

水稻の高温稔実障害に関する研究

第6報 登熟期の高温が穎果の酵素活性に及ぼす影響*

稲 葉 健 五・佐 藤 庚

(東北大学農学部)

前報¹⁾において、高温(昼一夜温、35—30°C)による稔実期間の短縮には、呼吸の昂進による炭水化物絶対量の不足のほかに、籾の受入れ能力の減退が大きく関与していることを明らかにした。

本報においては、炭水化物受入れ能力の早期減退を、主に穎果の酵素活性の面から検討した。

実験材料および方法

第1実験

1973, 74 両年度、播種期を異にして前報¹⁰⁾と同様に戸外でポット栽培した水稻農林 17 号を、それぞれ出穂期に達した時に、生育の揃った茎を選び、その穂の上半分に開花した強勢穎果に墨で印をつけ、2日後に 12 ポットを昼一夜温、35—30°C (高温区) のキャビネットに、12 ポットをそのまま戸外(戸外区)に置いて稔実させた。高温区で稔実が停止すると考えられる開花後2週間前後を中心に7回、選定した茎の基部から刈取り、穂を1—4°Cの低温室に搬入し、直ちに、墨印をつけた籾の内外穎を取り除いて穎果を取り出し、Wiskich らの方法¹³⁾に従って、毎回 5g の穎果からミトコンドリア液を調製した。この調製液を用いて、Maley らの方法⁵⁾に従い、30°C の恒温条件下でワールブルグ検圧計を用いて 25 分間、酸素吸収と磷酸化反応を同時に測定した。同時に完全な形での穎果の呼吸をワールブルグ検圧計を用いて測定した。また近藤らの方法³⁾に従って Peroxydase 活性をも測定した。

以上の酵素活性のほかに、籾と茎葉の水分含有率、茎葉の澱粉の多少を同一材料について測定した。茎葉の澱粉の多少は、葉鞘をつけたまま、稈を縦に2分して、2% I-IK 液につけ、ヨード反応による相対的な値で求めた。

第2実験

1973 年度、第1実験と全く同様の栽培法で、同様にサンプルした材料について実験した。

Phosphorylase 活性は、サンプル後、-25°C の氷室に保存した穎果を用い、中村⁸⁾の方法に従って測定した。Peroxydase, Peptidase, Lipase, Succinic dehydrogenase については、組織化学的測定を行ったが、全て新鮮材料を用いて、凍結切片、徒手切片あるいは凍結真空パラフィン切片を作製し、Peroxydase は Straus¹²⁾の方法、Peptidase は Burstone ら¹⁾の方法、Lipase は Gomori¹²⁾の方法、Succinic dehydrogenase は Nachals ら⁷⁾の方法に従ったが、pH, 反応温度、時間に多少の変更を加えた。

一方、同一の材料について、全炭水化物、窒素を前報¹⁰⁾と同様に測定した。

実験結果

第1実験

籾および葉身の水分含有率の推移を fig. 1 に示した。籾の水分含有率は、両区とも最初 60 数% あつたものが、稔実が進むにつれて急減し、3週間後には両区とも 27~28% に低下した。全期間を通じて高温区は、戸外区より低く経過し、稔実前期においては3~

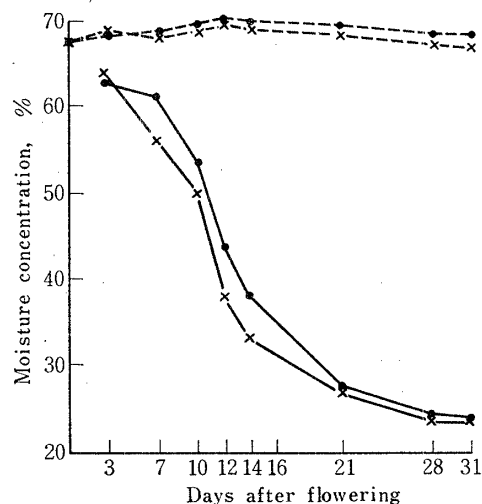


Fig. 1. Changes of moisture concentration in grain and flag-leaf during ripening (1972)

• Outdoor Flag-leaf
× 35—30°C — Grains

* 昭和 50 年 8 月 4 日受理

(大要は) 第159回講演会(50年4月)において発表

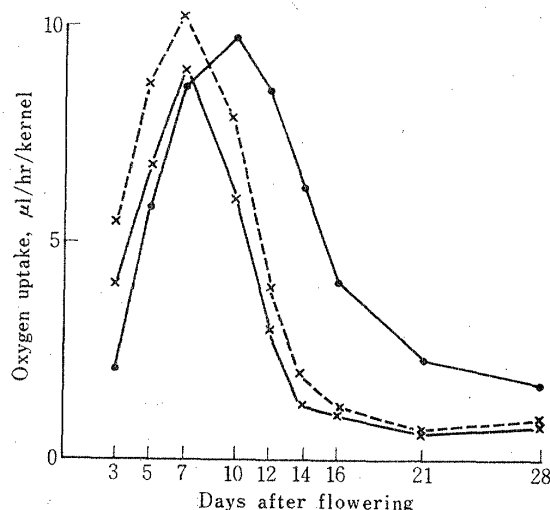


Fig. 2. Changes of respiration rate per kernel during ripening period.

• Outdoor, × 35—30°C, — Measured at 30°C Measured at 35°C

4%低かった。止葉葉身では、全期間を通じ変化少なく、67%前後であつたが、稔実中期から、高温区は戸外区より低くなつた。

穎果の呼吸 (fig. 2) は、両区とも稔実初期に高く、稔実が進むにつれて急減したが、高温区は、35°Cで測定しても、30°Cで測定しても、高温処理7日目で最大の呼吸を示し、その後急激に低下して2週間目には、ほぼ一定の低い値に達した。戸外区の穎果は、高温区よりややおくれて10~12日目に最大の呼吸速度を示し、その後の呼吸低下も高温区に比べると緩慢であつた。

ミトコンドリアの酸素吸収と ADP/O 比を fig. 3

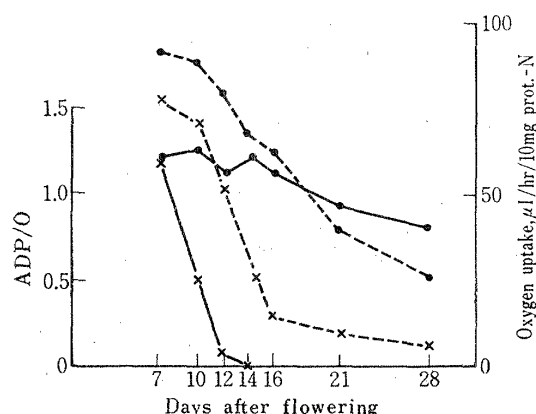


Fig. 3. Effect of high temperature during ripening period on the mitochondrial oxidative phosphorylation of kernels (1973, and '74)

• Outdoor — ADP/O
× 35—30°C O₂-uptake

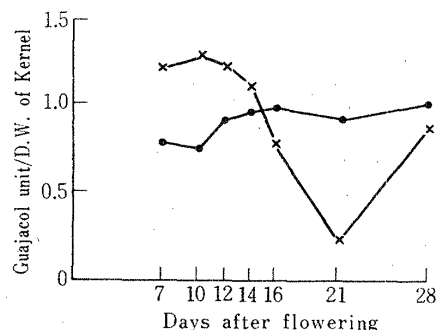


Fig. 4. Effect of high temperature during ripening on the peroxidase activity of kernel (1973)

× 35°C • Outdoor

に示した。ミトコンドリアの酸素吸収は、穎果全体の呼吸とほぼ同傾向を示した。高温区の ADP/O 比は、高温処理7日目以降急減し、12日目にはほとんどゼロになり、酸化的磷酸化反応はほとんど停止したといえる。戸外区の ADP/O 比は稔実が進むにつれて緩慢に低下したが、4週間目においてもなお磷酸化が認められた。

次に Peroxydase 活性を fig. 4 に示した。稔実前期には、高温区は戸外区より高く推移したが、2週間を過ぎるころから急速に低下し、3週間まで最低となり、4週間目には戸外区とほとんど同程度まで回復した。戸外区では、初期に活性が低く、12日目以降はほぼ一定の値で経過した。

以上に供試した材料について、葉鞘と茎の澱粉反応を稔実ステージを追って調査した結果、高温区では高温処理14日に、葉鞘基部をのぞいて、ほぼ澱粉反応が消失した。その後は茎、葉鞘ともほとんど存在が認められず、3~4週間目に至り再び茎および葉鞘の基部に澱粉反応が認められた。戸外区でも高温区と同様の経過をとるが、稔実後期の再度の澱粉蓄積はなかつた。

第2実験

fig. 5 に1穂当りの炭水化物と窒素の含有量の推移を示した。両区とも TAC (全糖+粗澱粉) 量の推移は、前報¹¹⁾の玄米千粒重の推移と同傾向を示した。窒素含有量はほぼ同傾向であつたが、高温区の蛋白態窒素量は、稔実が停止する14日目以前から増加が停止し、以後は80%エタノール可溶の非蛋白態窒素が漸

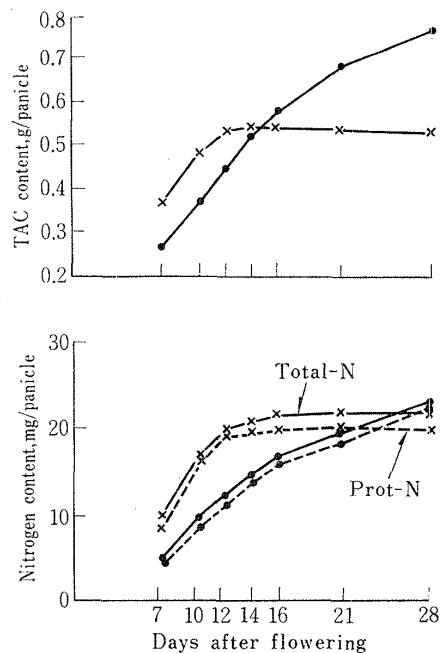


Fig. 5. Changes of TAC and nitrogen content of panicle during ripening period as affected by high temperature

• Outdoor × 35—30°C

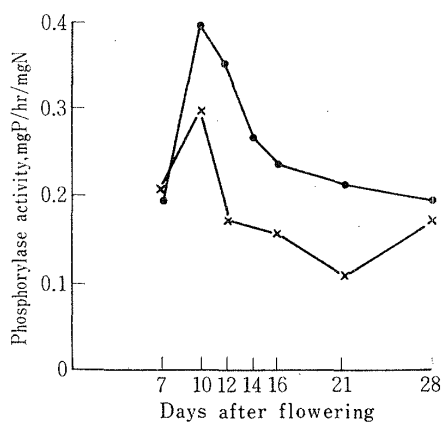


Fig. 6. Changes of phosphorylase activity in kernels (1973)

• Outdoor × 35—30°C

増した。同時期における Phosphorylase 活性 (fig. 6) を見ると、両区とも 10 日目に最高活性を示し、その後次第に低下したが、高温区の方が低下が急で、以後戸外区より常に低く推移した。

一方、組織化学的に穎果の部位別の酵素活性を調べると (table 1), Peroxydase 活性は胚と背軸維管束部、および果皮近くで高く、胚乳にはほとんど認められない。14 日目までは、背軸維管束部の活性は高温区の方が戸外区より高いが、その後、戸外区より低くな

Table 1. Distribution of peroxydase, peptidase and lipase activities in the portions of kernel by histochemical tests (1973)

Peroxydase						
Days	A		B		C	
	35°	OD	35°	OD	35°	OD
7	++	++	+++	+	+	+
10	++	++	+++	++	—	—
12	++	++	+++	++	—	—
14	++	++	+++	++	—	—
16	+	+	++	+	—	—
21	+	+	±	+	—	—
28	+	+	+	+	—	—

Peptidase						
Days	A		B		C	
	35°	OD	35°	OD	35°	OD
7	++	+	—	—	++	+
10	++	++	—	—	++	++
12	++	++	±	±	++	++
14	+	+	±	—	++	+
16	+	+	—	—	±	±
21	—	+	—	—	—	+
28	—	±	—	—	—	±

Lipase						
Days	A		B		C	
	35°	OD	35°	OD	35°	OD
7	+	±	+	±	++	+
10	+	+	+	±	++	+
12	+	+	±	+	++	++
14	+	+	±	+	+	++
16	+	+	—	±	±	±
21	—	±	—	±	—	±
28	—	±	—	—	—	—

A: Embryo B: Dorsal conducting tissues
C: Aleurone layer D: Starchy endosperm
OD: Outdoor

つた。Peptidase 活性は、胚と胚乳外縁部（糊粉層と澱粉貯蔵細胞層の 1~2 層を含む）で高く、Lipase 活性は、胚、背軸維管束、糊粉層に見られ、両酵素とも高温による影響は少ないが、やや高温の方が活性低下が早い傾向があつた。コハク酸脱水素酵素活性 (table 2) は、背軸維管束部と胚において特に活性が高く、高温区では背軸維管束部の活性は高温処理 16 日ではほぼ消失したが、戸外区では 3 週間をすぎても活性を示した。穂の各部についてコハク酸脱水素酵素の分布を調べたところ、一次枝梗、小枝梗、小穂軸の維管束部に強い反応が見られた。各部位とも、その部分の黄化が始まる直前に活性を消失したが、温度処理間

Table 2. Distribution of succinic dehydrogenase activity in the portions of kernels and spikelet by histochemical tests (1973) Means of 25 spikelets.

Days	A		B		C		D		E		F	
	35°	OD	35°	OD	35°	OD	35°	OD	35°	OD	35°	OD
7	卅	卅	卅	卅	+	+	—	±	卅	卅	+	+
10	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	±	卅	卅	+	±
12	卅	卅	卅	卅	+	+	—	—	卅	卅	+	+
14	卅	卅	+	卅	±	±	—	—	卅	卅	±	+
16	+	+	±	+	±	±	—	—	+	卅	±	+
21	+	+	—	+	±	—	—	—	±	+	—	±
28	+	+	—	±	—	—	—	—	—	+	—	—

Symbols (A-D, OD) are the same as in Table 1.

E: Rachilla, F: Pedicel

では高温区が、部位別では小穂軸が早く、温度処理開始後16日目（開花後18日目）では活性を消失した。

考 察

前報¹¹⁾において、高温下における稔実の早期停止が、呼吸の昂進による炭水化物量の不足よりも、穂の炭水化物受入れ能力の早期停止によるところが大きいことを指摘した。穎果の活性は、その呼吸速度で代表されると考えられるが、この呼吸速度が高温下の穎果では、戸外区に比べて早期に急減し、高温処理14日目にはほぼ一定の低い値に達している。冷害をうけて呼吸活性が低下する時や、老化組織における呼吸活性の低下などは、ミトコンドリアの構造破壊に原因する⁹⁾といわれている。本報では、穎果内のミトコンドリアについて実験したが、穎果内には多少のクロロプラストを含む。したがって、ミトコンドリア調製液中に多少のグラナが混入するのをさけることが出来なかつた。ミトコンドリアもクロロプラストも磷酸化を行うが、クロロプラストの光磷酸化反応だけを阻害するアンモニアイオン⁴⁾を反応系に 10^{-2} Mの濃度で加え、磷酸化反応を行なつたが、Fig. 3に示したADP/O比と大差のない値を示した。したがって、Fig. 3に示した磷酸化反応は、ミトコンドリアで行なわれたものと判断した。さて、この穎果のミトコンドリアによる酸素吸収は、穎果全体の呼吸と同様に、高温区では早期に低下しており、さらに酸化的磷酸化反応(ADP/O)は、高温処理10日目（開花受精後12日目）には戸外区に比べて激減し、12日目から14日目にかけて停止している。したがって、冷害を受けた組織や老化組織におけると同様に、高温下の穎果での呼吸の早期低下は、ミトコンドリアの活性低下に関係していると考えられる。

Succinic dehydrogenase はミトコンドリア内膜に強く結び付いているといわれているが⁴⁾、この活性は

胚と背軸通導組織に強く認められた。後者は同化産物を胚乳に導入する部位であるが、ここにはミトコンドリアが多いのかもしれない。高温下でこの部位のSuccinic dehydrogenase 活性が早期に減退したことは、この部位のミトコンドリアの活性が早期に減退したことを暗示する。

Peroxydase や Dehydrogenase も呼吸に関係する酵素であるが、これらも高温区では戸外区に比べると早期に低下している。

炭水化物代謝に関係の深い Phosphorylase 活性は、高温、戸外両区とも10日前後に最大に達し、その後、急減し、常に戸外区の方が活性が高かつた。Peptidase は蛋白質の、Lipase は脂質の代謝に関与する酵素であるが、これらの活性は高温区と戸外区で大差はなく、前者の方が活性消失がやや早い傾向があつたにすぎない。

中山⁹⁾は、小枝梗上位部の維管束の脱水素酵素の作用力低下が穎果の受入れ機能低下以前におこること、籾の黄化は穎果の酵素作用の低下に並行することを指摘している。本実験では、穂の各部の黄化は、肉眼によると、小穂軸で最初に始まり、高温区では戸外区より黄化が早かつた。高温区では、16日目に小穂軸のTTC還元力が急減し、その直後に黄化が認められた。すなわち、玄米の酵素活性が低下した直後に小穂軸の活性が低下するように見え、この点中山の報告⁹⁾と異なっている。

以上から、高温下における穎果の炭水化物受入れ能力の早期減退は、呼吸速度、その内容としてのミトコンドリアの酸素吸収、磷酸化などの早期減退、穎果細胞の全般的な生理的活性の早期低下と密接な関係があるものと推定される。

摘 要

稔実期間の高温による千粒重減少の原因を、籾の炭

水化物受入れ能力の早期減退にあると考え、その内容を明らかにするため、主に穎果内の諸酵素活性の推移を調べた。

1) 穎果の呼吸速度は、高温区、戸外区とも稔実が進むにつれて低下したが、高温区の方が急激で、高温処理 14 日目には、ほぼ最低レベルに達した。ミトコンドリアの酸素吸収も同傾向であり、高温区の ADP/O 比は、14 日目には 0 になつたが、戸外区では最後までかなり高く保たれた。高温区の磷酸化反応が停止する時期には、茎葉にはなお澱粉が存在した。

2) 籾の水分含有率は、両区とも稔実が進むにつれて急減したが、高温区の方が常に低く推移した。止葉葉身の水分含有率は変化が少ないが、高温区の方が低く、稔実が進むにつれて戸外区との差を拡大した。

3) 穎果の炭水化物、窒素含有量は千粒重と同傾向で推移した。高温区の蛋白態窒素量は稔実が停止した 14 日目より以前から増加を停止し、以後は非蛋白態窒素量が漸増した。

4) Phosphorylase 活性は、両温度区とも 10 日目で最大値に達し、その後次第に低下したが、戸外区の方が高く推移した。

5) Peroxydase, Succinic dehydrogenase 活性は、高温区の方が早期に活性を低下した。Peptidase, Lipase 活性もほぼ同傾向であつた。

6) 小穂の黄化は、小穂軸でもつとも早くあらわれ、高温区の方が黄化が早く、高温処理 16 日目には小穂軸の TTC 還元力が消失し、その直後に黄化が認められた。

7) 高温下における籾の炭水化物受入れ能力の早期低下は、穎果細胞の生理的活性の早期低下に密接に関係しているものと推定された。

引用文献

1. BURTON, M.S. and J.E. FOLK 1956. Histochemical demonstration of aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem. 4: 217—223.
2. 古谷雅樹・宮地重遠・玖村敦彦編 1972. 植物生理学講座 (2) 代謝生理. 朝倉書店, 東京.
3. 近藤金助・森田雄平 1951. Phyto-Peroxidase に関する研究. 第 1 報. Phyto-Peroxidase の単離に就て. 京大食研報告 4: 12—15.
4. LEHINGER, A.L. 1971. Biochemistry. Worth Publishers INC., New York.
5. MALEY, G.F. and G.E. PLAUT 1953. Yields of oxidative phosphorylation by heart mitochondria. J. Biol. Chem. 205: 297—310.
6. 松島省三・和田源七 1960. 水稻収量の成立と予察に関する作物学的研究. 第 52 報. 水稻の登熟機構の研究 (10). 日作紀 28: 44—45.
7. NACHLAS, M.M., M.C. TSOU, E.D. SOUZA, C.S. CHENG and A.M. SELIGMAN 1959. Cytochemical demonstration of succinic-dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J. Histochem. Cytochem. 5: 420—436.
8. 中村道徳 1959. 植物の phosphorylase 活性定量法の研究. 農化 33: 388—391.
9. 中山治彦 1969. 水稻における穂の老化現象. 第 1 報. 籾の老化と脱水素酵素作用の減退. 日作紀 38: 338—391.
10. 佐藤 庚・稲葉健五・戸沢正隆 1973. 高温による水稻の稔実障害に関する研究. 第 1 報. 幼穂形成期以降の生育時期別高温処理が稔実に及ぼす影響. 日作紀 42: 207—213.
11. ———— 1976. 水稻の高温稔実障害に関する研究. 第 5 報. 稔実期の高温による籾の炭水化物受入れ能力の早期減退について. 日作紀 52: 156—161.
12. 武内忠男・清水信夫・小川和朗編 1969. 酵素組織化学. 朝倉書店, 東京.
13. WISKICH, J.T. and W.D. BONNER, Jr. 1965. Preparation and properties of sweet potato mitochondria. Plant Physiol. 38: 594—604.

High Temperature Injury of Ripening in Rice Plant

VI. Enzyme activities of kernel as influenced by high temperature

Kengo INABA and Kanoe SATO

(Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai)

Summary

To clarify the cause of early decline of assimilate storing ability of grains by high temperature during ripening period, enzyme activities of kernels which may be concerned with the ability was compared at high and normal temperature with the progress of maturation.

1) Respiration rate of kernels declined with the progress of ripening, more rapidly at high temperature reaching the lowest level at two weeks after anthesis. Oxygen uptake by kernel mitochondria followed a similar pattern as kernel respiration and ADP/O ratio at high temperature reached zero at the 14th day, whereas that at normal temperature remained fairly high until maturity. When ADP/O ratio at high temperature rapidly declined, available starch still remained in the straw although of small amount. Water percentages of kernels rapidly and that of leaf-blade gradually decreased with the progress of ripening, being always lower at high temperature.

2) Carbohydrate and nitrogen contents of kernels paralleled with 1000-kernel weight during ripening at both temperatures, but protein-N at high temperature stopped to increase before the 14th day of treatment and non-protein-N gradually increased thereafter.

3) Phosphorylase activity reached a maximum at the 10th day and then gradually decreased at both temperatures, being lower at high temperature.

4) Yellowing of spikelet was first recognized at rachilla portion and occurred earlier at high temperature. Succinic-dehydrogenase activity at rachilla disappeared at the 16th day and soon yellowing started. Kernel enzyme activities seemed to decline earlier than disappearance of succinic-dehydrogenase activity at rachilla.

5) It was suggested that the early decline of assimilate storing ability of grains at high temperature had a close relation to early decline of physiological activities of kernel cells.