液中に存在していた。

各作物ともゼアチンリボシド濃度が他のサイトカイニンよりも高かった (Table 2)。作物間の比較をすると、トマトではトランスゼアチン、ナスではシスゼアチンとゼアチンリボシドの濃度がそれぞれ他作物に比べて高かった。また溢泌液からのサイトカイニン溢出量は溢泌速度に強く影響されていた (Table 3)。根でのサイトカイニンの生産が作物種類によって異なることが認められた。

2. サイトカイニン形態、活性と生育

SITTON ら¹⁴⁾は根から地上部へのサイトカイニン供給の減少に伴う植物の老化を観察している。植物の成長速度、光合成及び葉のサイトカイニン含量が根によって左右されることが報告されている^{3,15)}。SKENE ら⁶⁾は溢泌液中のサイトカイニン含量がブドウの生育及び収量に大きな影響を及ぼすことを報告している。また、STEVEN ら⁸⁾は桜桃の溢泌液のサイトカイニン含量と収量との間には高い正の相関が見られたと報告している。本実験でも溢泌液中のトランスゼアチン含量と地上部乾物重の間には高い正相関が認められた (Fig. 4)。すなわち、生育量の多いトマトではトランスゼアチン含量が著しく多く、逆に生育量の少ないピーマンではトランスゼアチンが少なかった。しかし、ゼアチンリボシド及び他のサイトカイニンと生育との間には高い相関は見られなかった。

今まで自然界に存在するサイトカイニンの中で、アデニンとシスゼアチンの活性が著しく弱く、トランスゼアチンとゼアチンリボシドの活性が高いと報告されている⁷⁾。SPIESS¹⁶⁾と WHITAKER ら¹⁷⁾も *Funaria Hygrometrica* の生物検定法でトランスゼアチンの活性がゼアチンリボシドよりも著しく高いと報告している。しかし、DAVEY ら⁵⁾は大豆カルス生物検定法で測定したところ、ゼアチンとゼアチンリボシドがほとんど同じ位で、高い活性をもっていたと報告しているが、PALNI ら¹⁸⁾はゼアチンリボシドがゼアチンよりも高いと報告している。以上の報告から、サイトカイニンの生物活性が MOK ら¹⁹⁾の指摘しているように植物の種類によって異なるのかも知れない。本実験ではトランスゼアチンと生育との間に高い相関が認められ、他のサイトカイニンでは認められなかったことから、トランスゼアチンは他のサイトカイニンよりも密接に生育に関与しているように思われる。

3. 窒素形態とサイトカイニン

アンモニア態窒素の高濃度比率で各作物ともトランスゼアチンと 2iP 濃度が著しく減少したが、アデニンが増加し、またシスゼアチン、ゼアチンリボシドと 2iPA がほとんど変わらなかった。これは高アンモニア濃度の条件下でトランスゼアチンの生産が減少したほかに、トランスゼアチンがアデニンやゼアチンリボシドまで分解または移行したものと思われる。2iP においても同様なことが考えられる。このように、高アンモニアの濃度下で生育と密接に関係している活性の強いトラ

ンスゼアチン含量が低下したことによって生育が阻害されたのではないと思われる。各作物とも硝酸態窒素とアンモニア態窒素の濃度比率を7:3とした場合に溢液中のトランスゼアチン含量が著しく高いので、生育が促進されたが、それよりもアンモニア態窒素の濃度比率増加でトランスゼアチン含量の減少とともに生育も阻害され、とくにトマトではより顕著であった。サイトカニン生産に及ぼす窒素形態の影響について、SALAMAら²⁰⁾はヒマワリの溢液中のサイトカニン含量が硝酸態窒素施用区でアンモニア態窒素の施用区よりも高いと報告している。YOSHIDAら⁹⁾はアンモニア態窒素の施用で溢液中のサイトカニン含量が硝酸態窒素の施用の場合に比べて著しく減少することを報告している。これらの結果は本実験の結果と一致しているように思われる。

要 約

トマト、ナス、ピーマンの溢液を採集し、溢液中のサイトカニンに及ぼす硝酸態窒素とアンモニア態窒素の濃度比率の影響について調査した。

各作物とも溢液中にアデニン、トランスゼアチン、シスゼアチン、ゼアチンリボシド、2iPと2iPAが検出された。トマトではトランスゼアチン、ナスではアデニン、2iPと2iPA、ピーマンではシスゼアチンとゼアチンリボシドの濃度がそれぞれ他作物に比べて高かった。アンモニア態窒素の高濃度比率でシスゼアチン、ゼアチンリボシドと2iPA濃度がほとんど変わらなかったが、アデニン濃度が増加し、逆にトランスゼアチンと2iPの濃度が減少した。トマトではそれらの減少がより顕著であったが、ナスでは少なかった。株当たり時間当りの溢液中のトランスゼアチン含量と生育量との間には高い正の相関が認められたが、他のサイトカニンでは認められなかった。

文 献

- 1) 鐘 鈴録・加藤 徹：ナス科果菜の比較生理生態的研究 (第6報)。生育および体内成分に及ぼす窒素形態の影響。生物環境調節, 26, 9-19 (1988)。
- 2) 鐘 鈴録・加藤 徹・沢村 正義：ナス科果菜の比較生理生態的研究 (第7報)。溢液中の化学組成に及ぼす施用窒素の形態の影響。生物環境調節, 26, 53-60 (1988)。
- 3) CARMÍ, A. and VAN STADEN, J.: Role of roots in regulating the growth rate and cytokinin content in leaves. *Plant Physiol.* 73, 76-78 (1983)。
- 4) CHEN, C-M., ERTL, G. R., LEISNER, S. M. and CHANG C-C.: Localization of cytokinin biosynthetic sites in pea plants and carrot roots. *Plant Physiol.* 78, 510-513 (1985)。
- 5) DAVEY, J. E. and VAN STADEN, J.: Cytokinin translocation: Changes in zeatin and zeatin-riboside levels in the root exudate of tomato plants during their development. *Planta*, 130, 69-72 (1976)。
- 6) SKENE, K. G. M. and ANTCLIFF, A. J.: A comparative study of cytokinin levels in bleeding sap of *Vitis vinifera* (L) and the two grapevine rootstocks, Salt Creek and 1613. *J. Exp. Bot.* 23, 283-293 (1972)。
- 7) SKENE, K. G. M. and KERRIDGE, G. H.: Effect of root temperature on cytokinin activity in root exudate of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiol.* 42, 1131-1139 (1967)。
- 8) STEVENS, G. A. Jr. and WESTWOOD, M. N.: Fruit set and cytokinin-like activity in the xylem sap of sweet cherry (*Prunus avium*) as affected by rootstock. *Physiol. Plant.* 61, 464-468 (1984)。
- 9) YOSHIDA, R. and ORITANI, T.: Studies on nitrogen metabolism in crop plants. XIII. Effects of nitrogen top-dressing on cytokinin content. *Proc. Crop. Sci. Japan.* 43, 47-51 (1974)。
- 10) KANNANGARA, T., DURLEY, R. C. and SIMPSON, G. M.: High performance liquid chromatographic analysis of cytokinins in sorghum bicolor leaves. *Physiol. Plant.* 44, 295-299 (1978)。
- 11) HORGAN, R. and KRAMERS, R. M.: High performance liquid chromatography of cytokinins. *Journal of Chromatography.* 173, 263-270 (1979)。
- 12) HEWETT, E. W. and WAREING, P. F.: Cytokinins in *Populus robusta*: Changes during chilling and bud burst. *Physiol. Plant.* 28, 393-399 (1973)。

- 13) CAHILL, D. M., WESTE, G. M. and GRANT, B. R. : Changes in cytokinin concentrations in xylem extrudate following infection of *Eucalyptus marginata* Donn ex Sm with *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Plant Physiol.* 81, 1103-1109 (1986).
- 14) SITTON, S., ITAI, C. and KENDE, H. : Cytokinin production as a factor in shoot senescence. *Planta*, 73, 296-300 (1967).
- 15) CARMI, A and KOLLER, D. : Regulation of photosynthetic activity in the primary leaves of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by materials moving in the water conducting system. *Plant Physiol.* 64, 285-288 (1979).
- 16) SPIESS, L. D. : Comparative activity of isomers of zeatin and ribosylzeatin on *Funaria hygrometrica*. *Plant Physiol.* 55, 583-585 (1975).
- 17) WHITAKER, B. D. and KENDE, H. : Bud formation in *Funaria hygrometrica*: A comparison of the activities of three cytokinins with their ribosides. *Planta*, 121, 93-96 (1974).
- 18) PALNI, L. M. S., PALMER, M. V. and LETHAM, D. S. : The stability and biological activity of cytokinin metabolites in soybean callus tissue. *Planta*, 160, 242-249 (1984).
- 19) MOK M. C., MOK, D. W. S. and ARMSTRONG, D. J. : Differential cytokinin structure-activity relationships in *Phaseolus*. *Plant Physiol.* 61, 72-75 (1978).
- 20) SALAMA, A. M. EI-D. A. and WAREING, P. F. : Effects of mineral nutrition on endogenous cytokinins in plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.) . *J. Exp. Bot.* 30, 971-981 (1979).

(昭和63年9月30日受理)

(昭和63年12月27日発行)

