

植物は土壌中の高分子有機態窒素を直接吸収し、養分として利用できるのか？

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者名	宮沢,佳恵 村山,徹
発行元	日本土壌肥料学会
巻/号	80巻3号
掲載ページ	p. 263-267
発行年月	2009年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



植物は土壌中の高分子有機態窒素を直接吸収し、
養分として利用できるのか？

宮沢佳恵・村山 徹

キーワード 腐植物質, PEON, 有機態窒素, 溶存炭素

1. はじめに

植物が高分子有機態窒素を吸収することは、古くから報告されている。1950年代には、根によるタンパク質の吸収が示唆され (Brachet, 1954, 1955, 1956), 60年代には、リゾチームやヘモグロビンが根細胞に取り込まれることがオートラジオグラフィーにより観察された (McLaren *et al.*, 1960)。その後、これらの高分子有機物がエンドサイトーシスにより根から取り込まれることが多くの報告で示されてきた (Nishizawa and Mori, 1977)。しかし、これらの高分子有機態窒素の吸収は、細胞の生理的活性等へ影響を与えるものの、それ自体の植物に対する窒素源としての効果はほとんどないと考えられてきた (Ulrich *et al.*, 1964)。高分子有機態窒素を与えて窒素源としての効果が見られた場合でも、窒素源として利用されたのは植物根から分泌されるプロテアーゼにより分解された低分子有機態窒素である可能性が示唆されている (Godlewski and Adamczyk, 2007)。

これに対し、Matsumoto *et al.* (2000a) はいくつかの植物種は土壌中の高分子有機態窒素を窒素源として直接吸収し利用しているという仮説を提唱した。これは、有機態窒素 (菜種油粕等) を施用した土壌で、無機態窒素のみを与えた場合に比べてより多くの窒素を吸収する植物種が存在する事実と、それらが高分子有機態窒素を取り込む能力が高いことから導かれた。さらに、植物が利用する土壌中の高分子有機態窒素は、土壌の種類にかかわらず大量に蓄積する分子量約8000~9000 Daの均一なタンパク質様物質であると報告した (Matsumoto *et al.*, 2000b, 2000c)。この高分子有機態窒素の植物による吸収に関する仮説は学

会内で大きな反響を呼んだだけでなく、肥料会社等によっても紹介され、多くの農家が関心を持つところとなっている。

その後、さまざまな手法によりこの仮説に関連した研究が行われ、新たな知見が報告されている。そこで、これらの結果や新たなデータを元に、この仮説の再検討を試みる。

2. 土壌中に蓄積する高分子有機態窒素は、本当に均一なタンパク質様物質なのか？

土壌からリン酸緩衝液で抽出される有機態窒素量は、培養試験による土壌中の可給態窒素評価量との相関が高いため、可給態窒素量自体の推定に用いられてきた。Matsumoto *et al.* (2000b, 2000c) で報告された土壌中の高分子有機態窒素は、このリン酸緩衝液で抽出された有機態窒素画分から見出されたものである。Matsumoto *et al.* (2000b, 2000c) は、さまざまな土壌から抽出したこの有機態窒素画分を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、およびドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分析した。その結果、HPLCでピークはひとつしか検出されず (ゲルろ過カラム, およびイオン交換カラムそれぞれで分離), SDS-PAGEでも主なバンドはひとつであった。さらに、すべてのサンプルにおいて、ゲルろ過カラムで分離されたピーク, およびSDS-PAGEで検出されたバンドがどちらも分子量8000~9000 Daに相当する位置で観察された。Matsumoto *et al.* (2000b, 2000c) はこれらの結果から、リン酸緩衝液抽出により得られる有機態窒素画分は、土壌の種類によらず分子量的にも化学的にも均一な物質であるとし、PEON (phosphate-buffer extractable organic nitrogen) と命名した。また、各抽出液で検出されたPEONのピーク面積と、ブラッドフォード法で測定したタンパク質推定量に高い相関が見られたこと、さらにPEON抽出液がタンパク質と同様に波長280 nmに吸光があることなどから、PEONはタンパク質様物質であるとした。

しかし、この結果を検証した最近の研究では異なる結論が得られている。分取カラムを用いてPEONをさらに細かく分取し、Matsumoto *et al.* (2000b, 2000c) と同じゲルろ過カラムを用いて分析を行なったところ、ひとつに見えるピークが実際にはさまざまな分子量をもつ物質の集合体であることが示された (Miyazawa and Murayama, 2007)。これらは、土壌により異なるが、標準タンパク質に基づいた分子量換算で少なくとも2100 Daから34000 Da相当であった。また、疎水性カラムへの吸着率が異なることから、疎水性も異なる物質の集合体であることが明らかになった (Miyazawa and Murayama, 2007)。SDS-PAGEによる分析でも、ひとつのバンドではなく低分子から高分子までのスミアなバンドが検出された (Watanabe and Yoshikawa, 2007)。さらに、PEONは波長280nmに吸光を持つものの、タンパク質とは異なり吸収極大が280 nmではないことや、320~350 nmの領域に蛍光スペクトルの発光極大を持たないことなどから、PEONはタンバ

Kae MIYAZAWA and Tohru MURAYAMA: Can plants directly absorb and use high molecular soil organic nitrogen as a nitrogen source?

農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター カパークロップ研究チーム (960-2156 福島県福島市荒井字原宿南50)

2008年4月28日受付・2009年1月6日受理

日本土壌肥科学雑誌 第80巻 第3号 p.263~267 (2009)

ク質ではないと推測された (Aoyama, 2006).

PEONは多分散性であり、UV領域から可視光領域にかけて減少する吸光スペクトルをもつこと (Aoyama, 2006; Miyazawa and Murayama, 2007), 負電荷を帯びており、分子量の大きい画分ほどC/N比が小さく窒素組成に占めるアミノ酸の割合が高いこと (Watanabe and Yoshikawa, 2007) など、腐植物質がもつ性質と共通点が多い。さらに、土壌を水やリン酸緩衝液で抽出すると腐植物質が抽出されることもわかっている (Matsumoto *et al.*, 2000b, 2000c; Aoyama 2006). したがって、PEONは分子量的にも化学的にも均一なタンパク質様物質ではなく、腐植物質であると考えるのが妥当であろう。

3. PEONは植物に吸収されて養分として利用されるのか?

これまで、PEONが植物の根から直接吸収されることを示唆する結果がいくつか報告されている。Matsumoto *et al.* (2000a) は土耕および水耕栽培のチンゲンサイの溢液をゲルろ過カラムで分離し、土耕栽培のチンゲンサイから採られた溢液でのみPEONと同じ保持時間にピークをHPLCで確認した。Koga *et al.* (2001) はビオチンで標識したPEONを水耕栽培下で6時間、10種類の植物に供与し、それぞれの植物の根からPEONを検出した。Okamoto and Okada (2004) は水耕栽培下でPEONを3時間植物に供与し、4種類のうち3種類の植物の水耕液でPEONの減少を確認した。冒頭にも述べたとおり高分子有機態窒素の吸収に関しては古くから知られており、腐植物質の吸収も報告されている (Nardi *et al.*, 2002). したがって、PEONの吸収自体に関しては特に大きな議論の余地はないと思われる。

問題は、根から直接吸収されたPEONが実際に植物体内で代謝され、養分として植物生育に貢献するかどうかであるが、これに関しては、2つの異なる結果が報告されている。Matsumoto *et al.* (2000a) は、無菌条件でチンゲンサイおよびニンジンへのPEON添加試験を行った。処理として使用した液体培地は、(1) 無窒素のMS液体培地、(2) 無窒素のMS液体培地の1割をPEON溶液 (88.2 mg-N L^{-1}) で代替、および(3) 無窒素のMS液体培地の2割をPEON溶液で代替、の3種類である。これらの処理により、チンゲンサイとニンジンの生育および窒素吸収量は、PEON溶液の添加割合の増加に伴って増加することを示した。Miyazawa *et al.* (2008) も、同様に無菌条件でチンゲンサイへのPEONの添加試験を行った。処理として、無窒素のホーランド液にそれぞれ同量の(1) 蒸留水、(2) 硝酸、(3) アミノ酸、(4) PEON溶液を添加した。硝酸、アミノ酸、およびPEON溶液の窒素濃度は約 36 mg-N L^{-1} である。その結果、チンゲンサイの生育は硝酸とアミノ酸添加で増加したが、PEONを添加しても生育の増加は見られなかった。

植物生育へのPEON添加の影響を検証した研究は著者が知る限りこれまでのところ以上の2例のみだが、腐植

物質の添加の影響に関する研究は数多く報告されており、Nardi *et al.* (2002) によってまとめられている。腐植物質を添加すると、その一部は根に取り込まれ、主に細胞膜の機能や遺伝子発現に働きかけ硝酸などの養分吸収を促進する、あるいは植物ホルモン類似効果で植物生育に影響を与えることが示されている。しかし、取り込まれた腐植物質が代謝され、養分として利用されるという結果は得られていない。先に述べたように、PEONは腐植物質である可能性が高い。したがって、PEONの直接吸収による植物生育に対する効果があるとするれば、養分としてではなく、植物にさまざまな生理的刺激を与えることによるものと考えられる。

4. 植物によって無機態窒素と有機態窒素の施用に対する反応が異なるのはなぜか?

仮にここで、直接吸収されたPEONが植物に養分として利用されないとする、仮説の発端となった、“有機態窒素施用への反応が植物によって違う”という現象はどのように説明できるだろうか。この現象を報告した研究結果は大変興味深い。Matsumoto *et al.* (2000a) は、黒ボク土とパーミキュライトを1:4の割合で混ぜた土を用いて、無機態と有機態の窒素施用の効果をポット試験で調査した。無機態窒素として硫酸、有機態窒素として菜種油粕をそれぞれ 100 mg-N kg^{-1} の割合で施用し、過リン酸石灰と硫酸カリウムはそれぞれ 150 mg-P kg^{-1} , 100 mg-K kg^{-1} の割合で施用した。施用後14日間培養した土を500 mlのポットに詰め、あらかじめパーライト上で発芽させたピーマン (*Capsicum annuum*), リーフレタス (*Lactuca sativa*), ニンジン (*Daucus carota*), およびチンゲンサイ (*Brassica chinensis*) の実生を移植して28日間栽培した。ポット内の無機態窒素量は、菜種油粕施用に比べ硫酸施用で常に高く推移し、逆にPEON量は硫酸施用に比べて菜種油粕施用で常に高く推移した。植物の窒素吸収量を比べてみると、ピーマンとリーフレタスでは硫酸施用で吸収量が高かったのに対し、ニンジンとチンゲンサイでは逆に菜種油粕施用で吸収量が高くなった。Okamoto and Okada (2004) では、ソルガム (*Sorghum bicolor*), イネ (*Oryza sativa*), トウモロコシ (*Zea mays*), およびパールミレット (*Pennisetum glaucum*) を用いて同様の試験を行っている。無機態窒素として硝酸アンモニウム、有機態窒素として米糠をそれぞれ 500 mg-N kg^{-1} の割合で施用した土 (黒ボク土: パーミキュライト = 1:4) を14日間培養後、1 Lのポットに詰め、あらかじめパーミキュライト上で8~14日間栽培した実生を移植して21日間栽培した。ポット内の無機態窒素量は、硝酸アンモニア施用で高く推移し、PEON量は米糠施用で高く推移した。植物の反応はやはり種によって異なり、トウモロコシとパールミレットは硝酸アンモニア施用でそれぞれ有意に窒素吸収量が高くなったのに対し、ソルガムとイネでは生育も窒素吸収量も硝酸アンモニア施用と米糠施用とで同等の値を示した。土壌中の無機態窒素量が少ないにもかかわらず、有

機態窒素施用で旺盛な窒素吸収量を示した植物は、それぞれ PEON の吸収能力が高いことが示されている。植物が PEON を窒素源として利用することがこの現象の要因ではないとすると、根に吸収された PEON が何らかの生理的刺激を与えて（腐植物質でも示されているように）これらの植物の生育を促進したのだろうか？

しかし、ここで注目したいのは、これらの植物の無機態窒素施用処理における生育や窒素吸収量である。硫酸施用処理のピーマンやリーフレタスの窒素吸収量がポットあたり 20 mg 以上であるのに対し、ニンジンとチンゲンサイでは 15 mg 以下である。さらに、硝酸アンモニア施用処理のトウモロコシやパールミレットの窒素吸収量は 40 mg 前後、乾物重は 1000 mg 前後であるのに対し、ソルガムとイネでは窒素吸収量は 10 mg 以下、乾物重は 200 mg 前後である。植物それぞれ本来の生育速度や窒素吸収量を考えると、これらの傾向は不可解であり（たとえば通常はリーフレタスよりもチンゲンサイの方が初期生育や窒素吸収は旺盛）、これらのデータを比較対照として有機態窒素施用で窒素吸収量が増加したとはいえないだろうか。むしろ、ニンジンやチンゲンサイ、ソルガムやイネの生育や窒素吸収が無機態窒素施用で抑制されたと解釈できる。

無機態窒素施用で窒素吸収が抑制された要因はさまざま考えられるが、ひとつには、土壌の組成の 8 割がパーミキュライトであったということがあるだろう。上記のポット試験では、有機態窒素の添加による土壌の物理的な改善効果の影響を取り除くこと、そしてもとの土壌に含まれるバックグラウンド窒素量を抑えることを目的に、パーミキュライトを主体とした土壌を用いた。しかし、これによって土壌中の他の養分の含有量も抑えられてしまう。窒素、リン酸、カリウムに関しては無機態窒素処理、有機態窒素処理の両方で施肥されるため問題はないが、そのほかの要素に関しては、無機態窒素処理では供給されず、有機態窒素処理でのみ供給されるものもある。

たとえば、炭素はその顕著な例である。根からの炭素供給は、植物の炭素同化にとって重要な要素となることが報告されている (Cramer, 2002)。特に高温や強光条件、あるいは塩分ストレスなどで気孔コンダクタンスが高くなると、炭素同化に対する根からの炭素供給の寄与が高くなる (Cramer *et al.*, 1999)。また、溶存無機炭素の供給は、植物の窒素吸収を促進することも知られている (Bialczyk, 1994; Cramer and Lips, 1995)。根から供給される炭素を利用する能力の高い植物は、その供給が少ない場合には生育が抑制される可能性がある (Cramer and Richards, 1999)。

そこで著者らは、施用肥料形態による炭素供給の違いを調べるために、Matusmoto *et al.* (2000a) と同様に黒ボク土とパーミキュライトを 1:4 の割合で混ぜ、過リン酸石灰と硫酸カリウムをそれぞれ 150 mg-PL⁻¹, 100 mg-KL⁻¹ の割合で施用し、処理として (1) 無窒素、(2) 硫酸、(3)

菜種油粕（それぞれ 100 mg-NL⁻¹）を添加した土壌の溶存炭素量を測定した。その結果、菜種油粕を添加した土では、硫酸を添加した土に比べ無機態炭素で約 10 倍、有機態炭素で約 2 倍以上の水溶性炭素が検出された (表 1)。上記のポット試験においても施肥処理によって炭素供給に大きな違いがあったとすると、植物生育に影響を与えた可能性も考えられる。このように、人工的な土壌を用いたポット試験では予期しない様々な要素に処理の影響が現れかねないため、植物生育に対する供給窒素形態の影響のみを切り離して検証することは難しい。

かといって、圃場で検証を行うとその難しさは増すばかりである。著者らは、2004 年にリーフレタス (品種: グリーン) とチンゲンサイ (品種: 長陽) の秋作栽培において、緩効性窒素化学肥料 (LP70) と菜種油粕施用 (それぞれ 10 kg-N/10 a) の処理を設けて供給窒素形態の植物生育への影響を検証しようとした。しかし、易分解性の菜種油粕はすぐに分解したため、土壌中の無機態窒素濃度、PEON 濃度ともに施肥処理による有意な差は見られず (図 1)、リーフレタスとチンゲンサイの生育、窒素吸収量、その他の成分にも施肥処理による有意な差は認められなかった。そこで、2005 年には菜種油粕の代わりに、難分解性の完熟稲わら堆肥を施用したところ、土壌中の硝酸態窒素濃度は LP70 施用で完熟稲わら堆肥施用に比べて有意に高まり、PEON 濃度は僅かではあるが完熟稲わら堆肥施用で LP70 施用に比べて有意に高まった (図 2)。リーフレタスとチンゲンサイの新鮮重、窒素含有量、および窒素吸収量は LP70 施用で稲わら堆肥施用に比べて増加し、炭素含有量は減少したが、これらの変化に種間差は見られなかった (表 2)。土壌の PEON 濃度に大きな差があれば植物の反応にも違いが出てくる可能性はあるが、単年度の施肥試験程度では大きな PEON 濃度の差が期待できない (Okamoto *et al.*, 2003)。逆に、PEON 濃度に大きな差が出るほどの違いが見られる場合には、土壌の物理性や化学性も大きく違う可能性があり、やはり窒素形態の影響を検証することは難しいだろう。さらに、図 1 と図 2 を比べてもわかるように、無機態窒素の溶出パターンや PEON 濃度は年次によって大きく異なり、温度や降水量、土壌の種類によっても大きく変わる可能性がある。“有機態窒素施用への反応が植物によって違う” という現象は圃場では再現が難しく、再現

表 1 培養 14 日後の土壌中溶存炭素量

	溶存無機態炭素 mg kg ⁻¹	溶存有機態炭素 mg kg ⁻¹
無窒素	0.72±0.17*	24.1±0.48
硫酸	0.29±0.11	23.5±7.97
菜種油粕	2.88±0.55	53.1±4.63

* 標準偏差。

土壌は東北農業研究センター福島キャンパス圃場から採取したものを使用 (全炭素 5.14%, 全窒素 0.37%)。処理土壌はそれぞれ 3 反復で 120 mL ずつ、500 mL の遠心用チューブで 14 日間、25°C、最大容水量の 60% の水分量で培養。溶存炭素の測定は、乾土に対して 5 倍の蒸留水を加えて 1 時間振とう後、10 min、10000 rpm で遠心分離し、乾燥ろ紙でろ過した上澄みをサンプルとし、全有機態炭素計 (TOC-V CPN, 島津) で測定。

したとしてもその要因を特定することはさらに難しいように思われる。

5. おわりに

PEONは分子量的にも化学的にも均一なタンパク質様物質ではなく、腐植物質である可能性が高い。さらに、仮説の発端となった“有機態窒素施用への反応が植物によって

異なる”という現象は、窒素だけではなく、他の様々な要因が影響を与えていた可能性もある。したがって、“植物がPEONを直接吸収し窒素源として利用する”という仮説を支える前提が、不確定なものであったと言わざるを得ない。また、PEONが実際に養分として植物生育に寄与するかどうかという肝心な問題に関しては、直接検証した(そして異なる結論を得た)2つの試験は無菌栽培という限定された条件であり、実際に植物が生育する際に、土壌からPEONを吸収し利用するかどうかは今のところわかってい

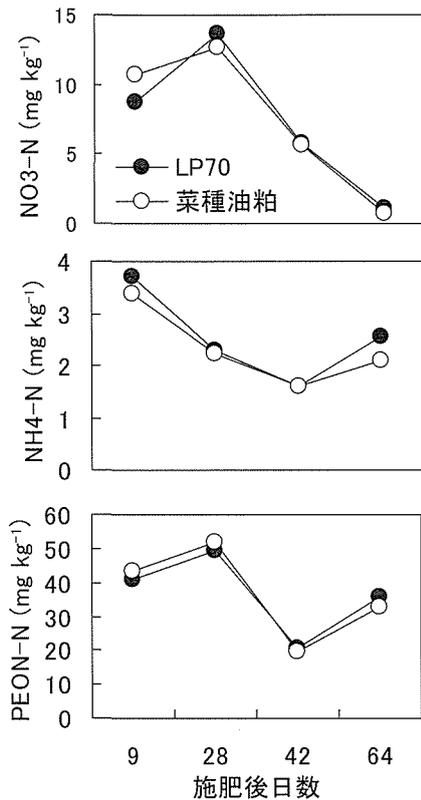


図1 緩効性窒素 (LP70) および菜種油粕施用下での土壌の形態別窒素含有量の変化

施肥量はそれぞれ 10 kg-N/10a. 1区画は1×4mで3反復。施肥日 2004年8月25日。施肥後、ベット幅1mの畝立てをし、黒ビニールマルチを張った。土壌は1区画あたり3箇所から直径3cm、深さ20cmで採取。無機態窒素含有量は風乾細土を2M塩化カリウム水溶液で抽出し、オートアナライザー(AA-II, ビーエルテック)で測定。PEON含有量は風乾細土を1/15M中性リン酸緩衝液で抽出し、アルカリ過硫酸塩で酸化(Cabrera and Beare, 1993)後、カルタド法で測定(Cataldo et al., 1975)。

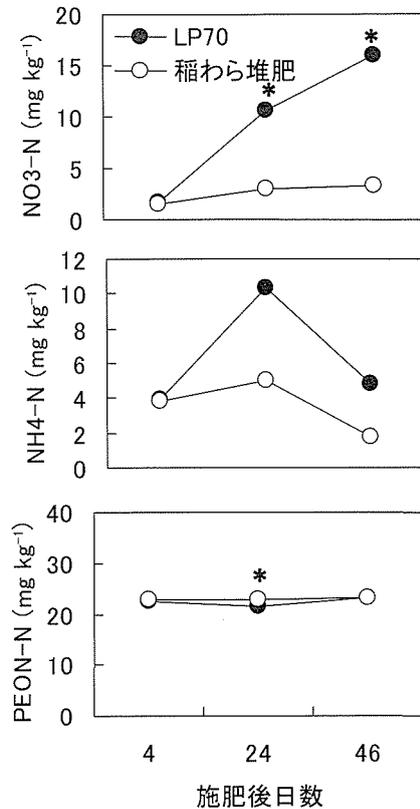


図2 緩効性窒素 (LP70) および稲わら堆肥施用下での土壌の形態別窒素含有量の変化

緩効性窒素区では、稲わら堆肥のリン酸、カリウム含有量に順じて過リン酸石灰(8kg-P/10a)および硫酸カリウム(15kg-K/10a)を施用。施肥日 2005年9月9日。その他の処理、手法に関しては図1と同様。*: 5%水準で有意差あり。

表2 リーフレタスとチンゲンサイの圃場栽培結果

	新鮮重 g 株 ⁻¹	窒素含有率 %	炭素含有率 %	窒素吸収量 mg 株 ⁻¹
リーフレタス				
LP70	77.1 ± 5.5	5.73 ± 0.03	38.42 ± 0.32	203.7 ± 11.6
稲わら堆肥	50.3 ± 20.9	5.41 ± 0.19	39.26 ± 0.31	133.7 ± 42.0
チンゲンサイ				
LP70	285.2 ± 47.7	6.06 ± 0.05	32.92 ± 0.27	594.0 ± 94.3
稲わら堆肥	207.3 ± 48.3	5.99 ± 0.19	34.34 ± 0.42	487.4 ± 57.7
種	***	**	***	***
施肥	*	*	***	*
種*施肥	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

播種日 2005年8月25日、移植日 9月12日、収穫日 10月25日。栽植密度は畝間15cm、株間15cm。地上部を一区画あたり4個体サンプリングし、新鮮重を測定後70°Cで48時間乾燥し粉碎。窒素および炭素含有量をNCアナライザー(Vario MAX, エレメンタル)で測定。***, **, *, ;0.1%水準, 1%水準, 5%水準でそれぞれ有意差あり。n.s.;有意差なし。

ない。しかし、アミノ酸などの低分子で既知の構造をもつ有機態窒素でさえ、実際に植物がアミノ酸を土壌から吸収し利用しているかどうか、そしてその吸収が植物栄養にどれだけ貢献しているかを示すには多くの技術的な問題が立ちだかっている (Jones *et al.*, 2005)。ましてや、PEONのようにその実態が明らかになっていない高分子有機態窒素では、その養分としての利用を実証することは現段階では極めて難しい。また、腐植が有機酸により低分子化することも示されていることから (Cozzolino *et al.*, 2001; Piccolo *et al.*, 2003)、PEONが腐植物質であるとする、その吸収利用の検証は、植物根から分泌される有機酸の作用などさらに複雑な問題を抱えることになる。今後新たな研究手法が開発されないかぎり、“植物がPEONを直接吸収し窒素源として利用する”という仮説の妥当性、そしてPEONの直接吸収が植物にとって意味のある窒素吸収経路であるかどうかについては意見が分かれるであろう。

文 献

- Aoyama, M. 2006. Properties of neutral phosphate buffer extractable organic matter in soils revealed using size exclusion chromatography and fractionation with polyvinylpyrrolidone. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **52**, 378–386.
- Bialczyk, J. 1994. Growth of tomato seedlings under different HCO_3^- concentration in the medium. *J. Plant Nutr.*, **17**, 801–816.
- Brachet, J. 1954. Effects of ribonuclease on the metabolism of living root tip cells. *Nature*, **174**, 876–877.
- Brachet, J. 1955. Further observation on the effects of ribonuclease on living root tip cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **16**, 611–613.
- Brachet, J. 1956. The mode of action of ribonuclease on living root tips. *Biochim. Biophys. Acta.*, **19**, 583.
- Cabrera, M. L., and Beare, M. H. 1993. Alkaline persulfate oxidation for determining total nitrogen in microbial biomass extracts. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **57**, 1007–1012.
- Cataldo, D. A., Haroon, M., Schrader, L. E., Youngs, V. L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant.*, **6**, 71–80.
- Cozzolino, A., Conte, P., and Piccolo, A. 2001. Conformational changes of humic substances induced by some hydroxyl-, ket-, and sulfonic acids. *Soil Biol. Biochem.*, **33**, 563–571.
- Cramer, M. D. 2002. Inorganic carbon utilization by plant roots. In Y. Waisel, A. Eschel and U. Kafkafi (eds.) *Plant roots; The hidden half*, 3rd edition, p. 699–716. Marcel Dekker, New York.
- Cramer, M. D., and Lips, S. H. 1995. The influence of enriched root-zone CO_2 concentrations on growth, nitrogen metabolism and root HCO_3^- incorporation in salinity stressed *Lycopersicon esculentum*. *Physiol. Plantarum*, **94**, 425–432.
- Cramer, M. D., and Richards, M. B. 1999. The effect of rhizosphere dissolved inorganic carbon on gas exchange characteristics and growth rates of tomato seedlings. *J. Exp. Bot.*, **50**, 79–87.
- Cramer, M. D., Gao, Z. F., and Lips, S. H. 1999. The influence of dissolved inorganic carbon in the rhizosphere on carbon and nitrogen metabolism in salinity-treated tomato plants. *New Phytol.*, **142**, 441–450.
- Godlewski, M., and Adamczyk, B. 2007. The ability of plants to secrete proteases by roots. *Plant Physiol. Biochem.*, **45**, 657–664.
- Jones, D. L., Healey, J. R., Willett, V. B., Farrar, J. F., and Hodge, A. 2005. Dissolved organic nitrogen uptake by plants - an important N uptake pathway? *Soil Biol. Biochem.*, **37**, 413–423.
- Koga, N., Yamagata, M., Matsumoto, S., and Ae, N. 2001. Evidence for direct organic nitrogen uptake by plants using specific tracer proteins. In W. J. Horst, M. K. Schenk, A. Bürkert et al. (eds.) *Book Series Developments in Plant and Soil Sciences 92, Plant Nutrition*, p. 212–213, Springer, Netherlands.
- McLaren, A. D., Jensen, W. A., and Jacobson, L. 1960. Absorption of enzymes and other proteins by barley roots. *Plant Physiol.*, **35**, 549–556.
- Matsumoto, S., Ae, N., and Yamagata, M. 2000a. Possible direct uptake of organic nitrogen from soil by chingensai (*Brassica campestris* L.) and carrot (*Daucus carota* L.). *Soil Biol. Biochem.*, **32**, 1301–1310.
- Matsumoto, S., Ae, N., and Yamagata, M. 2000b. The status and origin of available nitrogen in soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **46**, 139–149.
- Matsumoto, S., Ae, N., and Yamagata, M. 2000c. Extraction of mineralizable organic nitrogen from soils by a neutral phosphate buffer solution. *Soil Biol. Biochem.*, **32**, 1293–1299.
- Miyazawa, K., and Murayama, T. 2007. Heterogeneity of neutral phosphate buffer extractable soil organic matter. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **53**, 1–6.
- Miyazawa, K., Murayama, T., and Takeda, M. 2008. Can plants absorb and utilize phosphate buffer-extractable soil organic nitrogen without its prior mineralization? *Soil Sci. Plant Nutr.*, **54**, 247–252.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., and Vianello, A. 2003. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. Biochem.*, **34**, 1527–1536.
- Nishizawa, N., and Mori, S. 1977. Invagination of plasmalemma. Its role in the absorption of macromolecules in rice roots. *Plant Cell Physiol.*, **18**, 767–782.
- Okamoto, M., Okada, K., Watanabe, T., and Ae, N. 2003. Growth responses of cereal crops to organic nitrogen in the field. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **49**, 445–452.
- Okamoto, M., and Okada, K. 2004. Differential responses of growth and nitrogen uptake to organic nitrogen in four gramineous crops. *J. Exp. Bot.*, **55**, 1577–1585.
- Piccolo, A., Conte, P., Spaccini, S., and Chiarella, M. 2003. Effects of some dicarboxylic acids on the association of dissolved humic substances. *Biol. Fertil. Soils*, **37**, 255–259.
- Ulrich, J., Luse R. A., and McLaren, A. D. 1964. Growth of tomato plants in presence of proteins and amino acids. *Physiol. Plant.*, **17**, 683–696.
- Watanabe, S., and Yoshikawa, H. 2007. Characterization of neutral phosphate buffer extractable soil organic matter by electrophoresis and fractionation using ultrafiltration. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **53**, 650–656.