

## 水分欠乏が葉の水ポテンシャルと硝酸還元に及ぼす影響

堀口 毅

(肥料学研究室)

昭和61年8月8日 受理

### Effect of Water Deficiency on Water Potentials and Nitrate Reduction in Leaves

Tsuyoshi HORIGUCHI

(Laboratory of Plant Nutrition and Fertilizers)

#### 緒 言

前報<sup>5)</sup>において、比較的弱い水ストレスでも葉の蛋白態窒素含有率を低下させ、非蛋白態窒素含有率を増加させることが示されたが、水ストレスが蛋白質合成を抑制するとすれば、代謝回転の速い蛋白質が、より敏感なレスポンスを示すであろうと予想される。硝酸還元酵素は、代謝回転の速い蛋白質として知られており、その半減期は数時間といわれている<sup>7)</sup>。トウモロコシ (*Zea mays* L.)<sup>1,8)</sup>とオオムギ (*Hordeum vulgare* L.)<sup>6)</sup>について、水ストレスによって硝酸還元酵素の活性が低下するという報告があるが、これらの報告の中では種間比較や葉の水ポテンシャルとの関係は示されていない。一方、水ストレス付加の方法として、前報<sup>5)</sup>では培養液へのマンニトールの添加を行ったが、マンニトールは植物体に吸収され代謝されるので適当でないという報告もある<sup>3)</sup>。そこで、本報では砂耕法で植物を栽培し、水の供給を断つことによって水ストレスを付加した。水ストレスに対して比較的強いと考えられるトウモロコシと比較的弱いと考えられるダイズ (*Glycine max* Merr.) にこの方法によって水ストレスを付加し、植物体各葉位ごとに受ける水ストレスの程度を pressure chamber 法<sup>10)</sup>で水ポテンシャルを測定することによって比較した。また、葉の水ポテンシャル、硝酸還元酵素活性、硝酸態窒素、およびアンモニア態窒素についても比較検討した。

#### 材 料 と 方 法

##### 1. 植物の培養と処理

植物はトウモロコシ (ゴールドエンクロスバンタム) およびダイズ (秋センゴク) を用い、種子をウスプルン1,000倍液に1時間浸漬して殺菌した後、ろ紙上で発芽させた。培養用容器としては、1ℓ容ポリプロピレン容器に Fig. 1 に示したように側面の下方と底面

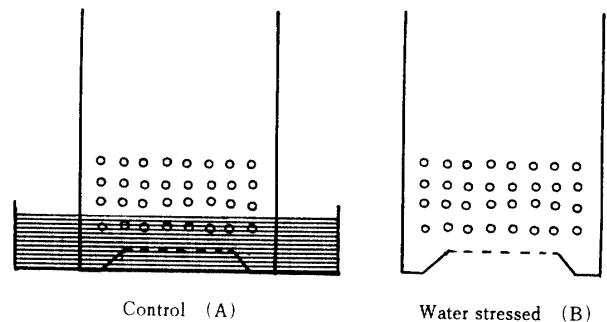


Fig. 1. Method of sub-irrigation and drainage for plant container. The container had numerous holes in the side and bottom for sub-irrigation (A) and drainage (B). The plant was sub-irrigated by immersion in a larger and shallow container filled with water. Water stress was imposed by termination of irrigation.

に孔をあけ、これに直径1~2mmのボラを充てんした。発芽した種子は容器に写し、最初は Fig. 1(A) のように下に受皿をつけ、1日30mlずつ培養液を与えた。培養液は、ホーランド液 (0.005 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.005 M  $\text{KNO}_3$ , 0.002 M  $\text{MgSO}_4$ , 0.001 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) を基本とし、これを希釈して $\frac{1}{2}$ 濃度としたものを用いた。微量要素としては、3 ppm Fe, 0.3 ppm Mn, 0.01 ppm Cu, 0.01 ppm Zn, 0.01 ppm Mo, 0.1 ppm B となるように、Fe-EDTA,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  をそれぞれ加えた。水は脱イオン水 (比抵抗 $5.0 \times 10^5 \Omega\text{cm}$ 以上) を用い、pHは5~6に調整した。栽培はガラス室内で行い、処理期間中、対照区の容器には受皿に水を入れ、水ストレス区の容器からは受皿を除き水の供給をしなかった。

##### 2. 葉の水ポテンシャル測定法

葉の水ポテンシャルは、大起理化学製植物体内水分張

力測定器を用い pressure chamber 法<sup>10)</sup>によって測定した。

### 3. 供試液の調製法

新鮮重として 5 g の試料に 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 10~15ml を入れて氷冷しながら乳鉢でホモゲナイズし、これを 0°C 20,000×g で15分間遠心分離し、上澄液を硝酸還元酵素活性、硝酸態窒素、およびアンモニア態窒素の分析用供試液とした。

### 4. 硝酸還元酵素の活性測定法<sup>9)</sup>

試験管に、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.3ml, 0.1 M KNO<sub>3</sub> 0.1ml, 供試液 0.5ml をとり、これに 5 mM NADH (上記緩衝液に溶解したもの) 0.1ml を加えて 30°C で反応させた。30分間反応後 1% (w/v) スルフェニルアミド液 (1.5 N 塩酸に溶解したもの) 1 ml と 0.02% (w/v) N-1-ナフチルエチレンジアミンハイドロクロライド 1 ml を加え、10分間放置した。さらに、20% 冷トリクロロ酢酸 1 ml を加え、3,000×g 10分間遠心分離して除蛋白後、上澄液の亜硝酸を 540

nm の吸光度で比色定量した。ブランクには NADH の代わりに蒸留水を加えた。酵素活性は 1 時間に生成した亜硝酸の量 (n mol) を試料新鮮重 1 g あたりで表した。

### 5. アンモニア態窒素および硝酸態窒素の定量法

アンモニア態窒素および硝酸態窒素は微量拡散分析法<sup>2)</sup>により測定した。供試液 2 ml ずつを別々のコンウェイユニットにとり、アンモニア態窒素はそのまま定量し、硝酸態窒素は検液をデバルタ合金を用いて還元してアンモニア態窒素と硝酸態窒素の含量を求め、差引計算によって求めた。

## 結 果

### 1. 水ストレスがトウモロコシとダイズの葉位別水ポテンシャルに及ぼす影響

トウモロコシとダイズを 5 日間水ストレス状態においた水ストレス区と、受皿に水を張った対照区との葉位別水ポテンシャルの比較を Fig. 2 に示した。葉位

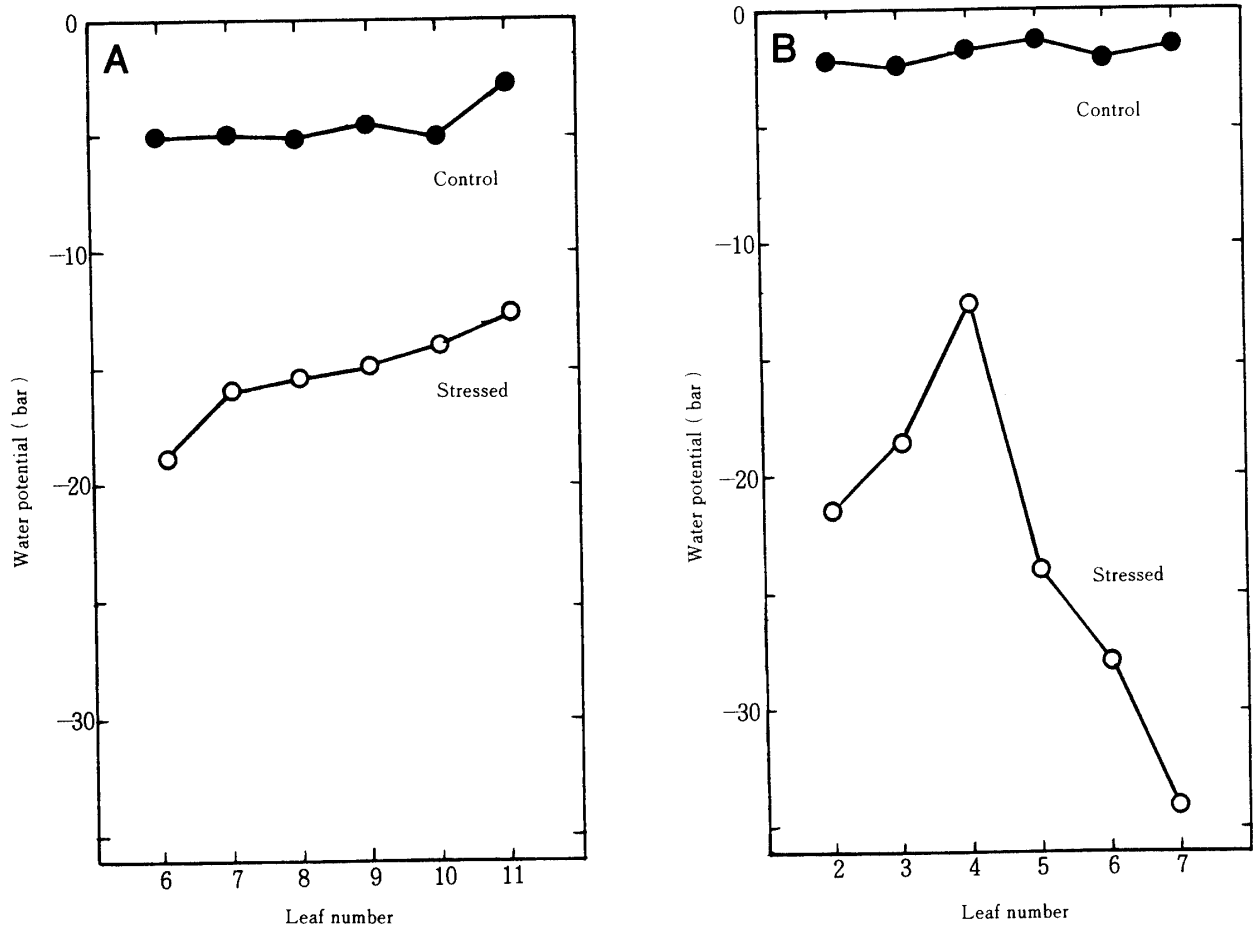


Fig. 2. Differential water potential in corn (A) and soybean (B) leaves of different positions, grown under water-stressed conditions. Water stress was imposed according to the method described in Fig. 1 during 5 days. Water potential was measured by the pressure chamber method<sup>10)</sup>.

Table 1. Effect of water deficiency on water potentials, nitrate reductase activities, NO<sub>3</sub>-N and NH<sub>4</sub>-N contents of corn and soybean leaves

Plant	Period of treatment	Treatment*1	Water potential*2 bars	Nitrate reductase*3 nm/h/g FW	NO <sub>3</sub> -N*4 % of FW	NH <sub>4</sub> -N*4 ppm of FW
Corn	4	Control	- 5.0	96(100)*5	0.010(100)*5	32(100)*5
		Stress	-13.9	76(79)	0.038(380)	44(138)
	5	Control	- 4.7	110(100)	0.016(100)	33(100)
		Stress	-14.8	73(66)	0.062(388)	49(148)
Soybean	5	Control	- 1.9	941(100)	0.023(100)	45(100)
		Stress	-24.9	Trace	0.134(583)	112(249)

\*1: Water stress was imposed according to the method described in Fig. 1.

\*2: Water potential was measured by the pressure chamber method<sup>10</sup>.

\*3: Activity of nitrate reductase is expressed in n moles of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> formed h<sup>-1</sup> (g fresh weight)<sup>-1</sup>.

\*4: NH<sub>4</sub>-N and NO<sub>3</sub>-N were determined by the method of Conway<sup>2</sup>.

\*5: % of control.

は番号の小さい方が下位葉を、大きい方が上位葉を示している。水ストレス区の植物の葉の水ポテンシャルは、いずれも対照区よりも低下したが、特にダイズでは著しく低下した。トウモロコシでは下位葉ほど水ポテンシャルが低かったが、ダイズでは上位葉の水ポテンシャルが著しく低下した。

2. 水ストレスがトウモロコシとダイズの葉の水ポテンシャル、硝酸還元酵素活性、硝酸態窒素含有率、およびアンモニア態窒素含有率に及ぼす影響  
トウモロコシについては4日間と5日間、ダイズについては5日間水ストレス処理した。トウモロコシについては第9葉と第10葉について、まずおのおの水ポテンシャルを測定し、次にこれらを混合して分析に供し、ダイズについては第4葉、第5葉、第6葉、第7葉について水ポテンシャルを測定し、次いでこれらを混合して分析に供した。結果はTable 1に示した。水ポテンシャルの値は各葉位の平均値である。

葉の水ポテンシャルはトウモロコシ、ダイズともに受皿から水を供給した対照区は-5.0 bar以上であり、水ストレス区では-10 bar以下になっていた。とくにダイズでは著しく低下していた。4日間水ストレス処理したトウモロコシ葉の水ポテンシャルは対照区よりも8.9 bar低下し、硝酸還元酵素活性は21%低い値を示した。また、4日間処理区の硝酸態窒素含有率は対照区の3.8倍、アンモニア態窒素含有率は対照区の1.4倍であった。トウモロコシの対照区の硝酸還元酵素活性は4日目よりも5日目の方がやや増大していたのに対し、水ストレス区では4日目よりも5日目の方

がやや低かった。ダイズ葉においては、対照区の硝酸還元酵素活性はトウモロコシの約10倍も高かったのにもかかわらず、水ストレス区では検出されなかった。硝酸態窒素含有率、アンモニア態窒素含有率ともにダイズ葉では水ストレスによる増加が著しく、硝酸態窒素は対照区の5倍以上、アンモニア態窒素も対照区の2倍以上になった。

## 考 察

前報<sup>5)</sup>では、水ストレスを付加する方法として、培養液にマンニトールを加えて培養液の水ポテンシャルを低下させる方法を用いたが、マンニトールは植物体に吸収されて代謝されるので適当でないとの報告もある<sup>3)</sup>。そこで本報ではボラを支持体とした砂耕法を行い、水の供給を断つことによって水ストレスを付加した。対照区では受皿に水を充たしておくことによって対照区の植物の葉の水ポテンシャルをほぼ-5 bar以上に保つことができた。これは前報<sup>5)</sup>の水耕法の場合よりもやや低い程度である。5日間水の供給を断つことによって、トウモロコシでは葉の水ポテンシャルが-10~-15 bar程度に低下した。トウモロコシの場合、上位葉ほど水ポテンシャルが高いのは、上位葉が内側に巻き込まれ、直立しているために水の蒸散量が比較的少ないのであろう。これに対しダイズでは上位葉は十分に展開しており、水ポテンシャルも最上位葉が最も低下していた。最下位葉ではいずれも低い水ポテンシャルを示したが、これは老化によるものと思われる。前報<sup>5)</sup>において、比較的弱い水ストレスでも葉の蛋

白態窒素含有率を低下させ、非蛋白態窒素含有率を増加させることが示された。生物体内の蛋白質は常に代謝回転しており、その回転の速い蛋白質と遅い蛋白質が存在することが知られている。水ストレスが蛋白質合成を抑制する<sup>4)</sup>とすれば、代謝回転の速い蛋白質が、より敏感なレスポンスを示すであろうと予想される。硝酸還元酵素は、代謝回転の速い蛋白質として知られており、その半減期は数時間といわれている<sup>7)</sup>。トウモロコシ<sup>1,8)</sup>とオオムギ<sup>6)</sup>について、水ストレスによって硝酸還元酵素の活性が低下するという報告があるが、これらの報告の中では種間比較や葉の水ポテンシャルとの関係は示されていない。本報では、pressure chamber 法<sup>10)</sup>によって水ポテンシャルを測定したトウモロコシとダイズの葉における硝酸還元酵素活性、硝酸態窒素含有率、およびアンモニア態窒素含有率を測定した。4日間水ストレス処理したトウモロコシ葉では、水ポテンシャルが対照区より8.9 bar 低く、硝酸還元酵素活性は21%低い値を示した。また、硝酸態窒素含有率、アンモニア態窒素含有率ともに水ストレス区では対照区よりも高く、これらの傾向は4日間処理区よりも5日間処理区の方がやや高まった。硝酸還元酵素は適応酵素として知られ、基質である硝酸の供給が誘導的に働きその活性を高めるといわれている。本研究では培養液の窒素源としては硝酸を用いたので、もしも水ストレスが硝酸の吸収を抑制した<sup>4)</sup>とすると、硝酸還元酵素の活性も低下することになる。しかし、本研究の結果では水ストレス区の硝酸態窒素含有率は対照区よりも高く、これは硝酸還元酵素の活性低下によって基質である硝酸が十分に還元されずに残ったためと考えられる。ダイズの場合にはこれらの傾向がさらに著しく現れた。トウモロコシと同様な処理に対して、葉の水ポテンシャルは20 bar 以上低下し、対照区の硝酸還元酵素活性はトウモロコシの約10倍も高かったのにもかかわらず、水ストレス区では検出されなかった。硝酸態窒素およびアンモニア態窒素の水ストレスによる増加もダイズではさらに著しく、アンモニア過剰による障害も考え得る。作物の種類によっては、葉に集積した過剰の硝酸がそれを食用とする人間や家畜に害を及ぼす場合があるので水ストレス環境下で栽培した場合には硝酸の集積に配慮する必要があるだろう。水ストレスによるアンモニアの集積については報告も少なく、その起源も明らかではないが、水ストレスによって蛋白質の合成が抑制されたり、蛋白質の分解が促進されたりした場合にはアミノ酸が過剰になり、その脱アミノ反応によって生成することが考え

られる。とくにアンモニアを窒素源として作物を栽培する場合には、水ストレスによるアンモニア過剰障害にも配慮する必要があるだろう。本報では、同じ条件下でトウモロコシとダイズを栽培したが、ダイズの葉の水ポテンシャルの方が水ストレス処理によって一層低下したために、葉の同一水ポテンシャルにおける両作物の比較はできなかった。水ストレスの程度を段階的に変えることによって、同一水ポテンシャルの作物間比較をすることが今後可能であろうと思われる。

## 要 約

トウモロコシとダイズの葉について、水分欠乏が水ポテンシャル、硝酸還元酵素活性、硝酸含有率およびアンモニア含有率に及ぼす影響について比較検討した。

プラスチックポットに、直径1~2mmのボラを1ℓ入れ、これに植物を個体ごとに植えて自然条件下のガラス室で栽培した。ポットには地下かん水と排水のために、底面と側面に多くの孔をあけた。それぞれのポットには処理開始までは1日につき30mlの1/2強度のホーグランド培養液を与えた。植物は大きな浅い容器に水を充たして地下かん水を行い、水ストレスはかん水を停止することによって付加した。処理後、葉を各葉位別に収穫し、直ちに水ポテンシャルを pressure chamber 法によって測定した。葉身は30mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中でホモゲナイズし、抽出液を硝酸還元酵素、硝酸、アンモニアの分析に供した。

水ストレス条件下では、トウモロコシ葉の水ポテンシャルは葉位が上から下に行くに従って減少したが、ダイズの上位葉は下位葉よりも著しく低い水ポテンシャルを示した。トウモロコシ、ダイズともに水ストレスに反応して葉の水ポテンシャルおよび硝酸還元酵素活性の低下と硝酸およびアンモニアの含有率の増加がみられた。水ストレスを4日から5日に延長すると、トウモロコシへの効果はある程度増大した。5日間の水ストレスによってトウモロコシの葉の水ポテンシャルは10 bar 低下し、それにとまって硝酸還元酵素活性は34%低下し、硝酸とアンモニアの集積はそれぞれ3.9倍と1.5倍になった。

ダイズはトウモロコシよりも水ストレスに敏感に反応し、水ポテンシャルは23 bar 減少し、硝酸還元酵素活性はほとんど検出されず、硝酸とアンモニアの集積はそれぞれ5.8倍と2.5倍であった。

謝辞 本研究の実施にあたっては驚見充子氏の多大な御協力を得ましたので特記して感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Bardzik, J. M., March, H. V. and Havis, Jr and J. R. : Effect of water stress on the activities of three enzymes in maize seedlings. *Plant Physiol.*, **47**, 828-831 (1971)
- 2) Conway, E. J. : 微量拡散分析および誤差論 (石坂音治訳). 75-97, 南江堂, 東京 (1957)
- 3) Carm, W. J. : Mannitol transport and suitability as an osmoticum in root cells. *Physiol. Plant.*, **61**, 396-404 (1984)
- 4) 堀口 毅・田中浩二・西原典則 : 葉タンパク代謝に及ぼす水ストレスの影響. 土肥要旨集, **27**, 341 (1981)
- 5) 堀口 毅 : 水分欠乏が葉の水ポテンシャルと蛋白質含量に及ぼす影響. 鹿大農学部学術報告, No. **36**, 77-81 (1986)
- 6) Huffaker, R. C., Radin, T., Kleinkopf, G. E. and Cox, F. L. : Effect of mild water stress on enzymes of nitrate assimilation and of the carboxylative phase of photosynthesis in barley. *Crop Sci.*, **10**, 471-474 (1970)
- 7) Huffaker, R. C. and Peterson, L. W. : Protein turnover in plants and possible means of its regulation, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **25**, 363-392 (1974)
- 8) Mattas, R. E. and Pauli, A. W. : Trends in nitrate reduction and nitrogen fractions in young corn (*Zea mays* L.) plants during heat and moisture stress. *Crop Sci.*, **5**, 181-184 (1965)
- 9) 中川弘毅・佐藤 了 : 硝酸還元酵素, “植物酵素・蛋白質研究法”, 蛋白質核酸酵素 別冊, 343-348 (1976)
- 10) Scholander, P. F., Hemmel, H. T., Badstreets, E. D. and Hemmingsen, E. A. : Sap pressure in vascular plants. *Science*, **148**, 339-346 (1965)

## Summary

Concerning the water-deficiency effects on corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* Merr.) leaves, some comparative investigations were carried out in relation to water potentials, nitrate reductase activities, nitrate and ammonia contents.

Each plant was grown on 1 liter of Bora (sandy pumice, 1-2mm in diameter) held in a plastic pot in a greenhouse under natural conditions. For sub-irrigation and drainage, numerous holes were made in its side and bottom. Until the initiation of the treatment, 30 ml of 1/2-strength Hoagland culture solution was supplied to each pot every day. The plant was sub-irrigated by being immersed in a large and shallow container filled with water. Water stress was imposed by termination of the irrigation.

The leaves were harvested at the different leaf positions immediately after the treatment, and the measurement of water potentials was carried out by the pressure chamber method. The leaves were homogenized in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5), and then the extract was subjected to assay for nitrate reductase, nitrate and ammonia.

Under water-stress conditions, corn leaves showed a gradient of water potential which decreases from the upper to the lower leaf positions, whereas the upper leaves of soybean showed remarkably low water potentials.

In response to the water stress, both corn and soybean leaves showed decreases in water potentials and nitrate reductase activities, and increases in nitrate and ammonia contents. A prolongation of the water-stress period from 4 to 5 days progressed the effects on corn to some extent. During the period of 5 day stress the water potential of corn leaves decreased by 10 bars, concomitantly with 34% reduction of nitrate reductase activities and with 3.9-fold accumulation of nitrate and 1.5-fold accumulation of ammonia.

In these respect, soybean was found to be more sensitive to water stress than corn; after the period of 5 day water stress, there were 23 bars reduction of water potential, trace detection of nitrate reductase activities, 5.8-fold accumulation of nitrate and 2.5-fold accumulation of ammonia.