

植物による環境修復：師管転流からみた高 CO<sub>2</sub>  
濃度に対する植物の応答

(課題番号 11660063)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））  
研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 藤田耕之輔

(広島大学生物生産学部)教授

## 緒言

高 CO<sub>2</sub> 濃度下では、C<sub>3</sub> 光合成能は上昇し、生産能も高まる場合が多い。しかしながら、高 CO<sub>2</sub> 濃度処理直後に上昇した光合成能は時間の経過と共に低下する、いわゆる光合成のダウンレギュレーション、をもたらす要因の解明が重要課題となっている。

本研究は、高 CO<sub>2</sub> 濃度下での光合成のダウンレギュレーションの原因をシンクによる糖類の葉からの取り去りに求めている。すなわち、CO<sub>2</sub> 濃度の上昇にとのないう光合成は直ちに上昇するが、これと対応して光合成産物を受け取り貯蔵するシンク能は増大しないため、上昇した光合成はフィードバック調節によってやがて低下すると推測される。このような、仮説の基に、1) 高 CO<sub>2</sub> 濃度と光合成産物や窒素同化産物の葉からシンクへの転流に与える影響を調査し、2) 窒素の還元・同化に対する高 CO<sub>2</sub> 濃度の影響について解析した。

以上の研究結果より、高 CO<sub>2</sub> 濃度下での光合成のダウンレギュレーションがシンク能に起因する師管転流の抑制によるか否かを検討する。

マメ科作物（ダイズ）を供試し、莢が光合成産物や窒素同化産物の主要なシンクとして働く時期に、このシンクとこれに近接して着生する葉（ソース）とを対象として実験を行う。

## 研究発表

(1) 学会誌等：

なし

(2) 口頭発表：

1. シンポジウム講演

藤田耕之輔

ソース・シンク単位からみた植物の生産能

日本土壌肥料学会1998年度大会 大阪府立大学

2. 一般講演

金本健志・延安弘行・実岡寛文・藤田耕之輔：ダイズにおけるCO<sub>2</sub>富化が炭素、窒素の分配に与える影響、日本土壌肥料学会（大阪、1998年4月2-4日）

出版物：なし

## 研究組織

研究代表者： 藤田耕之輔 （広島大学生物生産学部教授）

## 研究経費

平成11年度	2,400千円
平成12年度	600千円
合計	3,000千円

植物による環境修復：師管転流からみた高 CO<sub>2</sub> 濃度に対する植物の  
応答

目次

第1章 Effect of elevated CO<sub>2</sub> concentration on nitrate reduction in  
soybean

第2章 高 CO<sub>2</sub> 濃度処理・莢切除処理がダイズの <sup>13</sup>C および <sup>15</sup>N の分  
配に与える影響

## 第1章

### Effect of elevated CO<sub>2</sub> concentration on nitrate reduction in soybean ( *Glycine max* L. )

Hiroyuki Nobuyasu, Takeshi Kuzukawa, Hirofumi Saneoka, Hany El-Shemy and  
Kounosuke Fujita

*Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, Kagamiyama 1-4-4,  
Higashihiroshima, 739, Japan*

#### ABSTRACT

Effect of CO<sub>2</sub> enrichment on nitrate reduction in soybean was not clear. This experiment was undertaken to examine uptake and reduction of nitrate by <sup>15</sup>N tracer experiment, nitrate reductase assay under the elevated CO<sub>2</sub> concentration.

CO<sub>2</sub> enrichment led to an increase in whole plant weight when 100 ppm of nitrate-N was applied, however, it had no significant effect on it under withdrawal of nitrate-N.

The apparent photosynthetic rate (P<sub>o</sub>) of leaves was increased by CO<sub>2</sub> enrichment in spite of application of nitrate-N at 9 d after treatment initiation and onward, however, reverse tendency was observed for stomatal conductance. Sugar and starch content in leaves increased by CO<sub>2</sub> enrichment and the increase was attained earlier and more pronounced in starch than in sugar.

Reduced-N content in all the vegetative plant parts increased by nitrate application while that in leaf blade and stem tended to decrease by CO<sub>2</sub> enrichment

despite N application.

While CO<sub>2</sub> enrichment significantly increased reduced-N amount in whole plant with nitrate-N application, such effect was not observed at 0 ppmN. The <sup>15</sup>N tracer experiment revealed that the amount of reduced-N derived from nitrate-N was increased by CO<sub>2</sub> enrichment. The nitrate reductase activity in leaf significantly increased at 9 d after imposed to the elevated CO<sub>2</sub> concentration. These results indicate that response to elevated CO<sub>2</sub> concentration is different between dinitrogen fixation and nitrate reduction: while nitrate reduction is accelerated by CO<sub>2</sub> enrichment, such response of dinitrogen fixation is less.

<sup>15</sup>N fed from a terminal leaflet of upper trifoliated leaf translocated more to other plant parts in the CO<sub>2</sub> enriched than in the control plant, suggesting that increases in nitrate reduction at high CO<sub>2</sub> concentration is due to either increases in sink activity for reduced-N or promotion of N circulation in the phloem, or both.

From these results, it is suggested that CO<sub>2</sub> enrichment promotes nitrate reduction, which leads to higher plant growth, compared to plant dependent upon dinitrogen fixation, alone.

Key words: *CO<sub>2</sub> enrichment, nitrate reduction, dinitrogen fixation, soybean, sink activity*

## INTRODUCTION

A number of studies have shown that CO<sub>2</sub> enrichment stimulates net photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation rate in C<sub>3</sub> plant ( Makino, 1994 ) through acceleration of the carboxylation of ribulose-1,5-bisphosphate ( RuBP ) catalyzed by RuBP carboxylase/oxygenase ( Rubisco ), and consequently leading to increase in production of crops such as soybean ( Cooper and Brun, 1967; Hofstra and Hesketh, 1975; Hardy and Havelka, 1975; Imai and Murata, 1976; Kimball, 1983 ).

The response to CO<sub>2</sub> enrichment is reported to be closely associated with mineral nutrition status in plants, particularly nitrogen. For instance, it was shown that the response was poor under suboptimal N nutrition status and increased with increases in N accumulation in a nodulating soybean variety ( Masuda et al. 1989 ), in maize and cotton ( Wong 1979 ) and in loblolly pine seedlings ( Tissue et al. 1993 ). It has been suggested that CO<sub>2</sub> enrichment stimulates accumulation of N derived from combined-N which is applied into culture media and leads to increases in soybean growth at the vegetative stage ( Masuda, et al. 1989 ). However, how CO<sub>2</sub> enrichment affects N accumulation through uptake and reduction of nitrate-N is less understood.

Nitrate utilization by crops is a highly regulated process that involves the uptake of nitrate by root cells, its translocation into the shoot cells, followed by subsequent reduction and assimilation into amino acid and amide. It is well known that the reduction of nitrate to nitrite by the nitrate reductase enzyme is usually a rate-limiting factor compared with nitrate assimilation.

It was found that both uptake and reduction of nitrate by the leaf tissues of barley ( Aslam et al 1979, Aslam and Huffaker 1984 ) and by the shoot and root of maize seedlings ( Pace et al, 1990 ) can be regulated by the supply of carbohydrates. Pace et al. ( 1990 ) examined nitrate reduction activity of maize under the photosynthesis limited conditions and indicated that nitrate uptake and reduction were regulated by the supply of energy and carbon skeletons required to support these processes, rather than by the potential enzymatic capacity to catalyze nitrate reduction. However, since Pace ' s study was conducted under the CO<sub>2</sub>-limited conditions, whether their supposition can be true under the CO<sub>2</sub>-enriched conditions is not known.

It is expected that a number of agents may take part in nitrate reduction activity under high CO<sub>2</sub> conditions where energy and carbon skeletons are adequately supplied. A number of metabolites such as ADP and ATP ( Eaglesham and Hewitt, 1975 ), Pi

( Oji et al, 1987 ), NADH and amide ( Sauchez and Heldt, 1990 ), amino acids ( Oji et al, 1987 ) and nitrate concentration ( Franco et al, 1987 ; Pace et al, 1990 ) were reported to affect the nitrate reductase activity. It is also possible that the uptake and reduction of nitrate is affected by the sink activity ( Deane-Drummond and Clarkson 1979; Crafts-Brandner et al. 1984 ; Pan et al. 1986; Fujita et al. 1997 ). For instance, it was suggested that the rate of nitrate uptake is controlled by the N demand ( Imsamde and Touraine, 1994 ). Fujita et al. ( 1997 ) observed that removal of pods ( sink ) reduced leaf nitrate reductase activity in a soybean variety.

It has been demonstrated that the dinitrogen-fixing activity of nodules is under the control of the sink activity of pods for the fixed-N in the determinate type of soybean cultivars ( Fujita et al, 1991; Masuda et al. 1989 ). When the sink activity for the fixed-N was reduced by pod removal, the dinitrogen-fixing activity of nodules decreased mainly due to the accumulation of fixed-N in the nodules through the interruption of translocation of the fixed-N from nodules to host plant ( Fujita et al, 1991 )

This study was undertaken to examine the effect of CO<sub>2</sub> enrichment on nitrate reduction in leaves of a soybean cultivar, in comparison to it's effect on dinitrogen fixation.

## MATERIALS AND METHODS

### Experiment 1

Seeds of soybean (*Glycine max* L.) cv. Tamahomare were germinated using soil previously inoculated with commercial inoculant containing *Bradyrhizobium japonicum* strain J-10. Fourteen-days-old seedlings were transferred to pots ( diameter 10 cm, height 30cm ) made of poly vinylchloride pipe which contained vermiculite. The pots were placed in containers including a well aerated nutrient solution free of combined N as described by Ogata et al. ( 1986 ). The plants were grown under natural lit conditions at the day and night temperatures of 30 and 26 °C in the growth cabinet.

Using well-nodulated plants at the 3rd trifoliated-leaf stage, CO<sub>2</sub> enrichment and NO<sub>3</sub>-N concentration treatments were applied: <sup>15</sup>NO<sub>3</sub>-N ( 99.4 atom % ) concentration in culture solution was maintained at 0 and 100 ppm. One set of these plants were subjected to elevated CO<sub>2</sub> concentration ( 1000±200 ppm ), while another set was kept under the ambient air conditions ( about 350 ppm ) Air enriched with CO<sub>2</sub> was streamed into the cabinet in which the plants were grown, for 8.5 h starting from 8:30 A.M. everyday and the air was well mixed with fan. The CO<sub>2</sub> concentration in the cabinet was continuously monitored by an infrared gas analyzer ( Hitachi Horiba ASSA-110 type, Kyoto, Japan ) to maintain the desired concentration.

Sampling was done at 0, 9 and 21 d after treatment initiation ( DAT ). At each sampling plants were separated into leaf blades, stem plus petioles, pods and roots,

( nodules if present ), weighing after drying the plant parts at 80 °C for more than 3 d in a forced draught oven and ground for chemical analysis. On the same day, apparent photosynthetic rate (  $P_o$  ) and nitrate reductase activity in leaves, and reduced-N content and  $^{15}\text{N}$  atom % excess of reduced-N in various plant parts such as leaf blades, stem, pods and roots were measured.

#### **Measurement of photosynthetic rate:**

Photosynthetic rates of leaves at the upper position on the main stem were measured under natural light conditions after the  $\text{CO}_2$  enrichment applied by a portable infrared gas analyzer ( Model SPB-H2, Shimazu Seisakusyō-Co. Ltd. Kyoto, Japan). The PAR ( photosynthetic active radiation ) was above  $1200 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . The leaf area was determined by an auto leaf area meter ( Model AAM-5, Hayashi Denko Co. Ltd., Osaka, Japan )

#### **Nitrate reductase activity**

The nitrate reductase activity was determined for the 2nd and 3rd trifoliated soybean leaf from the uppermost leaf on the main stem according to the method described by Nicholas et al. ( 1976 ). The leaves were taken from soybean plants under full sunlight conditions, immediately placed in an ice box, and then brought to the laboratory for analysis.

#### **Measurement of reduced-N and $^{15}\text{N}$ atom % excess of reduced-N**

Nitrate-N concentration in the ground sample in each plant part was colorimetrically determined by the phenol-disulfonic acid method for the leaf blades,

stem+petioles, pods and roots after drying at 70 °C in an air-forced oven for more than 3 d and grinding. Reduced-N content was determined by the Kjeldahl method. Using a aliquat of solution distilled for reduced-N measurement, <sup>15</sup>N atom % was determined by mass spectrometry ( ANCA-SL, Europa Scientific Co. Ltd. ).

### **Measurement of carbohydrate contents**

After ground finely with a vibrating grinder ( Heiko, Co. Ltd, Iwaki, Japan ), the sugar and starch contents of leaf blades and stem+petioles were determined colorimetrically by anthrone after 80% ethanol extraction for the sugars and after 30% HClO<sub>4</sub> extraction from the residue for the starch.

### **Experiment 2:**

Soybean ( *Glycine max* L. ) cv. Tamahomare were grown in the growth cabinet as described in Experiment 1. At the pods filling stage, CO<sub>2</sub> enrichment ( 1000±200 ppm ) were applied with a control ( about 350 ppm CO<sub>2</sub> ). Immediately at , 13 d and 20 d after the initiation of CO<sub>2</sub> enrichment, <sup>15</sup>NO<sub>3</sub>-N ( 99.4 atom %, 100 ppm ) was fed to a terminal leaflet of the 3rd trifoliated leaf from the uppermost leaf. Five days after feeding , plants were harvested with 4 replication and were separated into a terminal leaflet to which <sup>15</sup>NO<sub>3</sub>-N was fed, lateral leaflets in the same trifoliated leaf, stem plus petioles, pods and roots, weighing after drying the plant parts at 80 °C for more than 3 d in a forced draught oven and ground for N content and <sup>15</sup>N atom %.

### **<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>-N feeding and measurement of <sup>15</sup>N atom %**

A terminal leaflet was dipped into the solution ( <sup>15</sup>NO<sub>3</sub>-N 99.4 atom %, 100 ppm N as KNO<sub>3</sub> ) for 3 h starting from 10 AM under the natural light conditions. Immediately after termination of feeding an assimilated leaflet was taken out from beaker containing <sup>15</sup>NO<sub>3</sub>-N solution, then washed thoroughly with tap water and plants were kept in the growth cabinet. Reduced-N content and <sup>15</sup>N atom % of reduced-N in various plant parts were determined as described in the Experiment 1.

### **Statistical analysis**

All the experiments were analyzed for the effect of treatments according to the expected mean squares given by McIntosh ( 1983 ). For mean separation, treatment sum of squares was partitioned by the method of orthogonal contrasts. The coefficients of variation for all response variables were below 10%.

## **RESULTS**

### **Experiment 1.**

Whole plant weight tended to increase with N application in the culture media and elevation of CO<sub>2</sub> concentration ( Table 1 ). The increase in whole plant weight by CO<sub>2</sub> enrichment was not significant at 0 ppm N throughout the experimental period. At 100 ppmN, the whole plant weight was not significantly affected by CO<sub>2</sub> enrichment at 9 DAT, however, at 21 DAT, it increased to about 157% of that of the control plant. This enhancement was mainly due to increases in leaf blade and roots weights.

Po was significantly increased by CO<sub>2</sub> enrichment at 9 DAT and onwards, however, it was not affected by N application under ambient air conditions ( Table 2 ). Under high CO<sub>2</sub> concentration, Po was slightly higher at 100 ppmN than at 0 ppmN. In contrast to changes in Po, stomatal conductance was reversely affected by CO<sub>2</sub> enrichment.

The nitrate reductase activity of leaf increased more remarkably at 9 DAT and was about 2.7 times higher in leaves of CO<sub>2</sub>-enriched plants than in non-treated plant ( Table 3 ).

Sugar content was not affected at 9 DAT by both CO<sub>2</sub> enrichment and N application, while at 21 DAT, it significantly increased by CO<sub>2</sub> enrichment but was not affected by N application ( Table 4 ). On the other hand, starch content was increased by CO<sub>2</sub> enrichment from 9 till 21 DAT, however, it was not significantly changed by N application under ambient air conditions. Despite the CO<sub>2</sub> concentration, starch content tended to decrease by N application.

Reduced-N content of all the plant parts was significantly increased by N application, however that of leaf blades and stem was decreased by CO<sub>2</sub> enrichment ( Table 5 ). Whole plant N amount was increased by N application despite CO<sub>2</sub> enrichment . While the whole plant N amount was not affected by CO<sub>2</sub> enrichment under the N-free conditions, it significantly increased by CO<sub>2</sub> enrichment at 100 ppmN. Under the presence of combined-N in the culture media, N derived from combined-N accounted for most parts of whole plant N. N amount of both fixed-N and combined-N

was significantly increased by CO<sub>2</sub> enrichment and the increase in the former was more pronounced.

## Experiment 2

The effect of CO<sub>2</sub> enrichment on nitrate reduction in leaves in relation to translocation of reduced-N was examined. The amount of <sup>15</sup>N in the whole plant was decreased by elevation of CO<sub>2</sub> concentration ( Table 6 ). CO<sub>2</sub> enrichment led to decrease in the percent of whole plant <sup>15</sup>N in the assimilating leaflet at 5 d after <sup>15</sup>NO<sub>3</sub> feeding while the percent of whole plant <sup>15</sup>N in the pods and the stem plus petioles increased .

## DISCUSSION

The results that Po of soybean leaves was increased by the elevation of CO<sub>2</sub> concentration in the ambient air, irrespective of plant N nutrition status and N sources ( Table 1 ) and that carbohydrate content in leaves was also increased by elevation of CO<sub>2</sub> concentration ( Table 3 ) corroborate reports where under the ambient air conditions, CO<sub>2</sub> concentration limits photosynthetic activity of C<sub>3</sub> plant like soybean, which leads to reduced plant growth ( Kimball, 1983; Makino, 1994 ). Rubisco capacity is limiting at present atmospheric CO<sub>2</sub> pressures and below, under saturating light conditions ( Evans 1986; Makino et al.1985 ), whereas above present atmospheric CO<sub>2</sub> pressures, light harvesting and electron transport capacities limit photosynthesis ( von Caemmerer and Farquhar 1981; Evans and Terashima 1988)

Highly significant increases in whole plant weight ( Table 1 ) and whole plant N amount ( Table 5 ) by CO<sub>2</sub> enrichment suggest that response to elevation of CO<sub>2</sub> concentration in terms of plant growth is closely related to N nutrition status in plant. For instance, we observed that the CO<sub>2</sub> enrichment gave none of the effect on whole plant weight of a non-nodulating soybean isolate, T 201 without application of N in the culture media, while it enhanced plant growth at the high N concentration in the culture media ( unpublished data, Kuzukawa, 1995 ). These results and observations indicate that the growth response to CO<sub>2</sub> enrichment is intimately associated with N nutrition status in the plant.

Under withdrawal of nitrate-N from the culture media, CO<sub>2</sub> enrichment had no significant effect on whole plant N amount of Tamahomare ( Table 5 ), suggesting that CO<sub>2</sub> enrichment gives no effect on dinitrogen fixation in this genotype under the experimental conditions employed here. This results is inconsistent to findings reported earlier by Finn and Brun ( 1982 ) in which CO<sub>2</sub> enrichment increased dinitrogen fixation accompanied by increasing nodule weight in an another genotype of soybean, at 18 d after treatment initiation. We observed similar phenomena in a nodulating soybean isolate, T 202, at 23 rd day after CO<sub>2</sub> enrichment initiation ( unpublished data, Kuzukawa 1995 ). These facts and observations suggest that response of dinitrogen fixation to CO<sub>2</sub> enrichment differs among soybean genotypes.

When <sup>15</sup>NO<sub>3</sub>-N was fed from a leaf, the amount of <sup>15</sup>N in the whole plant was less in the CO<sub>2</sub> enriched plants than in the control ( Table 6 ). It was observed that a trace

amount of  $^{15}\text{NO}_3\text{-N}$  was detected in plants 5 day after  $^{15}\text{NO}_3\text{-N}$  was administered ( data not shown). These results indicate that intake of  $\text{NO}_3\text{-N}$  by leaf is reduced at high  $\text{CO}_2$  concentration, presumably due to closure of stomata aperture at high  $\text{CO}_2$  concentration ( Idso, 1991 ). The main route of  $\text{NO}_3\text{-N}$  influx into leaf might be stomata.

The  $^{15}\text{N}$  tracer experiment revealed that  $\text{CO}_2$  enrichment led to a significant increase in whole plant N amount which was largely derived from nitrate-N applied into the culture media ( Table 5 ). It was also found that the nitrate reductase activity in leaves of Tamahomare was increased from 9 days after imposed to high  $\text{CO}_2$  concentration in the atmosphere ( Table 3 ). These results demonstrated that nitrate reductase activity in leaves and roots is accelerated by the elevation of  $\text{CO}_2$  concentration.

Pace et al. ( 1990 ) found that nitrate uptake and reduction of maize plant under the photosynthesis limited conditions were regulated by the supply of energy and carbon skeletons required to support these processes, rather than by the potential enzymatic capacity to catalyze nitrate reduction. However, their supposition cannot be true for our results for soybean at high  $\text{CO}_2$  concentration. For instance, nitrate reductase activity in Tamahomare leaves increased at 9 after subjection to high  $\text{CO}_2$  concentration, however, sugar content in leaves was not significantly affected by the identical treatment although starch content was increased ( Table 3 ). From these, it infers that the enhancement of nitrate reduction at high  $\text{CO}_2$  concentration observed in the current study might not be attributed to increases in the supply of energy and carbon skeleton.

It is conceivable that number of agents except for photosynthate supply may take part in nitrate reduction activity under high CO<sub>2</sub> conditions where energy and carbon skeletons are adequately supplied. It is possible that the uptake and reduction of nitrate is affected by the sink activity ( Deane-Drummond and Clarkson 1979; Crafts-Brandner et al. 1984 ; Pan et al. 1986; Fujita et al. 1997; Imsamde and Touraine, 1994 ). Fujita et al. ( 1997 ) observed that removal of pods ( sink ) reduced leaf nitrate reductase activity in a soybean variety. Amino acids or peptides circulating in the phloem may also regulate the rate of nitrate uptake ( Muller and Touraine 1992 ). Since behavior of nitrate-N uptaken by soybean roots is complex: after most nitrate-N translocates from roots to leaves, it is reduced and assimilated in leaves, thereafter reduced-N is translocated from a leaf to other plant parts, it is difficult to examine whether nitrate-N reduction is related to its translocation. For understanding this relationship, foliarly feeding of nitrate-N would be advantageous. When <sup>15</sup>NO<sub>3</sub>-N was fed from a terminal leaflet of a trifoliated-leaf of soybean, percent of whole plant <sup>15</sup>N in the assimilated leaflet decreased percent of whole plant <sup>15</sup>N ( Table 6 ), indicating a promotion of efflux of reduced-N from a leaf at high CO<sub>2</sub> concentration. Our results that at high CO<sub>2</sub> concentration percent of whole plant <sup>15</sup>N in pods and stem plus

petioles increased ( Table 6) indicate that influx of reduced-N from these plant parts is accelerated by CO<sub>2</sub> enrichment. These results suggest that CO<sub>2</sub> enrichment enhances sink activity for N in pods, which ensures to promote translocation of reduced-N from a leaf. Collectively, it is proposed that acceleration of nitrate reduction activity in the leaf under CO<sub>2</sub> enrichment is due to promotion of reduced-N translocation from a leaf to other plant parts through increasing their demand of sink for the reduced-N and/or amino acids and peptides circulating in the phloem.

However, the reason why sink activity for N increases by CO<sub>2</sub> enrichment is unclear from the results in the current study. Since photosynthetic activity and translocation of photosynthate from soybean leaves increase at high CO<sub>2</sub> concentration in the atmosphere ( Masuda et al. 1989 ), it seems that more photosynthate is supplied to the sink in the CO<sub>2</sub> enriched- than in the control plants. Presumably, it is speculated that increasing photosynthate supply to sink increases its activity for not only photosynthate but also nitrogenous compounds. However, the mechanism of the enhancement of nitrate reduction activity by CO<sub>2</sub> enrichment remains to be solved in future.

## REFERENCES

- Aslam M. and Huffaker R.C. ( 1984 ) : Dependency of nitrate reduction on soluble carbohydrates in primary leaves of barley under aerobic conditions. *Plant Physiol.* 75, 623-628
- Aslam M., Huffaker R.C., Rains D.W. and Rao K.P. ( 1979 ) : Influence of light and ambient carbon dioxide concentration on nitrate assimilation by intact barley seedling. *Plant Physiol.* 63, 1205-1209
- Crafts-Brandner S.J., Below F.E., Haper J.E. and Hageman R.H. ( 1984 ) : Effect of pod removal on metabolism and senescence of nodulating and nonnodulating soybean isolines. 2. Enzymes and chlorophyll. *Plant Physiol.* 75, 318-322.
- Deane-Drummond C.E. and Clarkson D.T. ( 1979 ) : Effect of shoot removal and malate on the activity of nitrate reductase assayed *in vitro* in barley roots (*Hordeum vulgare* cv. Midas). *Plant Physiol.* 64, 660-662
- Eaglesham A.R.J. and Hewitt L.J. ( 1975 ) : Inhibition of nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*. L. ) leaf by adenosine nucleotides. *Plant Cell Physiol.* 16, 1137-1149
- Evans, J. R. ( 1986 ) : The relationship between carbon dioxide-limited photosynthetic rate and ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase content in two nuclear-cytoplasm substitution lines of wheat, and the coordination of ribulose-bisphosphate-carboxylation and electron transport capacities. *Planta* 167, 351-358.

- Evans, J.R. and Terashima, I. ( 1988 ) : Photosynthetic characteristics of spinach leaves grown with different nitrogen treatments. *Plant Cell Physiol.* 29, 157-165.
- Finn, G.A. and Brun, W.A. ( 1982 ) : Effect of CO<sub>2</sub> enrichment on growth, nonstructural carbohydrate content, and root nodule activity in soybean. *Plant Physiol.*, 69, 327-331.
- Franco A.R., Cardenas J. and Fernandez E. ( 1987 ) : Involvement of reversible inactivation in the regulation of nitrate reductase enzyme levels in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 84, 665-669
- Fujita, K., Masuda, T. and Ogata, S. ( 1991 ) : Effect of pod removal on fixed-N ( N<sub>2</sub> ) export from soybean ( *Glycine max* L. ) nodules. *Soil Sci. Plant Nutr.* 37, 463-469.
- Fujita, K., Morita, K. and Nobuyasu, H. ( 1997 ) : Effect of pod removal on absorption and reduction of nitrate in soybean. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43, 63-73
- Hardy, R. W. F. and Havelka, U. D. ( 1975 ) Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis on soybeans. In *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*, E. P. S. Nutman, p 421-429, Cambridge Univ. Press, New York.
- Hofstra, G. and Hesketh, J.D. ( 1975 ). The effects of temperature and enrichment on photosynthesis in soybean. In: *Environmental and biological control of photosynthesis* ( R. Marcelle, de. ) pp. 71-80. The Hague, Junk 1975.
- Idso, S. B. ( 1991 ) : A general relationship between CO<sub>2</sub>-induced increases in net photosynthesis and concomitant reductions in stomatal conductance. *Environ.*

- Exp. Bot. 31: 381-383.
- Imai, K. and Murata, Y. ( 1976 ) : Effect of carbon dioxide concentration on growth and dry matter production of crop plants. 1. Effects on leaf area, dry matter, tillering dry matter distribution ratio and transpiration. Proc. Crop Sci. Japan 45, 598-606.
- Imsande J. and Touraine B. ( 1994 ) : N demand and the regulation of nitrate uptake. Plant Physiol. 105, 3-7
- Kimball, B. A. ( 1983 ) : Carbon dioxide and Agricultural yield: an assemblage and analysis of 320 prior observations. Agron. J. 75: 779-788.
- Makino, A. ( 1994 ) : Biochemistry of C<sub>3</sub> -photosynthesis in high CO<sub>2</sub> . J. Plant Res. 107, 79-84.
- Makino, A., Mae, T. and Ohira, K. ( 1985 ) : Photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves from emergence through senescence. Quantitative analysis by carboxylation/oxygenation and regeneration of ribulose 1,5-bisphosphate. Planta 166, 414-420.
- Masuda, T., Fujita, K. and Ogata, S. ( 1989 ). Effect of CO<sub>2</sub> enrichment and nitrate application on growth and dinitrogen fixation of wild and cultivated soybean plants during pod-filling stage. Soil Sci. Plant Nutr. 35: 405-416.
- McIntosh, M.S. ( 1983 ) : Analysis of combined experiments. Agron. J. 75: 153-155.
- Muller B. and Touraine B. ( 1992 ) : Inhibition of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. J. Exp. Bot. 43, 617-623
- Nicholas J.C., Harper J.E. and Hageman R.H. ( 1976 ) : Nitrate reductase activity in

- soybeans ( *Glycine max* [L.] Merr. ). 1. Effects of light and temperature. *Plant Physiol.* 58, 731-735
- Ogata S., Adu-Gyamfi J. and Fujita, K ( 1988) Effect of phosphorus and pH on dry matter production, dinitrogen fixation and critical phosphorus concentration in pigeon pea ( *Cajanus cajan* (L) Millsp.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 34, 55-64.
- Oji Y., Ryoma Y., Wakiuchi N., and Okamoto S. ( 1987 ) : Effect of phosphate on *in vitro* activity of NADH nitrate reductase isolated from the second row barley leaves. *Plant Physiol.* 83, 472-474
- Pace G.M., Volk R.J. and Jackson W.A. ( 1990 ) : Nitrate reduction in response to CO<sub>2</sub> limited photosynthesis. *Plant Physiol.* 92, 286-292
- Pan W.L., Camberato J.J., Jackson W.A. and Moll R.H. ( 1986 ) : Utilization of previously accumulated and concurrently absorbed nitrogen during reproductive growth in maize. *Plant Physiol.* 82, 247-253
- Sauech J. and Heldt H.W. ( 1990 ) : On the regulation of spinach nitrate reductase. *Plant Physiol.* 92, 684-689
- Tissue, R.B., Thomas, R.B. and Strain B.R. ( 1993 ) : Long-term effects of elevated CO<sub>2</sub> and nutrients on photosynthesis and rubisco in loblolly pine seedlings. *Plant, Cell and Environment* 16, 859-865.
- Von Caemmerer, S. and Farquhar, G.D. ( 1981 ) : Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and gas exchange in leaves. *Planta* 153, 376-387.
- Wong S.C. ( 1979 ) : Elevated atmospheric partial pressure of and plant growth. 1.

Interactions of nitrogen nutrition and photosynthetic capacity in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Oecologia* (Berl.) 44, 68-74.

Table 1. The effect of CO<sub>2</sub> enrichment and nitrate-N application on plant growth

Treatment	Leaf blades	Stem+petioles	Pods	Roots	Whole plant
0 DAT <sup>a</sup>					
0ppmN	0.30	0.15	—	0.23	0.67
9 DAT					
0ppmN	0.46	0.28	—	0.28	1.02
0ppmN+CO <sub>2</sub> <sup>b</sup>	0.56	0.31	—	0.34	1.20
100ppmN	0.64	0.35	—	0.37	1.35
100ppmN+CO <sub>2</sub>	0.68	0.35	—	0.37	1.40
21 DAT					
0ppmN	0.82	0.40	0.61	0.39	2.22
0ppmN+CO <sub>2</sub>	1.07	0.50	0.50	0.36	2.44
100ppmN	1.22	0.61	0.75	0.44	3.01
100ppmN+CO <sub>2</sub>	2.13	0.95	0.90	0.73	4.71
LSD (0.05)	0.24	0.1	NS	0.09	0.42

a DAT: days after treatment

b CO<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub> enrichment

Table 2. The effect of CO<sub>2</sub> enrichment and nitrate-N application on apparent photosynthetic rate and stomatal conductance

Treatment	Apparent photosynthetic rate ( $\mu \text{ mol m}^{-2} \text{ S}^{-1}$ )	Stomatal conductance ( $\text{mol m}^{-2} \text{ S}^{-1}$ )
0 DAT		
0ppmN	14.45	0.35
9 DAT		
0ppmN	19.10	0.63
0ppmN+CO <sub>2</sub>	26.33	0.33
100ppmN	18.48	0.77
100ppmN+CO <sub>2</sub>	27.00	0.45
21 DAT		
0ppmN	13.48	0.42
0ppmN+CO <sub>2</sub>	21.15	0.11
100ppmN	12.35	0.23
100ppmN+CO <sub>2</sub>	25.93	0.15
LSD (0.05)	4.37	0.28

See legends in Table 1

Table 3. The effect of CO<sub>2</sub> enrichment on nitrate reductase activity in an upper leaf of soybean grown at 100ppm NO<sub>3</sub>-N

Treatment	Nitrate reductase activity ( $\mu$ mol NO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
9DAT	
100ppmN	1.04
100ppmN+CO <sub>2</sub>	2.79
LSD (0.05)	1.15
21DAT	
100ppmN	2.53
100ppmN+CO <sub>2</sub>	3.12
LSD (0.05)	NS

See legends in Table 1

Table 4. The effect of CO<sub>2</sub> enrichment and nitrate-N application on sugar and starch contents in soybean leaf

Treatment	Sugar (mg g <sup>-1</sup> )	Starch (mg g <sup>-1</sup> )
0 DAT		
0ppmN	36.2	109.7
9 DAT		
0ppmN	83.9	75.4
0ppmN+CO <sub>2</sub>	87.4	172.4
100ppmN	81.7	40.3
100ppmN+CO <sub>2</sub>	87.3	138.0
21 DAT		
0ppmN	68.7	100.0
0ppmN+CO <sub>2</sub>	105.6	275.6
100ppmN	75.0	67.2
100ppmN+CO <sub>2</sub>	128.3	104.4
LSD (0.05)	37.6	53.6

See legends in Table 1

Table 5. Effect of CO<sub>2</sub> enrichment and nitrate-N application on amount of N derived from nitrate-N and fixed-N at 21DAT in soybean

Treatment	Leaf blades		Stem+petioles		Pods		Roots		Whole plant	
	NO <sub>3</sub> -N	Fixed-N								
0ppmN	0.24	15.47	0.14	6.03	0.31	32.28	0.07	1.85	0.76	55.64
0ppmN+CO <sub>2</sub>	0.14	17.80	0.03	6.34	0.12	22.53	0.05	1.68	0.34	48.34
100ppmN	46.85	0.02	16.12	2.15	27.11	5.00	8.84	0.86	98.92	6.30
100ppmN+CO <sub>2</sub>	59.38	6.66	20.63	3.46	36.88	6.66	15.77	0.09	132.66	16.87
LSD (0.05)	12.23	11.75	4.85	1.19	10.29	11.41	1.60	1.91	18.37	5.44

See legends in Table 1

Table 6. The effect of CO<sub>2</sub> enrichment and nitrate-N application on <sup>15</sup>N amount and <sup>15</sup>N distribution percentage in various plant parts at 13DAT

Treatment	Assimilation Leaf	Leaf blades	Stem+petioles	Pods	Roots	Total
	amount of <sup>15</sup> N (μg plant <sup>-1</sup> )					
100ppmN	5.10	4.06	0.95	16.66	0.94	26.99
100ppmN+CO <sub>2</sub>	1.86	3.05	1.00	12.43	0.91	19.97
LSD (0.05)	2.72	0.95	NS	NS	NS	7.68
Distribution percentage						
100ppmN	22.0	16.1	3.4	56.0	2.5	100.0
100ppmN+CO <sub>2</sub>	9.7	15.8	5.1	64.7	4.7	100.0
LSD (0.05)	2.5	NS	1.1	5.4	NS	-

See legends in Table 1

## 第2章

高CO<sub>2</sub>濃度処理及び莢切除処理が<sup>13</sup>C・<sup>15</sup>Nの転流・分配に  
与える影響

## 1. 実験方法

### (1) 植物体作成

ダイズ（品種：グリーンフォーマー）を供試し、マサ土を充填した3Lポットを用い、全期間自然光下で栽培した。施肥量は窒素肥料（N）として硫酸アンモニウム 150kgN/ha、リン肥料として過リン酸石灰 150kgP/ha、カリ肥料として硫酸カリウム 150kgK/ha、p h 調整剤として苦土石灰 1500kg/ha とし、元肥として培養土に加えた。なお、ハダニ、カメムシなどの害虫は、ダニトロン、スミチオンなどを適宜噴霧し防除した。処理は実験1と同様の莢切除処理と高 CO<sub>2</sub> 濃度処理(100PaCO<sub>2</sub>)を組み合わせ、対照区、高 CO<sub>2</sub> 処理区、(高 CO<sub>2</sub> + 莢切除)処理区の3区を設定した。播種後71日目の子実肥大期に、高 CO<sub>2</sub> 濃度処理を開始したものを高 CO<sub>2</sub> 処理区、すべての莢を切除し、高 CO<sub>2</sub> 濃度処理を開始したものを(高 CO<sub>2</sub> + 莢切除)処理区とし、無処理個体を対照区とした。

### (2) 試料採取法

試料採取は、各処理区から3個体ずつについて、莢切除処理開始時、及び処理後7、10、14、17日目に行い、葉、茎、根、及び莢に分けた。80℃で3日間以上熱風乾燥し、秤量後振動微粉碎機にて微粉碎し、糖・デンプンの定量に供した。

### (3) 糖濃度の定量法

実験1と同様の方法で行なった。

### (4) デンプン濃度の定量法

実験1と同様の方法で行なった。

(5)  $^{13}\text{C}$  トレーサー実験

$^{13}\text{C}$  同化は実験 1 と同様に行なった。また、試料の採取時間、乾燥方法、 $^{13}\text{C}$  atom%excess の測定法も実験 1 と同様に行なった。

(6)  $^{15}\text{N}$  トレーサー実験

I)  $^{15}\text{N}$  同化、II) アミノ酸定量法、III) GC-MS による  $^{15}\text{N}$  atom%excess の測定法は実験 1 と同様に行なった。

## 2、結果

### (1) 乾物重

全乾物重は、対照区では処理後 17 日目には約 16%増加した。高CO<sub>2</sub>処理区では、処理後 7 日目には対照区よりも高い値を示し、処理 17 日目には処理開始時に比べて約 40%増加した。(高CO<sub>2</sub>+莢切除)処理区では、莢を切除したにも関わらず、処理後 7 日目には対照区と差がなくなり、処理後 17 日目には約 23%増加し、対照区よりも高い値を示した(第 18 図)。

各器官重は、対照区では莢重が 2.5 倍に増加したが、その他の器官ではほとんど変化がなかった。高CO<sub>2</sub>処理区では莢重が処理後 17 日目には約 3 倍増加し、その他すべての器官においても対照区よりも増加した。(高CO<sub>2</sub>+莢切除)処理区では、葉、葉柄・茎、根すべての器官で対照区よりも増加したが、特に葉、葉柄・茎での増加が著しかった(第 19 図)。

### (2) 茎の糖、デンプン濃度

茎の糖濃度は対照区において処理後 10 日目には少しの上昇が見られたが、処理後 17 日目には約 25%減少した。高CO<sub>2</sub>処理区では、経時的に増加していき、処理後 17 日目には開始時よりも約 90%増加し、対照区の約 2.3 倍になった。(高CO<sub>2</sub>+莢切除)処理区では処理後 10 日目には開始時よりも 90%増加した。しかし、処理後 17 日目には 10 日目よりも減少し、開始時よりも 30%の増加に留まったが、対照区よりも高い値を示した(第 20 図)。

茎のデンプン濃度は、対照区では期間を通して約 1.5%で一定だった。CO<sub>2</sub>処理区では緩やかに増加していき、処理後 17 日目には開始時の約 3 倍の値になった。(CO<sub>2</sub>+莢切除)処理区では、直線的に増加していき、処理後 17 日目には開始時の約 7.5 倍に増加した(第 21 図)。

### (3) $^{13}\text{C}$ 転流率・分配率

$^{13}\text{C}$  転流率は、対照区において同化 12 時間後では約 40%、72 時間後では約 80%となった。CO<sub>2</sub> 処理により、同化 12 時間後の転流率は約 44%で対照区よりも高くなったが、72 時間後の転流率は対照区よりも低くなった。(CO<sub>2</sub>+莖切除)処理により、同化 12 時間後の転流率は 15%、同化 72 時間後の転流率は 50%と他の 2 処理に比べて低下した(第 22 図)。

$^{13}\text{C}$  分配率は、対照区において同化 12 時間後ではユニット外の莖への分配率が約 38%と最も高く、次に同化莖への分配率が 33%、根が 13%となった。72 時間後でもほぼ同様の傾向を示し、同化莖が 41%、ユニット外の莖が 40%、根が 14%の分配率を占めた。CO<sub>2</sub> 処理区において、同化 12 時間後の分配率は対照区とほぼ同様の傾向を示した。しかし、同化 72 時間後の分配率では、同化莖への分配率が 58%を占め、著しく増加した。(CO<sub>2</sub>+莖切除)処理区においては、同化 12 時間後に茎+葉柄への  $^{13}\text{C}$  分配率が 47%と最も高く、次いで根への分配率が 24%、同化葉柄が 18%となった。72 時間後の  $^{13}\text{C}$  分配率も同様の傾向を示した。また、(CO<sub>2</sub>+莖切除)処理区では、対照区と比べて同化茎、同化葉柄への分配率が高かった(第 23 図)。

### (4) $^{15}\text{N}$ 転流率・分配率

$^{15}\text{N}$  転流率は、対照区において約 70%だった。CO<sub>2</sub> 処理により、 $^{15}\text{N}$  転流率は 35%に低下し、(CO<sub>2</sub>+莖切除)処理区では 54%に低下した(第 24 図)。

$^{15}\text{N}$  分配率は、対照区ではユニット外の莖へ約 60%、同化莖へ約 35%分配されており、 $^{15}\text{N}$  のほとんどが莖へ分配されていた。CO<sub>2</sub> 処理区では、ほとんどが同化莖へ分配されていた。(CO<sub>2</sub>+莖切除)処理区では、茎・葉柄へ 46%と最も高く分配されており、次いで葉身へ 28%、根へ 17%分配していた(第 25 図)。

#### (5) 茎、葉柄のアミノ酸濃度

茎の全アミノ酸濃度は、CO<sub>2</sub>処理によって対照区よりも約 25%、(CO<sub>2</sub>+莖切除)処理によって約 3 倍に増加した。葉柄の全アミノ酸濃度は茎と同様の傾向を示したが、絶対量は茎と比べて少なかった(第 26 図)。

茎における各アミノ酸濃度は、対照区では Asn が最も多く、次いで GABA、Thr、Ile、が多かった(第 27 図)。CO<sub>2</sub>処理区では、対照区に比べてほとんど差は見られないが、Ser、GABA、Asn、Glu で少し増加した。(CO<sub>2</sub>+莖切除)処理区では、すべてのアミノ酸で上昇した。中でも Asn が最も増加し、対照区の約 6.5 倍になった。次いで、Asp で 5.8 倍、Pro で 4.5 倍に増加し、その他 Gly、Gln、Glu が大きく増加した(第 28 図)。

葉柄の各アミノ酸濃度は、対照区では Leu が最も多く、次いで Thr、GABA、が多かった。その他、Val、Ser、Ile、Asn、Asp が他のアミノ酸に比べて多かった(第 29 図)。CO<sub>2</sub>処理により、各アミノ酸濃度はほとんど変化しなかった。(CO<sub>2</sub>+莖切除)処理により Asn が著しく増加し、次いで Pro が大きく増加した。茎と葉柄とでは、茎の増加が大きかった(第 30 図)。

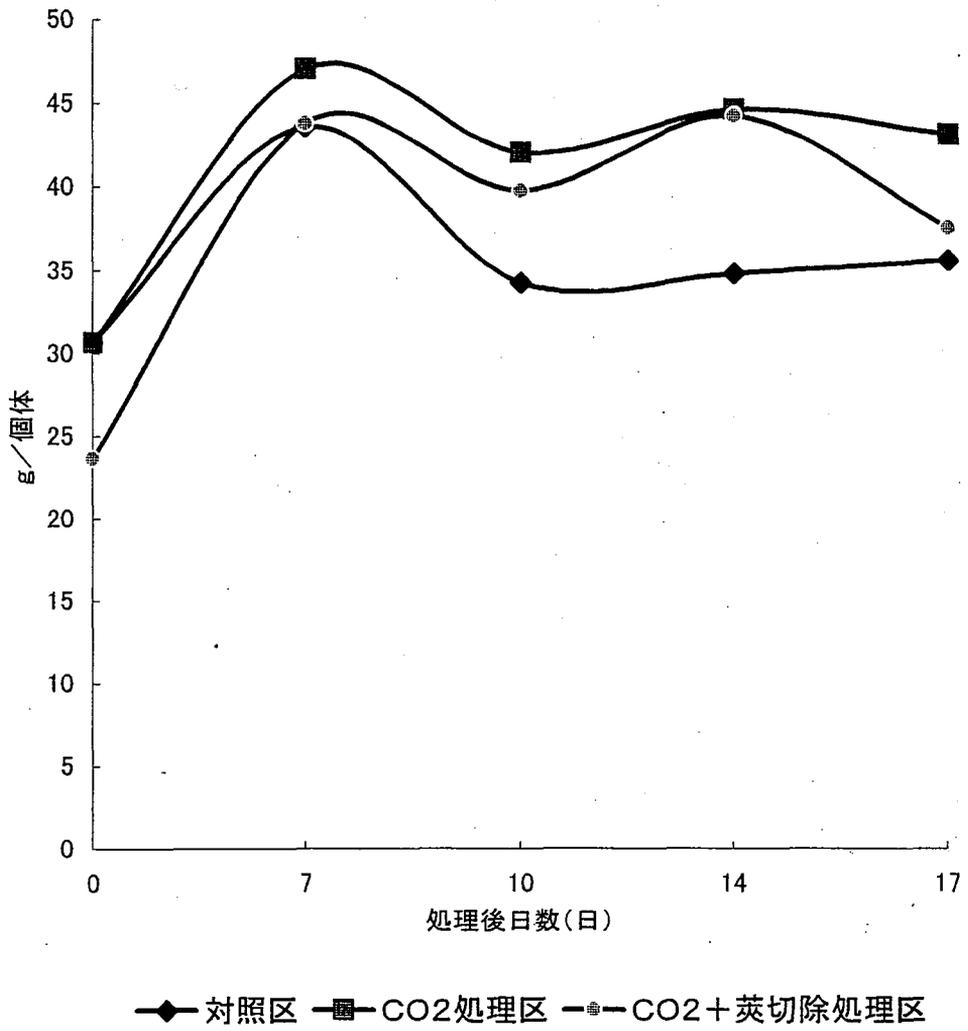
#### (4) 茎・葉柄における各アミノ酸の <sup>15</sup>N atom%excess

茎における各アミノ酸の <sup>15</sup>N atom%excess は、対照区では Thr、Tyr で高い値を示したが、その他のアミノ酸は低い値だった(第 31 図)。CO<sub>2</sub>処理による変化はあまり見られなかった。(CO<sub>2</sub>+莖切除)処理により、ProSerGABA での値が著しく上昇し、その他 Asp、Gln、Glu でも上昇が見られた(第 32 図)。

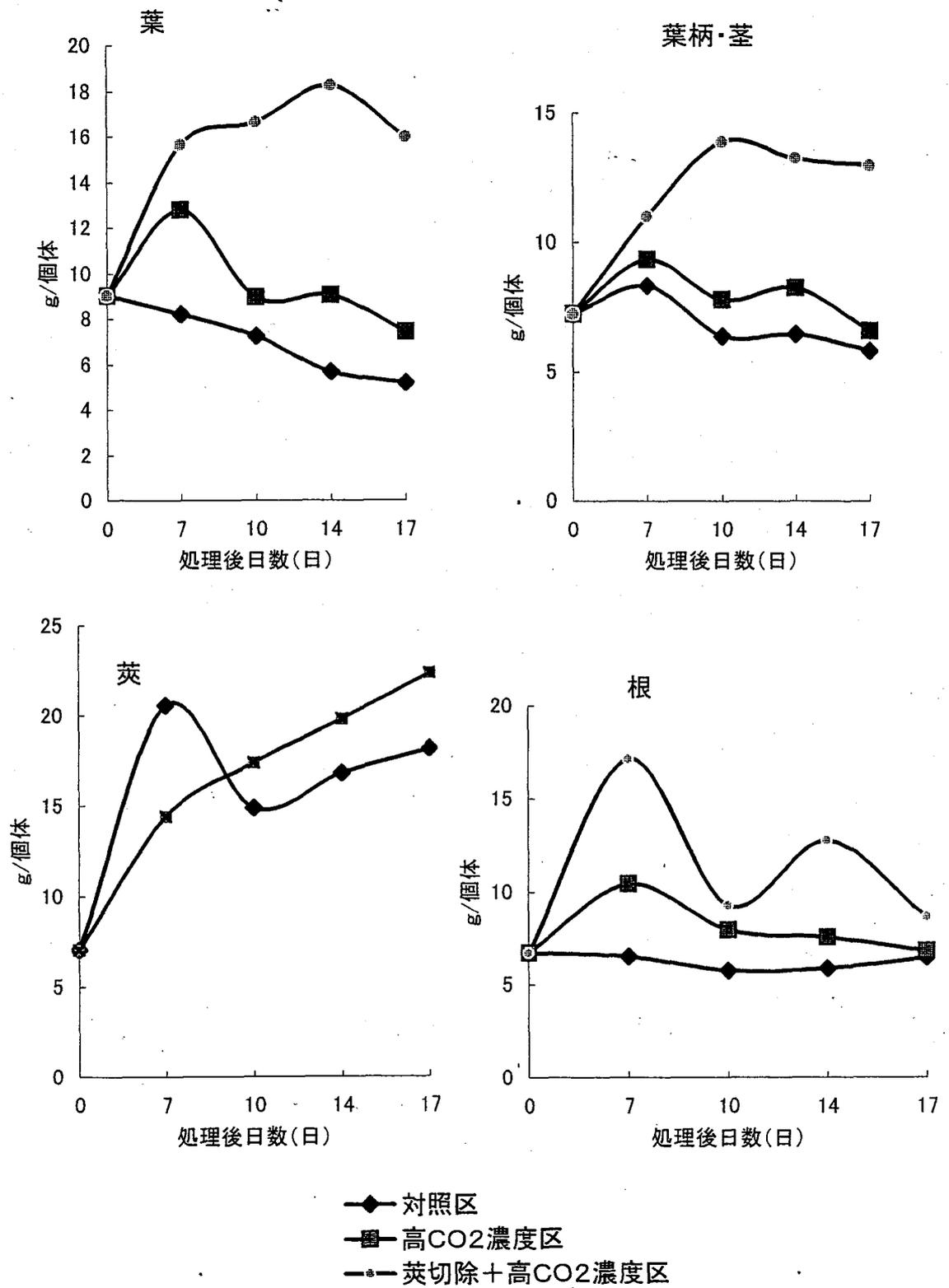
葉柄における各アミノ酸の <sup>15</sup>N atom%excess は、対照区では Thr で高い値を示したが、その他のアミノ酸は低い値を示した(第 33 図)。CO<sub>2</sub>処理により、Ser、Pro、Lys、Tyr で上昇したが、対照区とはほとんど差がなかった。(CO<sub>2</sub>+莖切除)処理により、Pro で約 11 倍上昇した。次いで、Lys、Ser で上昇した(第 34 図)。

第8表 高CO<sub>2</sub>及び莢切除処理が各器官の乾物重に与える影響(g/個体)

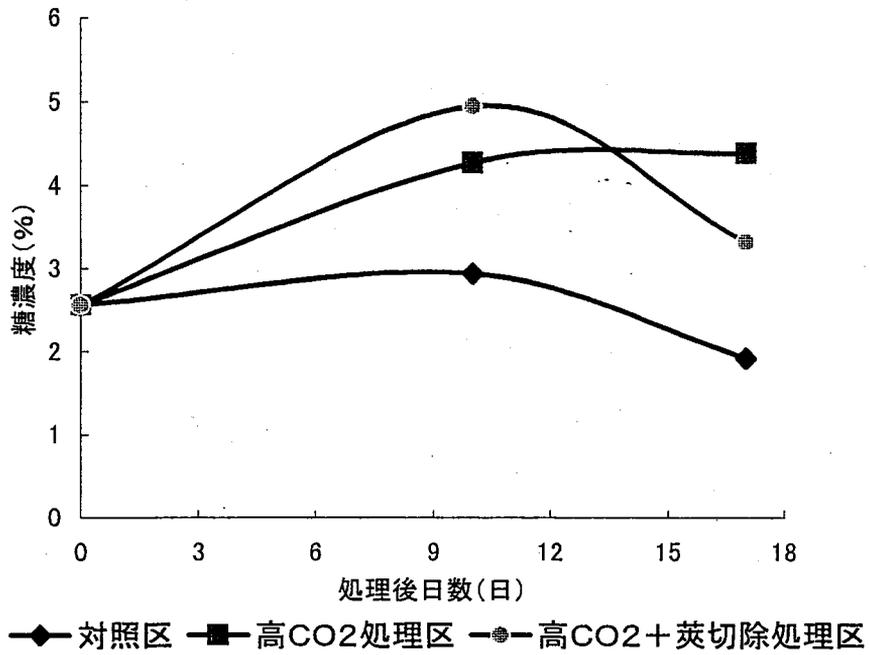
器官	処理区	処理後日数(日)				
		0	7	10	14	17
葉	対照区	9.0	8.2	7.2	5.7	5.2
	高CO <sub>2</sub> 処理区	—	12.78	8.95	9.04	7.41
	高CO <sub>2</sub> +莢切除処理区	—	15.63	16.63	18.25	15.98
茎・葉柄	対照区	7.2	8.3	6.4	6.5	5.8
	高CO <sub>2</sub> 処理区	—	9.4	7.8	8.2	6.6
	高CO <sub>2</sub> +莢切除処理区	—	11.0	13.9	13.2	13.0
根	対照区	6.7	6.5	5.7	5.9	6.5
	高CO <sub>2</sub> 処理区	—	10.4	7.9	7.5	6.8
	高CO <sub>2</sub> +莢切除処理区	—	17.1	9.3	12.7	8.6
莢	対照区	7.0	20.6	14.9	16.8	18.1
	高CO <sub>2</sub> 処理区	—	14.4	17.4	19.8	22.4
	高CO <sub>2</sub> +莢切除処理区	—	—	—	—	—



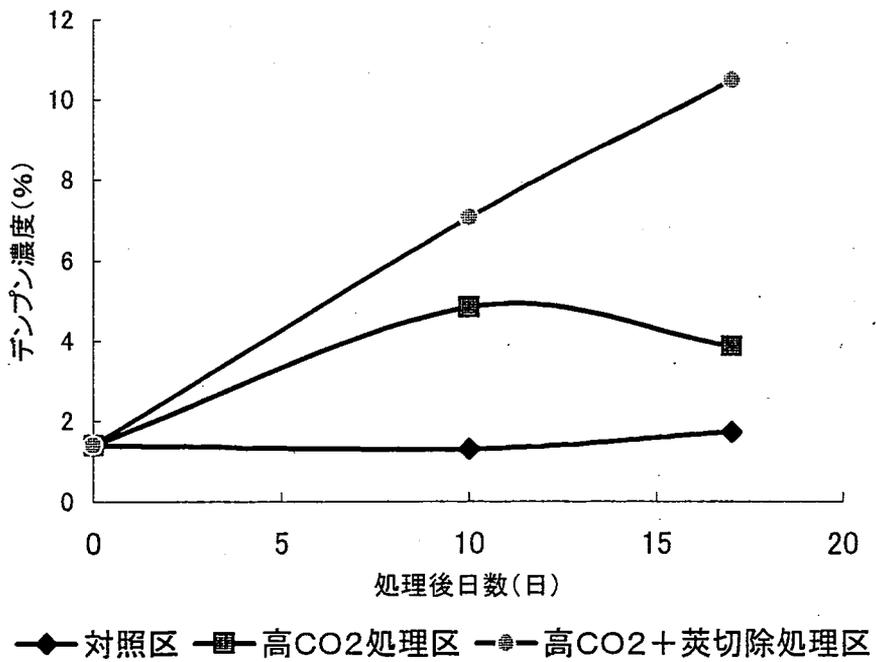
第18図 高CO<sub>2</sub>及び灰切除処理が全乾物重に与える影響



第19図 高CO<sub>2</sub>及び莢切除処理が各器官の乾物重に与える影響



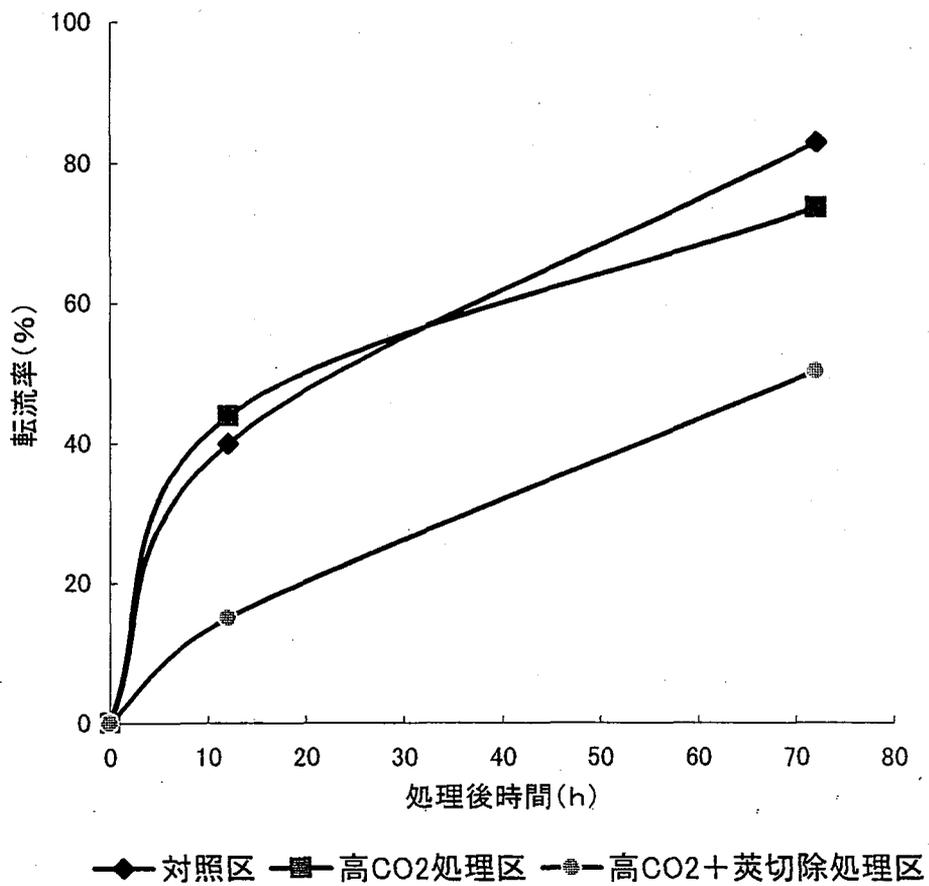
第20図 高CO<sub>2</sub>及び莖切除が茎の糖濃度に与える影響



第21図 高CO<sub>2</sub>及び莖切除が茎のデンプン濃度に与える影響

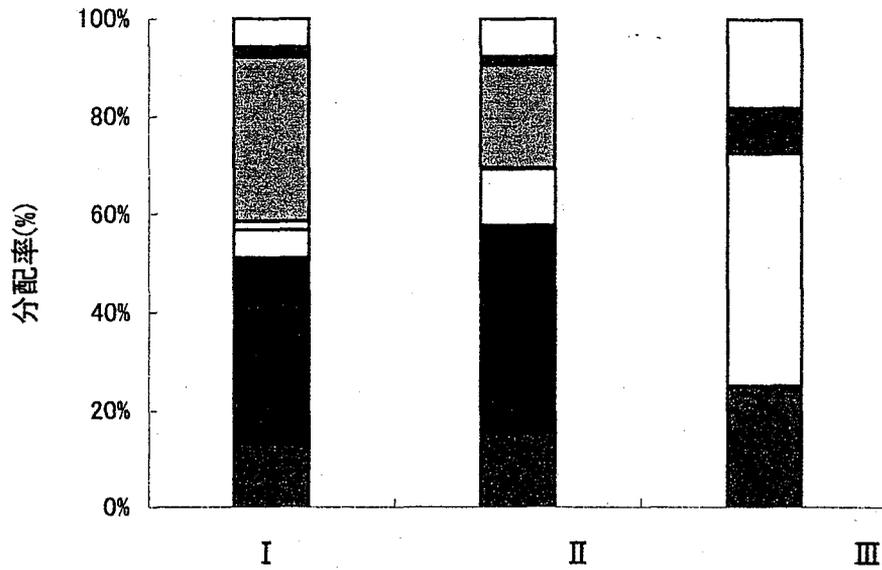
第9表 高CO<sub>2</sub>及び莢切除処理が各器官の<sup>13</sup>C atom% excessに与える影響

処理区	器官	同化後時間(時間)	
		12	72
対照区	同化先端尖葉	1.588	0.295
	同化水平葉	1.343	0.321
	同化葉柄	0.237	0.044
	同化莖	0.095	0.037
	同化莢	0.186	0.257
	葉身	0.002	0.004
	莖・葉柄	0.006	0.004
	莢	0.017	0.023
	根	0.006	0.025
高CO <sub>2</sub> 処理区	同化先端尖葉	1.282	1.598
	同化水平葉	1.093	1.718
	同化葉柄	0.236	1.259
	同化莖	0.095	1.156
	同化莢	0.226	1.317
	葉身	0.000	1.090
	莖・葉柄	0.015	1.099
	莢	0.024	1.116
	根	0.026	1.114
高CO <sub>2</sub> + 莢切除処理 区	同化先端尖葉	1.130	0.715
	同化水平葉	0.851	0.481
	同化葉柄	0.334	0.379
	同化莖	0.165	0.206
	同化莢	—	—
	葉身	0.000	0.000
	莖・葉柄	0.011	0.032
	莢	—	—
	根	0.006	0.021

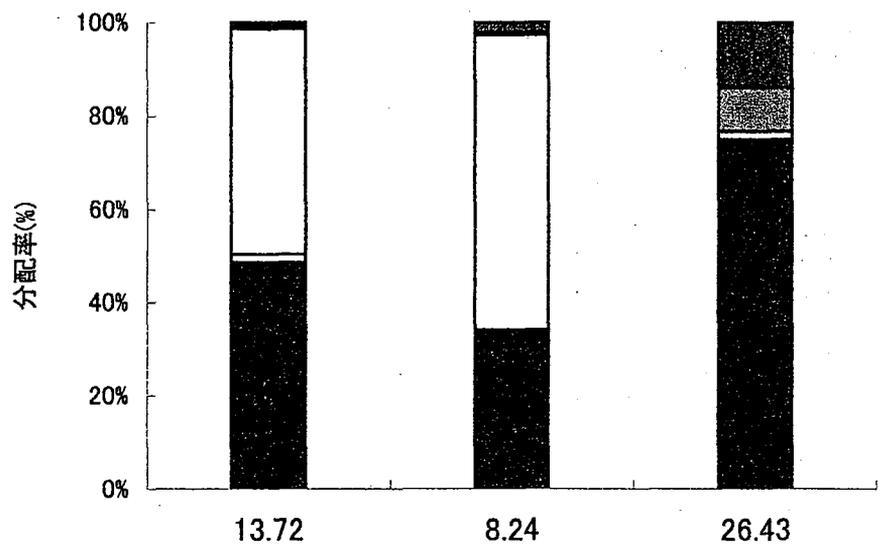


第22図 高CO<sub>2</sub>及び蒺切除処理が<sup>13</sup>C転流率に与える影響

同化12時間後



同化72時間後



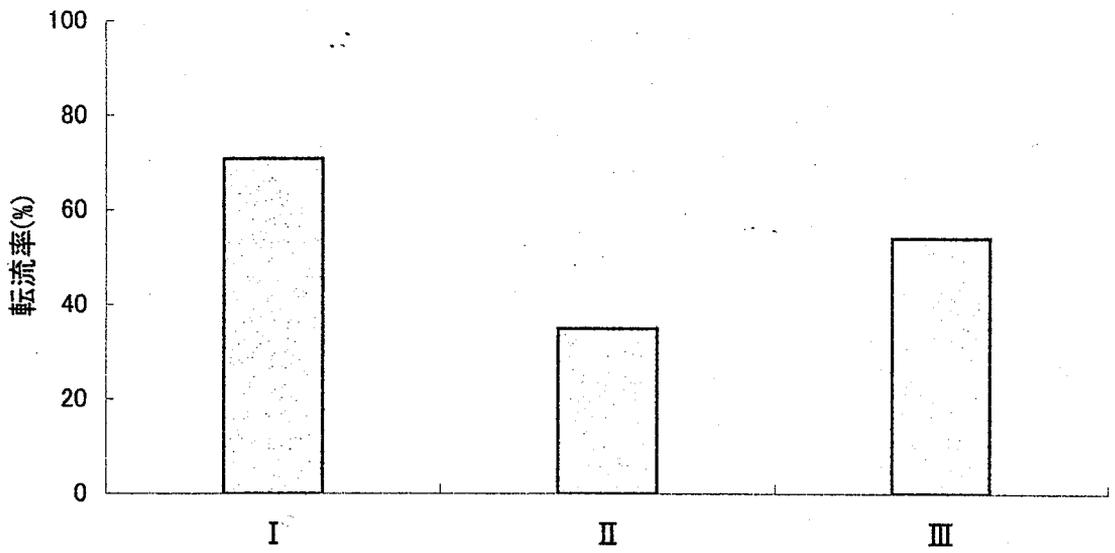
■ 莢 ■ 葉柄+茎 □ 葉身 □ 同化莢 ▨ 同化茎 ■ 同化葉柄 □

I 対照区 II 高 $\text{CO}_2$ 処理区 III (高 $\text{CO}_2$ +莢切除)処理区

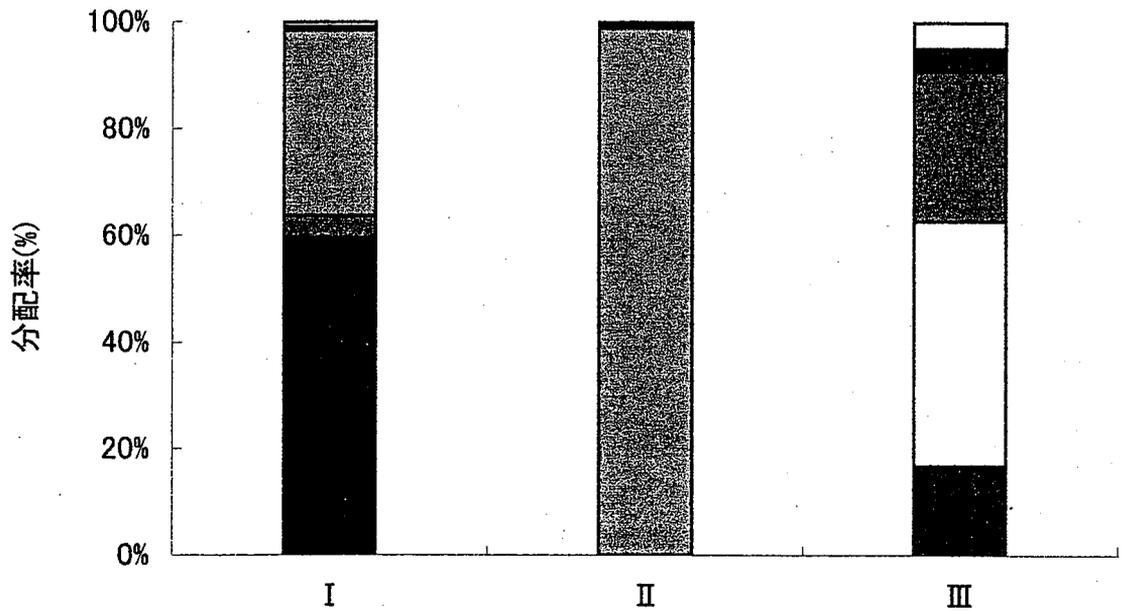
第23図 高 $\text{CO}_2$ 及び莢切除処理が $^{13}\text{C}$ 分配率に与える影響

第10表 高CO<sub>2</sub>及び莢切除が各器官の<sup>15</sup>N atom%excessに与える影響

器官	処理区		
	対照区	高CO <sub>2</sub> 処理区	高CO <sub>2</sub> +莢切除処理区
先端尖葉	0.196	0.089	0.129
水平葉	0.003	0.000	0.001
同化葉柄	0.012	0.007	0.018
同化莖	0.006	0.002	0.008
同化莢	0.014	0.006	—
葉身	0.001	0.000	0.002
莖・葉柄	0.000	0.000	0.003
莢	0.002	0.000	—
根	0.000	0.000	0.002



第24図 処理が同化72時間後の<sup>15</sup>N転流率に与える影響



■根 ■莢 □茎・葉柄 ■葉身 ■同化莢 ■同化茎 □同化葉柄 □水平葉

I 対照区 II 高CO<sub>2</sub>処理区 III (高CO<sub>2</sub>+葉切除)処理区

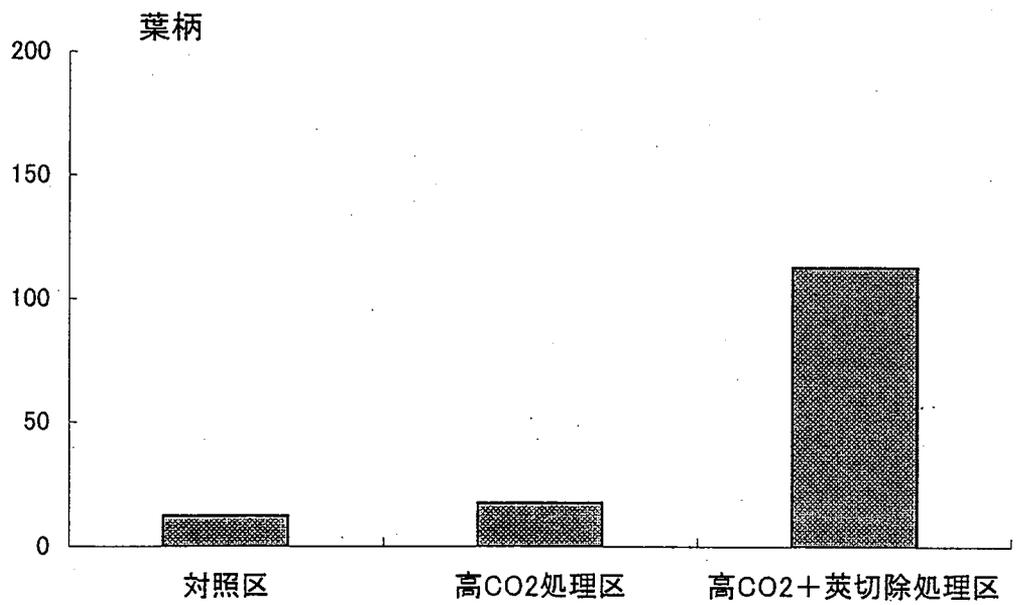
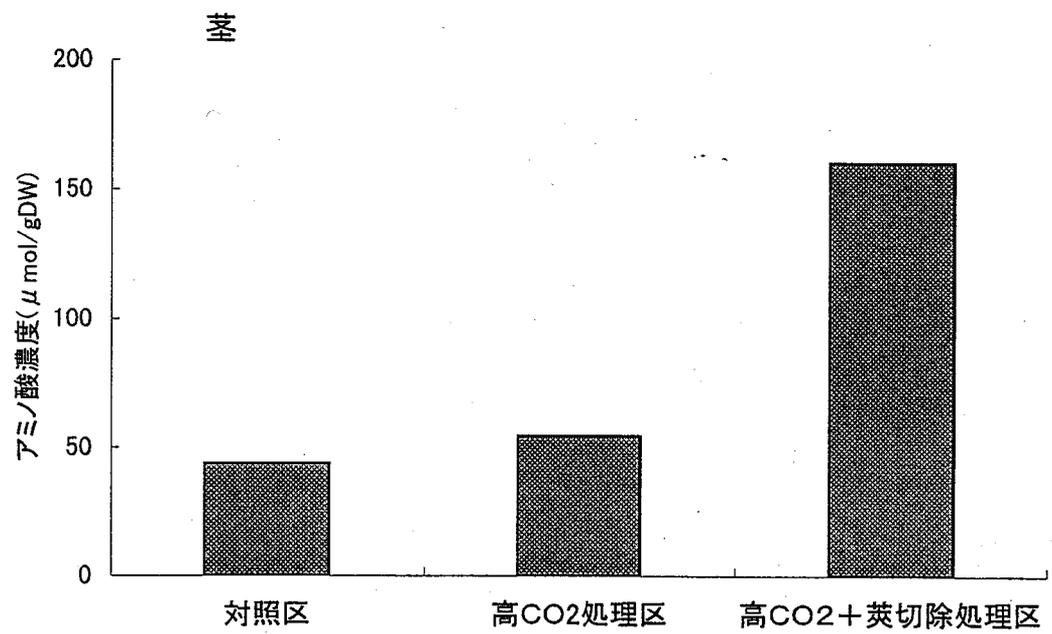
第25図 高CO<sub>2</sub>及び葉切除処理が同化72時間後の<sup>15</sup>N分配率に与える影響

第11表 高CO<sub>2</sub>及び莢切除が茎の各アミノ酸濃度に与える影響

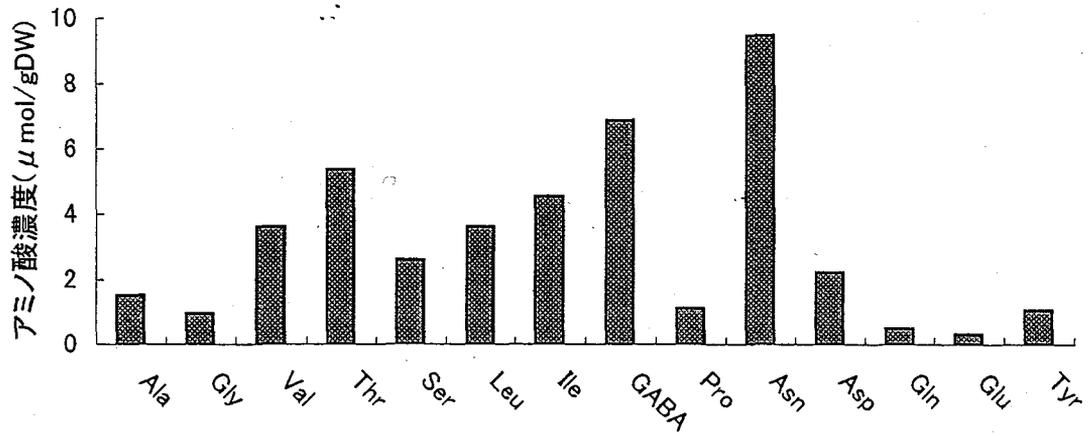
	処理区		
	対照区	高CO <sub>2</sub> 処理区	高CO <sub>2</sub> +莢切除処理区
Ala	1.51	1.15	3.31
Gly	0.95	1.18	3.67
Val	3.61	3.90	9.08
Thr	5.35	8.46	10.59
Ser	2.60	3.83	7.07
Leu	3.60	4.00	7.78
Ile	4.53	4.47	14.09
GABA	6.86	9.12	8.57
Pro	1.12	1.16	6.18
Asn	9.48	13.29	70.84
Asp	2.22	1.69	15.08
Gln	0.50	0.70	1.71
Glu	0.32	0.34	0.84
Tyr	1.05	1.07	1.50
Total(nmol/gDW)	43.68	54.36	160.31

第12表 高CO<sub>2</sub>及び莢切除が葉柄の各アミノ酸濃度に与える影響

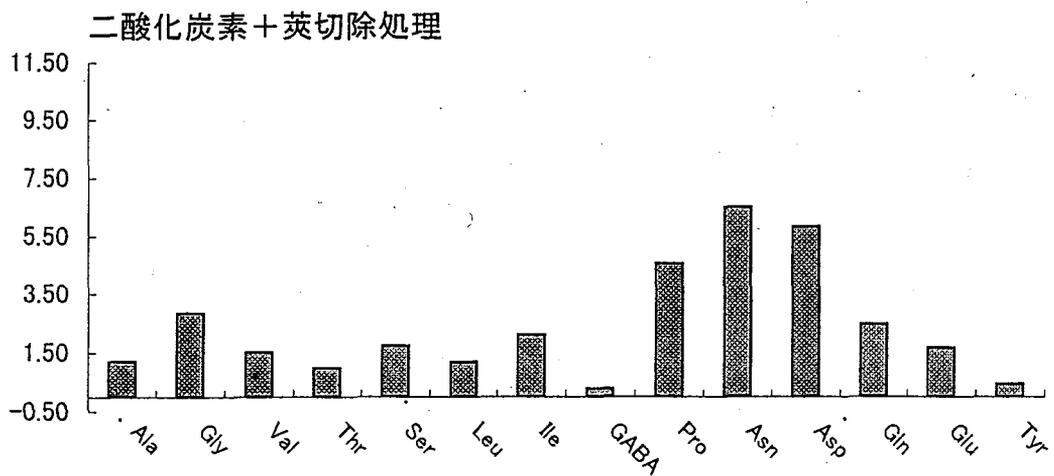
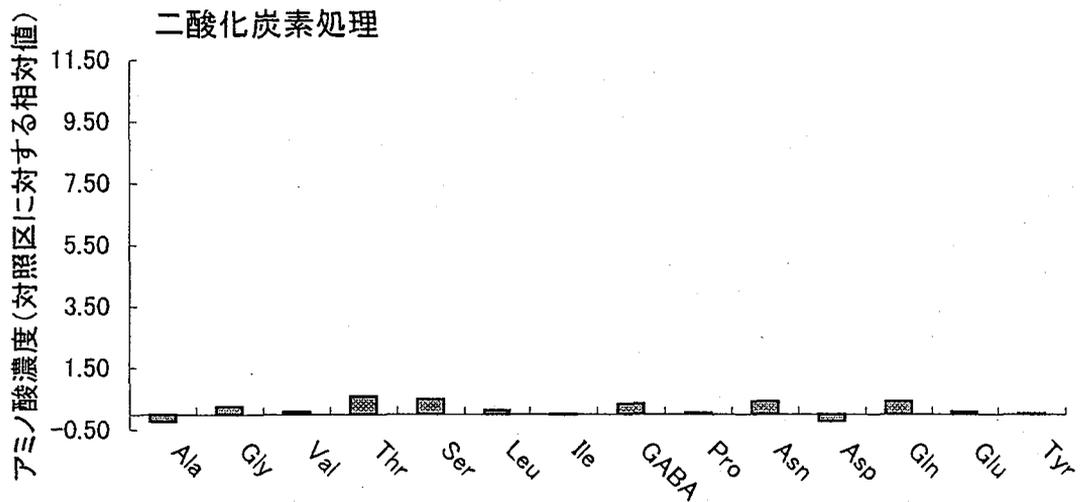
	処理区		
	対照区	高CO <sub>2</sub> 処理区	高CO <sub>2</sub> +莢切除処理区
Ala	0.56	0.76	3.02
Gly	0.32	0.36	2.19
Val	1.15	1.29	8.04
Thr	1.56	1.99	10.90
Ser	1.02	1.62	6.36
Leu	1.76	1.99	5.28
Ile	1.10	1.33	10.24
GABA	1.22	3.40	7.94
Pro	0.41	0.51	10.92
Asn	1.16	2.16	38.19
Asp	1.05	0.91	6.32
Gln	0.15	0.23	1.09
Glu	0.38	0.29	0.30
Tyr	0.43	0.65	1.91
Total(nmol/gDW)	12.27	17.49	112.71



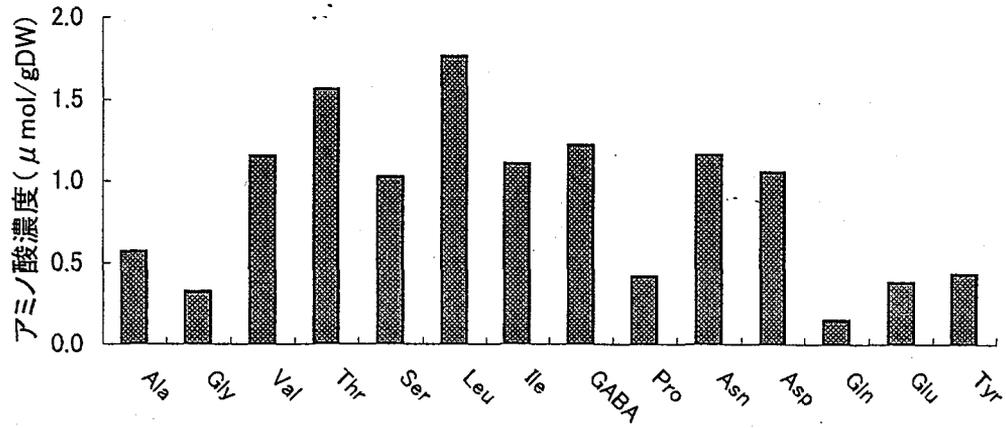
第26図 高CO<sub>2</sub>及び莢切除が茎・葉柄の全アミノ酸濃度に与える影響



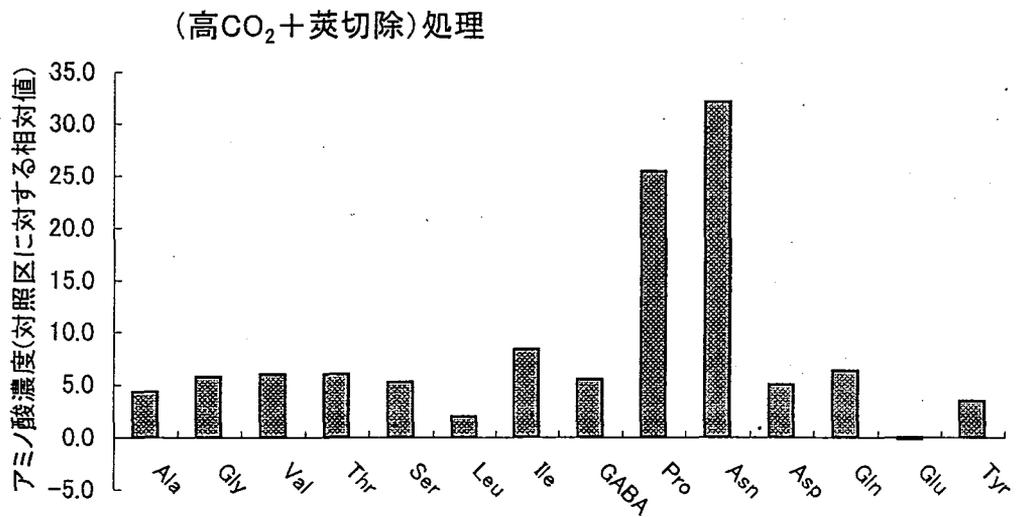
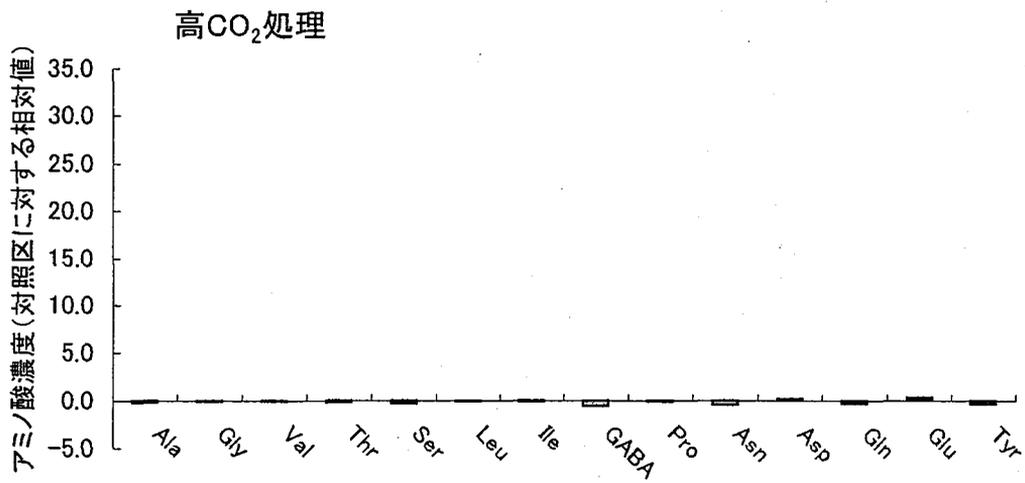
第27図 茎の各アミノ酸濃度(対照区)



第28図 高CO<sub>2</sub>及び莖切除が茎の全アミノ酸濃度に与える影響



第29図 葉柄における各アミノ酸濃度(対照区)



第30図 高CO<sub>2</sub>及び莖切除が葉柄の各アミノ酸濃度に与える影響

第13表

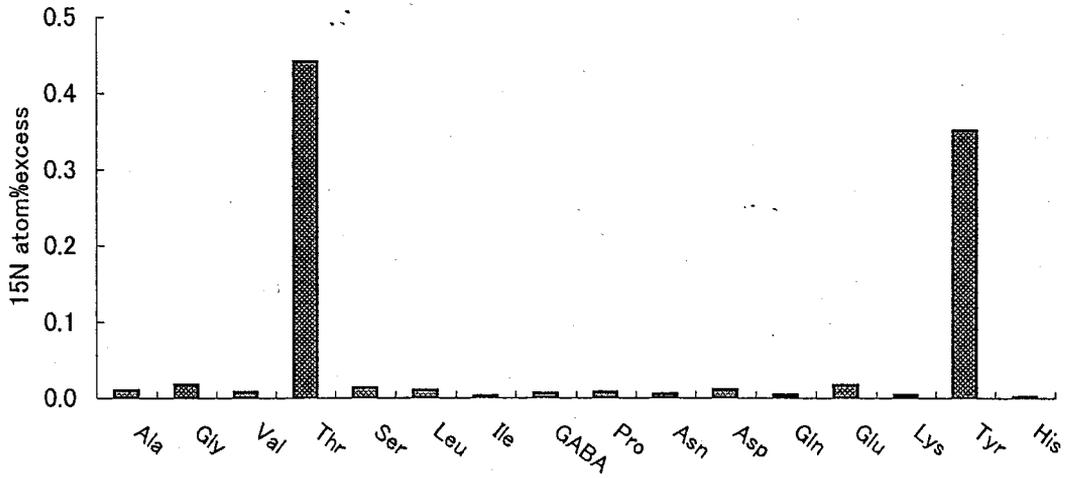
高CO<sub>2</sub>及び莢切除処理が茎中の各アミノ酸における<sup>15</sup>N atom% excessに与える影響

	処理区		
	対照区	二酸化炭素処理区	二酸化炭素+莢切除処理区
Gly	0.017	0.012	0.020
Ser	0.013	0.016	0.054
GABA	0.006	0.007	0.017
Pro	0.008	0.003	0.038
Asn	0.005	0.002	0.005
Asp	0.011	0.013	0.022
Gln	0.005	0.003	0.008
Glu	0.017	0.015	0.025

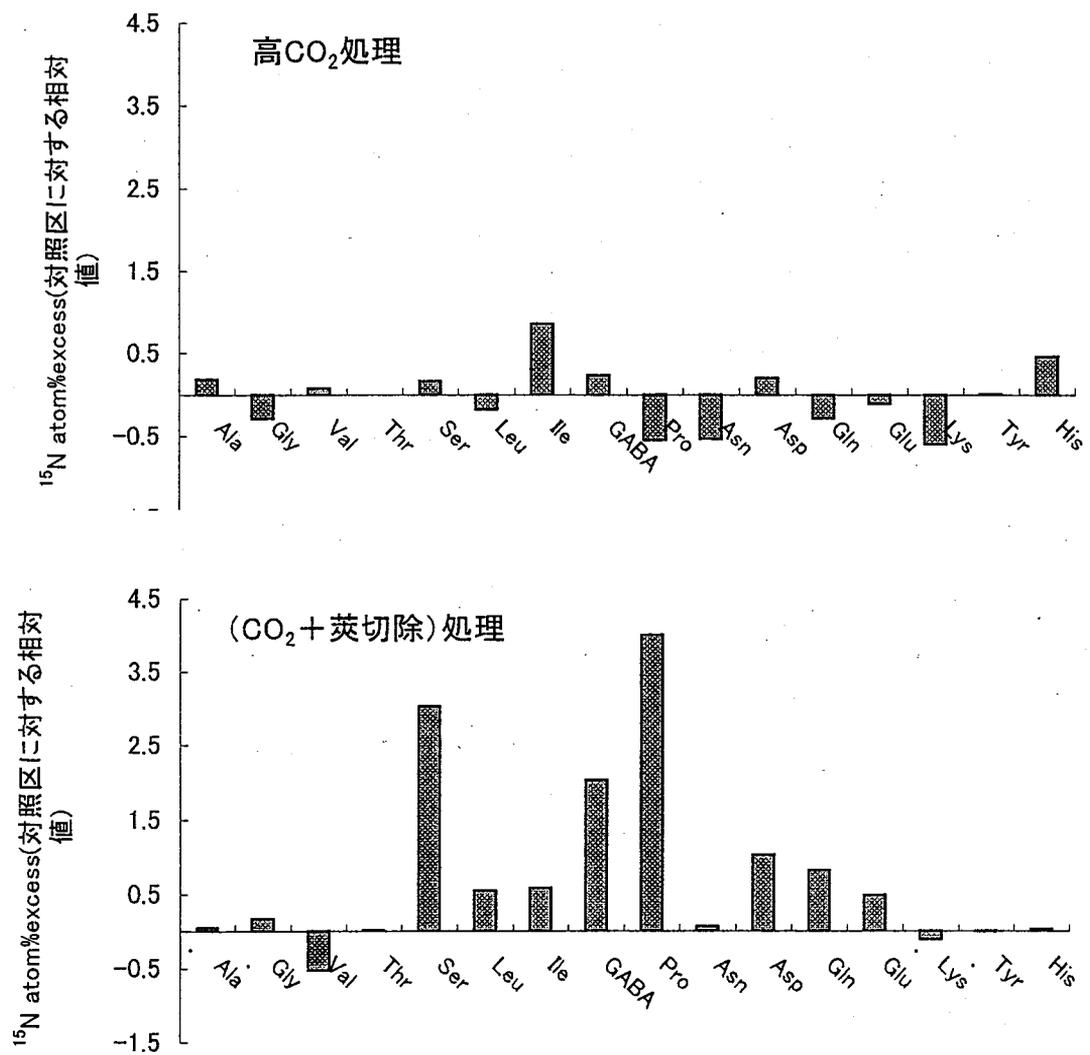
第14表

高CO<sub>2</sub>及び莢切除処理が葉柄の各アミノ酸における<sup>15</sup>N atom% excessに与える影響

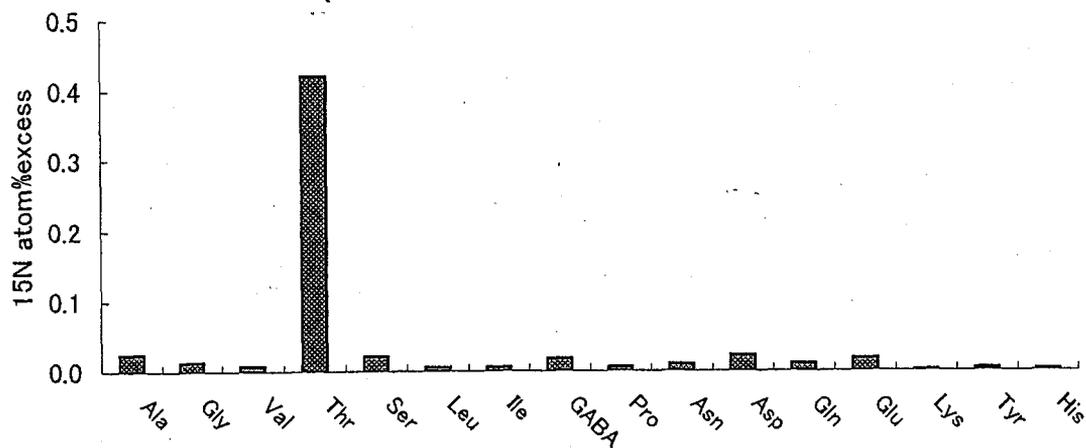
	処理区		
	対照区	二酸化炭素処理区	二酸化炭素+莢切除処理区
Gly	0.013	0.012	0.016
Ser	0.021	0.053	0.108
GABA	0.017	0.015	0.027
Pro	0.006	0.010	0.064
Asn	0.009	0.005	0.024
Asp	0.022	0.012	0.038
Gln	0.010	0.007	0.021
Glu	0.018	0.014	0.016



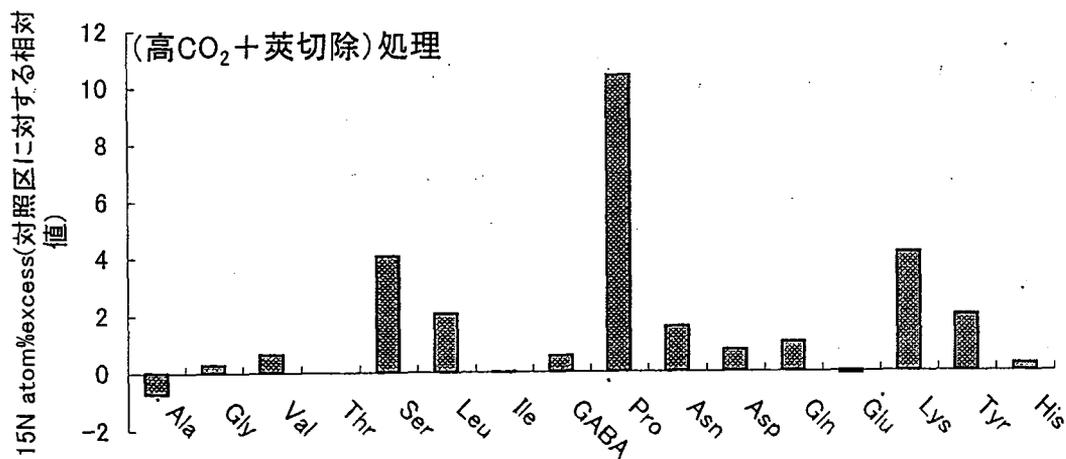
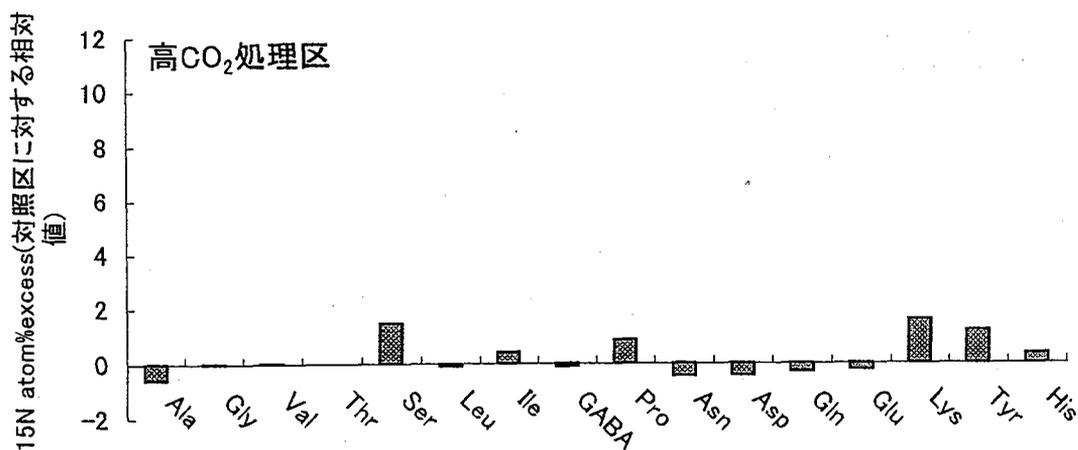
第31図 茎における各アミノ酸の<sup>15</sup>N atom% excess(対照区)



第32図 高CO<sub>2</sub>及び葉切除処理が茎における各アミノ酸の<sup>15</sup>N atom% excessに与える影響



第33図 葉柄の各アミノ酸における<sup>15</sup>N atom% excess(対照区)



第34図 高CO<sub>2</sub>及び葉切除処理が葉柄における各アミノ酸の<sup>15</sup>N atom% excessに与える影響

## 考察

### I : はじめに

ダイズは葉茎の生長だけでなく、子実生産にも多量の窒素集積を必要とする点で特徴的であり、他のマメ科穀実作物とは異なっている。このことは、本実験からも容易に見ることができる。一般にダイズ子実の組成はタンパク質及び炭水化物が 40%、脂質が 20%である。それ故、ダイズ子実は光合成産物のみでなく窒素化合物に対しても重要なシンクとして働くと推測される。さて、光合成産物は葉の葉肉細胞のクロロプラスト内で光合成によって合成される。その後、伴細胞へローディングされ、師管を通じてシンク細胞へ到達すると、そのアミロプラストなどへ貯蔵される<sup>9)</sup>。一方、窒素化合物も葉の葉肉細胞で  $\text{NO}_3^-$  から  $\text{NO}_2^-$ 、さらにクロロプラスト内で  $\text{NH}_4^+$ 、グルタミンへ取り込まれ、最終的にはアスパラギン、アスパラギン酸、グルタミンなどの主要な転流形態として光合成産物と同様に伴細胞、師管を経てシンク細胞へ転流し、プロテインボディに集積する。

そこで本研究では、ダイズの葉で生成された光合成産物や窒素化合物のシンク器官への転流の支配要因について解析することとする。

## II : 莢切除及び高 CO<sub>2</sub> 処理が光合成産物、窒素化合物の転流に与える影響

莢切除処理により、全乾物重に対する影響は見られなかった(第 1 図)。各器官について見ると、葉、茎、根すべての栄養器官において乾物重は増加した(第 2 図)。この結果より、子実肥大期のダイズにおいて莢切除処理を行なうと、栄養器官がこれを代替しシンク能を発揮すると考えられる。一方、全乾物重は高 CO<sub>2</sub> 処理によって増加し(第 18 図)、このことは高 CO<sub>2</sub> 処理によって乾物生産が増すという報告と一致している<sup>10)</sup>。また、器官中では、莢重が最も増加し(第 19 図)、このことは高 CO<sub>2</sub> 下で莢のシンク能が上昇することを示している。同様の結果は延安ら<sup>11)</sup>及び金本ら<sup>12)</sup>の実験でも得られている。即ち、高 CO<sub>2</sub> 処理により光合成能を高めると、光合成産物の主要な受け皿である莢でのシンク能が増大すると推測される。

<sup>13</sup>C 転流率は、莢切除によって著しく減少した(第 5 図)。これは、莢切除によるシンク不足の為と考えられる。一方、高 CO<sub>2</sub> 処理により、<sup>13</sup>C 転流率は同化 72 時間後に減少しており(第 22 図)、これまでの報告と一致する<sup>4, 13)</sup>。しかし、同化 12 時間後の転流率は、高 CO<sub>2</sub> 処理によって上昇した(第 22 図)。これは、高 CO<sub>2</sub> 処理による転流率の低下が、<sup>13</sup>CO<sub>2</sub> 同化 12 時間以降に見られる事を示唆している。<sup>13</sup>C の転流はほぼ 24 時間で完了する<sup>14)</sup>ことを考慮すると、高 CO<sub>2</sub> 処理により、夜間の転流率が低下すると考えられる。これらの結果は、昼間の転流率が高 CO<sub>2</sub> 処理による影響を受けなかったという金本ら<sup>12)</sup>の結果と一致する。即ち、本研究の結果は、昼間の転流率の支配要因はシンク要求強度自体であるのに対し、夜間の転流率はソース・シンク比により影響を受けるとの考え<sup>12)</sup>を支持している。

同化 72 時間後の <sup>13</sup>C 分配率をみると、高 CO<sub>2</sub> 処理によりユニット内の

莢への分配率が増加した(第 23 図)。これは、高  $\text{CO}_2$  処理によりソース能が高められた結果、個々のソース・シンク単位内での転流が強化されたためと考えられる。莢切除処理によって同化 12 時間後の分配率は茎、葉柄で上昇し、同化 72 時間後においても同様の傾向がみられた(第 6 図)。これは、莢切除によって茎、葉柄が代替としてシンク能を発揮したことを示す。

茎のデンプン濃度をみると、莢切除処理及び(高  $\text{CO}_2$ +莢切除)処理によって上昇した(第 4、21 図)。この結果も茎、葉柄がシンク能を発揮したことを示唆している。茎の糖濃度は、莢切除処理区では処理後 17 日目も約 5%と高い値を示した。一方、(高  $\text{CO}_2$ +莢切除)処理区では処理後 17 日目には約 3.5%になり、10 日目以降糖濃度が低下した(第 3、20 図)。莢切除区では処理後 10 日目以降も乾物重が増加したが、この増加は(高  $\text{CO}_2$ +莢切除)処理区では見られなかった(第 2、19 図)。即ち、大気及び高  $\text{CO}_2$  濃度下では、莢切除処理への反応が違うことを示唆する。大気下では莢切除処理により、茎が代替のシンク能を発揮するが、茎のシンク能には限界があると考えられる。一方、(高  $\text{CO}_2$ +莢切除)処理区では高  $\text{CO}_2$  処理によってソース能が高まり、より多く茎へ光合成産物が貯蔵される。

しかし、処理後 10 日目に茎のシンク能は限界となり乾物重及び糖濃度は低下する。一方、大気下では、ソース能が低い為処理 10 日目以降も茎はシンク能を発揮しつづけたと推測される。

$^{15}\text{N}$  転流率については、対照区に比べて高  $\text{CO}_2$  処理及び莢切除処理によって低下した。 $^{15}\text{N}$  転流率の低下度合いは  $^{13}\text{C}$  転流率の低下にくらべて著しく大きい(第 5、7、22、24 図)。これは、高  $\text{CO}_2$  処理によって莢の光合成産物に対するシンク能は増大するが、窒素化合物に対するシンク能はそれほど増加しないためであると推測される。 $^{15}\text{N}$  分配率は、対照区では  $^{13}\text{C}$  の分配とほぼ同様だったが、高  $\text{CO}_2$  処理によって莢への分配率が高くなった(第 8 図)。子実肥大期のダイズにおいて、窒素化合物の主なシンク

は莢である。莢切除処理によって茎、葉柄への分配率が上昇し、その傾向は(高 CO<sub>2</sub>+莢切除)処理によって促進された(第 8、25 図)。この結果により、窒素化合物の転流についても茎、葉柄が代替のシンク能を果たすことが示唆される。

茎および葉柄のアミノ酸濃度をみると、全アミノ酸濃度は茎、葉柄ともに高 CO<sub>2</sub> 処理による変化は見られなかったが、莢切除処理によって上昇し、(高 CO<sub>2</sub>+莢切除)処理で最も高い値になった(第 9、26 図)。このように、全アミノ酸濃度は高 CO<sub>2</sub> 処理による影響は受けないが、莢切除による影響は受けることが示された。茎はアスパラギンが最も多く、次いで GABA、トレオニン、イソロイシンが多く(第 10 図)、Ohyama<sup>15)</sup>によるとダイズ茎のアミノ酸濃度はアスパラギンが約 40%と最も多く、次いで GABA、アルギニンが多く、本実験の結果とほぼ一致した。高 CO<sub>2</sub> 処理によって茎、葉柄ともに各アミノ酸濃度は対照区と差がなかった(第 28、29 図)。即ち、高 CO<sub>2</sub> 処理によって、アミノ酸の組成は変化せずに、転流率のみが低下することが示された。一方、莢切除処理及び(高 CO<sub>2</sub>+莢切除)処理によって、茎の各アミノ酸濃度はアスパラギン、アスパラギン酸、プロリン、グルタミン、グルタミン酸、グリシンが主に増加しており、葉柄についてはアスパラギンとプロリンの増加が著しかった(第 11、13、28、30 図)。アスパラギンはマメ科植物の窒素転流において主な役割を果たし<sup>16)</sup>、その他、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸も窒素転流の形態であることから、莢切除処理によって、茎及び葉柄では主に転流形態のアミノ酸が増加したことが分かった。

茎及び葉柄における <sup>15</sup>N atom%excess では、莢切除処理によってセリン、イソロイシン、GABA、プロリンが特に高かった(第 15、17 図)。(高 CO<sub>2</sub>+莢切除)処理区においても莢切除区とほぼ同様だったが、プロリン、セリンが著しく高くなった(第 32、34 図)。各アミノ酸濃度では転流形態が多かったが、<sup>15</sup>N atom%excess では転流形態のアミノ酸よりも他のア

ミノ酸の方が高い値を示した。これは、葉から取り込まれた  $^{15}\text{N}$  が二次転流として茎、葉柄へ転流したが、茎、葉柄においてその他のアミノ酸に代謝されたことを示唆する。

また、莢切除区及び（高  $\text{CO}_2$  + 莢切除）処理区において各アミノ酸の  $^{15}\text{N}$  atom%excess はプロリンの値が著しく高かった。プロリンは一般的に植物が水ストレスなどのストレスを受けた時に濃度が上昇すると言われている。植物はストレスを受けた際、生理作用を営む妨げにならないような K、ショ糖、アミノ酸（プロリン、ベタイン）の濃度を高めて浸透圧を作り出し<sup>17)</sup>、ストレスに対応していると言われている。本研究結果では、対照区及び高  $\text{CO}_2$  処理区においてはプロリンの濃度及び  $^{15}\text{N}$  atom%excess は低い値を示したのに対して莢切除処理によって著しく増加した。即ち、人為的な水ストレスなどのストレスがかかっていたとは考えにくい。従って、高  $\text{CO}_2$  処理では起こりにくい、莢切除処理によって起こり得るストレスを受けていた可能性もある。

### Ⅲ：莢切除及び高 CO<sub>2</sub> 処理が光合成産物、窒素化合物の転流に与える

#### 影響の比較

本研究では、莢切除によって光合成産物、窒素化合物とも葉からの転流が阻害された。これらの実験結果は、莢のシンク能によって光合成産物の転流が支配されるというこれまでの報告<sup>2)</sup>を支持している。これに加えて、窒素化合物の葉からの転流も、莢のシンク能に支配されることを初めて明確に示している。

しかしながら、光合成産物と窒素化合物の転流に対するシンク能の影響は必ずしも一致しない。例えば、転流率をみると、対照区では光合成産物と窒素化合物で大差が認められない。しかし、莢切除によって光合成産物よりも窒素化合物の転流率の方がより大きく低下した(第5、7図)。この差異をもたらす要因はどのようなものであろうか。これと関連した要因をみると、(1) 莢内の子実の組成では、光合成産物が約60%、タンパク質が約40%と光合成産物のシンクの方がやや大きい。(2) タンパク質にもかなりの炭素が含まれていることを考慮すると、炭素と窒素の元素ベースでは子実のシンク能は炭素の方が窒素よりもさらに大きいと推定される。

このような推定値に基づくと、莢の炭素シンク能が窒素のそれより大きい。それにも関わらず、莢切除による転流率の低下は炭素よりも窒素の方が著しい。このことから、莢のシンク能だけでは莢切除下の転流率の変動は理解しえないと考えられる。

そこで、莢切除下の転流率について莢以外の器官の機能を考察してみ

た。莢切除下では  $^{13}\text{C}$  分配率は葉茎と根とが同程度に上昇した(第 6 図)。このことは、これまでの報告<sup>18, 19)</sup>と一致しており、莢が切除されると莢のシンク能を残った栄養器官が代替し、補償することを示している。一方、 $^{15}\text{N}$  分配状態をみると、根、葉柄、茎で上昇し、特に根への分配が 60% 以上と他の器官より高かった(第 8 図)。このように、炭素と窒素とでは転流される器官が異なっており、そのため、 $^{15}\text{N}$  の方が  $^{13}\text{C}$  よりも根への分配が高いと考えられる。このことから、少なくとも子実肥大期においては栄養器官のシンク能は炭素の方が窒素よりも高いと推測される。この時期には栄養器官が成熟し、条件しだいではこの器官内のタンパク質を分解して子実へ再転流することも起こる。それ故、栄養器官が積極的に窒素化合物を受け入れる可能性は低いと推測される。事実、 $^{15}\text{N}$  トレーサー実験やアミノ酸濃度の結果より莢切除処理下で葉柄や茎で転流中のアミノ酸が代謝、利用される可能性は低いと判断される。

莢切除下で  $^{15}\text{N}$  の根への分配率が上昇したことは、葉で合成されたアミノ酸類が条件しだいでは多少根へ転流することを示している。葉で合成されたアミノ酸類が根や根粒へ転流しそのタンパク合成に利用されることは良く知られている<sup>20)</sup>。

高  $\text{CO}_2$  濃度が炭素と窒素の転流に対してどのような影響を与えるかについて考察してみた。高  $\text{CO}_2$  処理が  $^{13}\text{C}$  転流率に対する影響は認められなかったが、 $^{15}\text{N}$  転流率は低下した。この違いはどのような要因によるものであろうか。高  $\text{CO}_2$  下では光合成の上昇によってソース能は高まるが、それに見合うシンク能の上昇を示さないため、光合成の転流率が低下することが報告されている<sup>21)</sup>。このため、シンク能が高い二十日ダイコンなどでは高  $\text{CO}_2$  にもただちに応答し、高生長速度を示すという報告もある<sup>22)</sup>。即ち、シンク能がソース能の上昇に対応して拡大しないことが高  $\text{CO}_2$  下での光合成の低下いわゆる“ダウンレギュレーション”の原因の一つだと考えられている。この意味で、本研究の炭素の動態については高  $\text{CO}_2$

の影響が見られず、光合成のダウンレギュレーションの起こった可能性は小さいと推測される。

炭素と窒素の転流に対する高  $\text{CO}_2$  処理の影響と分配先の器官との関連はどのようになるであろうか考察してみた。対照区ではユニット内の莢のみでなく、他の莢へも  $^{15}\text{N}$  分配が多かったのに対して、高  $\text{CO}_2$  処理区ではユニット内の莢への  $^{15}\text{N}$  分配が高まる傾向がみられた(第 25 図)。これらの結果から、分配先の器官のシンク能によって  $^{15}\text{N}$  の転流に対する高  $\text{CO}_2$  の影響が変動するとは考えられない。高  $\text{CO}_2$  による光合成能の上昇に伴い、葉の糖やデンプン濃度が高まるため、葉で吸収した  $^{15}\text{N}$  は葉自体での代謝が盛んになり、葉に留まるため転流率が低下した可能性がある。このことは将来さらに解析を深める必要があるだろう。

以上の考察により、莢切除処理によってシンク能を低下させた場合、高  $\text{CO}_2$  処理によって炭素のソース・シンク比を変えた場合、いずれも葉からの光合成産物及び窒素化合物の転流はシンク能によって支配されると考えられる。

## 第 5 章

### 要約

## [背景・目的]

### 実験 1 : 莢切除処理が $^{13}\text{C}$ ・ $^{15}\text{N}$ の転流・分配に与える影響

#### [材料と方法]

ダイズ（品種：グリーンフォーマー）をポットで土耕栽培し、播種後 7 日目の子実肥大期に莢切除処理を開始した。処理開始から 7 及び 14 日後に $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 同化実験を行なった。葉から $^{13}\text{C O}_2$ 及び $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ (99.4 atom%)をそれぞれ 1 時間ずつ吸収同化させ、同化 12、72 時間後に植物体を採取した。採取した全ての植物体について乾物重を、処理後 10、17 日目に採取した個体について茎の糖及びデンプン濃度を測定した。処理後 17 日目に採取した個体について茎及び葉柄のアミノ酸濃度はガスクロマトグラフィー、各アミノ酸における $^{15}\text{N}$ 存在率はガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)により測定した。採取したすべての個体について $^{13}\text{C}$ 存在率を、処理後 17 日目に採取した個体について $^{15}\text{N}$ 存在率を質量分析計(DELTA plus、フィニガン社製)で測定し光合成産物及び窒素化合物の転流状態を調査した。

#### [結果及び考察]

全乾物重は莢切除処理による影響がみられなかった。即ち、莢以外の器官、特に茎、葉柄が増加した。茎の糖およびデンプン濃度も莢切除によって上昇した。これらの結果より、莢切除により茎、葉柄がシンク能を発揮したと考えられる。 $^{13}\text{C}$ および $^{15}\text{N}$ 転流率は莢切除によって低下した。これは、莢切除によるシンク不足が原因だと考えられる。全アミノ酸濃度は、莢切除によって上昇し、特に転流形態であるアスパラギン、アスパラギン酸濃度などが増えていた。

## 実験 2 : 高 CO<sub>2</sub> 濃度処理及び莢切除処理が <sup>13</sup>C・<sup>15</sup>N の転流・分配に 与える影響

### [材料と方法]

ダイズ（品種：グリーンフォーマー）をポットで土耕栽培し、播種後 7 1 日目の子実肥大期に高 CO<sub>2</sub> 処理(100 PaCO<sub>2</sub>)及び（高 CO<sub>2</sub>+ 莢切除）処理を開始した。処理開始から 7 及び 1 4 日後に <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N 同化実験を行った。 <sup>13</sup>C、<sup>15</sup>N 同化方法及び採取日、測定項目は実験 1 と同様に行なった。

### [結果及び考察]

全乾物重は高 CO<sub>2</sub> 処理及び（高 CO<sub>2</sub>+ 莢切除）処理によって著しく増加した。高 CO<sub>2</sub> 処理によって莢重が最も増加し、（高 CO<sub>2</sub>+ 莢切除）処理によっては特に葉、茎・葉柄での乾物重が増加した。茎の、デンプン濃度は、高 CO<sub>2</sub> 及び（高 CO<sub>2</sub>+ 莢切除）処理によって上昇した。茎の糖 <sup>13</sup>C 及び <sup>15</sup>N 転流率は、高 CO<sub>2</sub> 処理によって低下したが、<sup>15</sup>N 転流率の方が <sup>13</sup>C 転流率に比べて低下の度合いは大きかった。高 CO<sub>2</sub> 処理への反応の大きさは光合成産物と窒素化合物とでは違うことが推測される。茎、葉柄におけるアミノ酸濃度及びアミノ酸組成に対する高 CO<sub>2</sub> 処理による変化は見られなかった。高 CO<sub>2</sub> 処理によって、アミノ酸組成は変化させずに転流率のみを低下させることが示された。（高 CO<sub>2</sub>+ 莢切除）処理によってアスパラギンなどの転流形態やプロリンが増加した。一方、<sup>15</sup>N atom%excess は転流形態のアミノ酸よりも GABA やセリンなどのアミノ酸で高かった。即ち、茎及び葉柄における窒素化合物は転流形態としての物質が多いが、転流形態として留まるのではなく、茎及び葉柄において代謝されていることが示された。これは、茎及び葉柄が窒素化合物に対してシンク能を発揮したことを示唆する。

## [結論]

子実肥大期のダイズにおいて、莢切除処理を行なうと茎、葉柄が光合成産物及び窒素化合物に対してのシンク能を発揮する。しかし、シンク能としての機能は十分でない為に転流率は低下する。

高 CO<sub>2</sub> 処理によって光合成産物及び窒素化合物の転流率は低下し、低下の度合いは窒素化合物の方が大きい。高 CO<sub>2</sub> 処理によって光合成産物に対する莢のシンク能はかなり増大するが、窒素化合物としてのシンク能はそれほど増加しない。高 CO<sub>2</sub> 処理によってアミノ酸濃度、アミノ酸組成は変化せずに窒素化合物の転流率のみを低下させる。

莢切除処理によってシンク能を低下させた場合、高 CO<sub>2</sub> 処理によって炭素のソース・シンク比を変えた場合では、いずれも葉からの光合成産物及び窒素化合物の転流はシンク能によって支配される。この程度は光合成産物の方が大きい。