わが国オオムギ品種における硝酸イオン吸収の ミハエリス＝メンテン式による解析*

長谷川 博

(大阪府立大学附属研究所)

1991年8月22日受理

要 旨: わが国で現在栽培されているオオムギ品種のなかから、六条皮麦、六条はだか麦および二条大麦各4品種、計12品種を供試して、水耕栽培を行った播種後7日目の幼植物における硝酸イオン吸収を調査した。25~1000 μM の硝酸カリウム溶液 (いずれの溶液も 500 μM の硫酸カルシウムを含んでいる) からの硝酸イオン吸収量を処理開始2, 4時間後に調査して、吸収速度と培養液中の硝酸イオン濃度との関係をミハエリス＝メンテンの酵素反応式で解析した。供試した品種の中で、25°C におけるミハエリス定数 (K_m) については 50.9~111.7 μM , 最大吸収速度 (V_{max}) については 2.24~4.99 $\mu\text{mol} \cdot \text{g f.w.}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (総生体重) $\cdot \text{h}^{-1}$ の変異の幅が認められた。 K_m と V_{max} の間には有意な正の相関があった。 K_m と V_{max} は温度の低下とともに低くなったが、その低下程度は品種間で異なっており、 K_m についてみると 15°C の値が 25°C の値に比べて 1/2 以下になる品種から低下の認められない品種があった。 V_{max} と幼植物の生体重、根長、第1葉長の間には相関は認められなかった。硝酸イオン吸収速度が植物体の大きさと相関を示さないことは幼植物における硝酸イオン吸収は植物体の生理的要因に依存するところが大きいことを示唆している。

キーワード: オオムギ, 温度, 硝酸イオン吸収, ミハエリス＝メンテンの式, 幼植物。

Michaelis-Menten Kinetics of Nitrate Uptake in Japanese Barley Cultivars: Hiroshi HASEGAWA (*Research Institute for Advanced Science and Technology, University of Osaka Prefecture, Sakai 593, Japan*)

Abstract: Nitrate uptake ability from low-concentration nitrate solution (below 1 mM) was evaluated based on Michaelis-Menten kinetics in 12 Japanese barley cultivars. Two kinetic parameters, K_m and V_{max} , were determined using 7-day-old seedlings that had been cultured with distilled water for 6 days and treated with induction medium (100 μM KNO_3 plus 500 μM CaSO_4) for 24h prior to the experiment. The uptake solution was composed of 25—1000 μM KNO_3 and 500 μM CaSO_4 . At 25°C, K_m and V_{max} in the 12 cultivars used in this experiment ranged from 50.9 to 111.7 μM and from 2.24 to 4.99 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ f.w.} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. K_m obtained in this experiment was roughly coincident with the values demonstrated by earlier studies in some plants including barley. A significantly high correlation ($r=0.896$) was found between K_m and V_{max} . K_m and V_{max} decreased at low temperatures and the extent of the decrease in K_m depended on the cultivars. The ratio of K_m at 15°C to that at 25°C ranged from about 1.00 to less than 0.50. Furthermore, it was observed that V_{max} was not related to such morphological traits as plant fresh weight, first leaf length, and root length.

Key words: Barley, Michaelis-Menten kinetics, Nitrate uptake, Seedling, Temperature.

多くの作物において窒素栄養は硝酸イオンのかたちで根の細胞膜を通して吸収されている。硝酸イオン吸収のメカニズムを解明し、その制御を行うことは、効率的な作物栄養管理および吸収効率の高い作物の育種の基礎として重要である。今日では硝酸イオン吸収は硝酸還元酵素活性とは独立した硝酸代謝系における最初の生化学過程であることが明らかになっている^{5,20,21,22}。硝酸イオン吸収はエネルギー依存性の生化学反応であり、細胞膜に存在するある種のタンパク質をキャリアーとして行われていると推測されている^{6,9}。硝酸イオン吸収にタンパク質が関与していることを示す重要な証拠のひとつが基質としての硝酸イオン濃度と吸収速度との関係がミハエ

リス＝メンテンの酵素反応式で解析されることである⁹。同式の定数 K_m (ミハエリス定数) および V_{max} (最大吸収速度) は作物の根の細胞膜の硝酸イオン吸収能力を直接に表現しており、これらをパラメーターとして作物の硝酸代謝能を評価することができる。ことに K_m はキャリアーの親和力を表しており、硝酸イオン吸収の遺伝子支配を知る上で重要である。

現在、硝酸イオン吸収のメカニズム解明はキャリアーの探索の段階である。ラン藻の一種では吸収に関与するタンパク質が同定されている¹⁴が、高等植物では未発見である。キャリアーの同定のために吸収欠失突然変異体を利用することが有効と考えられ、この選抜実験がオオムギ^{5,19}、イネ⁷で試みられている。一方、 K_m の決定とそれに及ぼす変動要因

* 本研究の一部に文部省科研費 (No. 03660007) の補助を受けた。

の解析を行うことも吸収メカニズムを解明するために意義あるものと考えられる。

しかしながら、作物の根における硝酸イオン吸収に関するミハエリス=メンテン定数についてはオオムギ^{13,16)}やトウモロコシ¹⁵⁾などで数例が報告されているのみであって、吸収能の種間、品種間差異や吸収能に及ぼす要因の解析を行うまでに至っていない。そこで、本実験では硝酸イオン吸収能の基礎資料を得ることを目的として、わが国で栽培されているオオムギを材料として水耕栽培を行った幼植物における硝酸イオン吸収を測定し、ミハエリス=メンテンの式の定数を求めた。さらに同定数に関する品種間差異の有無とそれらに及ぼす温度、植物体の大きさの影響について考察を加えた。

材料と方法

1. 実験材料と幼植物の栽培

現在わが国で栽培されているオオムギ品種のなかから六条皮麦4品種、ミユキオオムギ(宮城)、宮城12号(宮城)、栃木関取1号(栃木)、早生坊主(岡山)、六条はだか麦4品種、四石麦(奈良)、赤神力(鳥取)、キカイハダカ(岡山)、御島稈(長崎)、および二条オオムギ4品種、あまぎ2条(栃木)、ミサトゴールデン(栃木)、さつき2条(徳島)、成城17号(長崎)、計12品種を材料として選定した。各品種とも括弧内に示した県の農業試験場より1989年に収穫された種子の分譲を受け、材料に供した。

各品種の種子を種子消毒のため10%過酸化水素水で15分間浸漬処理した後、濾紙上に播種した。幼植物の栽培は、ポリエチレン製ネットのフロートを作り、そのフロート上に発芽した種子を置いた。プラスチックバットに蒸留水を満たしてエアレーションを行い、水面にフロートを浮かべた。種子の催芽、幼植物の栽培とも自然光に蛍光灯の補光のある人工気象室(25±1°C, 16時間日長)にて行った。

2. 硝酸イオン吸収の測定方法

播種後7日目における硝酸イオン吸収を調査した。吸収実験開始24時間前より幼植物を100 μM硝酸カリウムと500 μM硫酸カルシウムの溶液(吸収誘導溶液)の入ったバットへ移した。これは硝酸イオン吸収は硝酸により誘導される^{10,11)}ことを考慮したためである。吸収測定を開始する直前に各種子の胚乳を除去した。各品種の生育のよい幼植物を3~8個体ずつ50 mlの測定溶液の入ったビーカーに入れて、処理開始後2および4時間目に測定溶液

を8 mlずつサンプリングした。吸収測定溶液へのエアレーションは行わなかった。測定溶液として25, 50, 100, 250, 500および1000 μMの6段階の硝酸カリウムの濃度区を設定した。なおいずれの処理溶液も500 μMの硫酸カルシウムを含んでいる。吸収誘導溶液処理は幼植物の栽培と同条件の人工気象室内で行ったが、吸収測定はバイオトロン(日本医化器, LH 200 RD)内において行った。15°Cと25°Cの2温度区を設定し、各処理区2回反復とした。

溶液中の硝酸イオン濃度をアニオン分離カラム(IonPac AS 4 A, Dionex, USA)を装着したイオンクロマトグラフィー(2000 i, Dionex, USA)で測定し、硝酸イオンの減少量をもって吸収量とした。総生体重あたりの吸収速度(μmol・g 総生体重(f.w.)⁻¹・h⁻¹)を求め、それと初期硝酸イオン濃度との関係をミハエリス=メンテンの式、

$$v/V_{\max} = [S]/([S] + K_m)$$

により解析した。ここでvは吸収速度、[S]は溶液濃度であり、測定データよりV_{max}とK_mの値を求めた。V_{max}は最大吸収速度を表し、ミハエリス定数K_mはV_{max}に達する濃度の半分の濃度であり、吸収キャリアーの親和力を表している。なお2時間後の溶液の硝酸濃度も初期濃度として取り扱い、吸収速度は処理開始後0~2, 2~4時間目についての1時間ごとの平均として求めた。

吸収測定のサンプリングの終了後各品種より15個体を選んで個体ごとの生体重、第1葉長および最長根の長さを測定した。

結 果

供試した各品種の幼植物を24時間吸収誘導溶液にて前処理した後、25~1000 μMの硝酸イオンを含む測定溶液に移したところ、各処理区の植物体は処理開始時より硝酸イオンを吸収することが認められた。第1表は初期硝酸イオン濃度が100 μM区と1000 μM区の処理開始後2時間における各品種の硝酸イオン吸収速度を示している。100 μM区における吸収速度は1.09~3.42 μmol・g f.w.⁻¹・h⁻¹であり、1000 μM区においては1.77~5.14 μmol・g f.w.⁻¹・h⁻¹であった。吸収速度は溶液中の硝酸イオン濃度が大きくなれば大きくなり、吸収速度に関して供試品種のなかで100 μM区では3.1倍、1000 μM区では2.9倍の変異が認められた。100 μM区から1000 μM区の吸収速度の増加率にも品種間で差異があった。赤神力とミサトゴールデンでは両区間で

Fig. 1. Nitrate uptake ability in relation to the nitrate concentration in Seijo 17 at 25°C. Curved line shows the simulation by Michaelis-Menten equation using experimental values (open circles).

大きな差異が認められなかったが、あまぎ 2 条では吸収速度が 3 倍に上昇した。

第 1 図は品種「成城 17 号」について 25°C における硝酸イオンの初期濃度と吸収速度の関係を表したものである。白丸は測定値を表し、曲線は測定値をミハエリス＝メンテンの式で解析して得られたシミュレーションにより与えられたものである。第 2 表は供試した 12 品種について K_m , V_{max} および測定値と得られたシミュレーションとの相関係数 (r) を示したものである。ミュキオオムギと成城 17 号の 15°C 区を除いていずれの処理区においても測定値と推定値の間に有意な相関関係が認められ、硝酸イオン吸収に関してミハエリス＝メンテンの式が成立することが明らかになった。

ミハエリス＝メンテン式の定数 K_m と V_{max} は品種の違いおよび測定温度の差異により異なっていた。25°C における硝酸イオン吸収についてみると、供試した 12 品種において K_m に関して 50.9~111.7 μM , V_{max} に関しては 2.24~4.99 $\mu\text{mol}\cdot\text{g f.w.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ という約 2 倍の差異が認められた。 K_m が高い品種では V_{max} の値も大きく、両パラメーター間には 1%水準で有意な正の相関 ($r=0.896$) が認められた (第 2 図)。六条小麦品種と六条はだか麦品種群内においては K_m の変異の幅はほぼ 12 品種全体の場合と同様で約 2 倍を示したが、二条オオムギ品種の K_m は 50.9~71.1 と変異の幅が狭く、しかも低い値に偏っていた。

Fig. 2. Relationship between K_m and V_{max} for the nitrate uptake by 7 day-old seedlings of 12 barley cultivars at 25°C.

K_m と V_{max} は低温では共に小さくなる傾向が認められた。15°C において供試した 12 品種の K_m は 15.4~96.5 μM , V_{max} は 1.09~3.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{g f.w.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ であった。15°C においては 25°C の場合と比べて両パラメーターの最大値と最小値の比が大きくなっているが、これは温度低下による K_m と V_{max} の減少率に関する品種間差異が存在しているためである。 K_m に関してみると、25°C に対する 15°C における低下程度は、赤神力とさつき 2 条のように低下が認められない品種から、成城 17 号とあまぎ 2 条のように 25°C に対する 15°C の比が 0.5 以下となる品種があった。 V_{max} は K_m よりも温度の影響を受けやすく、赤神力とさつき 2 条においてもわずかな低下が認められた。

硝酸イオン吸収速度が植物体の大きさに依存しているかどうかを検討するために、25°C における V_{max} と播種後 7 日目のよく生育した個体の総生体重、第 1 葉の長さおよび最長根の長さとの関係を調べた。第 3 図 A に示したように総生体重と V_{max} の間には弱い負の相関 ($r=-0.569$) が認められたが有意ではなかった。第 1 葉の長さと V_{max} の関係は葉長大で低 V_{max} を示す 5 品種 (二条オオムギ品種とミュキオオムギ) と葉長小で高 V_{max} を示す 7 品種の 2 群に分かれた (第 3 図 B)。それぞれの群についての相関係数を求めたが、両群とも第一葉の長さと V_{max} の間に有意な相関は認められなかった。葉長小の品種は渦遺伝子の効果であると考えられる。最長根の長さと V_{max} の間には相関関係は認められなかった (第 3 図 C)。

考 察

高等植物の根における各種のイオン吸収に関して吸収速度とイオン濃度の関係がミハエリス=メンテンの酵素反応式で解析可能なことが示されている⁴⁾。このことは硝酸イオン吸収についても成立することがいくつかの植物の幼植物について確かめられている。本実験の結果は1 mM以下の低濃度においては硝酸イオン吸収についてミハエリス=メンテ

Table 1 Nitrate uptake ability ($\mu\text{mol}\cdot\text{g f. w.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) from 100 and 1,000 μM nitrate solution in the seedlings of 12 barley cultivars. Seedling culture and uptake measurement were carried out at 25°C. Average of two replications.

Cultivar	Nitrate concentration (μM)	
	100	1,000
Miyuki Omugi	1.09	2.38
Miyagi 12	2.88	5.14
Tochigi Sekitori 1	2.07	3.24
Wase Bozu	3.42	4.49
Shikokumugi	2.72	4.88
Akashinriki	2.41	2.72
Kikai Hadaka	3.30	4.45
Mishima Hadaka	2.24	3.38
Amagi Nijo	1.38	4.32
Misato Golden	1.64	1.77
Satsuki Nijo	2.48	3.14
Seijo 17	2.41	3.39

ン式が成立することを追認したものである。これまでに1 mM以下の低濃度における硝酸イオン吸収に関する K_m の値については、オオムギでは110 μM ¹⁶⁾、シロイヌナズナでは40 μM ³⁾、さらにヒマワリでは45 μM ¹⁾などが報告されている。Konesky et al.¹³⁾はオオムギとカラスムギそれぞれ3品種ずつを用いて K_m 値を比較し、オオムギでは8.5~36.1 μM 、カラスムギでは18.1~71.1 μM 変異の幅が認められたことを報告している。本実験で得られた K_m は25°Cにおいて50.9~111.7 μM 、15°Cにおいては15.4~96.5 μM であり、これまでに報告された K_m の値とほぼ同じ範囲内にあるといえよう。 K_m 値に関してみられる数倍の品種間差異の原因については今後の研究課題である。なお、これまでに報告されている K_m の値は同一種でも異なったものであり、この原因として品種や幼植物の栽培管理の他、溶液のイオン組成・濃度や測定時の温度などの条件の違いが考えられる。 V_{max} についてはこれまでの実験結果が異なる単位で、すなわち総生体重当りや根の乾燥重当りなどにより求められており、その値を他の報告例と比較することはできなかった。

イオン濃度が数 mM 以上の高濃度においては低濃度における High affinity-Low capacity の吸収機構とは異なる Low affinity-High capacity の機構が存在している⁴⁾。硝酸イオン吸収に関しては高濃度における吸収機構は培養液の硝酸イオン濃度がほぼ1 mM 以上において現れることが報告されて

Table 2 Kinetic parameters K_m (μM) and V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{g f. w.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), for nitrate uptake by the seedlings of 12 barley cultivars at 25 and 15°C. "r" shows the correlation coefficient between experimental and simulated K_m values.

Cultivar	25°C			15°C		
	K_m	V_{max}	r	K_m	V_{max}	r
Miyuki Omugi	57.8	2.24	0.714*	40.1	1.77	0.513
Miyagi 12	111.7	4.99	0.777**	71.3	3.25	0.735*
Tochigi Sekitori 1	68.2	3.19	0.778**	41.8	2.00	0.764*
Wase Bozu	84.7	4.98	0.822**	47.2	2.15	0.672*
Shikokumugi	102.1	4.56	0.858**	55.9	2.41	0.793*
Akashinriki	59.9	3.16	0.844**	62.4	2.71	0.658*
Kikai Hadaka	107.1	4.56	0.633*	96.5	3.50	0.838**
Mishima Hadaka	77.0	3.76	0.902**	59.0	2.67	0.703*
Amagi Nijo	68.5	2.50	0.658*	25.0	1.09	0.649**
Misato Golden	50.9	2.24	0.736*	48.3	1.57	0.676*
Satsuki Nijo	67.0	3.27	0.764**	69.2	2.88	0.745**
Seijo 17	71.1	3.26	0.859**	15.4	1.88	0.253

* and **: Significant at 5 and 1% level, respectively.

いる⁹⁾。本実験においては 1 mM における吸収速度は V_{max} の値とほぼ同程度であり、実験に用いた濃度では低濃度における吸収機構が働いていたと考えられる。あまぎ 2 条においては 1 mM における吸収速度が V_{max} よりもかなり高い値を示したが、これは高濃度における吸収機構が働いた結果による可能性もある。

25°C と 15°C における K_m と V_{max} の値を調べた結果、低温においては両パラメーターの値が低くなることが認められた。硝酸イオン吸収はカリウムイオン吸収と比較して低温における吸収能低下が著しく、イネでは 15°C においては吸収がほとんどなされないという結果も報告されている¹⁷⁾。Hasegawa⁸⁾ はイネ 10 品種の幼植物における硝酸イオン吸収を異なる温度において調べており、硝酸イオン吸収速度は温度の低下に伴って小さくなること、その減少程度に品種間差異が認められることを報告している。それによると、北海道の品種では減少率が小さく、Indica 品種では減少率が大きいという硝酸イオン吸収の温度反応に関してイネ品種の生態型適応との関連が示唆されている。本実験においては 15°C における K_m が 25°C における K_m の 1/2 以下となる成城 17 号とあまぎ 2 条の 2 品種から、15°C での K_m が 25°C での K_m よりもやや高くなる品種、赤神力とさつき 2 条、までの差異が認められた。しかしながら、イネにおいてみられた硝酸イオン吸収の温度反応と品種の生態型分化との関連は明らかでなかった。 K_m の温度による変化の原因をまず明らかにした上、これらの変異の品種間差異を考察することが必要である。なお、15°C 区では 25°C 区に比べて各品種ともミハエリス＝メンテン式への適合度が低下していたが、この原因がキャリアーの特性によるものなのか実験方法上の問題なのかについては今後解決すべき問題である。

本実験結果は現在日本において栽培されているオオムギ品種についてその幼植物期における硝酸吸収に関する K_m の値を定めたものであり、オオムギの硝酸代謝能力を評価するための基礎資料となるものである。 V_{max} と植物体の大きさとの間に相関がないことは、吸収速度が根の細胞膜の生理的能力に依存するところが多いことを示している。今後は吸収に続く代謝経路である硝酸還元酵素、亜硝酸還元酵素の活性を調査し、それらに植物の他の生理機能を考慮に入れて硝酸代謝能力を総合的に把握することが必要である。また、根における吸収と植物体各

Fig. 3. Relationship between V_{max} at 25°C and three morphological traits of 7-day-old seedlings in 12 barley cultivars. A; whole plant fresh weight, B; first leaf length, C; root length.

部位への窒素の転流・分配といった観点からのアプローチ¹⁸⁾についての基礎資料となりうるものであ

る。

最後に、本資料を活用するためには次の2つの点に留意する必要がある。第1の点は、細胞膜におけるイオンの働きは Influx (細胞外から内への流入) と Efflux (細胞内から外への流出) の2つの成分より成り立っている²⁾が、本実験では吸収を両成分の総和としたネット吸収量として評価していることである。第2の点は、本実験では水耕栽培したオオムギを実験材料として用いており、オオムギにとっては適しない条件において養分吸収能を評価していることである。従って、本実験結果が実際の栽培条件におけるオオムギの養分吸収能を表しているかどうかについては今後の検討が必要である。オオムギの成長に関して耐水性が品種間で異なっている¹²⁾。耐水性の大小とイオン吸収能の関係を明らかにすることが、本実験結果を実用面に応用するために必要なことと思われる。

謝辞 本実験で得られた測定データをミハエリス=メンテン式により解析するためのパソコンプログラムを神戸大学教育学部市橋秀樹博士に作成していただいた。ここに記して感謝の意を表する。

引用文献

1. Agüera, E., P. de la Haba, A.G. Fontes and J.M. Maldonado 1990. Nitrate and nitrite uptake and reduction by intact sunflower plants. *Planta* 182: 149–154.
2. Deane-Drummond, C.E. and A.D.M. Glass 1983. Short term studies of nitrate uptake into barley plants using ion-specific electrodes and $^{36}\text{ClO}_3^-$. I. Control of net uptake by NO_3^- flux. *Plant Physiol.* 73: 100–104.
3. Doddema, H. and G.P. Telkamp 1979. Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. II. Kinetics. *Physiol. Plant.* 45: 332–338.
4. Epstein, E. 1966. Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. *Nature* 212: 1324–1327.
5. 長谷川博 1988. 作物の硝酸吸収メカニズム. 近畿作育研究 33: 80–84.
6. 長谷川博・榎山匡央・是方敏之・渡辺 洋 1989. 硝酸イオン電極を用いたイネ幼植物の硝酸イオン吸収の測定. 近畿作育研究 34: 39–42.
7. 長谷川博 1990. 高等植物における硝酸吸収欠失突然変異体の3選抜方法の比較・検討. 近畿作育研究 35: 40–45.
8. Hasegawa, H. 1990. Short period uptake of nitrate by rice seedlings. *Jpn. J. Crop Sci.* 59: 498–502.
9. 井田正二 1988. 植物の無機窒素同化系酵素とその生合成. 京都大学食糧科学研究所報告 51: 34–44.
10. Jackson, W.A., R.J. Volk and T.C. Tucker 1972. Apparent induction of nitrate uptake in nitrate-depleted plants. *Agron. J.* 64: 518–521.
11. Jackson, W.A., D. Flesher and R.H. Hageman 1973. Nitrate uptake by dark-grown corn seedlings. Some characteristics of apparent induction. *Plant Physiol.* 51: 120–127.
12. 金谷良市・武田和義 1991. オオムギにおける耐湿性の F_1 分析. 育種 41 (別1): 430–431.
13. Konesky, D.W., M.Y. Siddiqi, A.D.M. Glass and A.I. Hsiao 1989. Genetic differences among barley cultivars and wild oat lines in endogenous seed nutrient levels, initial nitrate uptake rates, and growth in relation to nitrate supply. *J. Plant Nutr.* 12: 9–35.
14. Omata, T., M. Ohmori, N. Arai and T. Ogawa 1989. Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 defective in nitrate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6612–6616.
15. Pace, G.M. and P.R. McClure 1986. Comparison of nitrate uptake kinetic parameters across maize inbred lines. *J. Plant Nutr.* 9: 1095–1111.
16. Rao, K.P. and D.W. Rains 1976. Nitrate absorption by barley. I. Kinetic and energetics. *Plant Physiol.* 57: 55–58.
17. Sasakawa, H. and Y. Yamamoto 1978. Comparison of the uptake of nitrate and ammonium by rice seedlings. Influence of light, temperature, oxygen concentration, exogenous sucrose, and metabolic inhibitors. *Plant Physiol.* 62: 665–669.
18. Yoneyama, T., H. Yamada, M. Yamagata and H. Kouchi 1987. Nitrate reduction and partitioning of nitrogen in komatsuna (*Brassica campestris* L. var. *rapa*) plants: Compartmental analysis in combination with ^{15}N tracer experiments. *Plant Cell Physiol.* 28: 679–696.
19. Wallsgrave, R.M., H. Hasegawa, A.C. Kendall and J.C. Turner 1989. The genetics of nitrate uptake in higher plants. In Wray, J.L. and J.R. Kinghorn eds., *Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation*. Oxford Science Publications, Oxford New York Tokyo. 15–24.
20. Warner, R.L. and R.C. Huffaker 1989. Nitrate transport is independent of NADH and NAD (P) H nitrate reductases in barley seedlings. *Plant Physiol.* 91: 947–953.
21. Wray, J.L. 1986. The molecular genetics of higher plant nitrate assimilation. In Blonstein, A.D. and P.J. King eds., *A genetic approach to plant biochemistry*. Springer Verlag, Wien New York. 101–157.
22. Wray, J.L. 1988. Molecular approaches to the analysis of nitrate assimilation. *Plant Cell Environ.* 11: 369–382.