

TTCおよび α -ナフチルアミンによる 茶樹根の活力測定法ならびにその応用*

橘 尚**・中山 仰***

Examination on Determining Physiological Activities of Tea Roots by TTC Reduction and α -Naphthylamine Oxidation and Its Application.

Hisashi TACHIBANA and Aogu NAKAYAMA.

はしがき

高等植物においては、根は地下にあって地上部を固定し保持しているばかりでなく、養水分の吸収器官、貯蔵器官などとして植物の生長に欠くことができない。そこで、作物の根の活力の簡便な調査法が早くから要望されていた。既に、水稻根について相見らによりTTC(2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride)による脱水素酵素の還元反応をみる方法¹⁾や、 α -ナフチルアミン^{9, 11)}、Esculin²⁾による酸化力を測定する方法などが確立されている。これらの方法は、根組織の還元力、酸化力を測定し養分吸収力を推量しようとしたものである。

TTCは、生きた細胞や組織によって還元され、その還元力は呼吸の電子伝達系によって基質から遊離された電子(水素)をフラビン酵素から受容することによって生じるとされ⁴⁾、この点から呼吸との関係は当然高いと考えられる。また、 α -ナフチルアミンが生体内で酸化される機構は、呼吸代謝過程で生成される H_2O_2 の存在の下で、鉄酵素パーオキシダーゼが働いて酸化されることが明らかにされている⁶⁾。山田¹¹⁾らは、水稻根において、 α -ナフチルアミン酸化力と呼吸作用との間にきわめて高い正の相関を認め、また、稲田⁵⁾および岡島⁷⁾も水稻根の養分吸収と呼吸作用との関係において、呼吸の大小と養分吸収との間に密接な関係が存在することを明らかにしている。

茶樹根においても、これら酵素活性による測定方法を適用できれば、根の生理的活力程度を知るうえできわめて有効な手段となる。そこで、茶樹根においてTTCおよび α -ナフチルアミンを用い、根の生理的活力測定法について検討するとともに、それを応用して異なる土壌

条件下で生育した茶樹細根の活力について調査したので、その結果を報告する。

実験 I 茶樹根の活力調査のためのTTC還元力および α -ナフチルアミン酸化力測定法の検討 : 実験材料および方法

1. 実験材料

1975年10月、やぶきたさし木1年生苗を苗圃から、根をなるべく傷めないように抜き取り、十分水洗した後濾紙を用い付着水を取り除き、3~4cm程度に根を切断して供試した。

2. 測定法の概要

(1) TTC還元法^{10, 13)}

供試生根1gを100ml容三角フラスコにとり、0.2% TTC溶液(0.4% TTC水溶液と0.1M 磷酸緩衝液、PH 7.0の等量混合液)20ml中に浸漬し、37°Cの暗黒下で反応させた。所定時間後、2NH₂SO₄ 4mlを加えて反応を停止させ、根をとり出して水分をよく拭い去り、適量の酢酸エチルと少量の石英砂を加え乳鉢で磨砕しフォルマザンを抽出した。抽出した液を乳鉢から25mlメスフラスコに移し、残渣を2~3回少量の酢酸エチルで洗浄し、洗液を合体し、酢酸エチルで稀釈して、主波長485m μ で比色した。標準曲線は吉田¹⁰⁾の方法で作成し、根乾物1g、1時間当たりの生成フォルマザン量をもって表示した。

(2) α -ナフチルアミン酸化法^{10, 13)}

供試生根1gを100ml容三角フラスコにとり、20ppm α -ナフチルアミン溶液(α -ナフチルアミン40ppmと0.1M 磷酸緩衝液、PH 7.0等量混合液)50ml中に

* この報文の一部は、1976年茶業研究報告に発表した。

** 茶業センター

*** 農林省茶業試験場

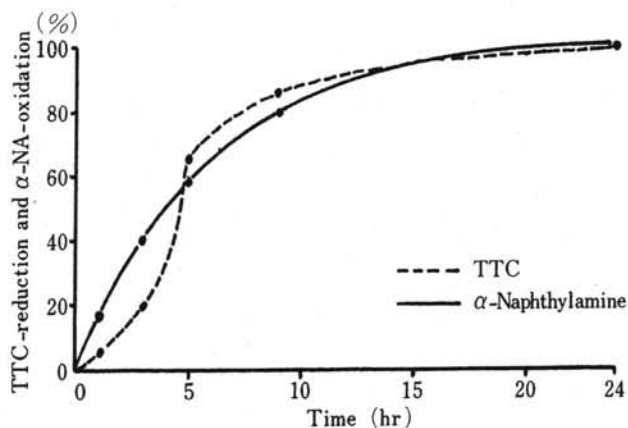
浸漬し、軽く振とうする。根による α -ナフチルアミンの急速な吸着が終了する5分後に、スタートの α -ナフチルアミン濃度を測定するために、前記液2mlを採取した。室温でときどき振とうしながら一定時間反応させ、反応終了後に第2回の採取2mlをとり、定量し両者の差から根による α -ナフチルアミン酸化量を算出した。なお、 α -ナフチルアミンは自己酸化を行うので、上記と同じ操作を根を加えずに行って、ブランク値を求めて自己酸化分を差引いた。 α -ナフチルアミンの定量は、坂井ら⁹⁾の方法に準じ、採取液2mlに10mlの蒸留水を加え、1%スルファニル酸溶液(1gのスルファニル酸を30%酢酸100mlに溶解)1mlおよび100ppm NaNO₂溶液1mlを加えて攪拌し発色させた後、全容を蒸留水で25mlとして、20~60分以内に510m μ で比色定量した。なお、光電比色計は島津スペクトロニック20を用いた。

結果および考察

1. TTC還元力および α -ナフチルアミン酸化力と浸漬時間との関係

TTC還元力ならびに α -ナフチルアミン酸化力を測定する場合、供試根をそれぞれの溶液に浸漬する時間と反応との関係を調査し、適切な浸漬時間を明らかにした。

その結果は、第1図に示すとおりであり、TTCの場合浸漬5時間までは著しく還元量は増し、その後も緩慢ではあるが、還元量は増大の傾向を示した。しかし、15時間以上の長時間の浸漬は、細根のみでなく溶液まで赤色の呈色反応を示し、正確な値が求められない場合があった。これは、細菌等の繁殖によって還元が進行したためと考えられる。したがって、長い浸漬は無意味であり、測定に適切な浸漬時間は、作業手順を合わせ検討すると、強度な還元が終了する5時間程度が望ましいものと考えられる。また、 α -ナフチルアミンの場合もTTCと同様な傾向にあり、5時間程度の浸漬で十分であろう。



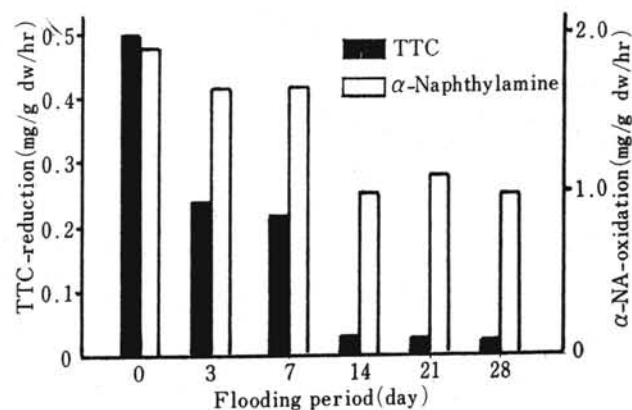
第1図 浸漬時間とTTC還元力および α -Naphthylamine酸化力の関係

注) 浸漬24時間後のTTC還元力および α -Naphthylamine酸化力を100とした。

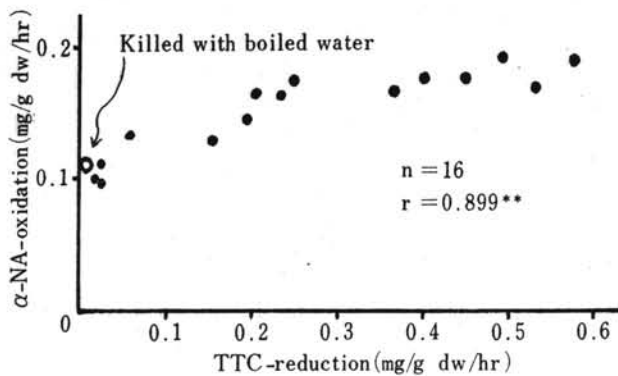
2. TTC還元力と α -ナフチルアミン酸化力との関係

茶樹細根におけるTTC還元力と α -ナフチルアミン酸化力との活力程度を検討するため過湿障害試験¹²⁾に使用した根試料を用い、両者の比較を行った結果を第2図にまとめた。茶樹細根のTTC還元力は、湛水処理3日後と14日後に著しい低下が認められ、湛水処理3日後で無処理の50%程度に、14日後には5%程度にまで低下した。また、 α -ナフチルアミン酸化力も同様の傾向を示したが、TTC還元力ほど顕著でなかった。さらに、両者の関係を相関表をもとに検討した結果、第3図に示すように $r=0.899$ のきわめて高い正の相関が認められた。しかし、 α -ナフチルアミン酸化力の反応は、TTC還元力の反応に比べ比較的弱く、しかもTTC還元力がほとんど認められない場合においても、 α -ナフチルアミンではかなりの酸化力が認められた。なお、細根を熱湯に3分間浸漬し細胞活性を止めた根(死根)のTTC還元力、 α -ナフチルアミン酸化力を生きている根(生根)と比較した結果、TTC還元力は、生根と死根の差異が呈色反応でも明らかに識別でき、死根はほとんどフォルマザンの生成が認められなかった。一方、 α -ナフチルアミン酸化力は、生根と死根とに差異を認めたが、なお死根においても相当量の酸化力が認められた。これは、茶樹が比較的強酸性土壤に生育するため、土壤中に鉄、マンガンなどの濃度が高く、それらが根の表面に付着あるいは吸着されているために、無機的に α -ナフチルアミンが酸化されるものと推察される。

以上のように、茶樹根において両溶液による活力測定法を適用した場合、根の活力程度にやや異なる評価が得られることが予想されるが、茶樹根の活力測定には、TTC還元法の適用がより有効と考えられた。



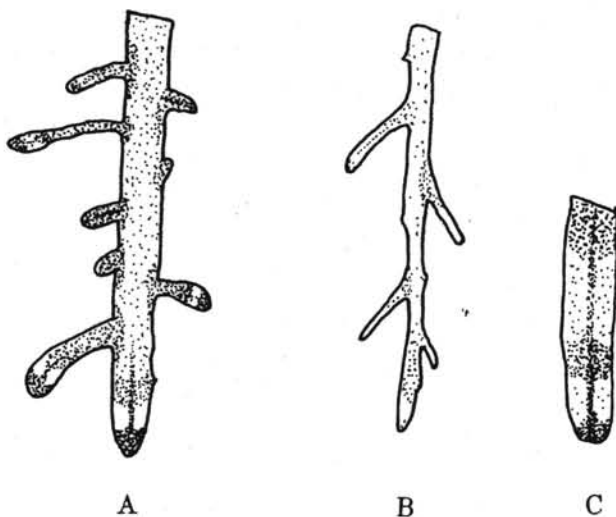
第2図 湛水処理日数がTTC還元力および α -Naphthylamine酸化力におよぼす影響



第3図 TTC還元力と α -Naphthylamine
酸化力の関係

3. TTC還元力による根の着色程度の検討

TTCにより反応を呈する細胞は、必ず原形質分離が起り生きている証拠を示す¹⁾が、細根各部位の活力の差異を詳細に調べるには、TTC反応の部位による着色程度の観察調査も必要となる。そこで、TTC還元力による茶樹根の着色程度について観察した結果を、第4図に示した。TTC還元力による着色は、新しい若い根などでは基部まで赤色に着色され(第4図、A)、特に根の先端部や分枝細根部では強く紅赤色に着色した(第4図、C)。なお、やや老化したとみられる根では、先端のごく一部分しか顕著な反応は認められなかった(第4図、B)。

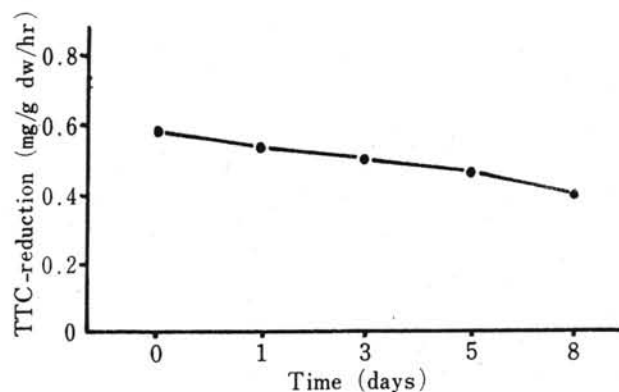


第4図 TTC溶液による茶樹細根の着色状況
注) 点の濃淡によって赤色の着色程度を示した。

このように、根の発育にともなってTTC溶液による着色の状態は変化するが、このことは、組織の発育に応じて、比較的若い組織すなわち細胞分裂が旺盛に行われている部分では、脱水素酵素反応が強いことを示すものであろう。⁸⁾

4. 低温で保存した根のTTC還元力

測定に際しては、採取した株から根を切り離し水洗したのち、根に傷害を与えないように注意し、新鮮な材料をそのまま用いることが基本となる。しかし、作業上の手順などにより、直ちに測定できないことがある。このような場合、6~10°Cでの保存も可能とされている¹⁰⁾。そこで水洗したやぶきた1年生苗の細根をビニール袋に入れ3~6°Cの冷蔵庫に保存しておき、保存日数によるTTC還元力の低下程度について検討した。その結果は、第5図に見られるように保存3日で約12%、8日で30%程度の還元力の低下が認められた。調査目的にもよるが、採取場所の相違などにより、供試根を同時に採取できない場合でも、アイスボックス等を携帯することにより、種々の根の活力を一括して比較することも可能と考えられる。ごく大まかに根の活力を知ろうとする場合には、上記の方法により2~3日間程度の保存はさしつかえないものと思われる。



第5図 低温での保存日数とTTC還元力

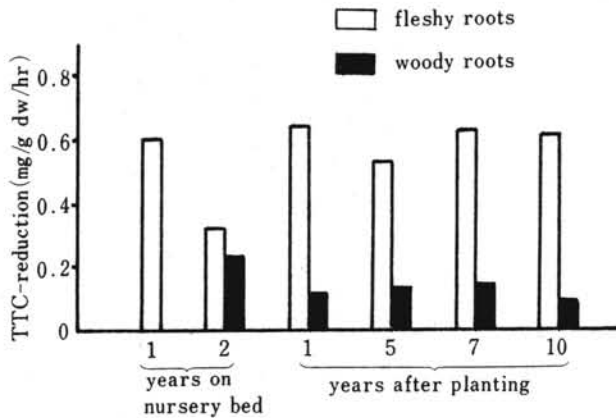
5. 樹齢を異にする茶樹根のTTC還元力の差異

前述した検討は、やぶきた1年生苗の細根の白根を供試し、一応均一なサンプルとして取り扱ったものである。次に茶樹の樹齢、採取場所、あるいは木化程度を異にする根のTTC還元力の差異について検討した。

供試茶樹は、すべてやぶきたとし、育苗中のさし木1年生、2年生および定植後1、5、7、10年生の茶園から健全な細根(直径2mm以下)を採取し、それらを白根と木化根に分け、それぞれのTTC還元力を測定した。なお、細根の分級に際して表皮の褐変したものは、すべて木化根とした。

結果は、第6図に示すとおりで、白根は2年生苗を除き、0.5 mg/g dw/hr以上の還元力が認められたが、木化根のそれは、0.1 mg/g dw/hr程度のきわめて低い値であった。2年生苗においては、他にくらべ白根は約50%、木化根は2倍程度の活力を示し、他とやや異なる傾向を示した。苗床にある2年生苗は、1年生時に

発達した細根が中根への移行期にあり、いわゆる白根との区別が困難であることと、他の細根にくらべやや太かったために低い値を示し、さらに、木化根においても木化進行中のものがあったことも若干高い値を示す結果になったものと思われる。



第6図 樹齢を異にする茶樹根のTTC還元力の差異

これらの結果から、同一品種で太さが同じ程度の健全な白根は、樹齢あるいは採取場所によるTTC還元力の差異が比較的小さいものと考えられる。さらに、木化根についてもTTC還元力の測定は可能であるが、還元力が小さく、また材料による変動が大きく、今後さらに検討する必要がある。しかしながら、このTTC還元力測定は、いろいろなほ場条件下に生育する茶樹根の活力を大まかに比較するには、きわめて有効な手段になるものと思われる。

なお、上記試験は、10～11月の根を使用しており、時期的な茶樹根の活力比較を行うには、さらに季節によるTTC還元力の差異について検討を加える必要があろう。

実験Ⅱ 茶樹根の過湿障害判定におけるTTC還元法の適用

実験材料および方法

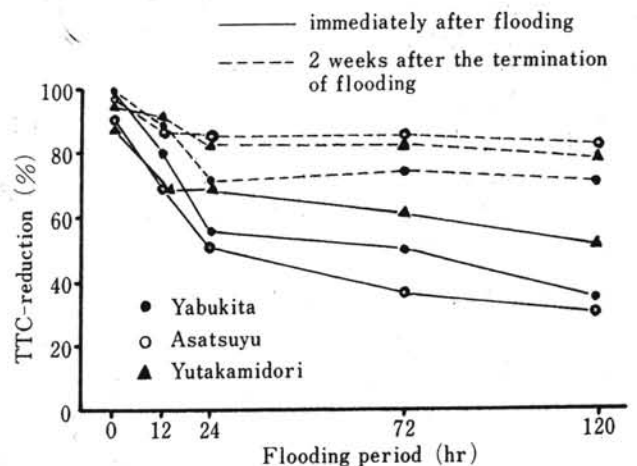
1年生苗を1/5,000のワグネルポットに移植し、活着させたのち同一条件で湛水処理を行い、湛水状態が白根におよぼす影響をTTC還元法により検討した。

試験方法は、前記2の結果を考慮して、湛水期間を0, 12, 24, 72および120時間とし、これら湛水時間の経過に伴う根の活力低下と湛水処理後の回復程度について、やぶきた、あさつゆおよびゆたかみどりの3品種を供試し比較調査した。なお、供試品種のうち、ゆたかみどりは耐湿性は中、またあさつゆは弱とされている³⁾。回復程度の調査は、湛水処理終了後に排水し、さらに2週間は場容水量を保持した後、TTC還元力を測定した。

結果および考察

前記2の結果は、湛水処理3日後には細根のTTC還元力が50%程度に減退し、7日後まではほぼ同程度の活力を維持することを示している。湛水処理による根圏の酸素不足が一時的に根の活力を減退させるものであるならば、さらに短い湛水時間でも活力低下が起こるものと想定され、また排水をし畑状態にもどすことによって、低下した根の活力はある程度まで回復するものとも想像できる。そこで、耐湿性を異にする品種について湛水処理を行い細根の活力の経時的推移と、その回復程度を調査した。

その結果は、第7図のとおりであり、各品種とも湛水期間が長いほど根のTTC還元力は低下した。特に24時間以内での低下が急激で、その後120時間までの還元力低下は、それほど著しいものでなかった。また、品種間にTTC還元力低下の程度に差異が認められ、あさつゆがもっとも顕著で、ゆたかみどりは比較的低下の程度が少なかった。これは、原田、三ッ井の結果³⁾と同様である。また、湛水処理終了後2週間目における各品種のTTC還元力から根の活力の回復程度をみると、いずれの湛水処理期間においてもある程度回復し、還元力低下の大きかったあさつゆも、他品種と同程度を示したが、湛水24時間以上の各区は無処理の70～80%程度の回復にとどまった。さらに、やぶきたについて細根各部のTTC呈色反応を観察したところ、120時間湛水区では根端部の呈色反応の少ない根が多く、72時間湛水区でもそのような根が僅かながらみられ、湛水の影響が明らかに残っていることが認められた。処理根の活力回復は経時的に変化するものとみられるので、さらに長期にわたる追跡調査が必要と考えられる。



第7図 湛水処理時間にもなるTTC還元力の減退ならびに処理後の回復程度

注) 無処理のやぶきたの還元力を100とした。

茶樹根の過湿障害の回復には、単に根組織中の諸物質の存在様式ばかりでなく、同一条件で灌水処理あとの活力回復に品種間の差があることから見ると、他の多くの内的外的要因が関与するものと推察される。本実験は、10～11月に行ったものであるが、一般に湿害の多い夏季においてさらに検討を加える必要がある。

総括

従来から茶樹根の生長を取り扱った研究は多いが、根の生理的活力程度を直接測定した例は、ほとんど見あたらない。そこでTTCおよび α -ナフチルアミンによる組織の還元力および酸化力を知る酵素活性測定法を用いて、茶樹根での測定法の検討ならびに過湿障害判定のための応用を試みた。

茶樹細根（白根部）におけるTTC還元力と α -ナフチルアミン酸化力の関係は、 $r = +0.899$ のきわめて高い相関が認められた。しかし、TTC還元力の反応は、 α -ナフチルアミン酸化力のそれに比べきわめて強く、両者は、ややその活力の程度を異にした。なお、茶樹根への適用は、TTC還元法がより有効と思われた。

チャのような木本植物では、根系が複雑であり、また個々の根の発達程度も異なっているので、生理的活力を調べるためには、あらかじめ発達程度のそろった根を得ることが必要であると考えられる。しかし、同一品種においては健全な白根のTTC還元力は、樹齢あるいは採取場所による差異は比較的少なかった。

灌水処理条件下の茶樹根の活力程度をTTC還元法を用いて測定した結果、灌水日数の経過とともに明らかな差異が認められ、本法の茶樹根への適用の可能性を確認した。

しかしながら、生理的活力を測定する方法は、厳密にはさまざまな規制された条件のもとで成り立つものである。そして、このことは主に根の呼吸能を手がかりに組み立てられていることに由来する。しかも呼吸や養分吸収力と一般的な生理活力との間の平行関係は、常に成立するという証明は必ずしもない。そこで、この活力測定法は、いろいろな環境条件下にある根の活力を大まかにとらえようとするときに用いるならば、きわめて有効な手段になると言える。

本報は、著者の一人橘の農林省茶業試験場における長期研修中（1975年9～12月）に行った研究結果をとりまとめたものである。

終りに臨み、本実験に際し供試材料の提供と種々有益な助言をいただいた茶樹第3研究室築瀬技官および種々ご協力を賜った茶樹第1研究室土井技官に厚く感謝の意を表す。なお、本報のとりまとめに当たって懇切なるご指導を賜った三重大学農学部、池田勝彦教授に対

し厚くお礼申し上げる次第である。

引用文献

- 1) 相見霊三・藤巻和子(1960): TTCによる根の活力診断法, 農及園, 35, 1345~1346.
- 2) 五島善秋・田井喜三男(1956): 水稻根の酸化力にかんする研究, 土肥誌, 26, 403~404.
- 3) 原田重雄・三ッ井稔(1957): 土壌水分が茶樹の生育に及ぼす影響について, 東近農試研報(茶), No. 5, 56~76
- 4) 稲田勝美(1967): 水稻根の生理的特性に関する研究, 農技研報, D, No. 16, 19~156.
- 5) 稲田勝美・馬場 赴(1958): 水稻根の諸特性と養分吸収との関係, 農業技術, 13, 289~293.
- 6) MATSUNAKA, S(1960): Studies on the Respiratory Enzyme Systems of Plants, Jour. Biochem., 47, 820~829.
- 7) 岡島秀夫(1960): 水稻根群の生理機能に関する研究, 東北大農研集報, No.12, 1~146.
- 8) 大山勝美(1970): クワ枝葉の切除が根の機能におよぼす影響に関する研究, 蚕試報, 24, 1~130.
- 9) 坂井 弘・吉田富男(1957): μ レ苗発生条件に関する研究, 北海道農試集報, No.72, 82~91.
- 10) 作物分析法委員会編(1975): 栽培植物分析測定法, 1, 養賢堂(東京), PP. 521~533.
- 11) 山田 登・太田保夫・中村 拓(1961): α -ナフチルアミンによる水稻根の活力診断, 農及園, 36, 1983~1985.
- 12) 築瀬好充・安部秀雄(1966): 茶樹の過湿障害について, 茶技協講要, February.
- 13) 吉田武彦(1966): 根の活力測定法, 土肥誌, 37, 64~68.

Summary

There are a considerable number of literatures on the growth of tea roots, but little work on the estimation of their physiological activity has been reported. The enzymatic activity of tea roots, therefore, was evaluated by determining the oxidizing- and reducing-power of tissue with α -naphthylamine (α -NA) or TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride).

Some experimental results on the roots of flooded tea plants were also obtained by using this method.

A highly significant correlation ($r = +0.899$) between the TTC reductive activity and the α -NA oxidative one was found when the fleshy roots were used. However, the former was far more striking

in its reaction than the latter. The TTC reduction method can be recommended for the determination of the physiological activity of tea roots.

Since the root systems of tea plants consist of a large number of roots of various developmental stages like other woody plants, a careful attention should be paid to obtain uniform samples of rootlets in the examination of their physiological activity. The TTC reducing-power of fleshy roots of a tea variety varied slightly with its plant age

and growing place.

The physiological activity of tea roots grown under flooding conditions decreased significantly with the increase of flooding days.

It is concluded that the above-mentioned method may be an excellent means to estimate roughly the activity of tea roots grown under various conditions.