

国立公害研究所研究報告 第28号

Research Report from the National Institute for Environmental Studies, No. 28, 1981.

R-28-'81

复合汚染物質の植物影響に関する研究

昭和56年度 特別研究報告

Studies on effects of air pollutant mixtures on plants

Progress report in 1979-1980

NIES

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境庁 国立公害研究所

序

昭和51 — 53年度に実施された特別研究「陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究」では、主として二酸化硫黄や二酸化窒素など単一汚染ガスの植物影響に関する基礎的研究を行い、アブサイシン酸 (ABA) などの植物ホルモンが気孔開閉に影響を与え、その結果、大気汚染による可視傷害の発現が左右されることが明らかになった。

本研究では、大気中の二酸化硫黄、二酸化窒素、光化学オキシダントなどの共存する場合のいわゆる複合大気汚染に関する植物影響を取り上げて研究したが、その内容は次の3種類に分けることができる。

第1は、植物の生理機能および成長に与える影響に関する基礎的研究である。それによって複合汚染が単独の場合よりは一般にいて、植物に強い影響を与えることを見出し、その生理機能について研究を進めた。

第2は、光化学オキシダントに対して感受性の高い稲の品種を系統化することに成功し、また、ポプラの中で複合汚染に強い品種を見出した。

最後に数種の樹木を用いて大気汚染混合ガス吸収能力を評価した。また、植物群落の大気浄化機能を評価することを目的として、熱赤外線画像計測によるリモートセンシングの技術開発を進めた。

以上は、昭和54年度から3年計画で進めている特別研究であるが、新しく得た知見が相当な量に達したので、ここに中間報告として印刷に付する次第である。本研究に対し所外より援助を賜わった方々に感謝するとともに多くの方々の興味をひき、内容につき御批判を賜われれば甚だ幸である。

国立公害研究所長

近藤次郎

昭和56年6月1日

目 次

I 研究成果の概要 (戸塚 績)	1
II 報 文	
1. 混合大気汚染物質の光合成電子伝達系に及ぼす影響 菅原 淳・小倉 清・滝本道明・近藤矩朗	11
2. オゾンおよび二酸化窒素暴露による植物の蒸散変化とアブサイシン酸に対する 気孔の感受性増大 近藤矩朗・丸田一成・及川武久・菅原 淳	23
3. オゾン暴露によるハウレンソウ葉の光合成色素の分解について 神 剛・近藤矩朗	31
4. ソラマメ葉肉細胞プロトプラストの単離とその光合成活性に及ぼす亜硫酸の影響 神 剛・近藤矩朗	39
5. オゾンおよび二酸化硫黄がハウレンソウ葉の細胞微細構造に及ぼす影響 三宅 博・古川昭雄・戸塚 績・前田英三	47
6. 混合大気汚染ガスの高等植物への影響 I. NO ₂ , O ₃ 混合ガス処理による可視 障害の発現 古川昭雄・猪野瀬桂子・横山政昭・田崎忠良・戸塚 績・牛島忠広	87
7. ヒマワリの生長に及ぼすオゾン長期暴露の影響 清水英幸・本橋 理・岩城英夫・古川昭雄・戸塚 績	99
8. 植物葉に吸収された NO ₂ 窒素の移動と光合成産物の転流に及ぼす NO ₂ 暴露の影響 岡野邦夫・米山忠克・戸塚 績	111
9. 植物の NO ₂ 収着速度を支配する植物側の要因に対する NO ₂ の暴露期間および暴露 時の光条件の影響 名取俊樹・大政謙次・安保文彰・戸塚 績	123
10. 汚染ガスに被曝した植物の葉温パターンの計測 (II). 種々の汚染ガスによる葉の可視害症状の発現に寄与する主要な要因について 大政謙次・橋本 康・相賀一郎	133
11. 大気汚染物質に対する感受性のポプラ品種間差異 藤沼康実・戸塚 績・相賀一郎	149

Contents

Preface

I Outlines of the studies	1
TOTSUKA, T.	
II Papers	
1. Effects of air pollutant mixtures on photosynthetic electron transport systems	11
SUGAHARA, K., OGURA, K., TAKIMOTO, M. and KONDO, N.	
2. Changes in transpiration rate and increase in stomatal sensitivity to abscisic acid with fumigation of ozone and nitrogen dioxide	23
KONDO, N., MARUTA, I., OIKAWA, T. and SUGAHARA, K.	
3. Destruction of photosynthetic pigments in O ₃ -fumigated spinach leaves	31
SAKAKI, T. and KONDO, N.	
4. Isolation of mesophyll protoplasts from broad bean and the effects of sulfite on its photosynthetic activities	39
SAKAKI, T. and KONDO, N.	
5. Effects of ozone and sulphur dioxide on the fine structure of spinach leaf cells	47
MIYAKE, H., FURUKAWA, A., TOTSUKA, T. and MAEDA, E.	
6. Effects of mixed air pollutants on higher plants I. Foliar injury caused by NO ₂ + O ₃ mixture	87
FURUKAWA, A., INOSE, K., YOKOYAMA, M., TAZAKI, T., TOTSUKA, T. and UHIZIMA, T.	
7. Effects of chronic O ₃ exposure on the growth of sunflower plants	99
SHIMIZU, H., MOTOHASHI, S., IWAKI, H., FURUKAWA, A. and TOTSUKA, T.	
8. Transfer of NO ₂ -nitrogen absorbed in the leaves and the effect of NO ₂ fumigation on CO ₂ assimilates partitioning in plants	111
OKANO, K., YONEYAMA, T. and TOTSUKA, T.	
9. Effects of fumigation periods and light condition during NO ₂ fumigation on plant's factors controlling NO ₂ sorption rate	123
NATORI, T., OMASA, K., ABO, F. and TOTSUKA, T.	
10. Measurement of the thermal patterns of plant leaves under fumigation with air pollutants (II). The major factors caused the appearance of characteristic visible injuries on leaves by air pollutants	133
OMASA, K., HASHIMOTO, Y. and AIGA, I.	
11. Interclonal variation in responses to air pollutants of hybrid poplar trees	149
FUJINUMA, Y., TOTSUKA, T. and AIGA, I.	

I

研究成果の概要

戸塚 績¹

Outlines of the studies

Tsumugu TOTSUKA¹

1. はじめに

最近では大気中の二酸化硫黄濃度は年々減少し、環境基準を満足する地域が多くなっている。しかし、二酸化窒素濃度は多くの都市域で横ばい、または微増の傾向を示している。更に、窒素酸化物とその他の大気汚染物質との混在下における光化学反応に由来する光化学オキシダント濃度は、都市域ばかりでなく、都市郊外においても社会問題化している。

本研究に先立って昭和51-53年度に実施された特別研究「陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究」は、大気汚染の植物影響に関する研究プロジェクトの第1期計画と位置付けられたもので、主として二酸化硫黄や二酸化窒素など単一汚染ガスの植物影響に関する基礎的知見の収集につとめた。これらの研究成果は国立公害研究所研究報告第10号として昭和54年度に公刊されている。

しかし、野外条件下における大気汚染は、複数の汚染物質が共存した複合汚染である。そこで、本研究では、NO₂、SO₂、O₃、炭化水素など大気汚染ガスの種類と濃度の組合せを変えた混合ガスが、植物の生理機能および生長に与える影響を種々な環境条件下で実験し、複合大気汚染ガスの植物影響に関する基礎資料の収集、野外条件下における複合大気汚染環境評価のための植物指標の開発および、植物群落の大気汚染環境浄化機能を評価することを目的として昭和54-56年度の3年計画で開始された。

本研究に先立って、O₃や炭化水素を含め、複数の汚染ガスの組合せによる混合ガス暴露実験の可能な施設が完成した。この施設を利用して当初、O₃の単一ガスやO₃+NO₂混合ガスによる

1. 国立公害研究所生物環境部

1. Division of Environmental Biology, The National Institute for Environmental Studies, Tsukuba-gakuen, Ibaraki 305

暴露実験をすすめるとともに、これまでの研究の継続として SO_2 や NO_2 の単独ガス暴露による植物の障害発現に係る機作の解明につとめてきた。

2. 研究成果の概要

本研究プロジェクトは先に述べた研究目的、すなわち、(I)複合大気汚染ガスの植物影響に関する基礎資料の収集、(II)野外条件下における複合大気汚染環境評価のための植物指標の開発、および(III)植物群落の大気汚染環境浄化機能の評価、をめざして生物環境部生理生化学研究室、陸生生物生態研究室、ならびに技術部生物施設管理室との共同研究として実施されたものである。ここに本研究の中間報告として主として昭和54年度に得られた主な成果をとりまとめた。以下に本報告書に掲載された報文の内容を中心として研究目的ごとに成果の概要をのべる。なお、終わりに発表された成果を一覧にまとめ、本文中にその番号を引用した。

I 植物影響に関する基礎資料

近年、特に光化学オキシダントを中心とした複合大気汚染が社会問題化している。そこでこのような汚染状態が植物に与える影響を明らかにするために、当初、光化学オキシダントの主要成分であるオゾン (O_3) が単独で植物の生長に及ぼす影響を検討した (本報告書 II-8)。ヒマワリ幼植物を 0.1 および 0.2 ppm O_3 で 12 日間暴露処理した結果、暴露開始後 2~3 日で植物葉面に可視障害が発現し、12 日目では大部分の葉に被害が観察された。また、下位葉では枯死がめだつた。植物個体の乾重量は 0.1 および 0.2 ppm O_3 の暴露処理終了時でそれぞれ対照の 90、70% であった。各器官別乾重量の増加は O_3 暴露により抑制されたが、特に根の生長抑制が顕著に認められた。

O_3 暴露による葉面における可視障害発現の機作を明らかにする研究の一貫として、 O_3 処理による光合成色素の分解を調べた結果、0.5 ppm O_3 で 8-12 時間処理でカロチノイドやクロロフィル *a* および *b* の分解が観察された。しかし、5.5 時間暴露ではこれらの色素の分解は観察されなかったが、 O_3 処理停止後、光照射および酸素の存在下で色素分解が進行した。 O_3 による可視障害の症状は二酸化硫黄 (SO_2) の場合と非常に異っているが、色素の分解には SO_2 の場合と同様に O_2 が関与していることが示唆された (本報告書 II-3 参照)。なお、葉肉細胞内の微細構造の変化では、はじめに葉緑体内膜 (ラメラ) の膨潤がみられ、やがてゴルジ体、核の二重膜などの膜系に膨潤が認められた (本報告書 II-5)。

一方、汚染ガスに対する植物の抵抗性を支配する要因の一つであるアブサイシン酸 (ABA, 気孔閉鎖ホルモン) と気孔の閉鎖との関係を、ABA 含有量の多いラッカセイ、トマトおよび ABA 含有量の少ないダイコン、ソラマメ、ホウレンソウ、トウモロコシを 0.5 ppm O_3 で暴露処理して調べた

(本報告書Ⅱ-2)。その結果、ラッカセイ、トマトでは暴露処理直後から蒸散速度が低下した。これは気孔開度の減少を示す。ダイコン、ソラマメ、トウモロコシでは、処理10~30分後から蒸散速度の低下がはじまり、ハウレンソウは暴露開始直後から徐々に低下していった。このようにO₃暴露による気孔閉鎖反応もSO₂暴露におけると同様にABA含有量の多い植物の方が敏感であることが認められた。

O₃とその他の汚染ガスとの混合ガスでは、O₃単独の場合とは異なった、混合ガスの複合効果がみられる。例えば混合ガス暴露したハウレンソウの葉からとり出した葉緑体の光合成電子伝達反応の光化学系Ⅰと系Ⅱに対する混合ガスの影響を調べた結果、光化学系ⅠおよびⅡに対するNO₂の阻害効果がO₃によって増大すること、光化学系Ⅱに対するSO₂の阻害効果が著しい場合O₃の共存により保護されることが明らかとなった(本報告書Ⅱ-1)。

NO₂とO₃混合ガスで葉面における可視障害の発現がそれぞれの単独ガスの場合より顕著となる。ヒマワリでは0.2ppm O₃あるいは2ppm NO₂では5時間暴露しても可視障害が発現しないが、両ガスを混合して暴露すると可視障害が発現した。その障害の程度はNO₂濃度が高まるにつれて増大した(本報告書Ⅱ-6)。SO₂+O₃混合ガスで葉を暴露処理すると、処理後短時間でSO₂単独処理の場合と類似の症状がヒマワリ葉肉細胞内の微細構造の変化として発現した。このことから、O₃とSO₂の混合ガスではO₃の膜系に対する作用によって膜の透過性が変化してSO₂の取り込みが促進され、主としてSO₂による障害が発現したものと推論された(本報告書Ⅱ-5)。

その他、SO₂の光合成反応系阻害および葉面における可視障害発現の機作を追究した一連の実験で以下のことが明らかとなった。亜硫酸ナトリウムをハウレンソウ葉片に与えて電子伝達反応阻害と亜硫酸の葉緑体への取り込みの関係を調べた結果、光照射下において、亜硫酸イオンもSO₂と同様、光化学系Ⅱを阻害し、Na₂³⁵SO₃の³⁵Sの葉緑体への取り込みは暗黒下より多く、DCMUを加えると系Ⅱ阻害が抑制され、³⁵Sの葉緑体への取り込みも抑制された(4, 10)。ソラマメ葉肉細胞プロトプラストを単離し、低pHで亜硫酸ナトリウム処理した後にpHを中性に変え、NaH¹⁴CO₃を与えて炭酸の取り込みおよび固定を調べると、亜硫酸は炭酸固定阻害と同時に炭酸の取り込みも阻害することが明らかになった(本報告書Ⅱ-4)。ハウレンソウをSO₂に暴露して炭酸固定系酵素の変動を調べると、フラクトース-1,6-二リン酸フォスファターゼ、NADP-グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素、リブロース-5-リン酸キナーゼの3種のSH酵素が速やかに失活した。SH酵素は低濃度H₂O₂によって阻害されることが知られているので、葉内H₂O₂の増加、SH酵素の失活、光合成低下の経時変化を比較すると、いずれも同様の変動を示した。したがって、SO₂暴露時の炭酸固定の低下はH₂O₂によるSH酵素の失活が原因であると考えられた(5)。SO₂暴露時における可視障害は、葉のタンパク部分が影響を受けたため発現すると考えられるので、傷害発現におけるプロテアーゼとプロテアーゼインヒビターの関与を検討した。プロテアーゼ投与により、SO₂暴露による傷害発現が増強した。また、H₂O₂を与えると傷害が発現し、プロテアーゼ

活性も増大した。これらの結果はSO₂による傷害にプロテアーゼが関与していることを示唆している(7)。今後、SO₂とO₃、NO₂とO₃等の複合効果についてさらに研究を続ける予定である。

Ⅱ 環境評価のための植物指標の開発

特定な大気汚染ガスに特異的な感受性を示す植物を用いて局所的な複合大気汚染環境を評価する手法を開発するために、遺伝的に系統化され、栽培も容易な水稲やポプラの指標植物化の可能性を追求してきた。その結果、日本在来のイネの品種「金南風」の穂を突然変異誘起剤で処理して得られた系統のなかに、O₃に特異的に反応する系統が得られた。さらに、日本在来品種群のなかでSO₂に高感受性のLO 182(♀)と抵抗性の4品種(LO 271, 818, 1148, 1181)(♂)を交配し、F₂で形質分離比を調べたところ、SO₂感受性は優性関係のない一対の遺伝子によって支配されていることが明らかとなった。一方、ポプラでは73品種についてSO₂とO₃に対する抵抗性を調べ、両方の大気汚染質に対して特異的な反応を示す品種が選抜された(本報告書Ⅱ-11)。また、O₃に対して抵抗性を異にする20品種についてO₃暴露による蒸散速度の変化(これは気孔開度の変化を示す)を調べた結果、可視障害の発現程度が顕著な品種ほど蒸散速度の低下が少なく、O₃吸収速度が大きくなる傾向がみられたが、障害発現度の小さい品種のなかにもO₃の吸収速度の大きい品種があった。また、O₃抵抗性の高い品種を葉中へのO₃吸収量が少ないものが多いものに類別できた(本報告書Ⅱ-10)。

以上の研究成果をもとに選定されたポプラ、イネの特定品種を大気汚染地域に配置して野外条件下における両種の植物の複合大気汚染に対する反応を調査した。その結果、ポプラの落葉率や葉色変化率などが複合大気汚染度の指標として有効であることが認められた。

以上の他に、植物の生理活性を指標とする環境評価法の開発では、葉中のカタラーゼ、グルタチオン還元酵素活性がSO₂汚染度の指標になりうる可能性が示唆された(5)。

Ⅲ 植物の大気汚染環境浄化機能の評価

各種植物について混合大気汚染ガスの葉内吸収、蒸散速度を測定し、これをもとに植物群落の混合汚染ガス吸収能に関する数学モデルを組み立てることを目的として、若干の基礎資料を収集した。

植物のガス吸収能に関してこれまで比較的高濃度の短期暴露による知見が多く、長期間の連続暴露によるガス吸収能の変化については報告がなかった。そこで、研究開始の当初に低濃度NO₂の長期暴露が植物のガス吸収能力に及ぼす影響を、ヒマワリ、トマト、キュウリを用いて検討した。0.2 ppm NO₂で1~2か月間連続暴露した直後に0.8 ppm NO₂で5時間暴露して、蒸散速度とガス吸収速度を測定した結果、いずれも対照値とほぼ一致した値が得られた。このことは、植物に対する毒

性の低い汚染ガスの場合には、比較的長期間暴露されてもガス吸収能力は変化しないことを示している（本報告書Ⅱ-9）。

一方、混合ガスに対する植物のガス吸収能を数種の本木植物について測定した。0.1 ppm SO₂ + 0.1 ppm NO₂ および 0.1 ppm NO₂ + 0.1 ppm O₃ の比較的低濃度の混合ガスで、汚染ガスに対する抵抗性の異なる7種類を用いて実験した。使用した植物は強い抵抗性種として知られているキョウチクトウおよびマサキ、やや強い種としてアオキとトウカエデ、中程度の抵抗性を示す種としてサンゴジュ、抵抗性の弱い種としてシラカシとケヤキを選定した。SO₂ + NO₂ 区、NO₂ + O₃ 区とも抵抗性の強い種はガス暴露により短時間に蒸散速度の減少（すなわちガス吸収能の低下）がみられた。この減少は混合ガスを構成するそれぞれの単独ガス暴露の場合より顕著であった。一方、抵抗性の弱い種では混合ガス暴露の場合でも蒸散速度の顕著な減少は観察されなかった（20）。

次にリモートセンシングによる植物のガス吸収能を評価する手法および大気汚染による植物影響の評価手法の開発をめざして、汚染ガス環境下における植物の反応と汚染ガス吸収量を非破壊で計測する熱赤外画像計測システムの技術開発をすすめた（22, 24, 44）。また、実際にヒマワリを用いてSO₂、NO₂、O₃ 暴露処理による葉面温度の経時的変化を計測し、蒸散速度、ガス拡散に対する気孔抵抗、汚染ガス吸収速度を算出した。その結果、SO₂ および NO₂ では葉面における吸収量があるしきい値を越えた部位にのみ可視害の発現する傾向が認められた。しかし、O₃ では葉面における吸収量と葉面に発現した可視障害度との間には、ほとんど相関が認められなかった（本報告書Ⅱ-10）。

終わりにあたり、本特別研究を推進する上で多くの大学関係者、試験研究機関の研究者のかたがたより御協力をいただいた。ここに記して感謝の意を表します。

研究組織

1. 研究担当者

1. 生物環境部 菅原 淳
2. 生物環境部生理生化学研究室
近藤矩朗・渡辺恒雄・田中 浄・島崎研一郎・榊 剛
3. 生物環境部陸生生物生態研究室
戸塚 績・古川昭雄・米山忠克^{*}・岡野邦夫・伊藤 治・名取俊樹・
可知直毅・清水英幸（*現在、農林水産省農業技術研究所化学部）
4. 技術部生物施設管理室
相賀一郎・大政謙次・安保文彰・藤沼康実・松本 茂・町田 孝

2. 研究協力者

1. 岩城英夫・及川武久・丸田一成・渡辺和人・本橋 理（筑波大学生物科学系：305 新治郡桜村）
2. 滝本道明・小倉 清・猪野瀬桂子・中町貴美子・大坪鉄昭（東邦大学理学部：274 船橋市三山町542）
3. 田崎忠良・牛島忠広・横山政昭^{*}（東京農工大学農学部：183 府中市幸町，^{*}現在 千代田デームズアンドムーア^株）
4. 橋本 康（愛媛大学農学部：790 松山市樽味3-5-7）
5. 前田英三・三宅 博^{*}（名古屋大学農学部：464 名古屋市千種区不老町，^{*}現在 東京農工大学農学部）

研究発表

1. 講演

- (1) 榊 剛・近藤矩朗：葉肉細胞プロトプラストの光合成活性に及ぼす亜硫酸イオンの影響。日本植物生理学会，東京。（55.4）
- (2) 近藤矩朗・丸田一成：大気汚染物質暴露による蒸散変化におけるpH低下とアブサイシン酸の関与。日本植物生理学会，東京。（55.4）
- (3) 丸田一成・近藤矩朗：亜硫酸イオンおよびpHのソラマメの気孔開度に及ぼす影響とアブサイシン酸の関与。日本植物生理学会，東京。（55.4）
- (4) 島崎研一郎・中町貴美子・近藤矩朗：亜硫酸ナトリウム処理葉緑体の電子伝達反応阻害への光の関与。日本植物学会第45回大会，仙台。（55.9）
- (5) 田中 浄・大坪鉄昭・近藤矩朗：二酸化硫黄暴露葉緑体における炭酸固定系酵素阻害への過酸化水素の関与。日本植物学会第45回大会，仙台。（55.9）
- (6) 榊 剛・近藤矩朗：葉肉細胞プロトプラストにおける亜硫酸イオンの取り込みと光合成活性の阻害について。日本植物学会第45回大会，仙台。（55.9）
- (7) 渡辺恒雄・近藤矩朗・渡辺和人：プロテアーゼによる植物組織障害発現の増強とプロテアーゼインヒビターの作用。日本植物学会第45回大会，仙台。（55.9）
- (8) 近藤矩朗・丸田一成・菅原 淳：亜硫酸による気孔開孔阻害。日本生物環境調節学会第18回大会，福井。（55.10）
- (9) 丸田一成・近藤矩朗：二酸化硫黄暴露による気孔閉鎖運動。日本植物学会第45回大会，仙台。（55.10）
- (10) 田中 浄・近藤矩朗：二酸化硫黄暴露ホウレンソウの葉緑体における過酸化水素生成。第

- 53回日本生化学会, 東京. (55. 11)
- (11) 島崎研一郎・近藤矩朗・中町貴美子: 亜硫酸ナトリウムによる光合成電子伝達反応の阻害. 第21回大気汚染学会, 浦和. (55. 11)
- (12) 榊 剛・近藤矩朗: 葉肉細胞プロトプラストの光合成活性におよぼす亜硫酸イオンの影響. 第21回大気汚染学会, 浦和. (55. 11)
- (13) 近藤矩朗・丸田一成: 大気汚染物質暴露による蒸散変化とアブサイシン酸の関係. 第21回大気汚染学会, 浦和. (55. 11)
- (14) 荒井邦夫・米山忠克: 成熟葉からのNとCの移動 — $^{15}\text{NO}_2$ と $^{13}\text{CO}_2$ の暴露実験から —. 日本作物学会, 東京. (55. 4)
- (15) 戸塚 績: 植物の生長におよぼす大気汚染ガスの影響. 国立公害研究所研究発表会, 筑波. (55. 6)
- (16) 荒井邦夫・米山忠克: ヒマワリの成熟葉からの ^{15}N , ^{13}C の転流. 第17回理工学における同位元素研究発表会, 東京. (55. 7)
- (17) Yoneyama, T., K. Arai and T. Totsuka: Metabolism and translocation of atmospheric NO_2 in sunflower leaves. CSPP/LAPP Meet., Calgary, Can. (55. 7).
- (18) 荒井邦夫・米山忠克: ヒマワリ葉からのCとNの移動と個体生長への利用の差異. 日本作物学会, 鶴岡. (55. 9)
- (19) 清水英幸・古川昭雄・戸塚 績・本橋 理・岩城英夫: ヒマワリの生長におよぼすオゾン暴露の影響 — 葉位別の光合成および生長の変化. 日本生物環境調節学会第18回大会, 福井. (55. 10)
- (20) 名取俊樹・大政謙次・安保文彰・戸塚 績: 木本植物の蒸散速度に対する混合ガス暴露の影響. 第21回大気汚染学会, 浦和. (55. 11)
- (21) 相賀一郎: 植物による大気汚染ガス吸収速度推定のための葉面温度パターンの計測法について. 国立公害研究所研究発表会, 筑波. (55. 6)
- (22) 大政謙次・安保文彰・橋本 康・相賀一郎: 画像処理による汚染環境下での植物反応の評価に関する研究 — 画像処理システムについて. 日本農業気象学会関東支部会, 東京. (55. 1)
- (23) 大政謙次・安保文彰・橋本 康・相賀一郎: サーモグラフィによる汚染ガスに被曝した植物の葉温パターンの計測. 第12回日本医学・生物学サーモグラフィ研究会, 東京. (55. 6)
- (24) 大政謙次・安保文彰・相賀一郎・橋本 康: 大気汚染環境下の植物の画像計測 — 熱赤外画像に含まれる生体情報の定量化について. 計測自動制御学会, 東京. (55. 8)
- (25) 大政謙次・安保文彰・橋本 康・相賀一郎: 汚染ガスに暴露された植物の画像処理(II) —

蒸散, 気孔抵抗, 汚染ガス吸収速度の葉面分布の定量化. 日本生物環境調節学会第18回大会, 福井. (55.10)

- (26) 大政謙次・安保文彰・相賀一郎・橋本 康: 熱赤外面像計測システムによる植物温度の計測. 第4回人間—熱環境系シンポジウム, 東京. (55.12)
- (27) 藤沼康実・戸塚 績・相賀一郎: ポプラの大気汚染ガス感受性の品種間差異について. 日本生物環境調節学会第18回大会, 福井. (55.10)
- (28) 藤沼康実・町田 孝・戸塚 績・相賀一郎: 制御環境下でのヒマワリの生長—人工条件下での乾物生長について. 日本生物環境調節学会第18回大会, 福井. (55.10)

2. 印 刷

- (29) Kondo, N., I. Maruta and K. Sugahara. 1980: Effects of sulfite and pH on abscisic acid-dependent transpiration and on stomatal opening. *Plant & Cell Physiol.*, **21**, 817–828.
- (30) Shimazaki, K. and K. Sugahara. 1980: Inhibition site of the electron transport system in lettuce chloroplasts by fumigation of leaves with SO₂. *Plant & Cell Physiol.*, **21**, 125–135.
- (31) Shimazaki, K., T. Sakaki, N. Kondo and K. Sugahara. 1980: Active oxygen participation in chlorophyll destruction and lipid peroxidation in SO₂-fumigated leaves of spinach. *Plant & Cell Physiol.*, **21**, 1193–1204.
- (32) Tanaka, K. and K. Sugahara. 1980: Role of superoxide dismutase in defense against SO₂ toxicity and an increase in superoxide dismutase activity with SO₂ fumigation. *Plant & Cell Physiol.*, **21**, 601–611.
- (33) 戸塚 績. 1980: 植物の大気汚染環境浄化機能. 産業と環境, **9** (7), 67–71.
- (34) 荒井邦夫・戸塚 績. 1980: 植物の生育におよぼす大気汚染の影響に関する基礎調査. 複合大気汚染の影響, 複合大気汚染による生体影響 (環境庁委託業務結果報告書), 71–84. 公衆衛生協会
- (35) 名取俊樹・戸塚 績. 1980: 二酸化窒素の短期および長期暴露に伴う植物のガス収着速度を支配する植物側の要因について. 大気汚染学会誌, **15** (8), 329–333.
- (36) Shimizu, H., A. Furukawa and T. Totsuka. 1980: Effect of low concentrations of SO₂ on the growth of sunflower plants. *Environ. Control in Biol.*, **18**, 39–47.
- (37) 米山忠克. 1980: 大気中窒素の植物による固定—¹⁵N希釈法をめぐって. 化学と生物, **18**, 293–295
- (38) 米山忠克・熊沢喜久雄. 1980: 高等植物における窒素の同化と循環. 重窒素利用研究法 (三井進午ら編, 学会出版センター), 93–110.

- (39) Yoneyama, T., K. Arai and T. Totsuka. 1980: Transfer of nitrogen and carbon from a mature sunflower leaf- $^{15}\text{NO}_2$ and $^{13}\text{CO}_2$ feeding studies. *Plant & Cell Physiol.*, **21**, 1367-1381.
- (40) Matsumaru, T., T. Yoneyama, T. Totsuka and Y. Matsuoka. 1981: Absorption of atmospheric NO_2 by rice, wheat and barley plant; Estimation by ^{15}N -dilution method. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **27**(2), 255-261.
- (41) 青木正敏・矢吹万寿・戸塚 績. 1981 : 赤外カラー航空写真による植物活性調査に関する基礎研究, 文部省特別研究「環境科学」研究報告集 B 91-R 52-3, 227 - 236.
- (42) 大政謙次. 1980 : 汚染された大気と植物とのあいだのガス交換. *環境情報科学*, **9**(2), 77-80.
- (43) 大政謙次・相賀一郎. 1981 : 画像処理による植物の生育・生理反応の評価. *遺伝*, **35**(1), 25-31.
- (44) 大政謙次・安保文彰・相賀一郎・橋本 康. 1981 : 大気汚染環境下の植物の画像計測—熱赤外面像に含まれる生体情報の定量化について. 計測自動制御学会論文集, **17**(6), (印刷中)
- (45) 大政謙次・安保文彰・橋本 康・相賀一郎. 1981 : サーモグラフィによる汚染ガスに被暴した植物の葉温パターンの計測. *サーモグラフィと医学・生物学*, **1**, (印刷中)
- (46) Omasa, K., Y. Hashimoto and I. Aiga. 1981: A quantitative analysis of the relationships between SO_2 or NO_2 sorption and their acute effects on plant leaves using image instrumentation. *Environ. Control in Biol.*, **19**, 59-67.

II-1

混合大気汚染物質の光合成電子伝達系に及ぼす影響

菅原 淳¹・小倉 清²・滝本道明²・近藤矩朗¹

Effects of air pollutant mixtures on photosynthetic electron transport systems

Kiyoshi SUGAHARA¹, Kiyoshi OGURA², Michiaki TAKIMOTO²
and Noriaki KONDO¹

要 旨

大気汚染物質の二酸化硫黄 (SO₂), 0.5 ppm, 二酸化窒素 (NO₂), 4.0 ppm 及びオゾン (O₃), 0.1 ppm を, 二種および三種に混合して暴露したホウレンソウ葉から, 葉緑体を単離して, 光合成電子伝達反応への影響を光化学系Iと系IIの反応に分けて調べた。

1) SO₂ + O₃の複合影響では, SO₂単一ガスで見られた系IIの阻害が, O₃が加わることによって大きな増加を示すことはなかった。むしろ, SO₂による阻害が30%を越えるような30時間暴露の場合, 阻害を弱めるような保護効果を示した。光化学系Iの反応は, O₃が存在しても全く阻害を受けなかった。

2) NO₂ + O₃の複合影響では, 単一ガスでは全く阻害を与えないO₃が, NO₂と混在することにより明らかな活性阻害を引き起こした。この阻害は光化学系IおよびIIの両方に及んでおり, 光化学系IIの阻害は相乗的であった。

3) NO₂ + SO₂の複合影響では, 光化学系Iの反応が暴露10時間前後に促進され, 暴露が30時間を経ると阻害されることが示された。光化学系IIの反応は暴露時間の経過と共に阻害度を増し, 30時間後には50%に達した。

4) NO₂ + SO₂ + O₃の複合影響では, NO₂ + SO₂の影響として表われた暴露10時間前後の活性促進を, O₃が抑制する傾向が見られた。光化学系IIの反応の阻害はNO₂ + SO₂の場合に近似していた。暴露30時間について見ると, NO₂の存在する全ての場合において光化学系Iが阻害された。

以上の結果について, 現在までに報告された知見による, これらの機作の解明の可能性を検討し, 今後の問題点について考察した。

-
1. 国立公害研究所 生物環境部
 2. 東邦大学 理学部

1. Division of Environmental Biology, The National Institute for Environmental Studies, Tsukubagakuen, Ibaraki 305
2. Faculty of Science, Toho University, Funabashi, Chiba 274

緒 言

大気汚染物質の植物影響に関する研究は、単一ガスでの研究が多くなされて来たが、近年漸く複数の汚染ガスを用いた研究も行われるようになった。これらの研究は主として葉の可視障害や植物の生長阻害について行われている。しかしながら、これらの障害が現れるためには、すでに生体内の生理機能が変化を受けているはずであり、これらの解析が原因究明の重要なカギとなる。

最近、この点に留意して、SO₂による可視害発現以前の光合成電子伝達系への影響について研究が行われた(7, 8)。その結果、SO₂は光化学系Iの反応には全く影響を与えずに、光化学系IIの反応を特異的に阻害することが示された。この現象は、SO₂を含む混合汚染ガスの影響解析に際して、指標となり得る可能性がある。本研究ではこれらの観点から、SO₂、NO₂およびO₃の二種および三種の混合ガスの光合成電子伝達系への影響を光化学系IとIIの反応に分けて調べた。

一方、複合大気汚染物質は、汚染物質の組合わせ、それぞれの濃度、暴露時間、植物の生育条件および植物の種類などによって、さまざまな障害を植物に与える(1)。一般に複合影響を明確にするために、汚染物質単独ではほとんど影響がないが複数に汚染物質が混合されると影響が現れるような条件を設定する。しかし、障害はガス濃度だけではなく、複数のガスの濃度比や植物の持つ単独ガスによる障害のしきい値にも大きな関連を持つのでこれらを十分に考慮しなければならない。

本研究では、単一ガスでの一連の実験結果から、SO₂、0.5 ppm、NO₂、4.0 ppm、O₃、0.1 ppmという濃度を選び、これらのガスの二種および三種の混合で30時間までの暴露を行った。結果の考察については、上記の条件下での解析という制約が課せられるが、今後の複合汚染の機作の解明のために、このようなデータの集積が必要である。

材料および方法

植物材料： ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L. cv. New Asia) を温度昼 20 °C、夜 15 °C、湿度 70 % に制御した自然光ガラス室で育成し、播種後 5 ~ 6 週間のものを実験に用いた。

ガス暴露： 自然光ガラス室で育成した鉢植えホウレンソウ 20 鉢を、20 °C、湿度 75 % のグロースキャビネットに入れ、約 30 K lx の光照射下で 2 時間前処理した。次いで半分の 10 鉢を、前記と同条件下で、0.5 ppm SO₂、0.1 ppm O₃、4.0 ppm NO₂あるいはこれらの混合ガス条件に設定したガス暴露用キャビネットに素早く移し、連続照射下で所定の時間暴露した。

葉緑体の単離： ガス暴露したホウレンソウの葉を直ちに 0.4 M 蔗糖、0.02 M NaCl を含んだ氷冷の 0.05 M トリシン-NaOH 緩衝液 (pH 7.5) 中でホモジナイザーで破碎し、4 層のガーゼで濾過する。濾液を 200 × g 5 分間冷却遠心分離して、細胞破片を除去後、この上清を更に 1,500 × g 7 分間遠心分離して葉緑体を沈澱させる。この葉緑体を同じ緩衝液にけん濁して実験に使用した。

光合成反応の測定： 単離葉緑体によるジクロロフェノールインドフェノール (DPIP) の光還元は、日立二波長分光光度計を用いて、590 nm における吸光度の減少により測定した。光電子増

倍管の前にコーニングフィルター 9782 を取り付け、励起光は 300 W のプロジェクターランプの前に赤色カットオフフィルターを挿入し、620 nm 以上の光を使用した。反応混液は 4 ml で、次の組成からなっている： 12.5 mM トリシン-NaOH 緩衝液 (pH 7.5), 100 mM 蔗糖, 5 mM NaCl, 50 μ M DPIP, およびクロロフィル 20 μ g 相当の単離葉緑体。

ニコチンアミドジスクレオチドリ酸 (NADP) の光還元は、光電子増倍管の前に東芝 V-40 および UV-D 33S の 2 枚のフィルターを挿入し、340 nm における吸光度の増加から測定した。反応混液は 4 ml で、以下の通りである： 12.5 mM トリシン-NaOH 緩衝液 (pH 7.5), 100 mM 蔗糖, 5 mM NaCl, 5 μ M NADP, フェレドキシンの充分量およびクロロフィル 40 μ g 相当の単離葉緑体。NADP-NH₄Cl 系では、電子伝達速度を促進させるために、脱共役剤として NH₄Cl を 25 mM 加えた。NADP-DPIP H₂ 系では、光化学系 I だけの反応を見るために、阻害剤ジクロロフェニールジメチルウレア (DCMU) 50 μ M, DPIP 50 μ M, アスコルビン酸ナトリウム 2.5 mM および NH₄Cl 25 mM を加えた。

クロロフィルの定量： クロロフィルの定量は Mackinney の方法 (4) により行った。

結 果

二酸化硫黄とオゾンの複合影響

図 1 A は、光化学系 II の活性を示す DPIP 光還元反応に対する SO₂ と O₃ の複合影響を見たものである。各暴露時間と同じ時間、ガスを流していないグロースキャビネット中に置かれた対照植物から単離した葉緑体の活性を 100 として、ガス暴露による DPIP 光還元活性の変化を百分率で示した。

0.1 ppm O₃ 単独暴露では、各暴露時間ともほとんど影響は見られない。0.5 ppm SO₂ 単独暴露の場合は 10 時間以上の暴露で、約 20% の阻害が見られた。両者の混合暴露では、各暴露時間においてわずかな阻害の増加が見られたが、相乗効果という程の影響ではない。

光化学系 I だけの活性を表す NADP-DPIP H₂ 系に対する暴露の影響を図 1 B に示した。0.5 ppm SO₂ 暴露でもほとんど活性の低下はなく、0.1 ppm O₃ 単独および混合暴露でも全く阻害は見られずむしろ促進気味であった。

光化学系全体 (系 I + 系 II) の活性を示す NADP の光還元反応に対する影響を見た結果が図 1 C である。この系に関しても 0.1 ppm O₃ 単独ではむしろ促進気味で阻害は全くなく、0.5 ppm SO₂ 単独では、暴露時間の経過と共に阻害の程度が増加し、30 時間では約 35% に達した。混合暴露においては、20 時間以前でいく分阻害の増加がみられたが、SO₂ 単独での阻害が 30% を越えた 30 時間では、むしろ相殺的作用で SO₂ の阻害を O₃ が保護している現象が見られた。一般に相殺作用は汚染物質のどちらかの害作用が著しいときに生じることが報告されている (3, 9)。

以上の結果から、SO₂ が系 I を阻害せずに系 II だけを特異的に阻害する "SO₂ 効果" が明確に示さ

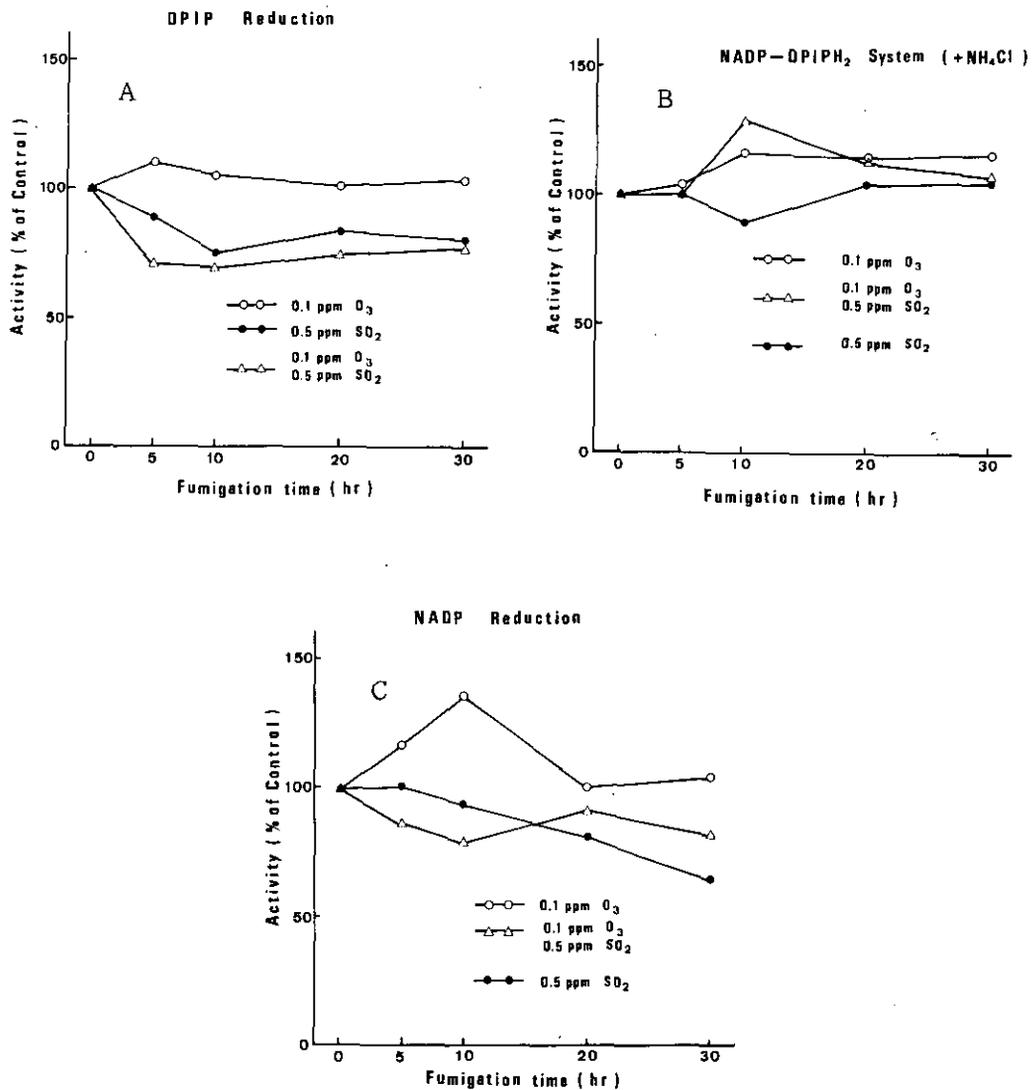


図1 SO₂とO₃の混合暴露による光合成電子伝達系への影響。A, DPIP光還元反応; B, NADP-DPIPH₂系; C, NADP光還元反応。

Fig. 1 Effects of the mixture of SO₂ and O₃ on photosynthetic electron transport systems. A, DPIP photoreduction; B, NADP-DPIPH₂ system; C, NADP photoreduction.

れた。この混合暴露ではSO₂の影響のみが現れてO₃の存在による阻害の増加はあまり起こらず、SO₂による阻害が大きくなった時には、O₃は保護効果を示すことが分かった。

二酸化窒素とオゾンの複合影響

図2Aは、DPIP光還元反応に対するNO₂とO₃の複合影響を示している。4.0 ppm NO₂単独暴露ではほとんど活性に影響を与えず、30時間暴露でもわずかに5%の活性低下である。しかしながら、これに0.1 ppm O₃が加わった混合暴露では、各暴露時間で明らかな活性低下が見られた。30時間では36%の阻害を示している。

光化学系Iについての影響を見た結果が図2Bである。0.5 ppm SO₂暴露の場合と異なり、4.0 ppm NO₂では光化学系Iの活性も影響を受けているように思われる。O₃とNO₂の混合暴露では、各時間でわずかではあるが阻害の増加が認められた。

光化学系全体についての影響をNADPおよびNADP-NH₄Cl系についてみたのが図2Cおよび図2Dである。NO₂単独で見られる阻害が、混合暴露で大きく相乗的に増加している。また阻害度は経時的に増加している。

以上の結果から、単一ガスでは活性低下を全く引き起こさない0.1 ppm O₃が、4.0 ppm NO₂と混在することにより明らかな活性阻害を引き起こすことが示された。この複合影響は光化学系IおよびIIの両方に及んでいる。この点は、SO₂とO₃の混合系が光化学系IIのみを阻害したことと異なっている。

二酸化硫黄と二酸化窒素の複合影響

図3Aに、0.5 ppm SO₂と4.0 ppm NO₂の混合暴露のDPIP光還元にあらず複合影響を示した。活性は暴露時間の経過と共に低下し、30時間後には約55%の阻害に達した。

光化学系Iへの影響は図3Bに示している。混合暴露の場合、10時間前後で活性の促進が見られた。しかし30時間になると阻害効果を示した。

光化学系全体についての影響を見た場合も、図3Cおよび図3Dでみられるように、光化学系Iへの影響の際に現れた10時間前後の活性促進が認められた。

以下の結果は、NO₂がSO₂に混在すれば、光化学系Iの反応が暴露初期の10時間前後に促進され、その後30時間を経ると阻害を受けるようになり、光化学系IIの反応は経時的に阻害を受けて行くことを示している。

二酸化硫黄、二酸化窒素及びオゾンの3種混合暴露による複合影響

図4AはSO₂、NO₂およびO₃の3種混合暴露によるDPIP光還元の活性の変化を経時的に調べた結果である。暴露30時間で阻害度50%である。この値は全ての2種混合暴露による阻害度より大きい。しかし、20時間以前では他の場合と差のない阻害度である。全体の傾向としては、NO₂+SO₂の場合に近い変化を示している。

図4Bは、NADP-DPIP-H₂系に対する影響について調べた結果である。光化学系Iの活性に

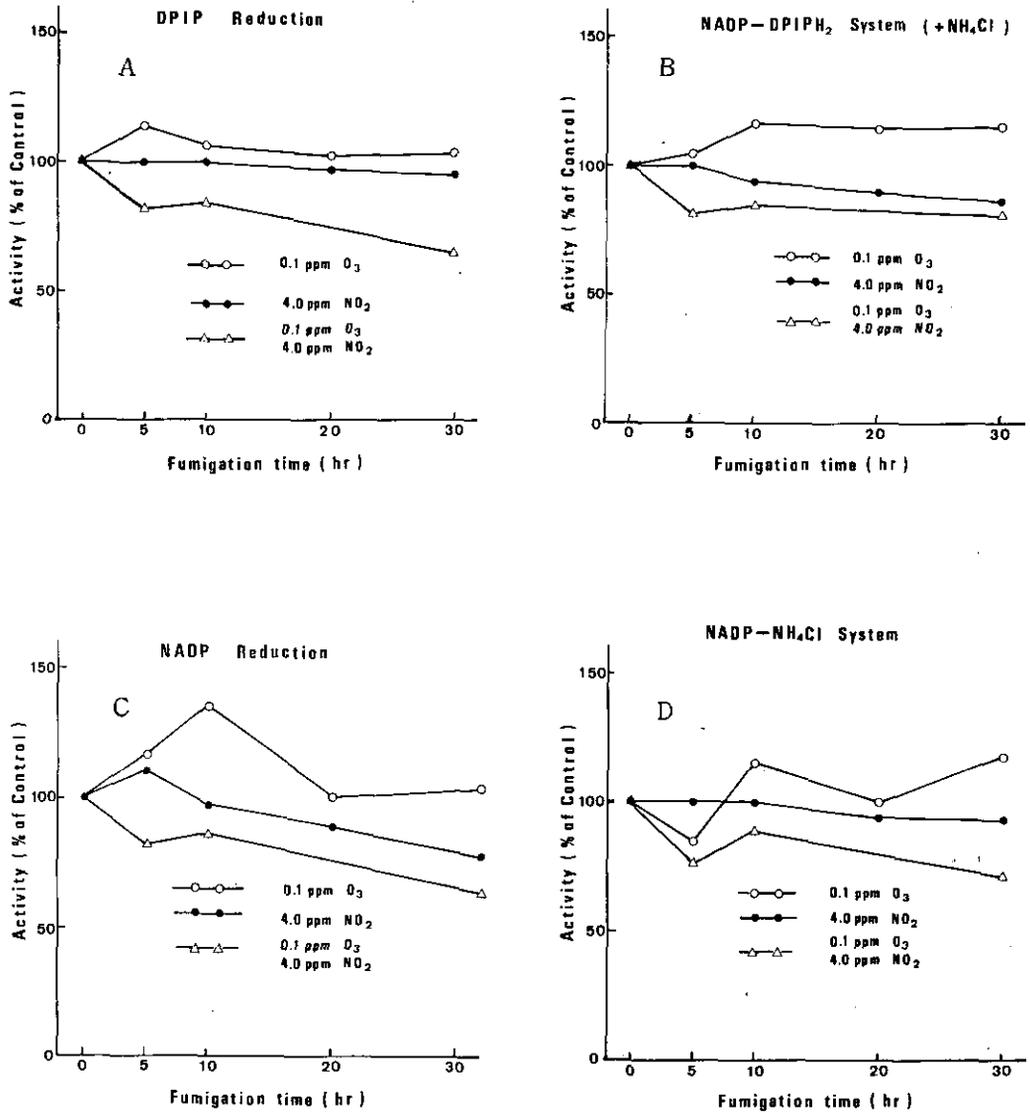


図2 NO₂とO₃の混合暴露による光合成電子伝達系への影響。A, DPIP光還元反応; B, NADP-DPIPH₂系; C, NADP光還元反応; D, NADP-NH₄Cl系。

Fig. 2 Effects of the mixture of NO₂ and O₃ on photosynthetic electron transport systems. A, DPIP photoreduction; B, NADP-DPIPH₂ system; C, NADP photoreduction; D, NADP-NH₄Cl system.

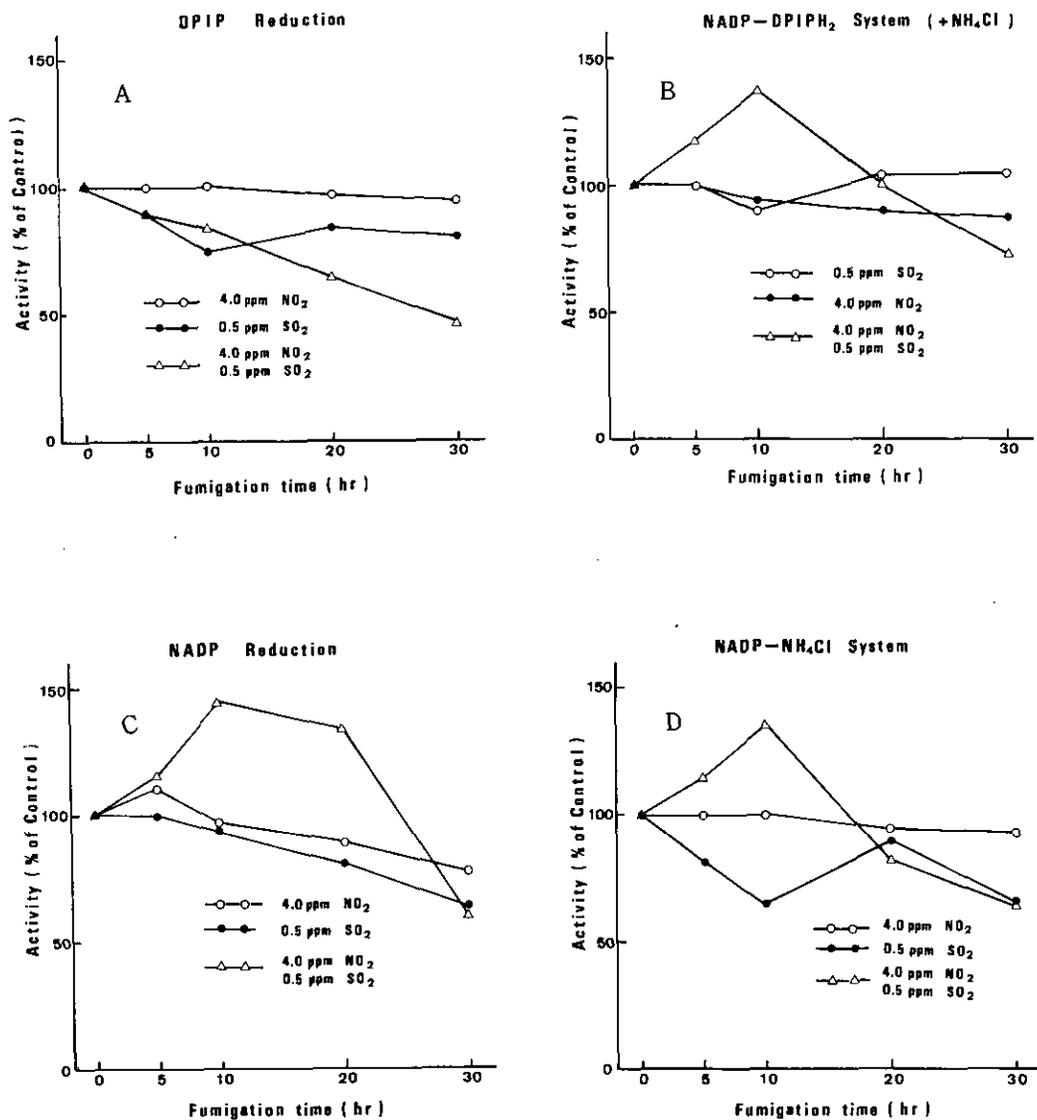


図3 SO₂とNO₂の混合暴露による光合成電子伝達系への影響。A, DPIP 光還元反応; B, NADP-DPIP₂系; C, NADP 光還元反応; D, NADP-NH₄Cl系。

Fig. 3 Effects of the mixture of SO₂ and NO₂ on photosynthetic electron transport systems. A, DPIP photoreduction; B, NADP-DPIP₂ system; C, NADP photoreduction; D, NADP-NH₄Cl system.

対する3種混合暴露の影響は、他の2種混合暴露の場合の平均的な変化を示しているように思われる。10～20時間では活性は促進され、30時間では阻害されている。30時間で阻害が現れる場合は、全てNO₂の存在する混合暴露であった。

光化学系全体に対する影響をNADPの光還元について調べた結果が図5である。NO₂+SO₂の2種混合暴露の際にみられた20時間以前の活性促進は、3種混合暴露の場合でも残存しているように見える。30時間では活性阻害が現れることもNO₂+SO₂の場合と近似している。

以上の結果から、3種混合暴露による複合影響は、NO₂+SO₂の2種混合暴露の影響と類似しており、NO₂の存在が長時間暴露の際の阻害につながることを示された。

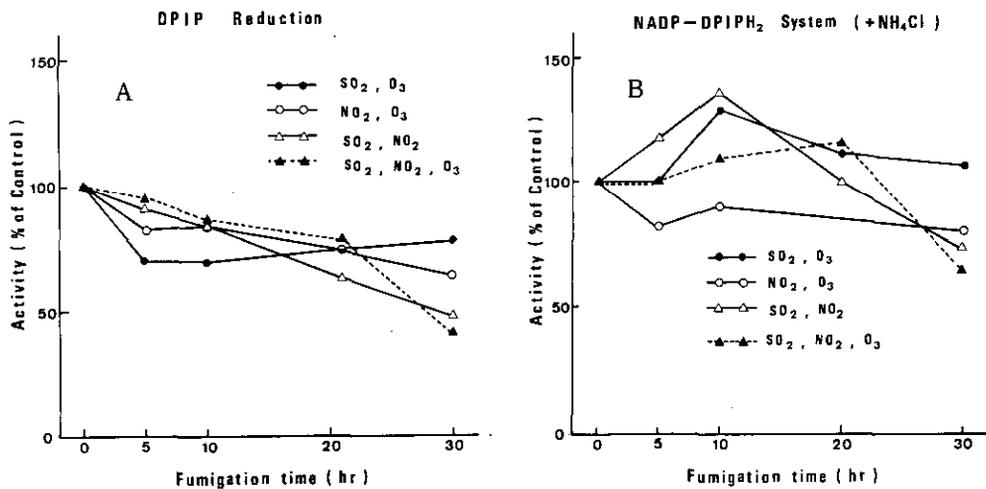


図4 SO₂、NO₂およびO₃の混合暴露による光合成電子伝達系への影響。A, DPIP光還元反応； B, NADP-DPIP₂系。

Fig. 4 Effects of the mixture of SO₂, NO₂ and O₃ on photosynthetic electron transport systems. A, DPIP photoreduction; B, NADP-DPIP₂ system.

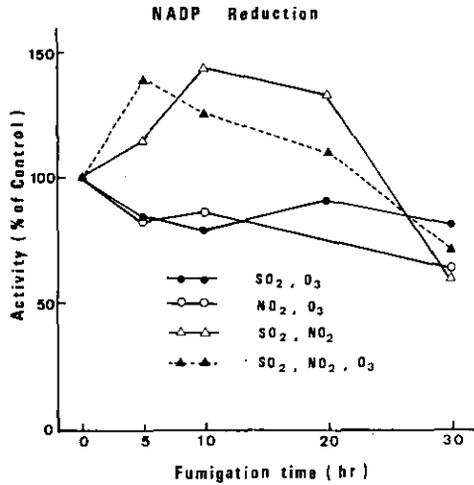


図5 SO₂, NO₂およびO₃の混合暴露によるNADP光還元反応への影響
 Fig. 5 Effects of the mixture of SO₂, NO₂ and O₃ on NADP photoreduction

考 察

今回の研究に用いた大気汚染物質の種類と濃度は、SO₂, 0.5ppm, NO₂, 4.0ppm, O₃, 0.1ppmである。実験結果から分かるように、これらの単一ガスの光化学系IおよびIIの反応に及ぼす影響は、反応の阻害に関して見る限り、O₃では暴露30時間まで全くなく、SO₂とNO₂では、それぞれの障害発現のしきい値を越えるか越えないかは、暴露時間の長さによって左右される状態であった。このような条件を念頭において結果を考察して行く。

SO₂とO₃の複合影響では“SO₂効果”が明確に示された。すなわち、系Iは阻害されずに系IIだけが特異的に阻害された。NADP光還元活性に対する影響で(図1C)、SO₂単独での阻害が30時間暴露で大きくなった時にO₃が阻害を軽減する保護効果を示した。可視障害と気孔抵抗の変化に対する同様な保護効果がいくつか報告されているが(2, 3)、その原因に関しては明確な解答は得られていない。

今回の生理機能阻害の保護効果は、細胞質内でSO₃²⁻イオンがある濃度以上に蓄積されると、生体に侵入したO₃と直接反応するようになり、SO₃²⁻への酸化が起って(6)無毒化される可能性があるが推論の域をでない。

NO₂とO₃の複合影響で見られたO₃の阻害誘起は、光化学系IおよびIIの両方に及んでいる(図

2A~2D)。この原因として考えられることは、NO₂単独暴露で植物体内に生じる亜硝酸イオンは代謝系によって有害濃度以下まで代謝されるが、O₃の共存によって代謝系が何らかの影響を受け、NO₂が有害濃度にまで蓄積するために阻害が生ずるとする可能性である。しかしこれも推測であり、正確な原因は今後の研究に待たねばならない。

NO₂とSO₂の複合影響では、光化学系Iの反応が暴露10時間前後で促進され、30時間では阻害されることが示された(図3B)。この活性促進は光化学系全体についての影響を見た場合にも現れてきている(図3C, 3D)。このような現象は今までに例を見ないものであり、現在までに得られた知見では説明しがたい。今後の研究課題として興味を持たれる。30時間での阻害は光化学系IとIIの両方で見られるが、全体系(系I+系II)としての阻害度は増加していない。このことは各光化学系の阻害を受けない部分が十分機能すれば、阻害の増加が現れないことを示唆している。

SO₂、NO₂及びO₃の3種複合影響では、光化学系I及びIIの両方について、NO₂+SO₂の場合を近似した影響が見られている。また、光化学系IIの30時間暴露の阻害度が、NO₂+SO₂の2種複合影響と大差ないのは、O₃の効果が弱いためにNO₂の効果によってマスクされたのかも知れない。一方、光化学系Iへの複合影響を考えると、SO₂+O₃の2種複合影響を中心に考えると、NO₂が加わることにより30時間での大きな阻害が引き起こされたといえる。また、NO₂+SO₂の影響を基本的に考えるならば、この系にO₃が加わることによりNO₂+O₃でみられたような阻害促進が起こって、10時間暴露での活性促進が相殺され、30時間暴露では阻害の増加が現れていると考えられる。また、“SO₂効果”を中心に考えるならば、NO₂の存在がすべて光化学系Iの阻害を引き起こしていると考えられることができる。

以上述べてきたことを総括すると、NO₂の存在が阻害発現に大きく関与していることが分かる。このことは今回使用した汚染物質のうち、NO₂の4.0 ppmという濃度条件が他のO₃やSO₂の濃度条件より、より厳しく植物に作用した、つまり障害発現のしきい値をより越え易い条件であったことを示唆している。従って、O₃の濃度を、しきい値を越える0.2 ppmにしたならば、O₃を中心とした阻害効果が現れる可能性がある。

本研究は、阻害機能の明らかな“SO₂効果”を指標として、他の汚染物質の影響解明を期待して行われたが、結果は複雑であった。今後の問題点として、複数の汚染物質の同時暴露でなく、交互暴露(5)あるいは順次暴露を行ってみてその影響を解析して行く必要がある。複合汚染の機作の解明のため今後一層の研究が望まれる。

引用文献

1. 荒井邦夫・戸塚 績. 1980. 複合大気汚染の影響. 昭和54年度環境庁委託業務結果報告書, 複合大気汚染による生体影響(植物影響): 71-84

2. Beckerson, D. W. and G. Hofstra. 1979. Stomatal responses of white bean to ozone and sulfur dioxide singly or in combination. *Atmos. Environ.* 13: 533-535
3. Heagle, A. S. and J. W. Johnston. 1979. Variable responses of soybeans to mixtures of ozone and sulfur dioxide. *J. Air Pollut. Cont. Assoc.* 29: 729-732
4. Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solution. *J. Biol. Chem.* 140: 315-322
5. 松島二良. 1971. 植物に対する亜硫酸ガスとオキシダントの複合害について. 産業公害7: 218-224
6. Penkett, S. A. 1972. Oxidation of SO₂ and other atmospheric gases by ozone in aqueous solution. *Nature (Physic. Sci.)* 240: 105-106
7. Shimazaki, K. and K. Sugahara. 1979. Specific inhibition of photosystem II activity in chloroplasts by fumigation of spinach leaves with SO₂. *Plant & Cell Physiol.* 20: 947-955
8. Shimazaki, K. and K. Sugahara. 1980. Inhibition site of the electron transport system in lettuce chloroplasts by fumigation of spinach leaves with SO₂. *Plant & Cell Physiol.* 21: 125-135
9. Tingey, D. T., R. A. Reinert, J. A. Dunning and W. W. Heck. 1973. Foliar injury responses of eleven plant species to ozone/sulfur dioxide mixtures. *Atmos. Environ.* 7: 201-208

Summary

After exposure of 0.5 ppm sulfur dioxide (SO₂), 4.0 ppm nitrogen dioxide (NO₂) and 0.1 ppm ozone (O₃) singly or in combination for 5-30 h to spinach plants, effects of the air pollutant mixtures on photosynthetic electron transport systems were analyzed about photosystem I and II by using chloroplasts isolated from the exposed spinach leaves.

- 1) On the exposure of the mixture of SO₂ and O₃, the inhibition of photosystem II reaction was not enhanced significantly than that with SO₂ alone. In the case of more than 30% inhibition, it was suggested that O₃ might protect photosystem II from SO₂. Photosystem I was not injured by the mixture.
- 2) On the exposure of the mixture of NO₂ and O₃, both reactions of photosystem I and II were inhibited significantly. Especially, the inhibition of photosystem II reaction was synergistic, whereas that with O₃ or NO₂ singly was not observed.
- 3) On the exposure of the mixture of SO₂ and NO₂, photosystem I reaction was enhanced at 10 h fumigation, but inhibited at 30 h fumigation. The inhibition of photosystem II reaction increased gradually with the time of fumigation and reached 50% after 30 h.
- 4) On the exposure of the mixture of SO₂, NO₂ and O₃, there was a tendency that the enhancement of photosystem I reaction, observed by fumigation with SO₂ and NO₂ for 10 h, was suppressed by O₃ participation. The inhibition pattern of photosystem II reaction almost resembled to that caused by the mixture of SO₂ and NO₂.
- 5) All of the mixtures containing NO₂ caused injury of photosystem I and II after 30 h fumigation, especially, the photosystem II reaction was inhibited severely.

From these results, possible mechanisms were discussed about the effects of the air pollutant mixtures on plants.

Key words: Air pollutant mixture - Electron transport - Chloroplasts - Photosystems

II-2

オゾンおよび二酸化窒素暴露による植物の蒸散変化と
アブサイシン酸に対する気孔の感受性増大

近藤矩朗¹・丸田一成²・及川武久³・菅原 淳¹

Changes in transpiration rate and increase in stomatal sensitivity to abscisic acid with fumigation of ozone and nitrogen dioxide

Noriaki KONDO¹, Issey MARUTA², Takehisa OIKAWA³
and Kiyoshi SUGAHARA¹

要 旨

アブサイシン酸 (ABA) 含有量の多い落花生, トマトおよび ABA 含有量の少ないダイコン, ソラマメ, ホウレンソウ, トウモロコシを用いて, 0.5 ppm オゾン (O₃) および 8 ppm 二酸化窒素 (NO₂) 暴露による蒸散速度の変化を調べた。O₃ 暴露の場合, 落花生とトマトは直ちに蒸散低下を示した。トマトはその後ほぼ一定のレベルを保ったが, 落花生は30分でほぼもとのレベルまで回復し, その後, 減少と増加を繰り返した。ダイコンとソラマメは10-30分のラグの後, 30%程度減少した。ダイコンはその後さらに徐々に蒸散低下を示し, ソラマメはほぼ一定のレベルを保った。トウモロコシは30分後から蒸散低下が始まり, わずかずつ減少し続けた。ホウレンソウは暴露開始直後から少しずつ蒸散低下を示した。NO₂ 暴露の場合もほぼ同様で, 特に落花生は極めて類似のパターンを示した。トマト, ダイコン, ホウレンソウは暴露開始後10分で, それぞれ30, 14, 8%減少し, その後ゆっくり減少し続けた。ソラマメとトウモロコシは暴露開始後わずかに蒸散が増加し, その後, 徐々に減少した。

2 ppm の二酸化硫黄 (SO₂), 0.5 ppm O₃ あるいは 8 ppm NO₂ に30分間接触したソラマメの表皮を剥ぎ取り, 表皮中の気孔のアブサイシン酸 (ABA) に対する感受性を調べると, SO₂ 暴露では感受性に変化は見られないが, O₃ および NO₂ 暴露を受けた気孔は ABA による開度減少がより顕著になった。

緒 言

大気汚染物質による植物被害は, 汚染物質の種類および濃度や植物種, 栽培条件等によって支配

1. 国立公害研究所 生物環境部
2. 筑波大学 環境科学
3. 筑波大学 生物科学
1. Division of Environmental Biology, The National Institute for Environmental Studies, Tsukubagakuen, Ibaraki 305
2. The Graduate School of Environmental Science, The University of Tsukuba, Sakura-mura, Ibaraki 305
3. Institute of Biological Science, The University of Tsukuba, Sakura-mura, Ibaraki 305

されるが、被害の程度を決める要因を生理、生化学的な観点から見ると、ガス吸収を支配している気孔の開閉の制御(4, 5, 12, 13, 22), 吸収されたガスの生化学的な無毒化(7, 8, 15)および有毒物質の生成(16-18)とその無毒化(19-21)等に分けて考えることができる。高濃度汚染物質による急性可視障害が気孔を通してのガスの吸収速度に依存することは、特にSO₂について顕著である(2, 5, 23)。このことはO₃やNO₂についても当てはまると考えられるので、これらの汚染物質に関しても同様の検討が必要である。O₃の場合にも、気孔を閉鎖させる条件では被害が軽減されることは知られており(1), O₃による被害と気孔密度および気孔開度との関係についても報告されている(3, 14, 24, 25)。私達はSO₂暴露開始直後の気孔開閉運動とSO₂に対する抵抗性との間に密接な関係のあることを見出した(9, 10, 12, 13)。さらに、このような気孔運動がABAによって制御されている可能性をも示した。本報告では、O₃およびNO₂の場合にもSO₂と同様の気孔運動が見られるかどうか、また、気孔運動とABA含有量の間に関連があるかどうかを明らかにすることを目的として行った実験の結果を述べる。

材料および方法

植物材料：落花生 (*Arachis hypogaea* L. cv. Chibahandachi), トマト (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Fukuju No. 2), ダイコン (*Raphanus sativus* L. cv. Minowase), ソラマメ (*Vicia faba* L. cv. Otafuku), トウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Yellow Dent corn) は温度25℃, 湿度70%に制御した自然光ガラス室にて、それぞれ8, 6, 5, 7, 5週間育成したものをを用いた。ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L. cv. New Asia) は温度昼20℃, 夜15℃, 湿度70%に制御したガラス室で7週間育成したものをを用いた。

ガス暴露および蒸散測定：ガラス室で栽培した植物をガス暴露用グロースキャビネット(170×230×190cm)へ移し、約30 klxの光照射下で25±0.5℃(ホウレンソウの場合は20±0.5℃)湿度75±3%の条件で2時間前処理し、O₃あるいはNO₂をそれぞれ0.5, 8 ppm (moles/moles)になるようにキャビネット内に導入し、一定濃度に制御した。蒸散測定のため、鉢の土壌面をビニールシートで覆い、植物体の重量減少をレコーダーに記録した。ガス暴露終了後、葉の面積を測定し、1時間当たり100cm²の葉から失なわれる水の重さ(g)にて蒸散速度を表した。キャビネット内の風速は0.22m/sであった。

ABAの抽出および定量：0.5 ppm O₃に30-40分間暴露したソラマメと無処理のソラマメの葉を切り取り、天秤の上に氷冷の抽出溶媒60mlを入れた三角コルベンを置き、葉の重量を測りながら溶媒に浸した。抽出溶媒は20mg/l ブチルヒドロキシルエンを含むメタノール-酢酸エチル-酢酸(50:50:1, v/v)である。ホモゲナイザーで磨砕してABAを抽出した。抽出液を濃縮した後、pH 2.5でn-ヘキサン, pH 9でジクロロメタンで洗い、pH 2.5に戻してジクロロメタンにて抽出した。さらに薄層クロマトグラフィで精製した後、ジアゾメタンでメチル化し、ECD付きガスクロ

マトグラフにて分析した。O₃ 処理，無処理とも 3 試料を用いた。

ソラマメの剥離表皮切片における気孔開度測定：ガラス室で栽培したソラマメをグロースキャビネットに移し，約30 klx の光照射下，25℃で約 4 時間前処理し，ガス暴露の直前と，2 ppm SO₂，0.5 ppm O₃ あるいは 8 ppm NO₂ を30分間暴露した直後に葉を切り取り，裏面の表皮を剥ぎ取った。表皮切片は音波破碎機（A 350G，Ultrasonic）を用いて 2 分間音波処理をして使用した。表皮切片を10mM KCl と 0.1mM CaCl₂ を含み，さらに10⁻⁶M ABA を含むかあるいは含まない 1/10 強度の McIlvaine の緩衝液（pH 6.0）10ml に入れ，約30 klx の光照射下，25℃に 2 - 3 時間置いた後，顕微鏡写真を撮影し気孔開度を測定した。

結 果

0.5 ppm O₃ 暴露による蒸散変化を図 1 に示す。O₃ 暴露により，落花生の蒸散速度は直ちに低下した後，回復した。その後35-40分周期で増減を繰り返した。トマトは10分で蒸散速度はほぼ半分に低下し，その後はほぼ一定のレベルを保った。ダイコンは暴露開始後20分から30分で26%蒸散が低下し，わずかに増減を繰り返しながら徐々に減少した。ソラマメは暴露開始後30分から減少し始め，

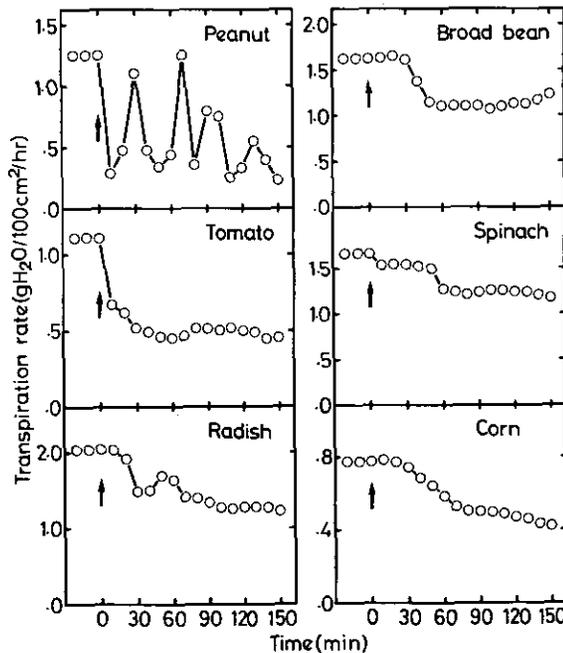


図 1 O₃ 暴露による蒸散変化。矢印で示した 0 時間に O₃ を導入し，0.5 ppm に制御した。

Fig. 1 Changes in transpiration rate with O₃ fumigation. O₃ gas was introduced into the cabinet at 0 time indicated by the arrow to make 0.5 ppm.

50分後には32%減少した。その後はほぼ一定のレベルを保った後、わずかつ回復した。ハウレンソウは暴露開始直後から徐々に減少する傾向を示した。トウモロコシの蒸散は暴露開始20分過ぎから減少した。8 ppm NO₂暴露による蒸散変化を図2に示す。落花生はNO₂に対してもO₃の場合とほとんど同じような蒸散変化を示した。トマトは暴露開始後10分で約30%の蒸散低下を示し、その後、徐々に減少した。ダイコンとハウレンソウは暴露開始後10分でそれぞれ14.8%蒸散が低下し、しばらく一定レベルを保った後、減少を再開し、その後再び一定レベルを保った。ソラマメとトウモロコシは初めわずかに蒸散が増加したが、20-30分後徐々に減少した。多くの場合、これらの結果は良い再現性が得られたが、O₃暴露のダイコンの場合には、暴露開始直後から40-50分間、蒸散が減少を続け、30%前後の低下を示し、その後、徐々に回復するというパターンも見られた。

可視被害を観察すると、NO₂の場合には トマト、ソラマメにわずかにネクロシスが見られることもあるが、どの植物も強い抵抗性を示した。O₃暴露の場合、落花生にはほとんど害徴が認められないが、他の植物はいずれも、葉に顕著な脱水症状を示した。特に、ダイコンの被害は著しかった。

ABA含有量の少ないソラマメがO₃暴露により30分過ぎから顕著な蒸散低下を示したので、O₃暴露によりABA含有量が増加したかどうかを調べた。しかし、表1に示すように、暴露開始30-

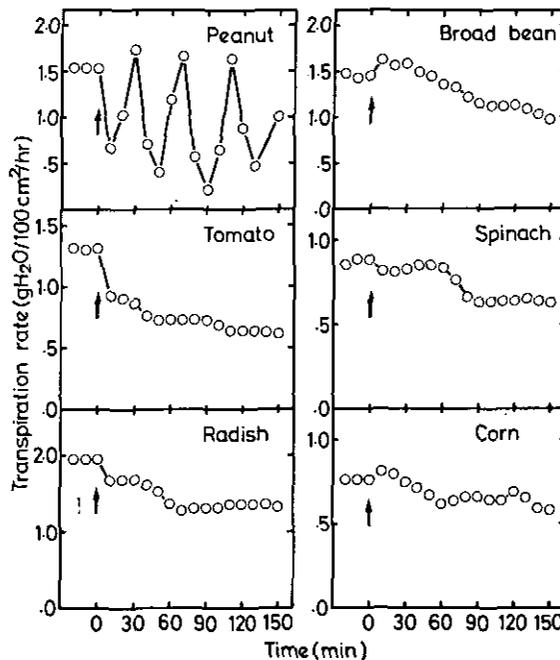


図2 NO₂暴露による蒸散変化。矢印で示した0時間にNO₂を導入し、8 ppmに制御した。

Fig. 2 Changes in transpiration rate with NO₂ fumigation. NO₂ gas was introduced into the cabinet at 0 time indicated by the arrow to make 8 ppm.

40分の時点でABA含有量はむしろ減少していた。

表皮切片の気孔開度の実験結果を表2に示す。それぞれのガス処理は別個体あるいは別の葉に対してなされているため、表の縦の列の数字は比較できない。ABA処理と無処理の気孔開度の比率を比較すると、SO₂暴露の有無によっては差は認められず、O₃およびNO₂暴露の場合には、ABAによる開度減少が促進された。即ち、O₃およびNO₂暴露により気孔のABAに対する感受性が増大した。

表1 O₃暴露によるソラマメのABA含有量の変化
Table 1 Change in ABA content in broad bean leaves with O₃ fumigation

	ABA content ^a (ng/g fr. wt)
Control	8.0 ± 1.3
O ₃ fumigation ^b	4.8 ± 1.7

各試料は3回測定された。

a: 3試料の平均値±標準偏差。

b: 0.5 ppm O₃ に30 - 40分間暴露した。

Each sample measured three times.

a: Average of three samples with standard deviation.

b: Plants fumigated with 0.5 ppm O₃ for 30-40 min.

表2 SO₂, O₃ および NO₂ に暴露されたソラマメ葉の剥離表皮切片の気孔開度に及ぼすABAの影響

Table 2 Effects of ABA on stomatal aperture in epidermal strips peeled from broad bean leaves exposed to SO₂, O₃ and NO₂

		Stomatal aperture (μm) ^a		
		-ABA	+10 ⁻⁶ M ABA	%
SO ₂	0	10.07 ± 0.63 (44)	5.76 ± 0.41 (48)	57
	2 ppm	8.36 ± 0.65 (44)	4.74 ± 0.31 (50)	57
O ₃	0	6.70 ± 0.51 (48)	6.07 ± 0.35 (47)	91
	0.5 ppm	7.93 ± 0.56 (61)	4.89 ± 0.51 (60)	62
NO ₂	0	6.62 ± 0.55 (45)	5.39 ± 0.60 (47)	81
	8 ppm	6.41 ± 0.54 (45)	3.99 ± 0.41 (53)	62

植物体はSO₂, O₃, NO₂ に30分間暴露された。

a: 各値に標準誤差を示した。かっこ内の数字は測定した気孔の数を示す。

Plants fumigated with SO₂, O₃ and NO₂ for 30 min.

a: Each value with standard error. Figures in parentheses representing the number of stomata measured.

考 察

既に報告したように、落花生、トマトの葉は多量のABAを含有しており、ダイコン、ソラマメ、ホウレンソウのABA含有量はほぼ一桁少ない(12, 13)。また、トウモロコシはさらに一桁少ない含有量であった(9-11)。図1および2に示した結果は、O₃およびNO₂暴露開始直後の蒸散変化がABA含有量と密接に関連していることを示している。トウモロコシは、SO₂暴露ではABA含有量が少ないにもかかわらず顕著な蒸散変化を示した(9-11)が、O₃およびNO₂の場合は、そのような変化は見られなかった。SO₂による蒸散変化の機作として、我々は、孔辺細胞あるいはその周辺のpH低下によって、ABAの孔辺細胞への移動が起り、気孔閉鎖が誘導されると考えた(10)。NO₂は水に溶けると硝酸と亜硝酸になるためpH低下を生じる。したがって、SO₂と同様の機作を考えることができるが、NO₂の蒸散低下作用はSO₂と比較してかなり弱い。SO₂は植物体に吸収されると亜硫酸あるいは重亜硫酸となり、酸化されて硫酸となる。大部分は硫酸のまま蓄積される(26)ので、SO₂は強い酸として作用することになる。一方、NO₂は溶けて亜硝酸と硝酸になるが、硝酸は還元されて亜硝酸になり、さらにクロロプラスト中でアンモニアに還元され、アミノ酸に取り込まれる(27, 28)。このように、吸収されたNO₂のほとんどはアミノ酸さらにタンパク質まで代謝されて、酸性物質として蓄積されない。NO₂がSO₂に比べて蒸散低下作用が弱いのはこのためかも知れない。

表2に示したように、SO₂暴露したソラマメ葉の気孔はABAに対する感受性に変化は見られないが、O₃およびNO₂暴露により気孔のABAに対する感受性が増大した。O₃は膜の透過性に影響を与えてK⁺の細胞外への流出を促進し、流入を阻害する(6)。O₃に暴露された気孔がABAに対する感受性が増大したのは、膜の透過性が変化してABAのK⁺流出作用が増幅されたのかも知れない。また、ABAの孔辺細胞への取り込みが増大した可能性もある。NO₂も不飽和脂肪酸と反応することが知られており、膜の透過性に影響を与える。このように、O₃およびNO₂とSO₂の作用機作は異なっていると思われる。

引 用 文 献

1. Adedipe, N. O., H. Khatamian and D. P. Ormrod, 1973. Stomatal regulation of ozone phytotoxicity in tomato. *Z. Pflanzenphysiol.* 68: 323-328
2. Bressan, R. A., L. G. Wilson and P. Fillner, 1978. Mechanisms of resistance to sulfur dioxide in the Cucurbitaceae. *Plant Physiol.* 61: 761-767
3. Dean, D. E., 1972. Stomata density and size as related to ozone-induced weather fleck in tobacco. *Crop Science* 12: 457-548
4. Furukawa, A., O. Isoda, H. Iwaki and T. Totsuka, 1979. Interspecific differences in responses of transpiration to SO₂. *Environ. Control in Biol.* 17: 153-159
5. Furukawa, A., O. Isoda, H. Iwaki and T. Totsuka, 1980. Interspecific difference in resistance to sulfur dioxide. In *Studies on the Effects of Air Pollutants on Plants and Mechanisms of Phytotoxicity*. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. No.11: 113-126

6. Heath, R. L., 1975. Ozone. In *Responses of Plants to Air Pollution*. (edit. by J. B. Mudd and T. T. Kozlowski), p.23-55, Academic Press Inc.
7. Kondo, N., Y. Akiyama, M. Fujiwara and K. Sugahara, 1980. Sulfite oxidizing activities in plants. In *Studies on the Effects of Air Pollutants on Plants and Mechanisms of Phytotoxicity*. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. No.11: 137-150
8. 近藤矩朗・秋山洋子・藤原 誠・菅原 淳・岩城英夫, 1979. 植物における亜硫酸酸化活性, 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究. 昭和51/53年度特別研究報告. 国立公害研究所研究報告 第10号: 61-76
9. Kondo, N., I. Maruta and K. Sugahara, 1980. Abscisic acid-dependent changes in transpiration rate with SO₂ fumigation and the effects of sulfite and pH on stomatal aperture. In *Studies on the Effects of Air Pollutants on Plants and Mechanisms of Phytotoxicity*. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. No.11: 127-136
10. Kondo, N., I. Maruta and K. Sugahara, 1980. Effects of sulfite and pH on abscisic acid-dependent transpiration and on stomatal opening. *Plant & Cell Physiol.* 21: 817-828
11. 近藤矩朗・丸田一成・菅原 淳・藤伊 正; 1979. 二酸化硫黄暴露による植物の蒸散変化のアブサイシン酸による制御と気孔開度に及ぼす亜硫酸イオンとpHの影響. 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究. 昭和51/53年度特別研究報告. 国立公害研究所研究報告 第10号: 49-59
12. 近藤矩朗・菅原 淳. 1978. 二酸化イオウに対する植物の抵抗性に関する研究(2). 二酸化イオウ暴露による植物の蒸散変化とアブサイシン酸量との関連について. 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究. 昭和51/52年度研究報告. 国立公害研究所特別研究成果報告 第2号: 66-78
13. Kondo, N. and K. Sugahara, 1978. Changes in transpiration rate of SO₂-resistant and -sensitive plants with SO₂ fumigation and the participation of abscisic acid. *Plant & Cell Physiol.* 19: 365-373
14. Menser, H. A., G. H. Hodges and C. G. McKee, 1973. Effects of air pollution on Maryland (Type 32) tobacco. *J. Environ. Quality* 2: 253-258
15. Miller, J. E. and P. B. Xerikos, 1979. Residence time of sulphite in SO₂ 'sensitive' and 'tolerant' soybean cultivars. *Environ. Pollut.* 18: 259-264
16. 島崎研一郎・榊 剛・菅原 淳, 1979. 二酸化硫黄暴露によるホウレンソウ葉の光合成色素分解と脂質過酸化反応に対する活性酸素の関与. 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究. 昭和51/53年度特別研究報告. 国立公害研究所研究報告 第10号: 87-100
17. Shimazaki, K., T. Sakaki and K. Sugahara, 1980. Active oxygen participation in chlorophyll destruction and lipid peroxidation in SO₂-fumigated leaves of spinach. In *Studies on the Effects of Air Pollutants on Plants and Mechanisms of Phytotoxicity*. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. No.11: 91-101
18. Spedding, D. J. and W. J. Thomas, 1973. Effect of sulphur dioxide on the metabolism of glycollic acid by barley (*Hordeum vulgare*) leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 281-286
19. 田中 浄・菅原 淳, 1979. 二酸化硫黄毒性防御へのスーパーオキシドジスムターゼの関与について. 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究. 昭和51/53年度特別研究報告. 国立公害研究所研究報告 第10号: 77-86
20. Tanaka, K. and K. Sugahara, 1980. Role of superoxide dismutase in the defense against SO₂ toxicity and induction of superoxide dismutase with SO₂ fumigation. In *Studies on the Effects of Air Pollutants on Plants and Mechanisms of Phytotoxicity*. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. No.11: 155-164
21. Tanaka, K. and K. Sugahara, 1980. Role of superoxide dismutase in defense against SO₂ toxicity and an increase in superoxide dismutase activities with SO₂ fumigation. *Plant & Cell Physiol.* 21: 601-611
22. Taylor, O. C., 1973. Acute responses of plants to aerial pollutants. In *Air Pollution Damage to Vegetation*. (edit. by J. A. Naegele), p.9-20. American Chemical Society, Washington, D. C.
23. Thomas, M. D., 1961. Effects of air pollution on plants. In *Air Pollution*. World Health Organization, Geneva, p.233-278

24. Ting, I. P. and W. H. Dugger, 1971. Ozone resistance in tobacco plants: a possible relationship to water balance. *Atmospheric Environ.* 5: 147-150.
25. Turner, N. C., S. Rich and H. Tomlinson, 1972. Stomatal conductance, fleck injury, and growth of tobacco cultivars ranging in ozone tolerance. *Phytopathol.* 62: 63-67
26. Weigal, J. and H. Ziegler, 1962. Die raumliche Verteilung von ^{35}S und die Art der markierten Verbindungen in Spinatblättern nach Begasung mit $^{35}\text{SO}_2$. *Planta* 58: 435-447
27. Yoneyama, T. and H. Sasakawa, 1979. Transformation of atmospheric NO_2 absorbed in spinach leaves. *Plant & Cell Physiol.* 20: 263-266
28. 米山忠克, 1979. 高等植物による大気二酸化窒素(NO_2)の吸収と代謝. 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究. 昭和54年度特別研究報告. 国立公害研究所研究報告 第10号: 343-350

Summary

Changes in transpiration rate with the fumigation of 0.5 ppm ozone (O_3) and 8 ppm nitrogen dioxide (NO_2) were examined, using peanut and tomato plants which contain large amount of abscisic acid (ABA) and radish, broad bean, spinach and corn plants which contain small amount of ABA. The transpiration rate of peanut and tomato was rapidly lowered by exposure to O_3 . Thereafter, the transpiration rate of tomato was almost constant. The rate of peanut increased almost to the initial level and then decreased again. This oscillation continued. The transpiration rate of radish and broad bean declined with O_3 fumigation by about 30% after a lag period of 10 to 30 min. The transpiration rate of corn began to decrease 30 min after the start of fumigation and slowly decreased. The rate of spinach also decreased slowly from the beginning of O_3 fumigation. Peanut exposed to NO_2 showed the transpiration change similar to the change induced by O_3 . The transpiration rate of tomato, radish and spinach declined by 30, 14 and 8%, respectively, 10 min after the start of NO_2 fumigation. Broad bean and corn slightly increased in transpiration rate immediately after the start of fumigation, then decreased gradually.

Stomatal aperture in epidermal strips peeled from broad beans exposed to 0.5 ppm O_3 and 8 ppm NO_2 for 30 min was more largely reduced by 10^{-6} M ABA treatment than the aperture in epidermal strips peeled from non-fumigated broad bean. Sulfur dioxide fumigation gave no effect on the stomatal closure caused by ABA.

Key words: Abscisic acid - Nitrogen dioxide - Ozone - Stomata - Sulfur dioxide - Transpiration.

II-3

オゾン暴露によるホウレンソウ葉の光合成色素の分解について

榊 剛¹・近藤矩朗¹

Destruction of photosynthetic pigments in O₃-fumigated spinach leaves

Takeshi SAKAKI¹ and Noriaki KONDO¹

要 旨

1 ppmのO₃にホウレンソウを暴露すると、約8時間目からクロロフィルa、全カロチノイドが分解しはじめ、12.5時間後には暴露前の含量のそれぞれ80%および60%までに減少した。クロロフィルbは12.5時間目では減少は認められず、22時間目で暴露前の含量の80%に低下していた。O₃暴露葉から抽出した色素を薄層クロマトグラフィーにて対照葉と比較したところ、既存の色素以外の有色物質は検出されなかった。脂質過酸化物の指標のMalondialdehyde (MDA)は、1 ppmのO₃暴露によって8時間目にて2倍以上に増加した。12.5時間後では暴露前の約5倍に達した。

葉内L-アスコルビン酸含量はO₃暴露によって大きく減少し、色素分解のはじまらない6時間目で暴露前の約40%まで低下した。このとき葉内にはデヒドロ-L-アスコルビン酸が増加していた。

1 ppmのO₃に6時間暴露したホウレンソウ葉からリーフディスクを打ち抜き光を照射すると、ディスク内のクロロフィルaおよび全カロチノイドが分解した。しかし暗黒下ではどちらも分解しなかった。また嫌気条件下で光を照射しても、どちらもほとんど分解しなかった。O₂のscavengerのTiron (1, 2-dihydroxybenzene-3, 5-disulfonate), アスコルビン酸をリーフディスクに与えたところ、クロロフィルa、全カロチノイドの分解は阻害された。しかし¹O₂のscavengerのDABCO (1, 4-diazabicyclo-(2, 2, 2)-octane), ¹O₂の寿命を延ばすD₂O, OHのscavengerの安息香酸や蟻酸は、どちらの分解に対しても影響がなかった。

緒 言

オゾン(O₃)暴露によって植物葉のクロロフィルが分解することはよく知られており、多くの種類の植物について報告されている(8, 10)。しかしながら、O₃によるクロロフィル分解の機構についてはほとんど知られていない。

1. 国立公害研究所 生物環境部
1. Division of Environmental Biology, The National Institute for Environmental Studies, Tsukubagakuen, Ibaraki 305

O₃は強い酸化剤であり、O₃暴露によって可視傷害の生じた葉(16)や、O₃をバブリングした葉緑体(9)、クロレラ(3)に不飽和脂質の過酸化反応を示すMalondialdehyde(MDA)が蓄積していることが報告されている。またO₃による植物葉の可視傷害を軽減させる物質として、抗酸化剤や還元剤が効果があることが報告されている(12, 15)。これらのことは、O₃による傷害の少なくとも一部が、O₃、あるいはO₃暴露の結果生じた何らかの酸化力による酸化作用に帰因していることを示している。

私たちは、光合成色素の分解にも上述の酸化作用が関与している可能性を考えた。本研究においては、まずO₃暴露葉における光合成色素の分解およびMDAの蓄積を経時的に調べ、またO₃傷害を抑える物質として知られるL-アスコルビン酸の葉内含量を定量した。更にO₃暴露葉から打ち抜いたリーフディスクのクロロフィル α および全カロチノイドの分解を調べたところ、光と酸素が分解に必要であり、活性酸素の一種のスーパーオキシドアニオン(O₂⁻)が関与していることが示唆された。

材料および方法

植物材料：ハウレンソウ(*Spinacia oleracea* L. cv. New Asia)を昼20℃、夜15℃、湿度70%に制御した自然光温室で鉢植え栽培した。栽培条件については文献(14)の方法に従った。播種後4-5週間目のものを用いた。

ガス暴露：ハウレンソウを鉢ごとガス暴露用キャビネットに移し、温度20℃、湿度75%、照度約3万lx(陽光ランプ)のもとで、1-2時間前処理した。つづいて所定濃度のO₃をキャビネット内に導入した。

光合成色素の定量：ガス暴露後、葉から直径1.5cmのリーフディスクを打ち抜き、80%アセトン中で磨砕して色素を抽出した。クロロフィル α 、 β および全カロチノイドは、Mackinney(11)およびKirkとAllen(7)の方法で分光的に定量した。薄層クロマトグラフィーによる色素の分離は、すでに示した(14)ように色素をジエチルエーテルに移した後に、microcrystallineのセルロースプレート(Avicel SF)に点着し、ヘキサン：アセトン(90：10, v/v)にて展開した。

MDAの定量：O₃暴露葉から経時的にリーフディスクを切り取り、蒸留水を加えてガラスホモジナイザー中で磨砕した。この磨砕液を試料にして、HeathとPackerの方法(6)に従い、チオバルビツール酸を用いて分光的に定量した。

L-アスコルビン酸・デヒドロ-L-アスコルビン酸の定量：Shigeokaらの方法(13)に準じた。暴露葉から得たリーフディスクにメタリン酸を加えて磨砕し、遠心して得られた上清を2,4-dinitrophenylhydrazineとインキュベートし、デヒドロ-L-アスコルビン酸を発色させて分光定量した。また同じ上清にDCIPを加えて、L-アスコルビン酸をすべてデヒドロ-L-アスコルビン酸に酸化し、全デヒドロ-L-アスコルビン酸含量を求め、両者の差からL-アスコルビン酸含量を算出した。

O_3 暴露葉ディスクの照射：1 ppmの O_3 に6時間暴露した葉からリーフディスクを打ち抜き、7枚を1組にして40 mMのリン酸緩衝液 (pH 6.0) に浮かべ、3 - 3.2 万 lx の光を照射した。リーフディスクに種々の試薬を与えるときは、リン酸緩衝液に溶かして陰圧下にてインフィルトレイトし、更に同じ液に浮かべた。また三角フラスコ (100 ml) 内にリーフディスクを浮かべ、窒素ガスを流し続けて嫌気条件をつくった (14)。

結果および考察

1 ppmの O_3 にホウレンソウを暴露すると、1-2時間目から葉面に水浸状の斑点が出現しはじめ、徐々に全体に広がった。7-8時間目までに葉はほぼ乾燥した状態になり、その後白化していった。暴露開始後5時間目および12.5時間目の葉から同一葉面積のリーフディスクを打ち抜き、80%アセトンにて色素を抽出し、吸収スペクトルを対照葉と比較した。5時間暴露では吸収スペクトルは変化しなかった。12.5時間暴露では全体的な吸収の減少がみられたが、新たなピークの出現やピークのシフトは見られなかった。また薄層クロマトグラフィーによってもRf値の異なる新たな色素は検出されなかった。これらのことから、 O_3 暴露によって既存の色素は他の色素に変換されて蓄積されるのではなく、ただちに色のない物質まで分解されていると考えられる。

図1は、1 ppmの O_3 暴露による光合成色素と不飽和脂質の分解を経時的に示している。暴露開

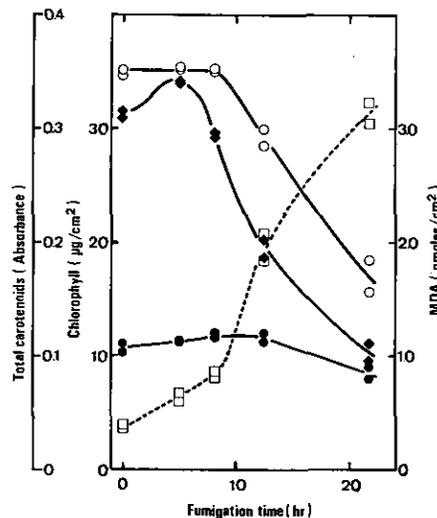


図1 1 ppm O_3 暴露による光合成色素とMDAの葉内含量の変動。クロロフィル a (—○—), クロロフィル b (—●—), 全カロチノイド (—◆—), MDA (…□…)。

Fig. 1 Changes in contents of photosynthetic pigments and MDA in 1 ppm O_3 -fumigated spinach leaves. Chlorophyll a (—○—), Chlorophyll b (—●—), Total carotenoids (—◆—), MDA (…□…)。

始後8時間目までは、色素含量はほとんど変化せず、以後クロロフィルaと全カロチノイドが分解しはじめ、12.5時間目においてそれぞれ80%および60%まで減少した。一方クロロフィルbは、12.5時間目まで分解は認められず、以後わずかに減少しはじめ、22時間で80%まで低下した。不飽和脂質の過酸化分解を示すMDAは、色素分解のはじまる8時間目までに約2倍に増加した。更に、クロロフィルa、全カロチノイドの分解とともに大きく増加し、12.5時間後には約5倍に達した。表1には、0.5 ppmのO₃を暴露したときの光合成色素とMDA含量の変動を、対照に対する百分率で示してある。1 ppm暴露の場合と同じように、8時間目まではクロロフィルa、b、全カロチノイドともほとんど分解せず、以後クロロフィルaと全カロチノイドが大きく減少した。MDA含量は8時間目で約1.5倍になり、14.5時間後には約5倍に増加した(図2)。

次にO₃による可視傷害を抑制することが報告されている還元剤のL-アスコルビン酸(4, 15)およびその酸化物のデヒドロ-L-アスコルビン酸含量を経時的に測定した。0.5 ppm O₃暴露によってL-アスコルビン酸は大きく減少し、色素分解のはじまらない6時間目で暴露前の約40%になった。このとき葉内にはデヒドロ-L-アスコルビン酸が増加していた。

上に示したように、O₃暴露葉内で不飽和脂質やL-アスコルビン酸が酸化分解されていることから、クロロフィルa、全カロチノイドの分解にも何らかの酸化過程が関与している可能性がある。

表2には、1 ppmのO₃に6時間暴露した葉から打ち抜いたリーフディスクを種々の条件下に置いたときの、クロロフィルaおよび全カロチノイド含量の変化を示してある。どちらも光および酸素が存在すると分解することが分かった。このことは、まだ色素分解のはじまらない6時間暴露によって、すでにO₃が存在しなくても分解が進行する条件が整っており、以後の分解にはO₃よりもむしろ酸素に由来する酸化力が関与していることを示唆している。

光と酸素が必要であることから活性酸素の関与を考え、そのscavengerを与えてクロロフィルaと全カロチノイドの分解を調べた(表2)。O₂⁻のscavengerのTiron、アスコルビン酸はクロロフィルaの分解を阻害した。しかし¹O₂のscavengerのDABCOでは、分解はほとんど抑えられな

表1 0.5 ppm O₃ 暴露による光合成色素と MDA 含量の変動
Table 1 Changes in contents of photosynthetic pigments and MDA in 0.5 ppm O₃-fumigated spinach leaves

	Content (%)		
	Fumigation time (h)		
	0	8	14.5
Chlorophyll a	100	99	76
Chlorophyll b	100	103	96
Total carotenoids	100	96	59
MDA	100	155	489

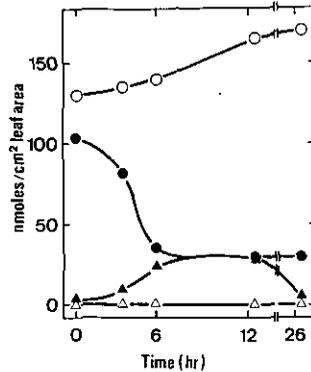


図2 0.5 ppmのO₃暴露によるL-アスコルビン酸 (○, ●) およびデヒドロ-L-アスコルビン酸 (△, ▲) 含量の変化。O₃暴露葉 (●, ▲), 対照葉 (○, △)。

Fig. 2 Effect of 0.5 ppm O₃ fumigation on the contents of L-ascorbate (○, ●) and dehydro-L-ascorbate (△, ▲). ●, ▲: O₃-fumigated, ○, △: non-fumigated.

表2 O₃暴露葉から打ち抜いたリーフディスクのクロロフィルaおよび全カロチノイド含量に及ぼす光, 酸素, および種々の試薬の影響

Table 2 Effect of light, oxygen, and some reagents on the destruction of chlorophyll a and total carotenoids in leaf discs punched from O₃-fumigated leaves

Treatment	Chlorophyll a content (%)	Total carotenoids content (%)
None	100	100
Dark (6 h)	104	96
Light (6 h)	54	37
+N ₂	98	93
+Tiron, 5mM	77	51
50mM	88	62
+Ascorbate, 1mM	76	53
10mM	96	82
+DABCO, 10mM	63	46
100mM	58	44
+D ₂ O	48	28
+Benzoate, 10mM	49	32
+Formate, 10mM	49	32

った。¹O₂の寿命を延ばすD₂Oもほとんど効果はなかった。またOH・のscavengerの安息香酸および巯酸も分解を阻害しなかった。

本報告において、私たちはO₃暴露葉に見られるクロロフィルa、全カロチノイドの分解にO₂⁻が

関与していることを示唆した。 O_2^- は、光照射時に葉緑体電子伝達系から生成する(1)が, superoxide dismutase (SOD) やL-アスコルビン酸などの内生の scavenger によって無害な濃度まで消去されている(1)。しかし、 O_3 暴露によってL-アスコルビン酸含量は、色素分解のはじまる以前に大きく低下する結果が得られており(図2)。これら内生の O_2^- 消去系の失活が、 O_2^- による色素分解に関与している可能性が高い。今後SOD活性についても検討する必要がある。一方、 O_3 暴露によって葉緑体電子伝達系が阻害されることが知られており(2, 5)、 O_2^- の生成経路が電子伝達系なのかどうか疑問である。この点についても、今後色素の分解と電子伝達系の活性との関連を調べなければならない。

O_3 暴露葉には、不飽和脂質過酸化物の指標のMDAが蓄積していた(図1)。脂質過酸化物は O_3 によって生成する(5)が、活性酸素の 1O_2 , $OH\cdot$ によっても生成することが知られている(1)。MDAは光合成色素の分解とともに顕著に増加するが、このとき葉内に O_2^- が生成することが示唆された。従って O_2^- から生じた 1O_2 , $OH\cdot$ が脂質過酸化物を生成している可能性が高い。

私たちは、すでに SO_2 暴露によるクロロフィルaの分解とMDAの生成について報告し、 O_2^- がクロロフィルaの分解に関与していることを示した(14)。本研究において、 O_3 暴露葉におけるクロロフィルaと全カロチノイドの分解も O_2^- によっている可能性が示されたが、このことは、これらの異なった汚染物質が葉内である類似した作用を及ぼしている可能性を示唆している。

引 用 文 献

1. Asada, K., M. Takahashi, K. Tanaka and Y. Nakano. 1977. Formation of active oxygen and its fate in chloroplasts. In *Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen*. (Edit. by O. Hayaishi and K. Asada), p.45-63. University of Tokyo Press, Japan
2. Coulson, C. and R. L. Heath. 1974. Inhibition of the photosynthetic capacity of isolated chloroplasts by ozone. *Plant Physiol.* 53: 32-38
3. Frederick, P. E. and R. L. Heath. 1975. Ozone-induced fatty acid and viability changes in *Chlorella*. *ibid.* 55: 15-19
4. Hanson, G. P., L. Thorne and C. D. Jativa. 1971. Ozone tolerance of petunia leaves as related to their ascorbic acid concentration. In *Proc. 2nd Internat. Clean Air Congr.* (Edit. by H. M. Englund and W. T. Beery), p.261-266. Academic Press, New York
5. Heath, R. L. 1980. Initial events in injury to plants by air pollutants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 395-431
6. Heath, R. L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189-198
7. Kirk, J. T. O. and R. L. Allen. 1965. Dependence of chloroplasts pigments synthesis effect of actidione. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21: 523-530
8. Knudson, L. L., T. W. Tibbitts and G. E. Edwards. 1977. Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. *Plant Physiol.* 60: 606-608
9. Koiwai, A., M. Fukuda and T. Kisaki. 1977. Effect of piperonyl butoxide and diphenylamine on lipid peroxidation in ozonated chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.* 18: 127-139

10. Leffler, H. R. and J. H. Cherry. 1974. Destruction of enzymatic activities of corn and soybean leaves exposed to ozone. *Can. J. Bot.* 52: 1233–1238
11. Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140: 312–322
12. Rich, S. 1964. Ozone damage to plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2: 253–266
13. Shigeoka, S., A. Yokota, Y. Nakano and S. Kitaoka. 1979. The effect of illumination on the L-ascorbic acid content in *Euglena gracilis* Z. *Agric. Biol. Chem.* 43: 2053–2058
14. Shimazaki, K., T. Sakaki, N. Kondo and K. Sugahara. 1980. Active oxygen participation in chlorophyll destruction and lipid peroxidation in SO₂-fumigated leaves of spinach. *Plant & Cell Physiol.* 21:1193–1204
15. Siegel, S. M. 1961. Protection of plants against airborne oxidants: Cucumber seedlings at extreme ozone levels. *Plant Physiol.* 17: 261–266
16. Tomlinson, H. and S. Rich. 1970. Lipid peroxidation, a result of injury in bean leaves exposed to ozone. *Phytopathology.* 60: 1531–1532

Summary

In spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. New Asia) leaves fumigated with 1 ppm O₃, chlorophyll *a* and total carotenoids started to be destroyed in about 8 h after the commencement of fumigation. In 12.5 h, chlorophyll *a* and total carotenoids contents were 80 % and 60 % of the initial ones, respectively. Chlorophyll *b* was not destroyed within 12.5 h and then decreased to 80 % of the initial level in 22 h. Pigments extracted from O₃-fumigated leaves, were chromatographically compared with those from non-fumigated leaves. No new pigments were detected. The amount of malondialdehyde (MDA), an indicator of lipid peroxidation, slightly increased in O₃-fumigated leaves before the destruction of pigments. The increase in MDA became remarkable in accompany with the destruction of the pigments. In the leaves fumigated with 1 ppm O₃, L-ascorbate content decreased and dehydro-L-ascorbate content increased before the beginning of the destruction of pigments.

In leaf disks punched from leaves fumigated with 1 ppm O₃ for 6 h, illumination caused the breakdown of chlorophyll *a* and total carotenoids. Under nitrogen stream, however, it could not cause the pigment destruction. Breakdown of both pigments was suppressed by adding 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate (tiron) and ascorbate, which were O₂⁻ scavengers. But breakdown of chlorophyll *a* and total carotenoids was not affected by 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octane (DABCO), which was ¹O₂ scavenger, or D₂O, which prolonged ¹O₂ lifetime. Benzoate and formate, which were OH[•] scavengers, did not suppress the pigment destruction.

Key words: Active oxygen – Ascorbic acid – Dehydroascorbic acid – Lipid peroxidation – Ozone – Photosynthetic pigments.

II-4

ソラマメ葉肉細胞プロトプラストの単離とその光合成活性
に及ぼす亜硫酸の影響

榊 剛¹・近藤矩朗¹

Isolation of mesophyll protoplasts from broad bean and the effects
of sulfite on its photosynthetic activities

Takeshi SAKAKI¹ and Noriaki KONDO¹

要 旨

ソラマメ葉から、高い光合成活性をもつプロトプラストを高収率で単離するための条件を検討した。ソラマメを播種後3-4週間自然光温室で育成し、更に人工光室(葉面の照度約3万lx, 日長14h)に移し1週間以上生育させると、高収率でプロトプラストを単離することができた。また葉令については、完全に展開したばかりの葉およびそれ以前に展開した2-3葉までを用いると収率がよかった。単離されたプロトプラストの光合成による酸素発生速度は、25℃下では2時間で約60%まで低下するが、氷冷下では1日以上安定だった。酸素発生速度に対する至適温度は30℃であった。至適pHは8.0で、7.0以下で急激に低下し、5.5では酸素発生は行わなかった。また、飽和光強度、飽和NaHCO₃濃度はそれぞれほぼ3万lx, 1.0-1.5mMであった。

ソラマメプロトプラストの光合成による酸素発生速度は、pH8.0においては10mMの亜硫酸を与えても影響を受けなかった。一方、プロトプラストをpH5.0で亜硫酸と1分間インキュベートした後にpH8.0にて測定すると、酸素発生速度は著しく低下していた。亜硫酸による酸素発生速度の阻害率は、インキュベートするときのpHの低下とともに大きくなるが、プロトプラストを単離するソラマメ葉の生育温度および葉令によって異なっていた。

緒 言

二酸化硫黄(SO₂)は気孔から植物葉内に侵入し、葉肉組織細胞に種々の生理生化学的影響を及ぼす。SO₂暴露によって生ずるこれらの影響は、気孔を通したSO₂の吸収量に依存すると考えられる(1, 7)が、SO₂の吸収を支配する気孔開度は、環境条件等の変化によって複雑に変動する。従ってSO₂の作用を定量的に調べるとき、気孔は大きな障害となる。

1. 国立公害研究所 生物環境部
1. Division of Environmental Biology, The National Institute for Environmental Studies, Tsukubagakuen, Ibaraki 305

私たちは上述の問題を除くことができる単純な実験系として、植物葉から単離した葉肉細胞プロトプラストを用いることにした。プロトプラストを用いる利点としては、上に述べた以外に次の点が上げられる。

- ① 細胞壁がなく細胞への直接影響を調べられる。
- ② 細胞内顆粒を比較的容易に単離できるため、プロトプラストに施したSO₂処理の、顆粒に対する影響を調べられる。
- ③ 植物器官および細胞間におけるSO₂の移動および代謝産物の転流の影響を除くことができる。
- ④ 懸濁液として定量的に取り扱うことができる。

私たちは、葉肉細胞プロトプラストの光合成活性に及ぼす亜硫酸の影響を調べることを目的として、ソラマメから高い光合成活性をもつプロトプラストを安定して単離できる条件を検討した。また、このプロトプラストを用いて亜硫酸による光合成活性阻害の予備実験を行った。

材料および方法

植物材料：ソラマメ (*Vicia faba* L. cv. Otafuku) 葉を材料として使用した。昼20℃、夜15℃、相対湿度70%の自然光温室で3-4週間生育させた後に、同じ温度、湿度に制御し、葉面に約3万 lxの照度をもつ人工光室(日長14h)に移し、更に1週間以上栽培した。また、昼25℃、夜20℃、相対湿度70%の自然光温室で育成したのもも用いた。

プロトプラストの単離：材料とする葉の裏面の表皮を除去した後に2cm角程度に切り、200mlの三角フラスコ中で酵素液(10-15葉/50ml)を真空浸透した。酵素液の組成は、0.5%(w/v)マセロチームR-10、2%(w/v)セルラーゼ・オノヅカR-10、0.5%(w/v)デキストラン硫酸カリウム、0.2%(w/v)BSA、1mM CaCl₂、0.6M マニトール(pH 5.5)である(3, 10)。約2万 lxの光照射下、28℃で2時間往復振とうを行い、プロトプラストを単離した。振とう開始後10分までに遊離したものは捨てた。振とう終了後、58μmのナイロンメッシュで濾し、濾液を低速遠心してプロトプラストを集め、更に0.6M マニトール液で2回遠心して洗浄した。得られたプロトプラストは測定まで0.6M マニトール液中に懸濁して氷冷保存した。プロトプラストの形態は光学顕微鏡で確認した。

光合成活性の測定：酸素電極を用いてプロトプラストの光合成による酸素発生速度を測定した。測定時の反応混液は、50mM Hepes-NaOH(pH 8.0)、1mM EDTA、0.6M マニトール、および基質として通常10mMのNaHCO₃から成っている。測定は25℃で行った。光源として100V-300Wのタングステンランプを用い、5万 lxの光を照射した。攪拌は、プロトプラストがつぶれないよう低速で行った。

結果および考察

材料の選択：自然光温室で生育したソラマメを材料に用いると、単離条件を一定にしても、日によって無傷プロトプラストの収率は大きく変動した。これはソラマメ葉の葉令と、生育時の環境条件の違いによるものと思われる。自然光温室で生育したソラマメを、温度・湿度を同じ条件に制御した人工光室に移して1週間以上生育させると、高い収率で光合成活性の安定したプロトプラストが得られるようになった。このことは、ソラマメ生育時の光条件が重要な要因であることを示している。また葉令については、若い葉を用いると酵素処理時間が短くて済むがつぶれやすかった。完全に展開したばかりの葉、およびそれ以前に展開した2-3葉までを用いると高い収率でプロトプラストが単離できた。

単離の条件：酵素液の組成、pH、および酵素処理温度は「材料および方法」に示した。BSAを加えると、しばしば無傷プロトプラストの収率が増加した(10)。往復振とうの速度は遅すぎると単離に要する時間が長くなり、速すぎるとつぶれたプロトプラストが増した。本実験では、振幅4.5 cm、振とう速度80回/分で1.5-2時間インキュベートした。酵素処理時に光を照射するとプロトプラストの収率とその炭酸固定能が増加することが報告されており(5)、本実験においても通常2万 lxの光を照射しながら単離した。

このようにして得られたプロトプラストの光合成による酸素発生速度は、高いもので130-140 $\mu\text{moles O}_2$ 発生 $\cdot \text{mgchl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ の活性を示した。以下の実験には、60 $\mu\text{moles O}_2$ 発生 $\cdot \text{mgchl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 以上の活性をもつものを使用した。

単離プロトプラストの保存：単離したプロトプラストを25℃に放置すると、酸素発生速度は漸次低下し、2時間目で単離直後の活性の60%になるが、氷冷下では24時間以上活性が保持されていた。しかし長時間氷冷保存したプロトプラストは、光合成活性を保持していても原形質膜に損傷を受けている可能性がある(2)ので、得られた材料はその日のうちに使用した。

酸素発生速度の測定：プロトプラストは暗黒下では呼吸によると考えられる酸素の吸収が起こるが、光を照射すると光合成による酸素発生を開始する(図4, A参照)。酸素発生速度に及ぼす温度、光強度、 NaHCO_3 の濃度、およびpHの影響を調べた。温度は30℃のときに最大の活性を示した。光強度はほぼ3万 lxで飽和し(図1)、 NaHCO_3 濃度は1.0-1.5 mMで飽和した(図2)。溶液のpHは8.0のとき最大で、7.0以下で急激に減少し、5.5では酸素発生は行わなかった(図3)。また酸素発生は、光合成電子伝達系の阻害剤であるDCMU(5 μM)によってほぼ完全に阻害された。これらのことは、本実験において単離された葉肉細胞プロトプラストが、他の研究者によって報告されたプロトプラストの光合成活性(3, 5, 10)に較べて十分高い値を持っており、光合成に関する種々の研究を行うのに適当な材料であることを示している。以下の測定は温度25℃、光強度5万 lx、 NaHCO_3 濃度10mM、pH 8.0にて行った。

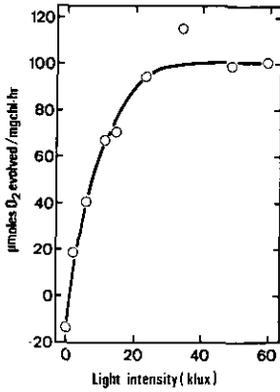


図1 ソラマメプロトプラストの光合成による酸素発生速度に及ぼす照射光強度の影響

Fig. 1 Effect of light intensity on the rate of photosynthetic O₂ evolution in broad bean mesophyll protoplasts

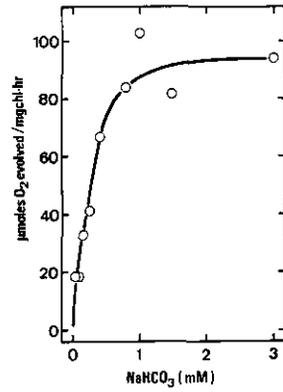


図2 ソラマメプロトプラストの光合成による酸素発生速度に及ぼすNaHCO₃濃度の影響

Fig. 2 Effect of NaHCO₃ concentration on the rate of O₂ evolution in broad bean mesophyll protoplasts

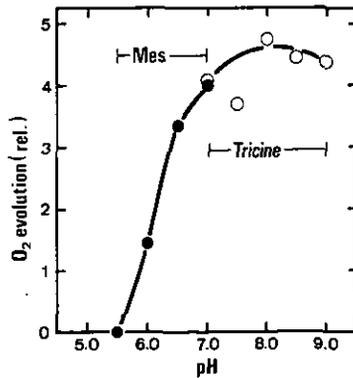


図3 ソラマメプロトプラストの光合成による酸素発生速度に及ぼすpHの影響
Fig. 3 pH Dependence of the rate of photosynthetic O₂ evolution in broad bean mesophyll protoplasts

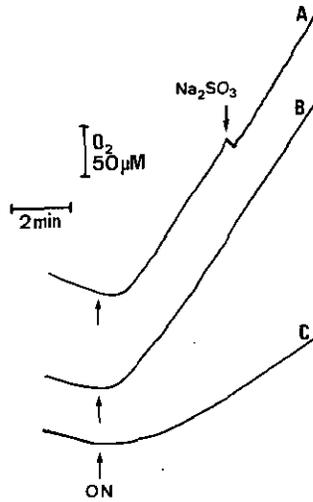


図4 ソラマメプロトプラストの酸素発生速度に及ぼす亜硫酸の影響。pH 8.0にて活性を測定した。矢印の所で10mM Na_2SO_3 を与えた(A)。またpH 5.0で0 mM(B), 10mM(C)の Na_2SO_3 と1分間インキュベートした後、pH 8.0にて測定した。

Fig. 4 Effect of Na_2SO_3 on the rate of O_2 evolution in broad bean mesophyll protoplasts. Assay was performed at pH 8.0. The arrow indicates the addition of 10 mM Na_2SO_3 (A). Protoplasts were incubated with 10 mM Na_2SO_3 (C) or without Na_2SO_3 (B) at pH 5.0 for a minute before assayed at pH 8.0.

亜硫酸の影響：図4に亜硫酸(Na_2SO_3)を与えたときの酸素発生速度を示す。測定時に10mMの亜硫酸を与えても阻害は起こらなかった。次にpH 5.0において10mMの亜硫酸とプロトプラストを氷冷下で1分間インキュベートした。インキュベート液は10mM Na_2SO_3 , 1mM EDTA, 5mM クエン酸緩衝液(pH 5.0), および0.6 M マニトールである。次いで最終濃度50mM, pH 8.0になるようにHepes緩衝液を加えた。このような処理をしたプロトプラストの酸素発生速度は著しく低下していた。亜硫酸を加えずにpH 5.0で処理をしても、pH 8.0における活性は低下しなかった。そこでpH 5.0および8.0において、種々の濃度の亜硫酸と1分間インキュベートしたときの酸素発生速度を調べた(図5)。pH 5.0では、1mMで70%, 10mMで35%まで低下するが、pH 8.0においては10mMで95%と、ほとんど阻害されなかった。図6は、亜硫酸を与えるときのpHと酸素発生活性の阻害との関係を示している。pHの低下に伴って阻害が大きくなった。以上の結果は、亜硫酸による光合成活性の阻害に溶液中のpH低下が大きく寄与していることを示している。Paul および Bassham は、ケシ葉肉細胞の光合成活性が亜硫酸によって阻害されず、むしろ促進されることを報告した(8)が、このときpH 8.0で亜硫酸を与えて実験を行っている。また地衣類(4, 9) およびコケ(6)を用いた実験では、亜硫酸あるいは SO_2 の水溶液による光合成活性の阻害が、pHの低下

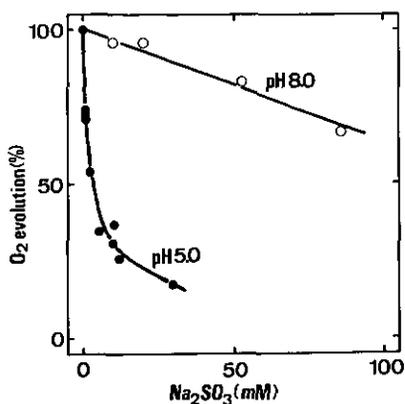


図5 プロトプラストの酸素発生速度に及ぼす亜硫酸の濃度依存性。pH 5.0 および 8.0 において、図4 と同じ方法でプロトプラストを亜硫酸とインキュベートした。

Fig. 5 Effect of Na₂SO₃ concentration on the rate of O₂ evolution in broad bean mesophyll protoplasts. Incubation of protoplasts with Na₂SO₃ at pH 5.0 and 8.0 was performed as described in Fig. 4.

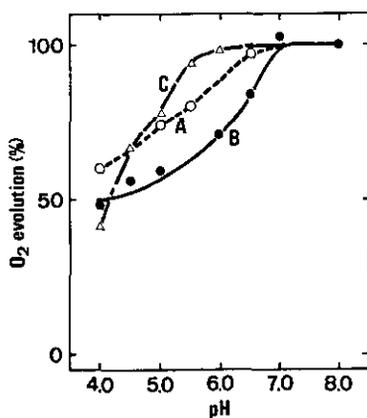


図6 酸素発生活性に及ぼす亜硫酸処理時の pH の影響。20°C で育成したソラマメの完全展開直後の葉 (A), 完全展開後 2 週間目の葉 (B), および 25°C で育成したソラマメの完全展開直後の葉 (C) からプロトプラストを単離した。各 pH で 10 mM の Na₂SO₃ と 1 分間インキュベートした後に pH 8.0 で測定した。

Fig. 6 Effect of pH of the incubation medium with Na₂SO₃ on the rate of O₂ evolution in broad bean mesophyll protoplasts. Protoplasts were isolated from youngest leaves fully developed grown at 20°C (A), the leaves 2 weeks after fully developed grown at 20°C (B), and youngest leaves fully developed grown at 25°C (C). Assay was performed at pH 8.0 after incubation with 10 mM Na₂SO₃ for a minute at various pH.

とともに大きくなることが報告されている。これらのことは、私たちの実験結果と一致している。pH低下が光合成活性の阻害に大きく影響を及ぼす原因については、私たちは亜硫酸の細胞内取り込みがpHの低下とともに促進されている可能性を考えており、現在³⁵S-亜硫酸を用いて検討している。

生育条件および葉令の異なる材料から単離したプロトプラストを用いて亜硫酸による阻害を調べた(図6)。どのプロトプラストを用いてもpHの低下につれて阻害が顕著になるが、同じpHで処理をしても材料が異なると阻害率は大きく変化した。即ち、生育条件や葉令の違いによって亜硫酸に対する感受性が変わることが分かった。このことはSO₂に対する植物葉の感受性の差異の一部を反映しているのかもしれない。

私たちは葉肉細胞プロトプラストの単離条件を検討し、高い光合成活性をもつプロトプラストを単離した。更に亜硫酸がプロトプラストの光合成活性を阻害する条件を見出した。今後亜硫酸による阻害の機作を明らかにし、SO₂による光合成阻害の機作との関連を検討していく予定である。

引用文献

1. Bressan, R. A., L. G. Wilson and P. Filner. 1978. Mechanisms of resistance to sulfur dioxide in the Cucurbitaceae. *Plant Physiol.* 61: 761-767
2. Douce, R.・西村幹夫・赤沢 堯. 1980. グリコール酸酸化酵素による緑葉プロトプラストのIntactnessの測定. 日本植物生理学会1980年度年会. 講演要旨集 p. 148
3. Edwards, G. E., S. P. Robinson, N. J. C. Tyler and D. A. Walker. 1978. Photosynthesis by isolated protoplasts, protoplast extracts, and chloroplasts of wheat. *Plant Physiol.* 62: 313-319
4. Hill, D. J. 1971. Experimental study of the effect of sulphite on lichens with reference to atmospheric pollution. *New Phytol.* 70: 831-836
5. Huber, S. C. and G. E. Edwards. 1975. An evaluation of some parameters required for the enzymatic isolation of cells and protoplasts with CO₂ fixation capacity from C₃ and C₄ grasses. *Physiol. Plant.* 35: 203-209
6. Inglis, F. and D. J. Hill. 1974. The effect of sulphite and fluoride on carbon dioxide uptake by mosses in the light. *New Phytol.* 73: 1207-1213
7. Kondo, N. and K. Sugahara. 1978. Changes in transpiration rate of SO₂-resistant and -sensitive plants with SO₂ fumigation and the participation of abscisic acid. *Plant & Cell Physiol.* 19: 365-373.
8. Paul, J. S. and J. A. Bassham. 1978. Effects of sulfite on metabolism in isolated mesophyll cells from *Papaver somniferum*. *Plant Physiol.* 62: 210-214
9. Puckett, K. J., E. Nieboer, W. P. Flora and D. H. S. Richardson. 1973. Sulphur dioxide: its effect on photosynthetic ¹⁴C fixation in lichens and suggested mechanisms of phytotoxicity. *New Phytol.* 72: 141-154
10. Rathnam, C. K. M. and G. E. Edwards. 1976. Protoplasts as a tool for isolating functional chloroplasts from leaves. *Plant & Cell Physiol.* 17: 177-186
11. Takebe, I., Y. Otsuki and S. Aoki. 1968. Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. *ibid.* 9: 115-124

Summary

Some factors affecting the isolation of mesophyll protoplasts from broad bean were examined with respect to yield and photosynthetic capacity. Protoplasts were prepared with high yield from leaves grown in a glass house under sunlight for 3–4 weeks and grown further in a growth cabinet under ca. 30,000 lx (daytime : 14 h) for more than a week. Isolation from 3–4 youngest leaves fully developed gained the high yields. The rate of photosynthetic O₂ evolution of isolated protoplasts was decreased to 60 % of the initial rate in 2 h at 25°C, but was stable for more than 24 h at 4°C. The optimum temperature of O₂ evolution was 30°C. The rate of O₂ evolution with pH optimum at 8.0 decreased as the pH of the solution lowered. Oxygen was not evolved at pH 5.5. Saturating light intensity and saturating concentration of NaHCO₃ of O₂ evolution were ca. 30,000 lx and 1.0–1.5 mM, respectively.

The rate of O₂ evolution was not affected by adding 10 mM Na₂SO₃ at pH 8.0. However, it was remarkably decreased when protoplasts were incubated with 10 mM Na₂SO₃ at pH 5.0 for a minute before assayed at pH 8.0. The rate decreased with decreasing the pH of the incubation medium with Na₂SO₃. The degree of decrease in O₂ evolution rate was dependent on leaf age and growth temperature.

Key words: Mesophyll protoplasts – Oxygen evolution – pH – Photosynthesis – Sulfite – *Vicia faba*.

II - 5

オゾンおよび二酸化硫黄がホウレンソウ葉の細胞微細構造に及ぼす影響

三宅 博^{1,3}・古川昭雄²・戸塚 績²・前田英三¹

Effects of ozone and sulphur dioxide on the fine structure of spinach leaf cells

Hiroshi MIYAKE^{1,3}, Akio FURUKAWA², Tsumugu TOTSUKA² and Eizo MAEDA¹

要 旨

播種後約1か月のホウレンソウに、0.5 ppmのオゾン(O₃)および1.0 ppmの二酸化硫黄(SO₂)を単独または同時に暴露した。暴露開始後時間を追って葉組織を採集し、組織・細胞構造の変化を光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察した。その結果を写真1~30に示した。

O₃単独暴露では最初に葉緑体のシラコイドの膨潤が観察された。次にゴルジ体、小胞体、核膜に膨潤が認められた。その後葉緑体の変形が観察された。これに対しSO₂単独暴露では最初に葉緑体のストロマの膨潤、これに伴う葉緑体の変形が観察された。シラコイドの膨潤が現れたのは暴露開始後かなり時間が経ってからであった。葉にしおれが現れ、一部に褐変が認められる頃には、O₃、SO₂いずれの暴露処理においても、破壊された細胞内構造体が凝集し細胞がつぶれてゆくの観察された。O₃とSO₂を同時に暴露すると、障害の進行は著しく促進された。電子顕微鏡で観察すると主にSO₂障害の特徴が現れていた。

緒 言

オゾン(O₃)および二酸化硫黄(SO₂)は主要な大気汚染質として古くから知られており、これらの汚染質が植物に及ぼす影響については、いろいろな方面から数多くの研究がなされてきた(6)。近年では電子顕微鏡を用いて、細胞微細構造におよぼす影響を調べた報告もいくつか提出されてい

1. 名古屋大学 農学部
2. 国立公害研究所 生物環境部
3. 現在 東京農工大学 農学部

1. Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464
2. Division of Environmental Biology, The National Institute for Environmental Studies, Tsukubagakuen, Ibaraki 305
3. Present address: Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183

る(8, 13, 16, 17)。しかし電子顕微鏡による観察結果は研究者によって必ずしも一致せず、個々の汚染質の作用性について統一した見解を得るのは困難な状況にある。これは用いた植物材料、暴露条件、電子顕微鏡用試料作製法その他の実験条件の違いによるものと思われる。そこで本研究では O_3 と SO_2 をできる限り同一の条件で処理し、両汚染質が細胞微細構造に及ぼす作用の相違について検討した。また O_3 と SO_2 を同時に処理し、両汚染質の相互作用について検討した。

これまでに電子顕微鏡を用いて、大気汚染質が細胞微細構造に及ぼす作用を比較したものは O_3 と peroxyacetyl nitrate について(14, 15)、 NO_2 と SO_2 について(18)、および HCl と SO_2 について(7)知られている。また O_3 と SO_2 を含む数種の大気汚染質の比較もなされている(8)。しかし O_3 と SO_2 の作用について、障害の発現過程を追って詳細に比較したものはないように思われる。また O_3 と SO_2 の細胞微細構造に対する複合影響について報告したものはみられない。

材料および方法

植物材料：自然光型制御温室で4～5週間生育させた鉢植ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L. cv. New Asia) を使用した(11)。

ガス暴露：植物を人工光型暴露キャビネット(1)に設置し、温度 $25^{\circ}C$ 、湿度75%、照度30～35 klx のもとで3時間放置し、その後同上の条件で0.5 ppm O_3 および1.0 ppm SO_2 を単独または複合で暴露した。暴露開始後時間を追って完全に展開している若い葉を採集し、電子顕微鏡用試料とした。対照としては処理前のもの、および汚染ガスを含まない同上条件に12時間放置したものを使用した。

電子顕微鏡観察：約 0.5×1 mm の葉切片を $4^{\circ}C$ にて5%グルタルアルデヒドにて12時間、または5%グルタルアルデヒドと4%パラホルムアルデヒドを含む混合固定液で4時間固定した。固定液はpH 7.2の0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液で調製した。その後緩衝液で3時間洗浄し、緩衝液で調製した2%オスミウム酸で15時間固定し、緩衝液で15分、蒸留水で15分洗浄した後、常法のアセトンシリーズで脱水した。その後プロピレンオキサイドを用いて組織に包埋剤 Quetol 812 を浸透させ、 $60^{\circ}C$ で48時間加熱硬化させて包埋試料を作製した。包埋試料より厚さ60～80 nm の超薄切片を作製し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡JEM100Cにて加速電圧80kVで観察した。また包埋試料より厚さ約 $2\mu m$ の切片を作製し、塩基性フクシン・メチレンブルー染色またはトルイジンブルー染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

結 果

未処理葉の正常な細胞微細構造の電子顕微鏡写真を写真1～4に示した。葉緑体(写真1)はグラナチラコイドとストロマチラコイドからなる内膜系が整然と配列し、いわゆるラメラ構造を示している。ミトコンドリア(写真2)はクリステ(cr)がよく広がっており、呼吸活性が高いことを

示唆している。核（写真3）は二重の核膜（ne）で囲まれており、内部に仁（no）が見られる。写真4に維管束の微細構造を示した。師管（se）に隣接して細胞質の濃い伴細胞（cc）が並び、やや離れて細胞質が希薄な維管束柔細胞（vp）が見られる。右上に細胞壁（w）が部分的に肥厚した導管（v）が見られる。

1) O₃による影響

暴露開始後約1時間ほどで葉の上面に光沢化した部位が生じ、3時間後には光沢化部位に黄緑色の不定形の斑点が現れ、7時間後には部分的なしおれと褐変化が起こった。

O₃処理による細胞微細構造変化の過程を写真5～14に示した。電子顕微鏡下で最初に認められる微細構造変化は、葉緑体のシラコイドの膨潤（写真5, 6, 矢印）であった。この現象は暴露後1時間で認められたが（写真5）、3時間後にはさらに顕著になった（写真6）。またこの現象は前固定をグルタルアルデヒド単独で行った場合（写真5）も、グルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドの混合液で行った場合（写真6）も同様に認められた。なお混合固定液を用いた方が膜系のコントラストは高くなるが、葉緑体がやや収縮する傾向が見られた。シラコイドの膨潤は、柵状組織よりも海綿状組織の葉緑体にやや先に現れたが、O₃障害はその後両組織ではほぼ同様に進行した。暴露開始3時間後には核膜（写真7, ne）、小胞体（写真7, er）、ゴルジ体（写真8, g）にシラコイドの場合と同様の膨潤が認められた。この頃になると細胞質が凝縮してくるので小胞体の識別が困難になるが、核膜との連続性（写真7, 矢印）によって小胞体を固定することができる。ゴルジ体の両端からは小胞が多数形成されているのが観察された（写真8, 矢印）。この時期のミトコンドリアはクリスタが収縮しており（写真8, cr）、呼吸活性に異常が起こっていることが予想される。暴露開始5時間以降には、球形ないし不定形に変形した葉緑体が観察された（写真9）。このような葉緑体はお互いに接近する傾向が見られた。その後葉緑体の限界膜は破壊され、ストロマの内容物は流出した（写真10）。7時間後には葉のしおれや褐変化が始まるが、このような部位では破壊された細胞内構造体が細胞内の一か所に凝集し（写真11）、その後細胞が収縮してゆくの観察された（写真12）。なお細胞内構造体が完全に破壊されないうちに収縮してしまう細胞も観察された。

O₃の影響は維管束、特に大維管束内の諸細胞にはあまり現れなかった。写真13には暴露開始12時間後の維管束の一部が示されている。この時期には葉肉はほぼ褐変していた。維管束内の諸細胞は伴細胞（cc）の葉緑体にシラコイドの膨潤が認められるものの（矢印）、ほぼ正常な構造を保っていた。写真14は葉脈の柔細胞の葉緑体であるが、やはりほぼ正常な構造を示している。

2) SO₂による影響

可視障害の発現はO₃の場合よりやや遅れ、暴露開始後約3時間ほどで葉の上面に光沢化部位が生じた。5.5時間後には黄緑色の円形の斑点が生じたが、やがてこの斑点は不定形になった。8時間後には部分的なしおれと褐変化が起こった。

SO₂処理による組織構造、細胞微細構造変化の過程を写真15～24に示した。細胞内構造の変

化は、暴露開始 2 時間後の、まだ可視障害が現れていない時期にすでに観察された。この時期の葉組織切片を光学顕微鏡で観察すると (写真 15)、海綿状組織 (sp) の葉緑体 (c) のメチレンブルーあるいはトルイジンブルーに対する染色性が著しく低下していた。このような葉緑体を電子顕微鏡で観察すると (写真 16)、ストロマが膨潤し内膜系が葉緑体内の片側へ押しやられていた。従って葉緑体の染色性の低下はストロマ成分の希釈によるものと考えられる。このようなストロマの膨潤、それに伴う葉緑体の染色性の低下はまず海綿状組織に現れるが、やがて柵状組織にも認められるようになり、その後の細胞微細構造変化は両組織間でほとんど差が認められなかった。暴露開始 3 時間後の、葉表面が光沢化してくる頃には、葉緑体はさらに変形し内膜系の配列が乱れた (写真 17)。この時期以降、葉緑体のストロマにはしばしば電子密度の高い (従って電子顕微鏡下で黒く見える) 顆粒ないしは沈着物が観察された (写真 17, pf)。これはファイトフェリチンと呼ばれる含鉄物質に類似している (12)。

SO₂ の影響は O₃ の場合と異なり、その影響が比較的早い時期に維管束内の諸細胞にも現れた。写真 18 は暴露開始 3 時間後の維管束の一部である。すでに伴細胞 (cc)、維管束柔細胞 (vp) の葉緑体 (c) が変形し、内膜系が乱れている。

暴露開始 5.5 時間後の、黄緑斑が現れた部位では、変形した葉緑体が集合、密着し、密着部位で限界膜が消失して葉緑体が融合するのが観察された (写真 19, 矢印)。この時期になってようやく O₃ 障害において見られたようなシラコイドの膨潤が生じた (写真 20, 矢印)。特に著しい障害を受けた葉緑体では限界膜が消失し、ストロマ成分が流出した (写真 21)。しかしこのような状況でもミトコンドリアはあまり障害を受けていなかった (写真 21, m)。また核もあまり障害を受けず、O₃ 処理において見られたような核膜の膨潤は観察されなかった (写真 22, ne)。8 時間後には葉のしおれや褐変化が始まるが、このような部位では葉緑体以外の細胞内構造体も破壊され、O₃ 障害の最終段階と同様に、破壊された細胞内構造体が細胞内の一か所に凝集し (写真 23)、その後細胞が収縮してゆくの観察された (写真 24)。

3) O₃ + SO₂ の影響

O₃ と SO₂ を同時に暴露すると、障害の進行は著しく早められ、暴露開始後わずか 30 分で葉の上面の光沢化が始まり、2 時間後にはすでに葉のしおれと褐変化が起こった。

同時暴露による組織構造、細胞微細構造変化の過程を写真 25 ~ 30 に示した。興味深いことに同時暴露においては主に SO₂ 障害の特徴のみが現れた。障害の発現が短時間のうちに起こるので、可視障害が現れる以前の内部構造変化をとらえることはできなかったが、暴露開始 30 分後には葉緑体の染色性の低下が観察された。障害の進行が速いので、組織間差を見出すのは容易でないが、SO₂ 単独暴露の場合と同様に海綿状組織の葉緑体に先に染色性の低下が認められた (写真 25, sp の c)。電子顕微鏡で観察するとこの時期の葉緑体は変形し、内膜系の配列が乱れていた (写真 26)。またストロマにはファイトフェリチン様顆粒が観察された (写真 26, pf)。また葉緑体はお互い

に集合、密着し、葉緑体の融合が起こった(写真27, 矢印)。これらはいずれもSO₂障害の特徴である。核膜の膨潤や小胞体の膨潤もいくつかの細胞において観察されたが(写真27, ne, er), これらはO₃障害の特徴である。1時間後には葉緑体その他の細胞内構造体が一か所に集合してゆくのが観察された(写真28)。写真29はこの時期に観察された葉緑体の融合像であるが、葉緑体間の限界膜が完全に消失している(矢印)。2時間後にはすでに葉のしおれや褐変化が始まるが、この時期には細胞内構造体が完全には破壊されないうちに細胞の収縮が始まっていた(写真30)。葉緑体のシラコイドの膨潤は全く観察されなかった。

以上の観察結果は表1にまとめた。

考 察

可視障害と微細構造変化の関係(表1)を見ると、同様の可視障害が現れていても汚染ガスの種類によって微細構造の状態はかなり異なる。O₃単独, SO₂単独, O₃+SO₂のいずれの処理区においても、最初に現れる可視障害は葉の光沢化であった。このような部位に見られる微細構造変化は、O₃処理では葉緑体シラコイドの膨潤であり、SO₂単独およびO₃+SO₂処理では葉緑体ストロマの膨潤であった。一般に光沢化は表皮下の葉肉細胞が収縮して細胞間隙が増大した時の外観であると解釈されている(6)。従って今回観察された微細構造変化は、葉の光沢化とは直接の関係はないように思われる。葉の黄緑化はクロロフィルの分解によるものであり、クロロフィルの存在場所であるシラコイドに何らかの異常が起こっていると考えられる。葉の黄緑化部位の葉緑体微細構造を調べると、O₃およびSO₂単独処理ではシラコイドの膨潤が起こっていたが、O₃+SO₂処理では内膜系の配列が乱れてはいるものの、シラコイドの膨潤は認められなかった。このように可視障害と微細構造変化は必ずしも一致しない。

O₃とSO₂の作用を比較すると、O₃処理では最初にシラコイドの膨潤が観察されたが、SO₂ではまずストロマの膨潤が起こり、シラコイドの膨潤が現れたのはかなり後期になってからのことであった。O₃処理ではその後ゴルジ体、小胞体、核膜のように膜に囲まれた部位に膨潤が起こった。しかし葉緑体やミトコンドリアの限界膜には膨潤は起こらなかった。同様の結果はO₃を処理したケヤキ葉でも得られている(8)。これらのことからO₃の作用点の一つはある種の膜系であると考えられる。すなわちO₃の作用によって膜系の透過性が変化し(4)、その結果膜に囲まれた部分の膨潤が起こったと考えられる。

SO₂処理では、初期には葉緑体以外の細胞内構造体にはそれほど影響は見られなかった。SO₂でストロマが膨潤することは他の植物でも知られている(5, 9)。またある種の除草剤を処理した場合にも生じる(2, 10)。このような電顕像は葉緑体限界膜の透過性が変化することによって生じると解釈されている(2)。従ってSO₂の作用点の一つは葉緑体の限界膜であると考えられる。

表1 0.5 ppm O₃ および 1.0 ppm SO₂ を暴露処理したホウレンソウ葉における可視障害と微細構造変化

Table 1 Visual and ultrastructural symptoms in spinach leaves treated with 0.5 ppm O₃ and 1.0 ppm SO₂ singly or in combination

		Fumigation time (h)									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
V*			• Glazing		• Yellow green patches					• Brown patches	
									• Wilting		
O ₃			• Swelling of thylakoids				• Deformation of chloroplasts				
	U				• Swelling of Golgi bodies				• Aggregation of Cellular contents		
SO ₂					• Swelling of ER						
	U				• Swelling of nuclear envelopes				• Shrinkage of cells		
V					• Glazing		• Yellow green spots			• Brown patches	
									• Wilting		
SO ₂			• Swelling of stroma				• Swelling of thylakoids				
	U				• Deformation of chloroplasts				• Aggregation of cellular contents		
O ₃										• Shrinkage of cells	
	V	• Glazing		• Brown patches, wilting							
+			• Yellow green patches								
			• Swelling of stroma								
SO ₂			• Deformation of chloroplasts								
	U			• Shrinkage of cells							

* V = 可視障害 U = 微細構造変化
 可視障害は葉面積の約10%をしめるようになった時に記録した。
 可視障害が発現した以後の微細構造変化は、可視障害部位にて観察されたものである。

* V = Visual symptoms U = Ultrastructural symptoms
 Visual symptoms were scored when they occupied about 10% of the leaf area.
 Ultrastructural symptoms were observed in the regions of visual symptoms, when the latter was apparent.

O₃とSO₂の作用について組織間差を見ると、O₃の影響はかなり後期になっても維管束内の細胞には現れないのに対し、SO₂処理においては比較的早い時期に、維管束内の柔細胞にも葉肉細胞と同じような構造変化が現れた。O₃は細胞内で比較的速やかに無毒化されてしまうのに対し、SO₂は毒性を保った形で葉組織内部へ移行するように思われる。O₃、SO₂、O₃+SO₂処理のいずれにおいても、柵状組織に比べ海綿状組織の方がわずかに障害の出現が早かった。このことは汚染ガスがいずれも気孔の多い背軸側（裏面側）表皮から主に侵入していることを示唆している。ある種の植物ではO₃の影響は主に柵状組織にのみ現れるとされている（6）。しかし本実験で用いたハウレンソウでは、柵状組織も海綿状組織もO₃によって同様に障害を受けた。同様の結果はハツカダイコンでも得られている（3）。O₃に対する柵状組織と海綿状組織の感受性の違いは植物の種によって異なるようである。

O₃とSO₂を同時に暴露すると、障害の発現は著しく促進されたが、単独暴露ではO₃の影響の方が早く現れるにもかかわらず、同時暴露では主にSO₂暴露で見られた微細構造変化のみが観察された。O₃は細胞内の膜に影響を与え、溶質に対する透過性を増大させることが知られている（4）。従ってO₃とSO₂を同時に処理した場合には、O₃の膜に対する作用によってSO₂の細胞内への取込が促進され、観察された細胞微細構造変化は、主にSO₂によって引き起こされたものと解釈することができる。

以上のように電子顕微鏡を用いると、ある限られた制御された条件下では、汚染ガスの作用の質的な違いを明らかにすることができ、また同じような可視障害が現れている部位においても、汚染ガスの特徴を見出すことができる。しかし緒言でも述べたように、汚染ガスによる微細構造変化は植物材料、実験条件によりかなり影響を受けることが予想され、例えば電子顕微鏡を被害植物の診断等に利用する場合には、さらに多くのデータの蓄積が必要であろう。

終りにあたり、電子顕微鏡の使用に際し多くの便宜をはかって下さった環境生理部竹中参二博士、計測技術部宮坂恵子氏ならびに本研究の遂行のために多くの御援助をいただいた東京農工大学農学部牛島忠広博士に深く感謝の意を表します。

引用文献

1. 相賀一郎・大政謙次・安保文彰、1978、大気汚染ガス暴露のためのグロースキャビネット、陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究、昭和51/52年度研究報告、国立公害研究所特別研究成果報告 第2号：193-210
2. Anderson, J. L. and J. P. Schaelling, 1970. Effects of pyrazon on bean chloroplast ultrastructure. *Weed Sci.* 18: 455-459
3. Athanassious, R. 1980. Ozone effects on radish (*Raphanus sativus* L. cv. Cherry Belle): gradient of ultrastructural changes. *Z. Pflanzenphysiol.* 97: 227-232
4. Evans, L. S. and I. P. Ting, 1973. Ozone induced membrane permeability changes. *Amer. J. Bot.* 60: 155-162

5. Fisher, K., D. Kramer und H. Ziegler. 1973. Elektronenmikroskopische Untersuchungen SO₂-begaster Blätter von *Vicia faba*. I. Beobachtungen an Chloroplasten mit akuter Schädigung. *Protoplasma* 76: 83-96
6. Heath, R. L. 1980. Initial events in injury to plants by air pollutants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 395-431
7. Masuch, G., H. Weinert und R. Guderian. 1973. Wirkungen von Chlorwasserstoff und Schwefeldioxid auf die Ultrastruktur der Chloroplasten von *Spinacia oleracea* L. In *Proceedings of the 3rd International Clean Air Congress*. p.160-163. VDI-Verlag, Dusseldorf
8. 松島二良・河合敏子・大平俊男・沢田 正・野内 勇. 1977. オゾン, 二酸化窒素, 二酸化硫黄, エチレンによるケヤキの不可視害葉における微細構造の比較. *大気汚染研究* 11: 360 - 369
9. Mlodzianowski, F. and S. Bialobok. 1977. The effect of sulphur dioxide on ultrastructural organization of larch needles. *Acta Soc. Bot. Poloniae* 46: 629-634
10. Pallett, K. E. and A. D. Dodge. 1980. Modifications of chloroplasts of flax cotyledons treated with monuron: myelinoid figures formed under low light conditions. *Plant Cell & Environ.* 3: 183-188
11. 島崎研一郎・菅原 淳. 1978. 二酸化イオウの植物影響の作用機序に関する研究(1) 光合成電子伝達反応阻害とクロロフィル分解との関連について. 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究. 昭和51/52年度研究報告. 国立公害研究所特別研究成果報告 第2号: 35 - 45
12. Sprey, B., G. Gliem and A. G. S. Jánossy. 1976. Iron containing inclusions in chloroplasts of *Nicotiana clevelandii* x *Nicotiana glutinosa*. I. X-ray microanalysis and ultrastructure. *Z. Pflanzenphysiol.* 79: 165-176
13. Thomson, W. W. 1975. Effects of air pollutants on plant ultrastructure. In *Responses of Plants to Air Pollution* (edit. by J. B. Mudd and T. T. Kozlowski), p.179-194. Academic Press, New York.
14. Thomson, W. W., W. M. Dugger, Jr. and R. L. Palmer. 1965. Effects of peroxyacetyl nitrate on ultrastructure of chloroplasts. *Bot. Gaz.* 126: 62-75
15. Thomson, W. W., W. M. Dugger, Jr. and R. L. Palmer. 1966. Effects of ozone on the fine structure of the palisade parenchyma cells of bean leaves. *Can. J. Bot.* 44: 1677-1682
16. 遠山 益. 1975. 葉緑体の微細構造にあたる光化学オキシダントの影響. *細胞* 7: 519 - 530
17. 遠山 益. 1976. 葉緑体とミトコンドリアの微細構造におよぼす光化学オキシダントの影響. *遺伝* 30(7): 47 - 54
18. Wellburn, A. R., O. Majernik and F. A. M. Wellburn. 1972. Effects of SO₂ and NO₂ polluted air upon the ultrastructure of chloroplasts. *Environ. Pollut.* 3: 37-49

Summary

Spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. New Asia) plants were fumigated with 0.5 ppm O₃ and 1.0 ppm SO₂ singly or in combination. The leaf tissues were harvested and examined by electron microscopy at time intervals until they were necrosed. Observations are summarized in Table 1 and results are shown in Plates 1-30.

The first sign of O₃ injury was swelling of thylakoids in chloroplasts, which was followed by swelling of Golgi bodies, endoplasmic reticulum and internal space between nuclear envelopes. Later the chloroplasts were deformed. On the other hand, SO₂ injury first appeared as swelling of stroma and deformation of chloroplasts. Swelling of thylakoids appeared at later stages. At final stages of both O₃ and SO₂ injuries, cellular contents were aggregated and cells were crushed. When O₃ and SO₂ were supplied simultaneously, the appearance and progress of injury were markedly accelerated compared with either of the single fumigations. Mainly the features of SO₂ injury were observed in the simultaneous fumigation.

Key words: Ozone - Sulphur dioxide - Spinach - Fine structure - Electron microscopy

写 真

Plates

略 符

c ; 葉緑体	p ; 柵状組織
cc ; 伴細胞	pf ; ファイトフェリチン様顆粒
cr ; クリステ	s ; デンプン粒
er ; 小胞体	se ; 篩管
g ; ゴルジ体	sp ; 海綿状組織
m ; ミトコンドリア	v ; 導管
ne ; 核膜	vp ; 維管束柔細胞
no ; 仁	w ; 細胞壁

Abbreviations:

c ; chloroplast	p ; palisade parenchyma
cc ; companion cell	pf ; phytoferritin-like particle
cr ; crista	s ; starch grain
er ; endoplasmic reticulum	se ; sieve element
g ; Golgi body	sp ; spongy parenchyma
m ; mitochondrion	v ; vessel
ne ; nuclear envelope	vp ; vascular parenchyma
no ; nucleolus	w ; cell wall

写真 1 ホウレンソウの未処理葉における葉緑体。× 22000

Plate 1 Chloroplast in a spinach leaf before fumigation. × 22000

写真 2 ホウレンソウの未処理葉におけるミトコンドリア。× 46000

Plate 2 Mitochondria in a spinach leaf before fumigation. × 46000

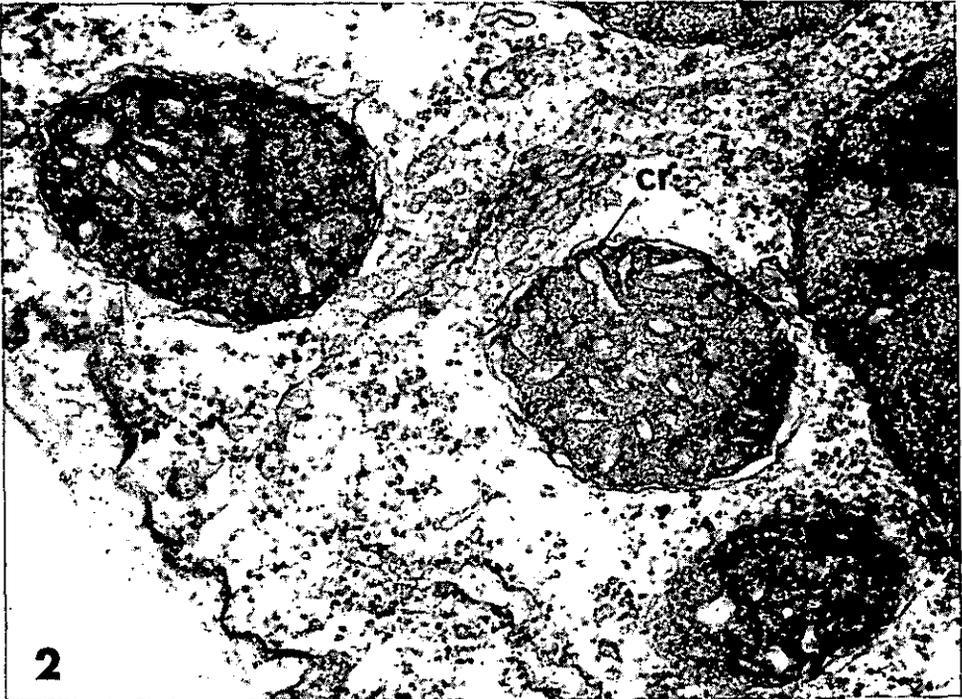
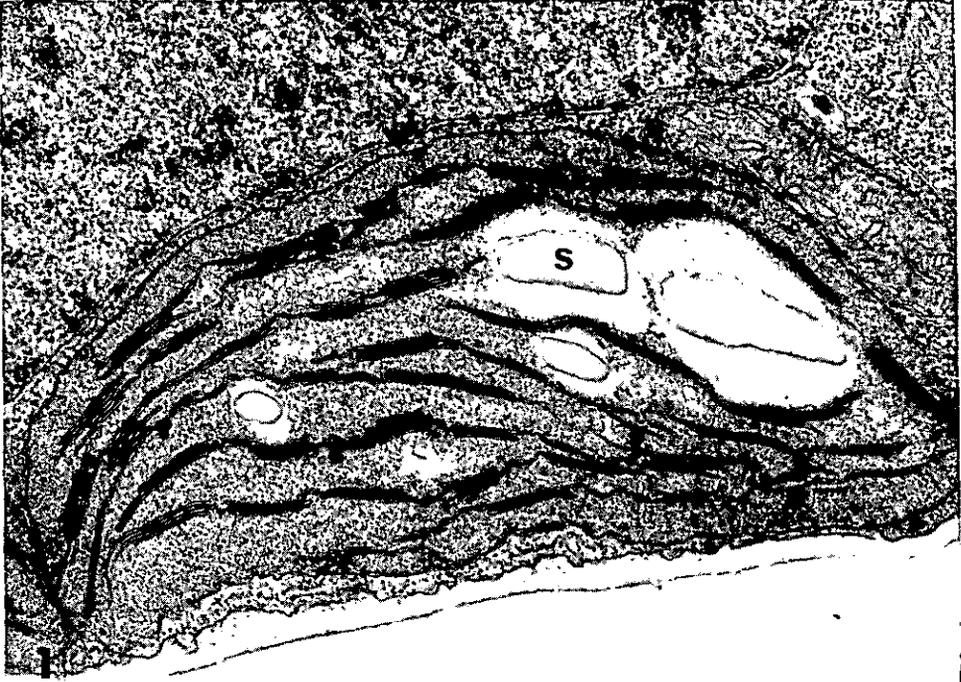
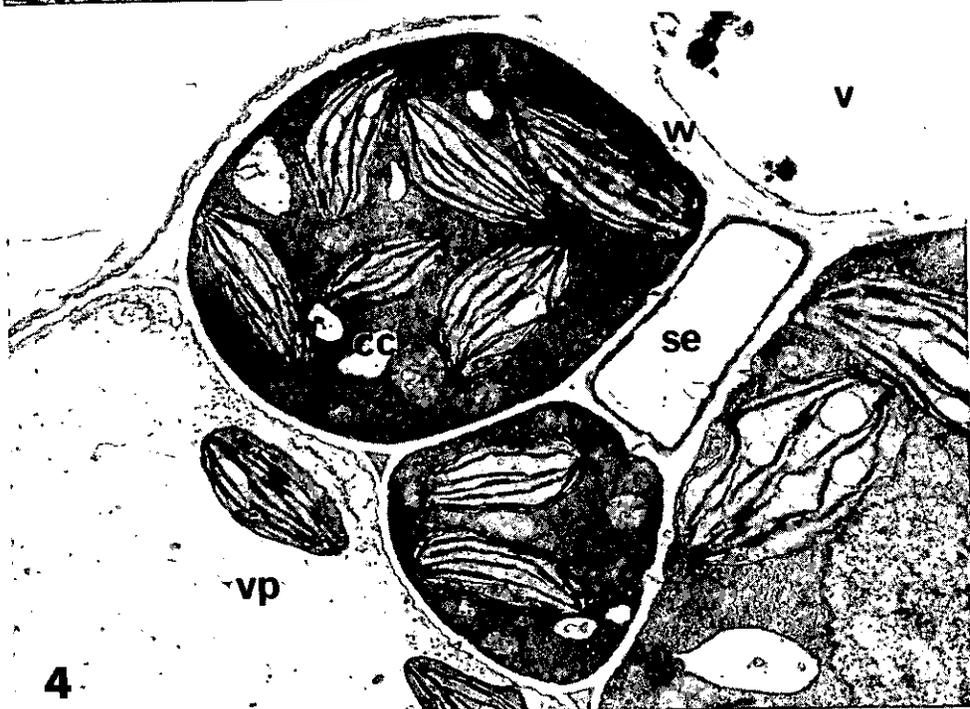
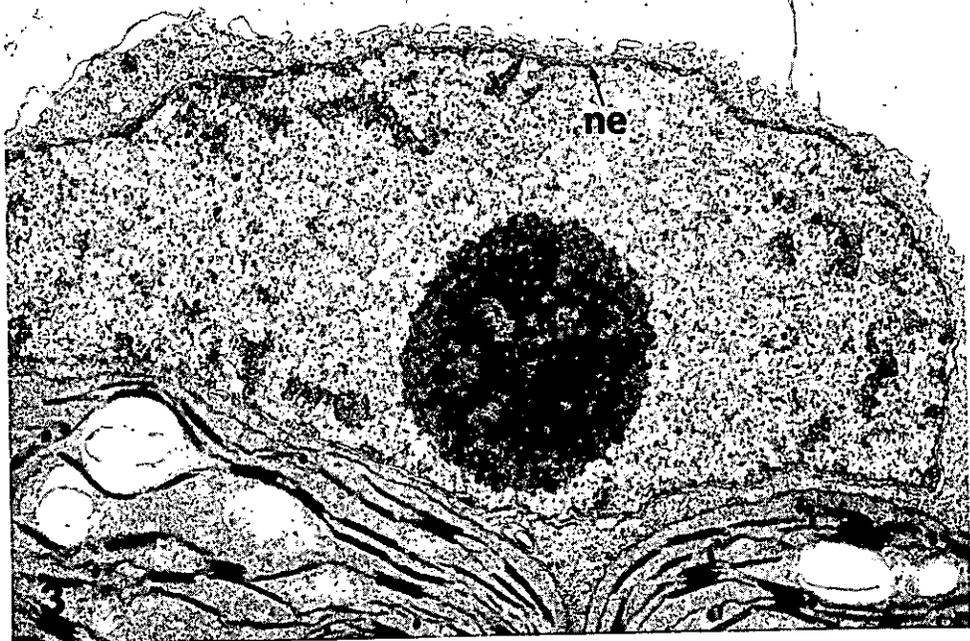


写真 3 ホウレンソウの未処理葉における核。× 14000

Plate 3 Nucleus in a spinach leaf before fumigation. × 14000

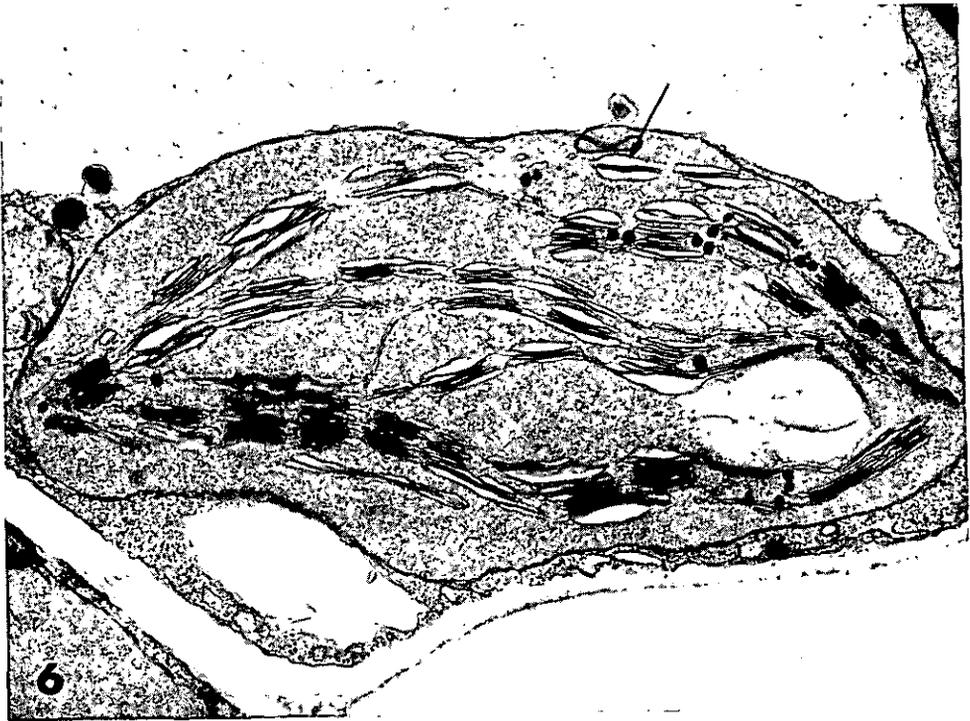
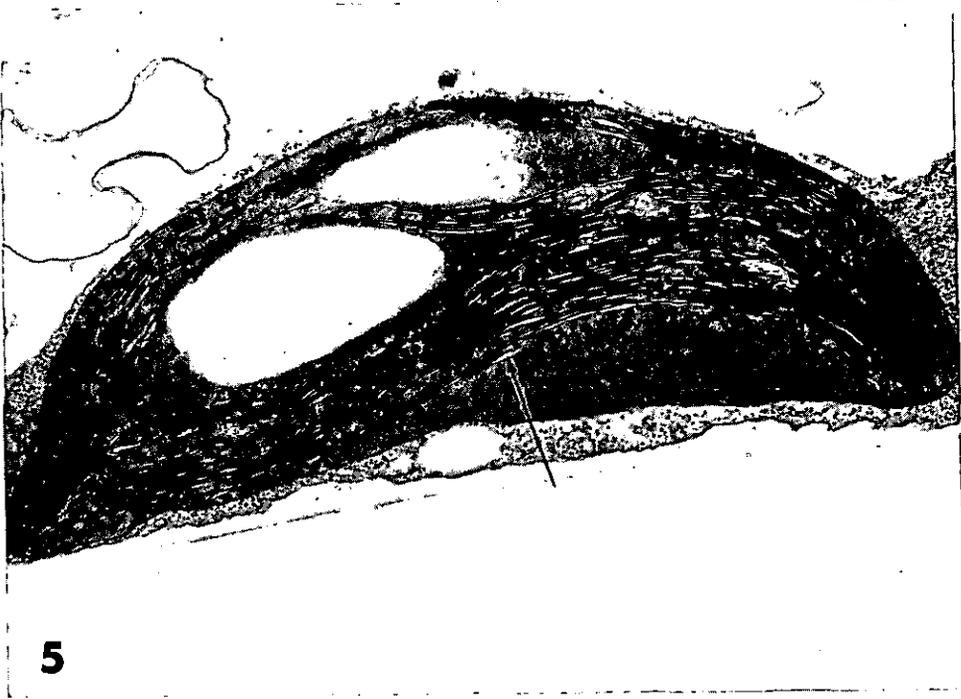
写真 4 ホウレンソウの未処理葉における維管束。× 6800

Plate 4 Part of a vascular bundle in a spinach leaf before fumigation. × 6800



- 写真 5 0.5 ppm O₃ で1時間暴露処理したホウレンソウ葉の葉緑体。シラコイドの膨潤が見られる(矢印)。×22000
- Plate 5 Chloroplast in a spinach leaf fumigated with 0.5ppm O₃ for 1 h. Note swelling of thylakoids (arrow). ×22000

- 写真 6 0.5 ppm O₃ で3時間暴露処理したホウレンソウ葉の葉緑体。シラコイドの膨潤が顕著になる(矢印)。×16000
- Plate 6 Chloroplast in a spinach leaf fumigated with 05. ppm O₃ for 3 h. Note extensive swelling of thylakoids (arrow). ×16000



- 写真 7 0.5 ppm O₃ で3時間暴露処理したホウレンソウ葉の核および小胞体。核膜と小胞体が膨潤している。矢印は核膜と小胞体の連続性を示す。× 31000
- Plate 7 Nucleus and endoplasmic reticulum in a spinach leaf fumigated with 0.5 ppm O₃ for 3 h. Note swelling of nuclear envelopes and ER. Arrows indicate continuity of nuclear envelopes and ER. × 31000

- 写真 8 0.5 ppm O₃ で3時間暴露処理したホウレンソウ葉の膨潤したゴルジ体(g)。矢印はゴルジ体から形成された小胞を示す。× 26000
- Plate 8 Swollen Golgi body (g) in a spinach leaf fumigated with 0.5 ppm O₃ for 3 h. Arrow indicates vesicles derived from Golgi body. × 26000

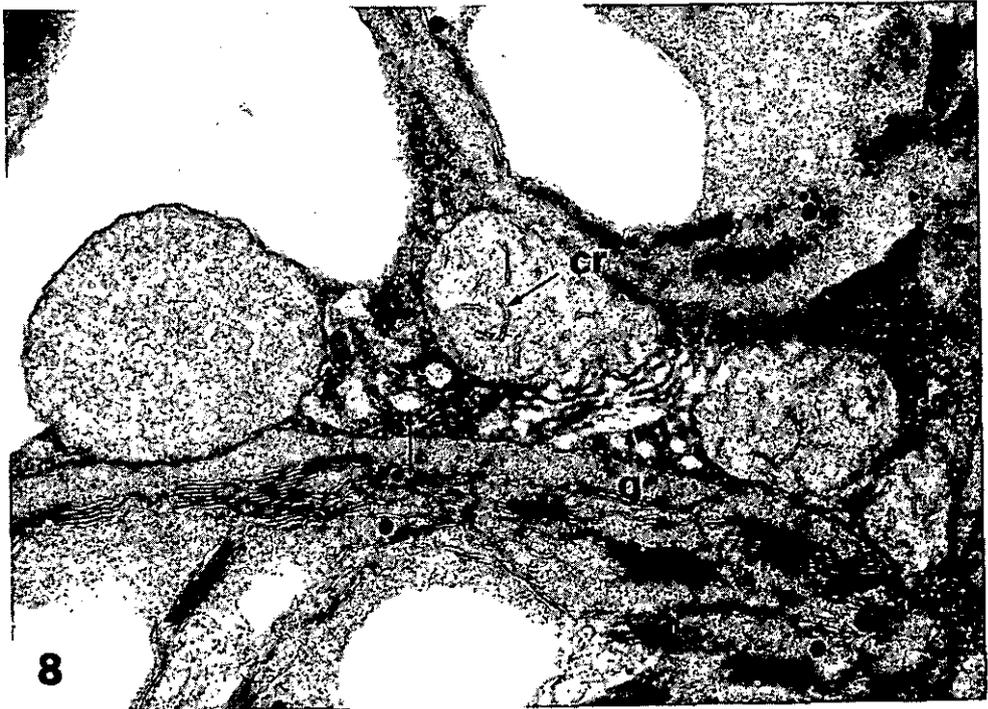
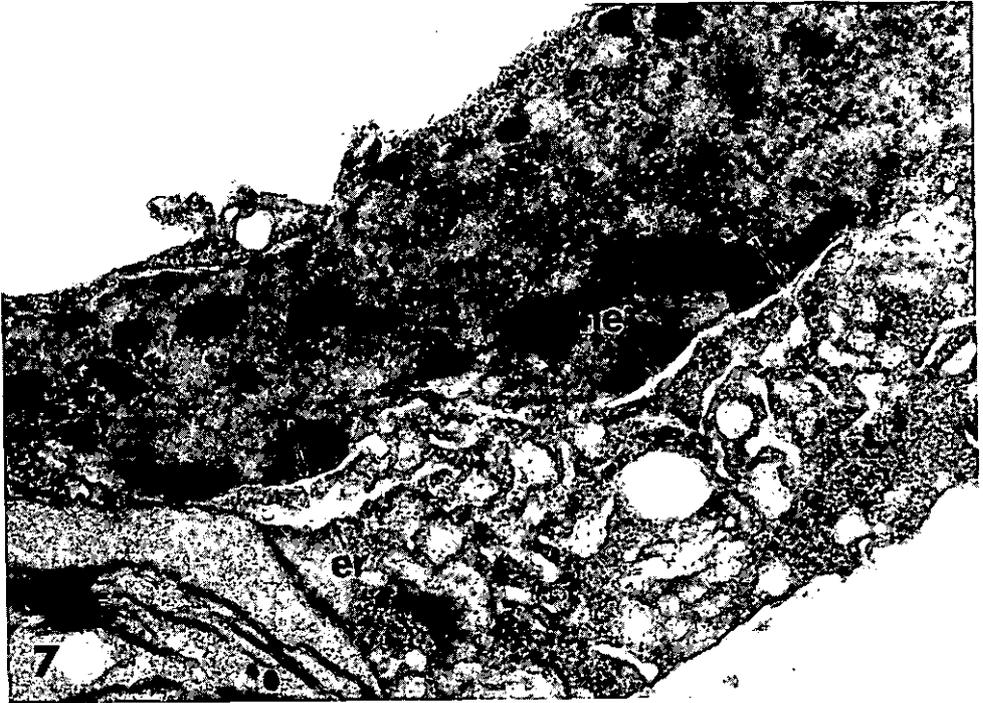


写真 9 0.5 ppm O₃で7時間暴露処理したホウレンソウ葉の変形した葉緑体。×14000

Plate 9 Deformed chloroplasts in a spinach leaf fumigated with 0.5 ppm O₃ for 7 h. ×14000

写真 10 0.5 ppm O₃で7時間暴露処理したホウレンソウ葉に観察された限界膜の消失した葉緑体。×13000

Plate 10 Disruption of chloroplast envelopes in a spinach leaf fumigated with 0.5 ppm O₃ for 7 h. ×13000

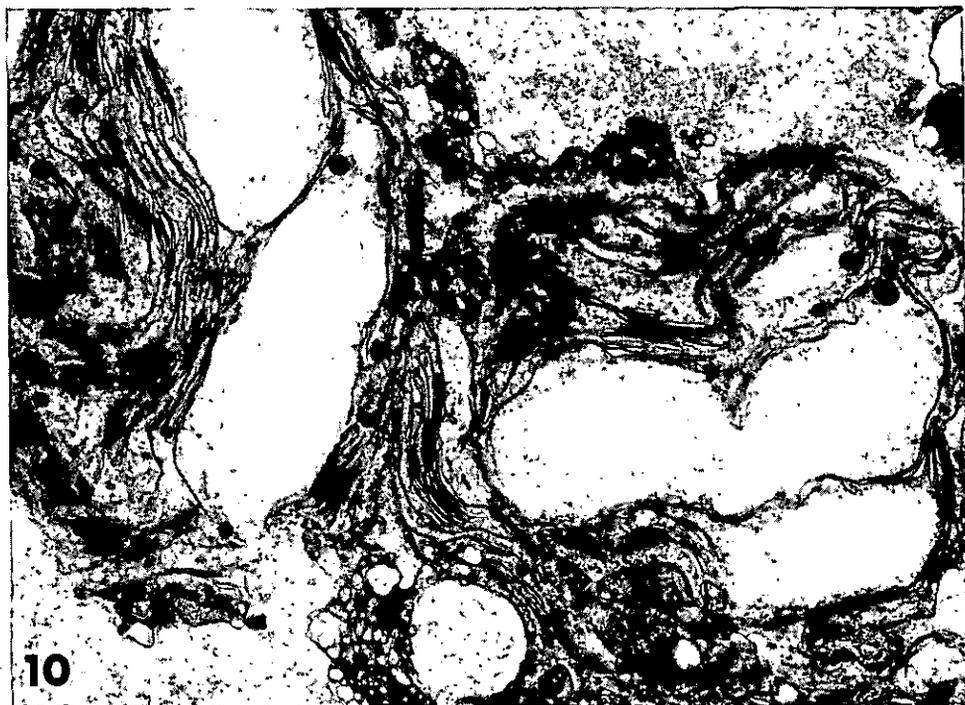


写真 11 0.5 ppm O₃ で 7 時間暴露処理したホウレンソウ葉に観察された細胞内構造体の凝集。× 10000

Plate 11 Aggregation of cellular contents in a spinach leaf fumigated with 0.5 ppm O₃ for 7 h. × 10000

写真 12 0.5 ppm O₃ で 7 時間暴露処理したホウレンソウ葉に観察された細胞の収縮。× 10000

Plate 12 Shrinkage of cells in a spinach leaf fumigated with 0.5 ppm O₃ for 7 h. × 10000

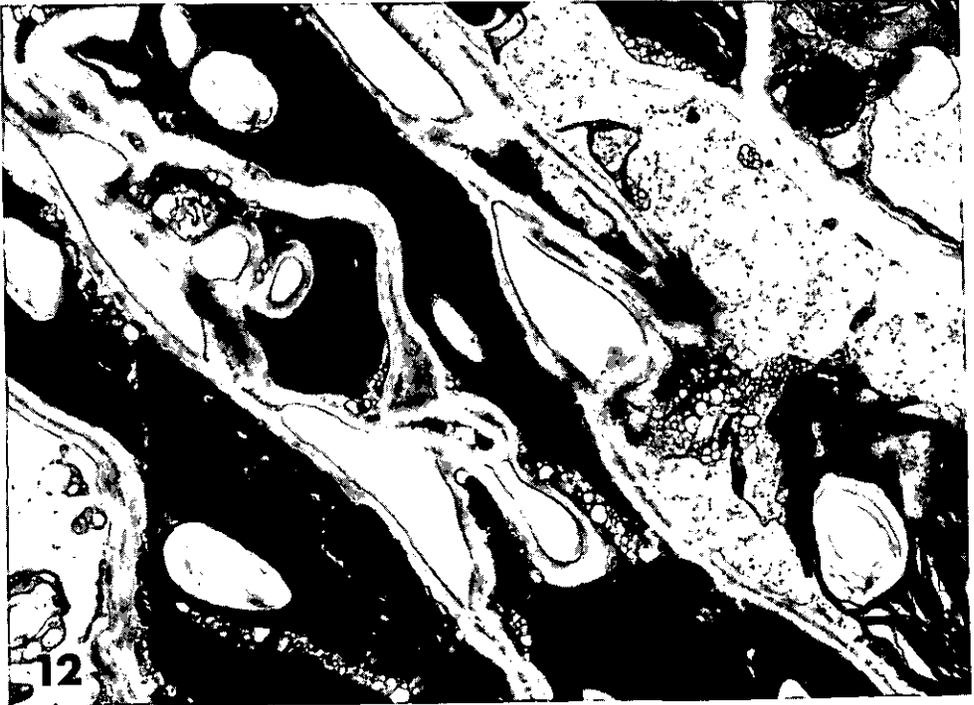
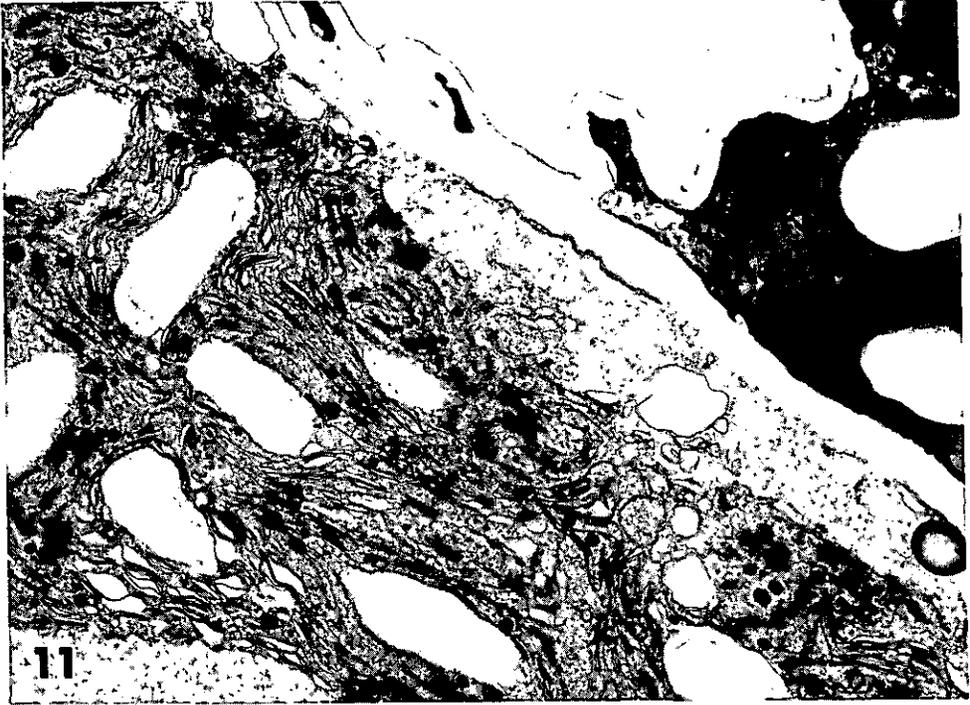


写真 13 0.5 ppm O₃で12時間暴露処理したホウレンソウ葉の維管束の一部。シラコイドの膨潤（矢印）が認められるものの、ほぼ正常な構造を保っている。× 9800

Plate 13 Part of a vascular bundle in a spinach leaf fumigated with 0.5 ppm O₃ for 12 h. Cell structure is almost normal except for slight swelling in thylakoids (arrow). × 9800

写真 14 0.5 ppm O₃で12時間暴露処理したホウレンソウ葉における葉脈の柔細胞の葉緑体。ほぼ正常な構造を保っている。× 25000

Plate 14 Apparently normal chloroplast in a vein parenchyma cell of a spinach leaf fumigated with 0.5 ppm O₃ for 12 h. × 25000

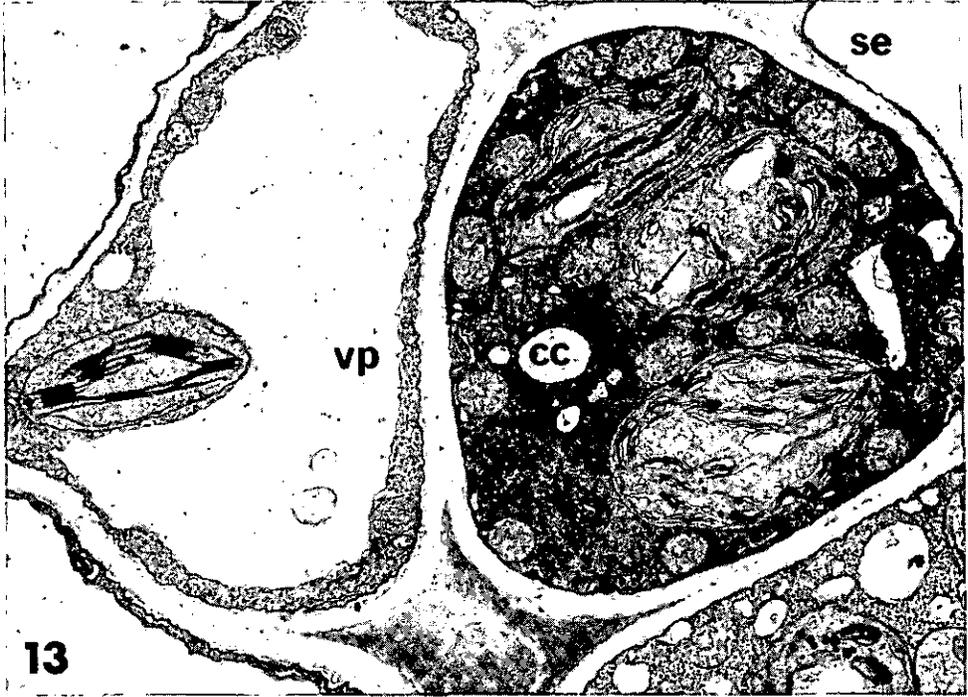


写真15 1.0 ppm SO₂で2時間暴露処理したホウレンソウ葉の横断切片の光学顕微鏡写真。塩基性フクシン・メチレンブルー染色。海綿状組織 (sp) の葉緑体 (c) の染色性が低下している。× 240

Plate 15 Light micrograph of a cross section of a spinach leaf fumigated with 1.0 ppm SO₂ for 2 h. The section was stained with basic fuchsin and methylene blue. Note low stainability of spongy cell chloroplasts (sp, c). × 240

写真16 1.0 ppm SO₂で2時間暴露処理したホウレンソウ葉の葉緑体。ストロマが膨潤している。× 20000

Plate 16 Chloroplast of a spinach leaf fumigated with 1.0 ppm SO₂ for 2 h. Note swelling of stroma. × 20000

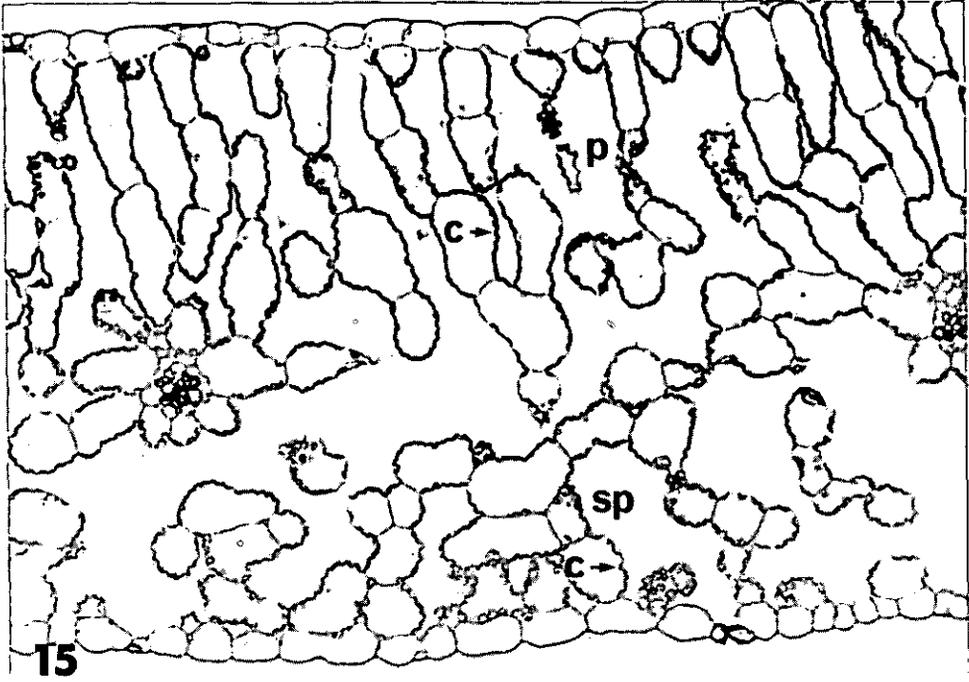


写真 17 1.0 ppm SO₂ で 3 時間暴露処理したホウレンソウ葉に観察された変形した葉緑体。× 22000

Plate 17 Deformed chloroplast in a spinach leaf fumigated with 1.0 ppm SO₂ for 3 h. × 22000

写真 18 1.0 ppm SO₂ で 3 時間暴露処理したホウレンソウ葉の維管束の一部。葉緑体
が変形している (c)。× 5000

Plate 18 Part of a vascular bundle in a spinach leaf fumigated with 1.0 ppm SO₂ for 3 h.
Note swelling and deformation of chloroplasts (c). × 5000

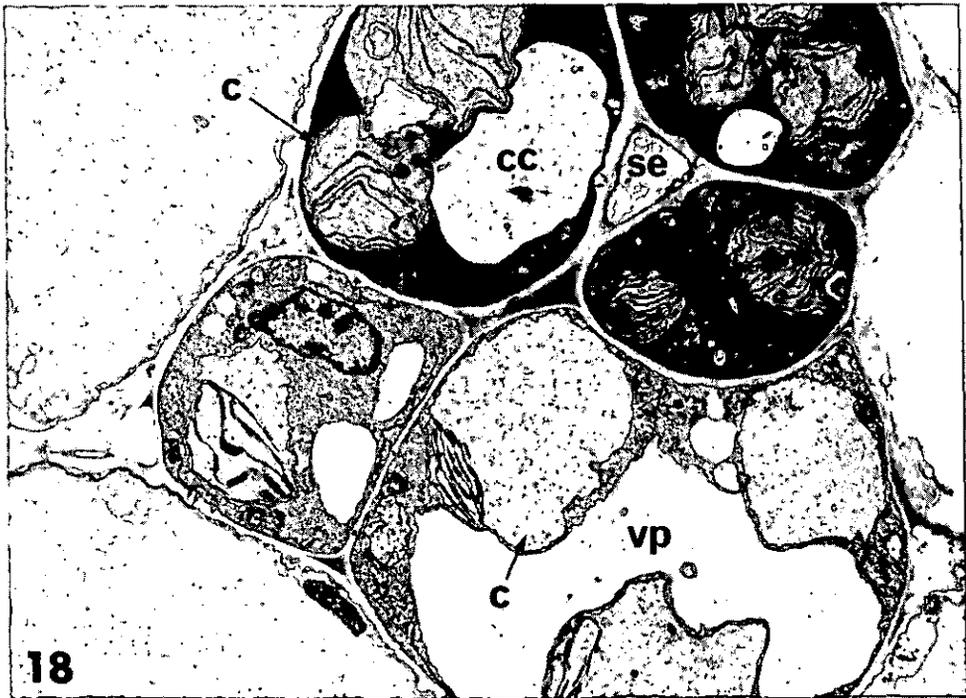
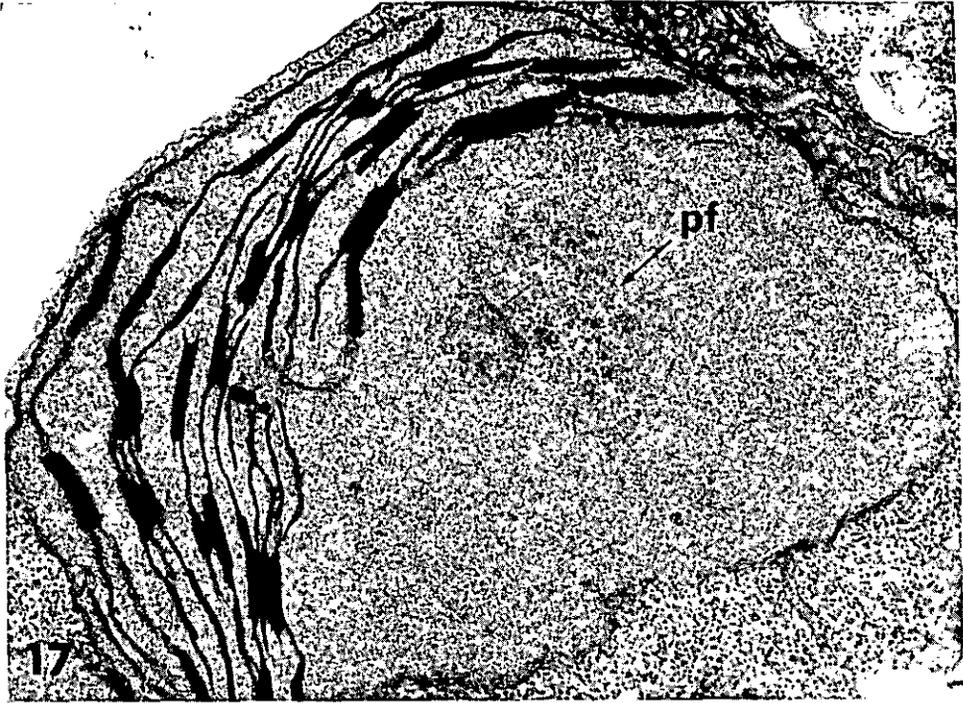


写真 19 1.0 ppm SO₂ で 5.5 時間暴露処理したホウレンソウ葉の葉緑体。葉緑体同士の融合が生じている (矢印)。× 14000

Plate 19 Chloroplasts in a spinach leaf fumigated with 1.0 ppm SO₂ for 5.5 h. Note chloroplast fusion (arrow). × 14000

写真 20 1.0 ppm SO₂ で 5.5 時間暴露処理したホウレンソウ葉の葉緑体。シラコイドの膨潤が見られる (矢印)。× 21000

Plate 20 Chloroplast in a spinach leaf fumigated with 1.0 ppm SO₂ for 5.5 h. Note swelling of thylakoids (arrow). × 21000

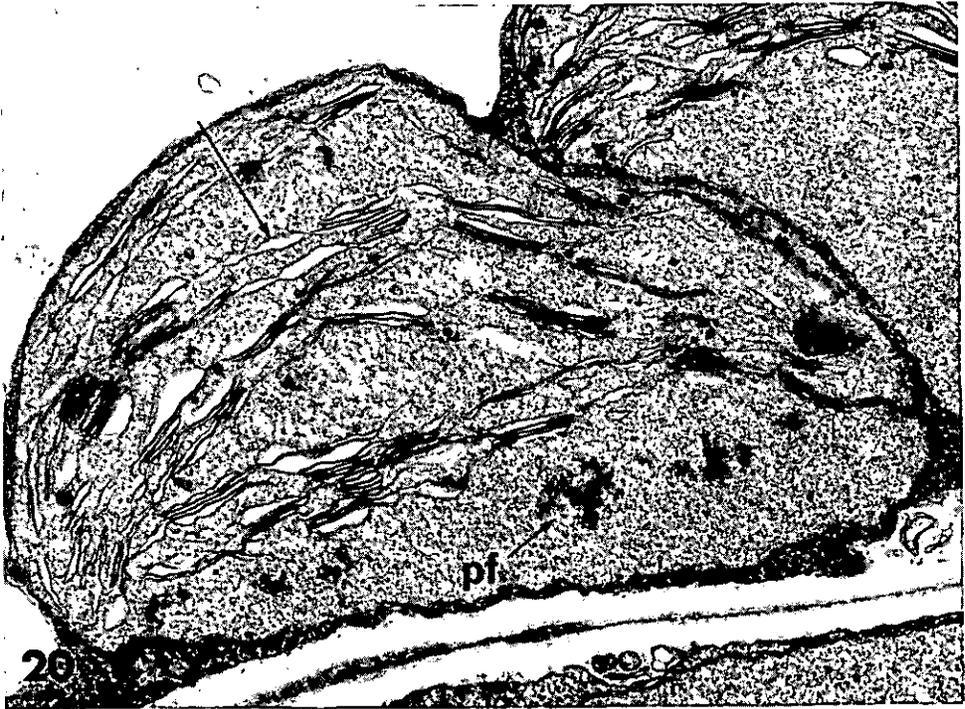
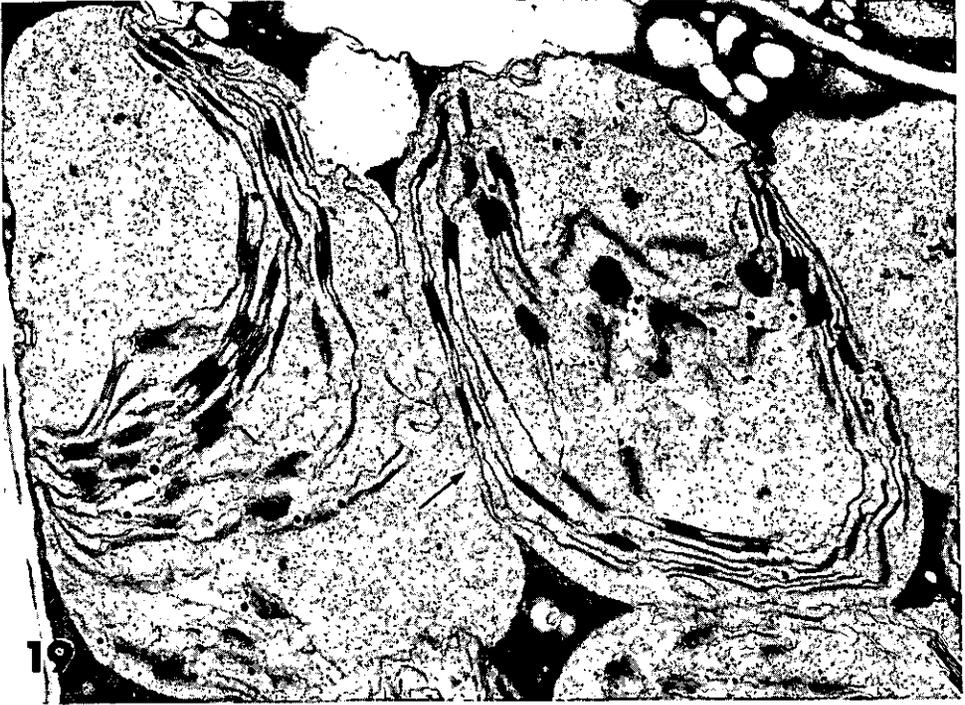


写真 21 1.0 ppm SO₂で5.5時間暴露処理したホウレンソウ葉に観察された限界膜の破壊された葉緑体。ミトコンドリア (m) は比較的正常な構造を保っている。× 13000

Plate 21 Disruption of chloroplast envelopes in a spinach leaf fumigated with 1.0 ppm SO₂ for 5.5 h. Mitochondrion (m) is relatively normal. × 13000

写真 22 1.0 ppm SO₂で5.5時間暴露処理したホウレンソウ葉の核。葉緑体に比べ正常な構造を保っている。× 13000

Plate 22 Nucleus in a spinach leaf fumigated with 1.0 ppm SO₂ for 5.5 h. Nucleus is relatively normal compared with chloroplasts. × 13000

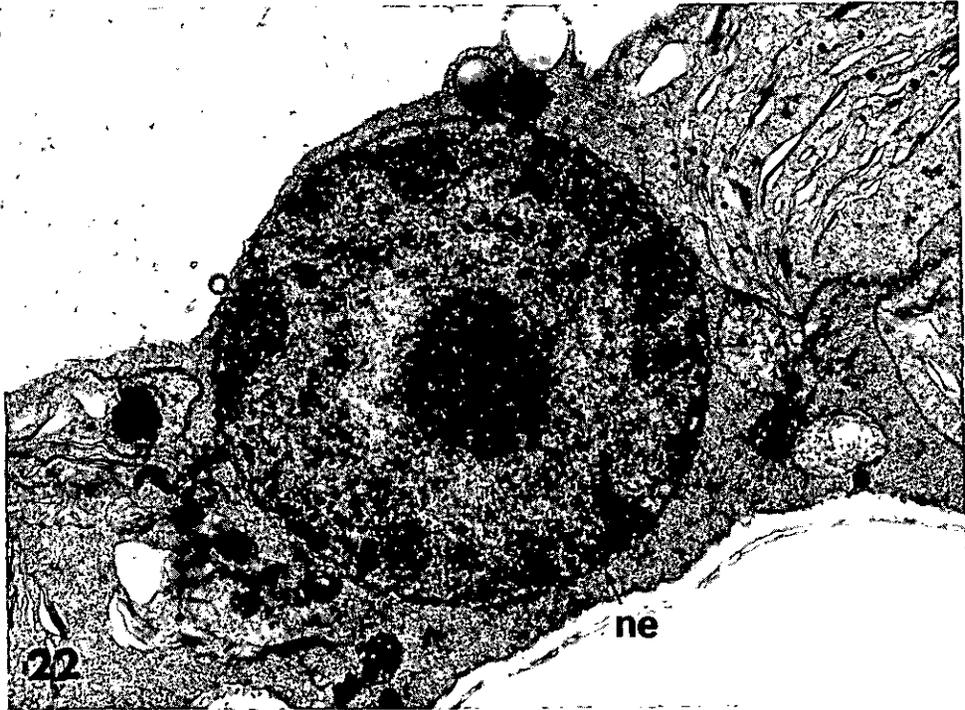
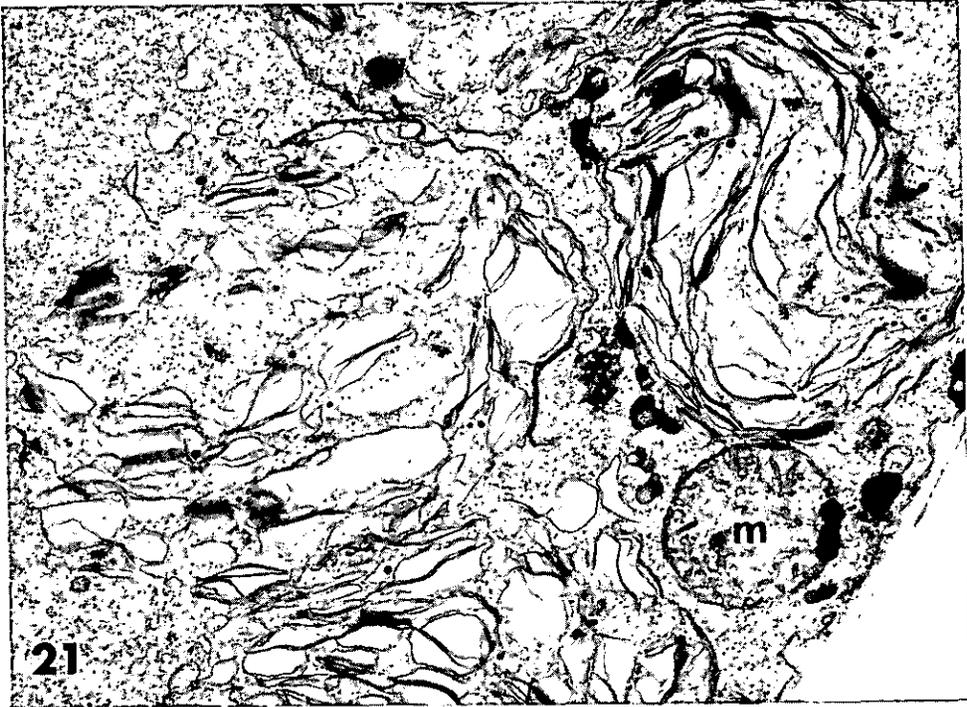
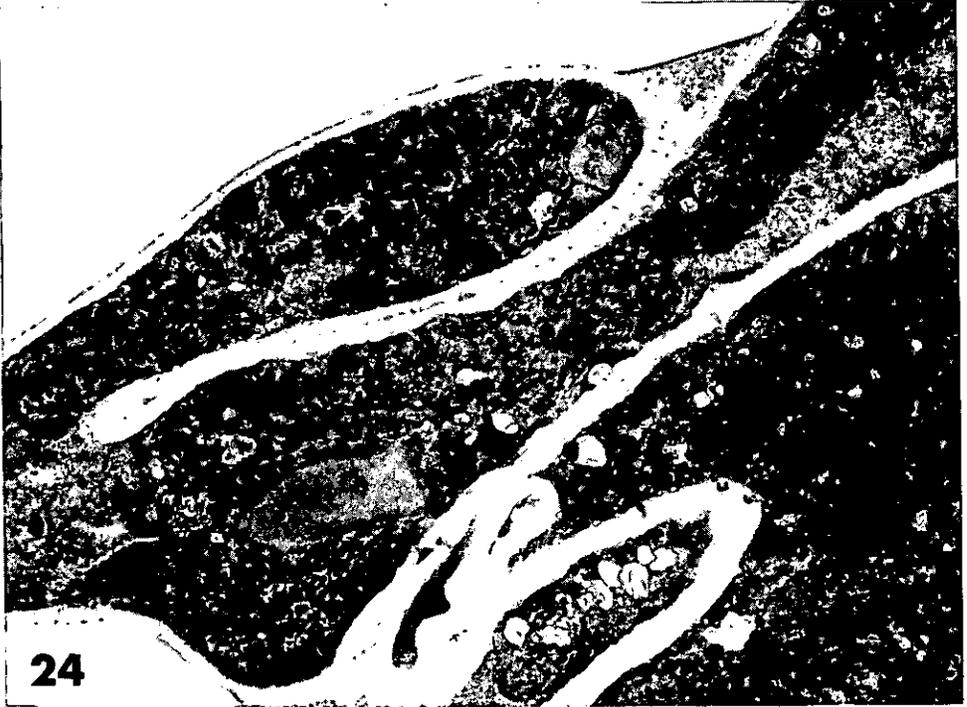
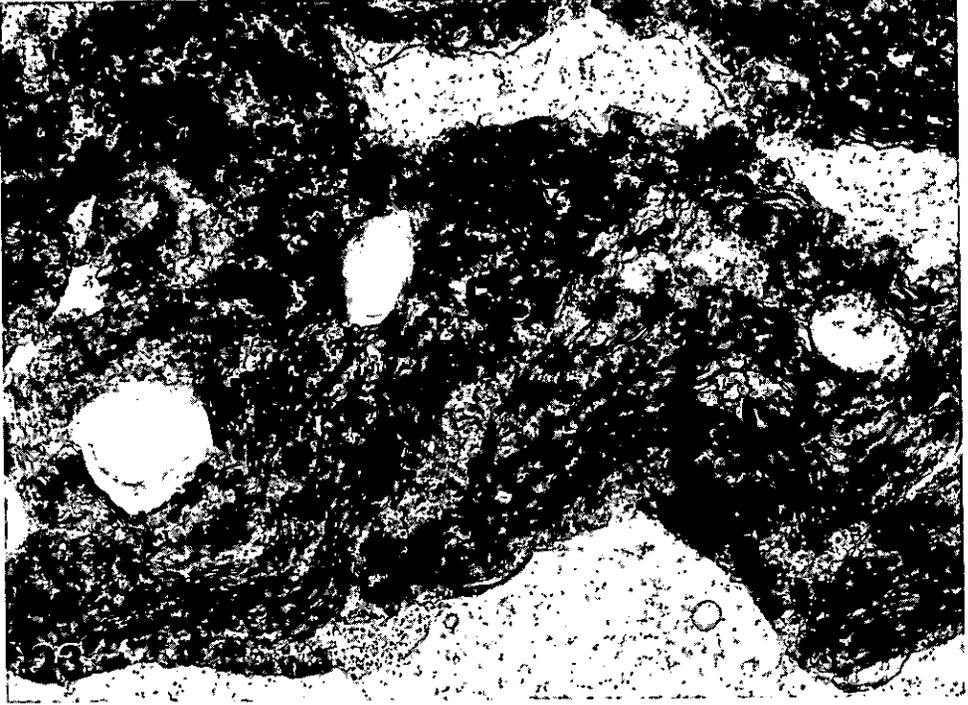


写真23 1.0 ppm SO₂で8時間暴露処理したホウレンソウ葉に観察された細胞内構造体の凝集。×16000

Plate 23 Aggregation of cellular contents in a spinach leaf fumigated with 1.0 ppm SO₂ for 8 h. ×16000

写真24 1.0 ppm SO₂で8時間暴露処理したホウレンソウ葉に観察された細胞の収縮。×9700

Plate 24 Shrinkage of cells in a spinach leaf fumigated with 1.0 ppm SO₂ for 8 h. ×9700



- 写真 25 0.5 ppm O₃ + 1.0 ppm SO₂を 30 分暴露処理したホウレンソウ葉の横断切片の光学顕微鏡写真。トルイジンブルー染色による。海綿状組織 (sp) の葉緑体 (c) の染色性が低下している。× 420
- Plate 25 Light micrograph of a cross section of a spinach leaf fumigated with 0.5 ppm O₃ + 1.0 ppm SO₂ for 30 min. The section was stained with toluidine blue. Note low stainability of spongy cell chloroplasts (sp, c). × 420

- 写真 26 0.5 ppm O₃ + 1.0 ppm SO₂ で 30 分暴露処理したホウレンソウ葉の葉緑体。× 13000
- Plate 26 Chloroplasts in a spinach leaf fumigated with 0.5 ppm O₃ + 1.0 ppm SO₂ for 30 min × 13000

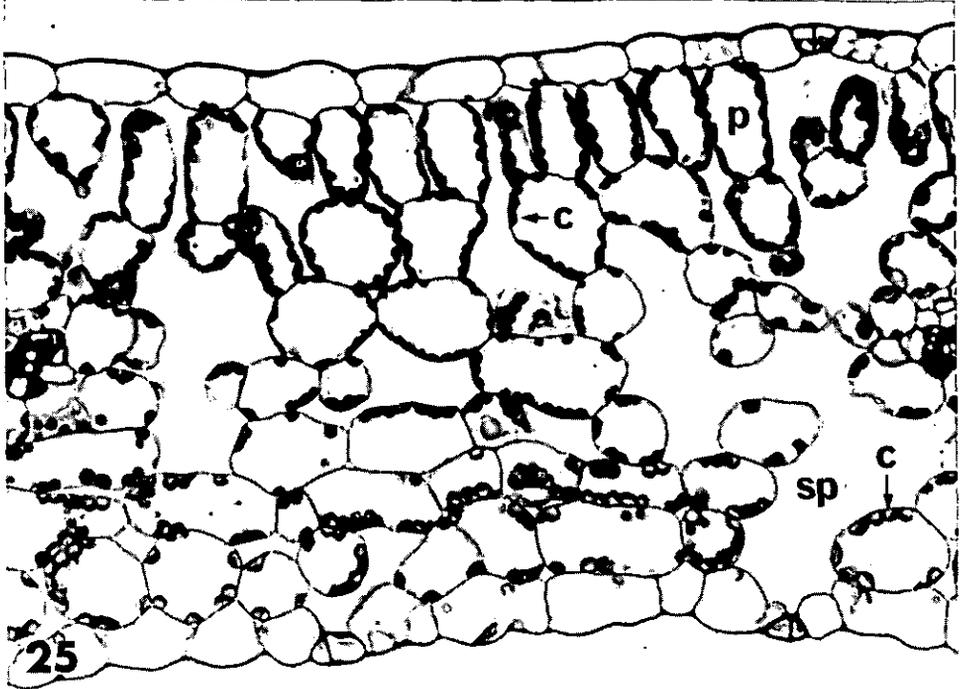


写真 27 0.5 ppm O₃ + 1.0 ppm SO₂で30分暴露処理したホウレンソウ葉に観察された葉緑体の融合(矢印)。×11000

Plate 27 Fusion of chloroplasts (arrows) in a spinach leaf fumigated with 0.5 ppm O₃ + 1.0 ppm SO₂ for 30 min. × 11000

写真 28 0.5 ppm O₃ + 1.0 ppm SO₂で1時間暴露処理したホウレンソウ葉に観察された葉緑体の凝集。×7000

Plate 28 Aggregation of chloroplasts in a spinach leaf fumigated with 0.5 ppm O₃ + 1.0 ppm SO₂ for 1 h. × 7000

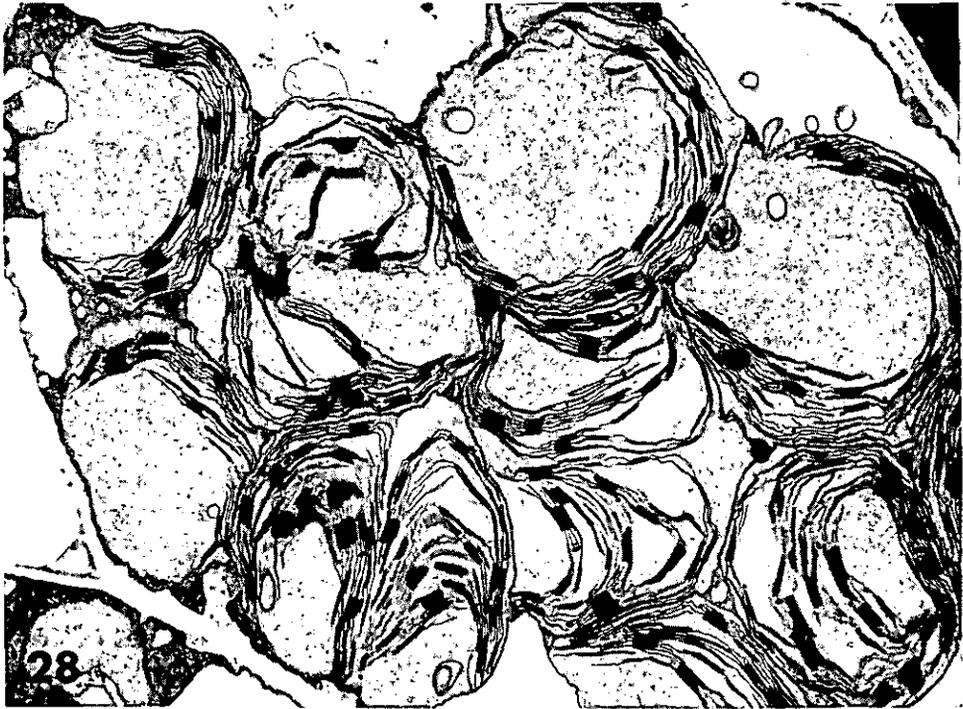


写真 29 0.5 ppm O₃ + 1.0 ppm SO₂ で1時間暴露処理したホウレンソウ葉に観察された葉緑体の融合 (矢印)。× 14000

Plate 29 Fusion of chloroplasts (arrow) in a spinach leaf fumigated with 0.5 ppm O₃ + 1.0 ppm SO₂ for 1 h. × 14000

写真 30 0.5 ppm O₃ + 1.0 ppm SO₂ で2時間暴露処理したホウレンソウ葉に観察された細胞の収縮。× 11000

Plate 30 Shrinkage of cells in a spinach leaf fumigated with 0.5 ppm O₃ + 1.0 ppm SO₂ for 2 h. × 11000



II - 6

混合大気汚染ガスの高等植物への影響

I. NO₂, O₃混合ガス処理による可視障害の発現

古川昭雄¹・猪野瀬桂子²・横山政昭³・田崎忠良²
戸塚 績¹・牛島忠広³

Effects of mixed air pollutants on higher plants

I. Foliar injury caused by NO₂ + O₃ mixture

Akio FURUKAWA¹, Keiko INOSE², Masa-aki YOKOYAMA³,
Tadayoshi TAZAKI², Tsumugu TOTSUKA¹ and Tadahiro USHIJIMA³

要 旨

大気汚染物質による障害の発現に関する研究は、これまでに数多くの植物を用いて膨大な報告がなされている。しかし、それらの報告は単独汚染質の影響について述べてあり、複合汚染質による影響の報告は少ない。そこで、NO₂とO₃の混合ガス処理による植物の可視障害発現について、障害評価方法に注目しながら明らかにすることを試みた。

ヒマワリ (*Helianthus annuus* L. cv. Russian Mammoth) を植物材料として用いた。ヒマワリは人工培地で種子より育て、自然光型温室で4~5週間栽培した。クロロフィルはエタノール抽出法とアセトン抽出法を用い、両者の比較検討を行ったが方法の違いによる基本的差は見られなかった。そこで、一度に大量の測定が可能なエタノール抽出法を用い、ガス暴露処理された植物の可視障害を観察した後に、葉のクロロフィルを抽出測定し、NO₂, O₃の植物影響を評価する試みをした。

NO₂, O₃各単独ガス処理では可視障害が発現しなくても、混合して処理すると可視障害が見られ、NO₂の濃度が高まるにつれて障害の度合は増加した。可視障害をクロロフィルa/b比との関係でみると、NO₂単独処理では、顕著な可視障害が発現する前からクロロフィルa/b比が変化した。また、O₃単独とNO₂, O₃混合処理による

-
1. 国立公害研究所 生物環境部
 2. 東邦大学 理学部
 3. 東京農工大学 農学部
 1. Division of Environmental Biology, National Institute for Environmental Studies, Tsukubagakuen, Ibaraki 305
 2. Faculty of Science, Toho University, Funabashi, Chiba. 274
 3. Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183

a/b 比の変化は類似していた。 NO_2 、 O_3 混合処理による可視障害の症状は単独ガス処理の場合と似ており、そのことは a/b 比によっても明らかにされた。

クロロフィル量の変化は、必ずしも可視障害の度合を反映しておらず、処理するガスの種類によって異なることが判明した。

緒 言

過去半世紀にわたって、植物に対する大気汚染質の影響に関する報告がなされ、それについての総説も書かれている (6, 10, 18,)。しかし、多くの研究は植物に対する単一ガスの影響である。

野外条件下では、大気汚染質が単一で存在することはほとんどなく、二種類あるいはそれ以上のガスが存在し、植物に影響を与えている。とりわけ、都市とその近傍では、工場からの排出ガスと車の排気ガスが混在し、数十種類もの大気汚染質が大気中に存在する。それゆえ、植物に対する大気汚染の影響をより良く理解するためには、混合大気汚染の植物影響を研究する必要がある。

近年、いくらかの研究者によって植物に対する混合大気汚染質の研究がなされてきている (15)。Menser and Heggstad (11) は、最初に SO_2 と O_3 の混合処理によっていわゆる相乗効果が見られると報告している。その後、農作物や自然植生に対する混合処理の影響が報告されている (4, 5, 20)。その他の種類の混合ガスの影響についての報告は少ない。White ら (21) と Bennett ら (3) は、いき値が SO_2 と NO_2 の混合処理によって低下すると報告している。

NO_2 と O_3 は都市近郊の大気汚染質の重要な成分で、光化学スモッグの発生要因ともなる。とりわけ O_3 は、それ自体でも植物の葉に可視障害を発生させうるほどの高濃度が存在する。しかし、この二種の大気汚染質が混在した時に植物がどのような反応を示すかについての報告はない。そこで、 NO_2 と O_3 を暴露して、ヒマワリ葉の可視障害を観察することによって NO_2 、 O_3 の混合処理の影響を明らかにする試みを行った。

材料および考察

植物材料：ヒマワリ (*Helianthus annuus* L. cv. Russian Mammoth) の種子をベンレート 1,000 倍液に 30 分間浸漬し、流水で一晩洗浄したのち、 10^{-4} アールのプラスチック製の鉢に 3 粒ずつ播種した。なお培地はピートモス・パーミキュライト・パーライト・小砂利を体積比で 2 : 2 : 1 : 1 に混合したものをを用いた。播種後 1 週間してから各鉢の個体数を 1 個体とした。植物の栽培は昼温 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、夜温 $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、湿度 $75 \pm 5\%$ の自然光型ファイトトロン温室において行った。灌水は朝夕 2 回、施肥はハイポネックスの 1,000 倍液を週 2 回灌水の代りにやることで行った。実験材料には播種後 4 ~ 5 週のものを用いた。

クロロフィル抽出方法：エタノールに浸漬してクロロフィルを抽出し測定した。この方法を検討するために、一般的方法である 80% アセトンを用いてクロロフィルを抽出する方法と比較した。ヒマワリの健全葉ではクロロフィル含量に差がほとんど見られないため、暗所に数日間放置すること

によって白化させ、クロロフィル含量を変化させた。肉眼的にクロロフィル含量が異なると思われるヒマワリから葉令などを考慮せず、葉をサンプリングし、葉脈をはさんで左右に分け、一方をアセトンによる抽出、他方をエタノールによる抽出に使用した。葉を切断後、葉面積を測定し、クロロフィル含量は単位葉面積あたりで求めた。

アセトンによるクロロフィルの抽出は Arnon (2) の方法によった。80%アセトンを切りきざんだヒマワリ葉に加え、ホモゲナイザーで約1分間粉碎し遠心分離によって上澄液をとり、その吸光度を645, 663 nmで測定し、次式によってクロロフィル含量を求めた。

$$\text{Chl } a = 12.7 A_{663} - 2.69 A_{645}$$

$$\text{Chl } b = 22.9 A_{645} - 4.68 A_{663}$$

エタノールによるクロロフィルの抽出は Wintermans and Demots (22) の方法によった。葉面積を測定した葉を粉碎せずに50ml三角フラスコに入れ、葉全体が浸るように100%エタノールを入れ、フタをして暗所に放置した。翌日、フラスコ中のクロロフィル抽出液を100 ml三角フラスコに移し、少量のエタノールで洗浄し、洗液を抽出液に加えた。洗浄後再びエタノールで満たし、暗所に放置した。この操作を3回繰り返えし、葉中のクロロフィルを完全に抽出、収集した。抽出液の吸光度を649, 665 nmで測定し、次式によってクロロフィル含量を求めた。

$$\text{Chl } a = 13.70 A_{665} - 5.76 A_{649}$$

$$\text{Chl } b = 25.80 A_{649} - 7.60 A_{665}$$

以上の操作によって得た全クロロフィル含量を比較した(図1)。その結果、相関係数0.97、回帰直線の勾配0.94で、両者の間にほぼ1:1の関係があることが判明した。

一枚の葉を左右半分に分けて測定法の比較を行ったが、葉の左右でクロロフィル含量に差があるかどうかを調べてみた。クロロフィルの抽出はエタノール浸漬法によって行った。図2より明らかなように左右ではほとんど差がなく、平均3%の差にすぎなかった。

エタノール浸漬法は時間的に2~3日間を要するので、保存期間中にクロロフィルの分解が起ると不都合を生じるので、保存条件を検討した。エタノール中のクロロフィル含量の変化を室温・明状態、室温・暗状態、低温・暗状態で調べた(図3)。室温・明状態では2時間後で分解が顕著になり、初期値の2%, 12時間後で18%, 24時間後では28%になった。減少割合はクロロフィル濃度に関係なかった。室温・暗状態と低温・暗状態では48時間後においてもクロロフィル含量に変化がなく、保存温度はクロロフィルの分解に関係なく、暗所に保存すればよいことが判明したので、以後の測定におけるエタノール抽出液の保存は室温・暗所で行った。

葉のクロロフィル含量を単位葉面積、乾重量、生重量で表す方法がある。しかし、大気汚染質処理によって可視障害が発現すると葉はしおれたり、まいたりするので、生重量、葉面積の測定が困難になる。そこで、乾重量をクロロフィル抽出葉について求められるならば非常に好都合であると考

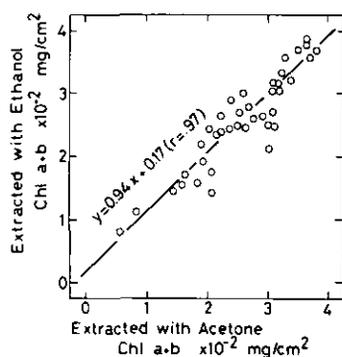


図1 クロロフィル抽出法の比較。ヒマワリ葉の左半分をエタノール浸漬法で、右半分を80%アセトンで粉砕しクロロフィルを抽出した。両者の相関は図中に示した直線回帰式で表される。

Fig. 1 Relationship between chlorophyll concentration of ethanol extracted and that of 80 % acetone extracted leaves. Sunflower leaves were cut into half and chlorophyll was extracted from right half with 80 % acetone and was extracted from left half with ethanol. The relationship determined by linear regression is shown in a figure.

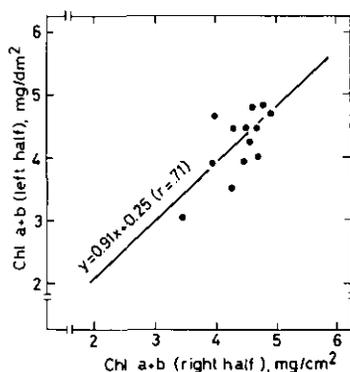


図2 ヒマワリ葉の左右でのクロロフィル含有量。主脈の左右両側のクロロフィル量をエタノール浸漬法を用いて測定した。両者の相関は図中に示した直線回帰式で表される。

Fig. 2 Relationship between chlorophyll concentration of right half and that of left half. Chlorophyll was extracted with ethanol. The relationship determined by linear regression is shown in a figure.

え、エタノール抽出による乾重量の変化を調べた。同一葉の左右でクロロフィル量に変化がないことから、葉半の一方を100%エタノールに浸漬し、クロロフィル抽出後、葉の乾重量を求めた。残りの半分は乾燥し乾重量を求めた。エタノール抽出を行った葉の乾重は対照の乾重の約80%で、エ

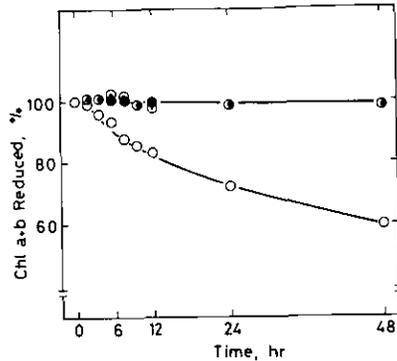


図3 光によるエタノール溶液中のクロロフィルの分解。エタノールで浸漬抽出したクロロフィルを室温、明状態(○)、室温、暗状態(◐)、低温、暗状態(●)で放置し、クロロフィル量の変化を調べた。

Fig. 3 Effect of illumination on chlorophyll concentrations in ethanol extracts. Ethanol extracts were stored in the light at room temperature (○), in the dark at room temperature (◐) or in the dark in a refrigerator (●).

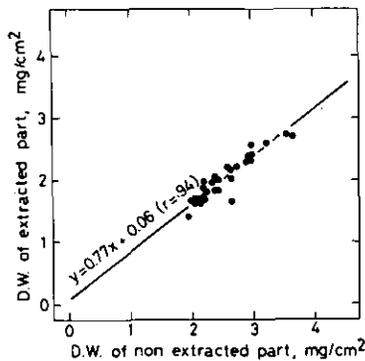


図4 エタノール浸漬による乾重量の変化。ヒマワリ葉を主脈の左右半分に切断し、片側をエタノール浸漬した後、乾重量を測定し、他方をそのまま乾燥し重量を測定して比較した。両者の相関は図中に示した直線回帰式で表される。

Fig. 4 Effect of ethanol extraction on dry weight of leaves. Sunflower leaves were cut into half and dry weight was determined with or without extraction with ethanol. The relationship determined by linear regression is shown in a figure.

タノール抽出による乾重量の減少が認められた(図4)。この事実は、エタノール抽出によってクロロフィルと共に、糖、脂質、タンパク等が溶出したためと考えられる。Knudsonら(8)は、エタノール抽出後の乾重量に対するクロロフィル量として定量する方法を報告しているが、20%の乾重量の変化は、クロロフィル量を過大に評価することになり、不適当と思われる。そこで以下の実験においては、測定に多少の困難さはあったが、葉面積を測定し、単位面積あたりのクロロフィル量として表示した。

大気汚染ガス処理方法：播種後4～5週目のヒマワリを1回の処理につき10個体を人工光型ガス暴露チャンバー内に置き、植物高において照度36 klx、温度30°C、湿度75%の条件下でNO₂、O₃、もしくは混合ガスを5時間処理した。人工光型ガス暴露チャンバーの構造および性質についてはすでに詳細に報告されている(1)。ガスの濃度制御は、NO₂はケミルミ法によるNO-NO₂-NO_x分析計(Thermo Electron社製、14型)を用い、O₃はケミルミ法によるO₃分析計(紀本社製、806型)を用いてモニターと制御を行った。

大気汚染ガス処理後、照度400lx、温度25°Cの室内に一昼夜放置し、可視障害の観察を行った。障害の程度を表すのに、ネクロシスや、クロロシスを起した部分を一枚の葉全体の面積に対する割合で10段階に分けて示した。可視障害の評価はガス処理した個体すべてについて、子葉を0葉位として下位の老葉から数え、全葉位の葉について行った。なお、茎のほぼ等位置から出ている葉は同葉位とし、上部の幼若葉についての可視障害の評価は行わなかった。

結果および考察

NO₂、O₃単独および混合処理による可視障害の発現：最初に、NO₂、O₃単独処理で可視障害がどのように発現するかについて調べた。可視障害発現には、ガスの種類や濃度、さらに葉位によって異なることが数多く報告されている(3, 4, 19)。そこで、ガスの濃度を変え、葉位別にNO₂による可視障害の発現を調べた(図5)。2～8 ppm NO₂単独処理では、老葉に障害の発現が顕著で、壮、若葉では目立った被害は観察されず、その多くが障害度5%以下であった。0.2 ppm O₃単独処理ではいずれの葉位においても可視障害の発現はなかった。

単独で処理した時には可視障害が観察されなかった濃度、すなわち、0.2 ppm O₃と2 ppm NO₂を混合処理すると可視障害が発現した(図6)。また、O₃の濃度を0.2 ppmとし、NO₂の濃度を高めて行くにしたがって可視障害の発現割合は増加した(図6)。しかし、0.2 ppm O₃と0.2 ppm NO₂の混合処理によってはほとんどの葉位において可視障害の発現は観察されなかった。

SO₂とO₃、NO₂とSO₂の混合処理によって障害の割合が単独処理の時よりも増大するとの報告が数種の植物について報告されている(19, 20)。しかし、NO₂とO₃の混合処理による影響についての報告は少なく、単独処理の時よりも被害が増加するとの報告は初めてと思われる。さらに、混合処理を行うと単独で処理した時よりも被害の程度が減少したり、単独処理の時と同程度の被害が発

現したとの報告が、 SO_2 と O_3 の混合処理について報告されている(19)。しかし、今回我々が行った NO_2 と O_3 の混合処理の実験においては、そのような効果は観察されず、混合処理を行うと常に単独処理の場合よりも被害の程度が増加した。しかし、混合処理による効果の度合は葉令によって著しく異なり、壮葉において効果が最も顕著であった。若葉においても混合処理による障害の増加

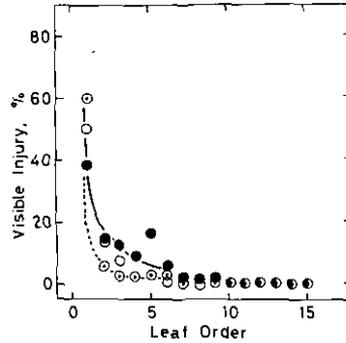


図5 NO_2 による可視障害の発現。ヒマワリの葉位別の可視障害の発現を8.0 ppm (●), 4.0 ppm (◐), 2.0 ppm (○) NO_2 を5時間処理した後に観察した。各点は10個体の平均値を示す。

Fig. 5 Foliar injury caused by NO_2 . The degrees of foliar injury were determined after the 5 hr-exposures of 8.0 ppm (●), 4.0 ppm (◐) or 2.0 ppm (○) NO_2 . Each estimate is the mean of ten determinations.

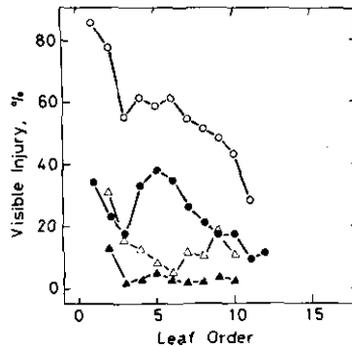


図6 NO_2 と O_3 混合処理による可視障害の発現。0.2 ppm O_3 と8.0 ppm (○), 4.0 ppm (●), 2.0 ppm (△), 0.2 ppm (▲) NO_2 と混合し、5時間処理した。各点は10個体の平均値を示す。

Fig. 6 Foliar injury caused by NO_2 and O_3 mixture. The degree of foliar injury was determined after the 5 hr-exposures of the mixture of 0.2 ppm O_3 and 8.0 ppm (○), 4.0 ppm (●), 2.0 ppm (△) or 0.2 ppm (▲) NO_2 . Each estimate is the mean of ten determinations.

効果は見られたが、壮葉ほどではなく、又、老葉においてはNO₂単独処理によってもNO₂濃度が増加するにつれて可視障害が観察され、混合処理による障害の増加傾向はそれほど顕著なものではなかった。

葉令を一定にして、NO₂、O₃、NO₂+O₃のガス濃度を変えた時に可視障害がどのように変化するかを調べた(図7)。葉位は第4、5、6とし、ガス処理を行った。この葉位の葉はクロロフィル量が一定しており、以後の実験に都合がよいため第4、5、6葉位の葉を用いた。

2~8 ppm NO₂ 5時間処理では図5からも明らかなように、可視障害発現の割合は低く、4 ppm以下ではほとんど障害の発現は見られなかった。一方、O₃では0.4 ppm以下では可視障害の発現は観察されなかった。すなわち、同一濃度ではO₃の方がNO₂よりも毒性が強く、かなりの低濃度でもO₃による可視障害の発現が見られた。この毒性の違いは、Bennett and Hill (3) のアルファルファを用いた光合成に対する影響評価の結果と一致している。また、NO₂とO₃の混合処理によって可視障害の発現は、かなり低濃度のNO₂から観察された。NO₂濃度と可視障害の関係はほぼ直線的で、O₃単独処理の場合にも両者の間に直線関係が得られた。さらに、0.2 ppm O₃と種々の濃度のNO₂を混合して処理した時のNO₂濃度と障害の関係の直線の勾配はO₃濃度と障害の直線関係のこう配に類似していた。可視障害の症状は、観察した結果、O₃単独によって引き起こされた症状とNO₂と混合した時に生じた症状と類似していた。すなわち、ヒマワリ葉にはNO₂、O₃混合処理によってO₃単独処理の時に観察される特有の漂白(白黄化)が見られた。SO₂とO₃混合処理によってもO₃型の可視症状が発現するとの報告もあり(15)、SO₂によっても、またNO₂によっても、O₃の効果を促進する働きを有しているように思われる。

可視障害とクロロフィルa、b量との関係：ヒマワリ健全葉の全クロロフィル量は3~5 mg/dm²の範囲内にあるが、葉令によってもかなりの差がある。また、同一葉令であっても生育時の環境条件、施肥条件によってクロロフィル量は変動し、可視障害の評価をクロロフィル量によって画一的に行うことは困難である。しかし、a/b比は葉令によって多少の高低はあるものの、変動はクロロフィル量の変動よりも少なく、可視障害の評価にはより都合がよいと思われた。そこで、可視障害の発現によってクロロフィルa/b比がどのように変化するかを調べた(図8)。

NO₂単独処理によってa/b比は顕著な影響を受け、可視障害のわずかな変化にもa/b比は影響され減少した。一方、O₃単独処理、並びにNO₂、O₃混合処理の際のa/bの変化は可視障害の発現割合につれて減少し、ほぼ直線関係を示した。

ここで考えられることは、NO₂処理によって可視障害(クロロシス、ネクロシス)が発現する以前に、葉組織内部の生理活性が何らかの影響を受けてクロロフィル量が減少し、a/b比の減少として見られるようになるものと思われる。クロロフィルbはクロロフィルaに比べて大気汚染質による影響を受けにくく(16)、a/b比の著しい変化は、もっぱらクロロフィルaの変動によるものと思われる。

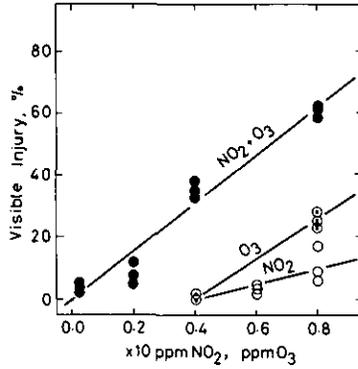


図7 NO₂、O₃単独および混合処理による可視障害の発現。混合処理の時のO₃濃度は0.2 ppm。第4～6葉位の葉を使用し、各点は10個体の平均値を示す。

Fig. 7 Foliar injury caused by various concentrations of NO₂ and/or O₃. Ozone concentration in the mixture was 0.2 ppm. Each estimate is the mean of ten determinations in the 4th to 6th leaves counted from the bottom.

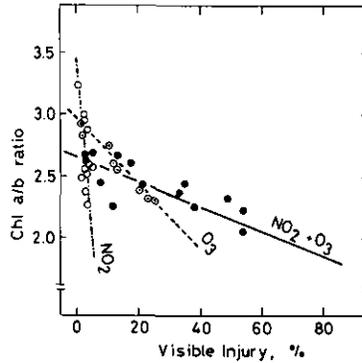


図8 クロロフィルa/b比に対するNO₂、O₃単独および混合処理の影響。処理条件は図7に同じ。

Fig. 8 Effect of various concentrations of NO₂ and/or O₃ on chlorophyll a/b ratio. See the legend in Fig. 7.

結 論

大気汚染の研究の一環として、樹木の活力度なるものを評価しようとする試みがある(23)。活力度なる、いたって文学的、情緒的定義を科学的測定法を用いて評価することにそもそも無理がある。しかし、この議論はさておいて、活力度を植物の緑の度合と考えてクロロフィル量を測定している人がいる(13)。しかし、ここで注意をしなければならないことは、大気汚染以外にも、クロロフィル量を変化させる条件がいくらかでもあることである。光条件によっては勿論のこと(9)、施肥条件によってもクロロフィル量は大きく変動する(17)。また、水分ストレス(乾燥)によってもクロロフィル量は変動し(12)、大気汚染の影響評価をクロロフィル量によって評価することの困難さを物語っている。植物の種によるクロロフィル量の変化は当然のこととして、たとえ、同一種の植物を使用してクロロフィル量を測定したとしても、クロロフィル量が変化したからといって植物が大気汚染によって被害を受けていると考えるのは大変な誤解だと言ってもさしつかえない。

さらに、可視障害をクロロフィル量で評価するには、大気汚染質によるクロロフィルの分解が相当進行していなくては困難である。可視障害率とクロロフィル a/b 比の関係は1:1にならず、可視障害率が50%になっても a/b 比の変化は約1.0変化するにすぎず(図8)、可視障害の評価をクロロフィル量によって行うことの困難さを示している。すなわち、可視障害の程度が少ない時には健全部位のクロロフィルによって稀釈され、クロロフィル量の減少が隠されてしまう。また、 SO_2 によってひき起される可視障害の場合には、障害が局部的に発現し(14)、全体のクロロフィル含量の減少としては顕著な減少となつては表れてこない。

実験室において均一な材料を用い、均一な条件でクロロフィル量の変動が大気汚染のみによるといった際に、可視障害の評価の一助としてクロロフィル量の変動を測定するのは筋が通っているが、その他の場合、例えば前述の活力度の評価、リモートセンシングの開発のためのクロロフィルの測定は多くの問題を含んでいる。すなわち、クロロフィル量によってのみこれら的事を評価するのは不可能であつて、他の色素類、例えばカロチノイドやアントシアニンについても同様に測定し、何等かの基準を作る必要がある。

引 用 文 献

1. 相賀一郎・大政謙次・安保文彰. 1978. 大気汚染ガス暴露のためのグロースキャビネット. 国立公害研究所特別研究成果報告第2号: 193 - 210
2. Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15
3. Bennett, J. H., A. C. Hill, A. Soleimani and W. H. Edwards. 1975. Acute effects of combination of sulphur dioxide and nitrogen dioxide on plants. *Environ. Pollut.* 9: 127-132
4. Costonis, A. C. 1970. Acute foliar injury of eastern white pine induced by sulfur dioxide and ozone.

Phytopathol. 60:994-999

5. Dochinger, L. S. F., W. Bender, F. L. Fox and W. W. Heck. 1970. Chlorotic dwarf of eastern white pine caused by an ozone and sulphur dioxide interaction. *Nature* 22: 476
6. Dugger, W. M., Jr. and I. P. Ting. 1970. Air pollution oxidants — Their effects on metabolic processes in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21: 215-234
7. Hill, A. C. and J. H. Bennett. 1970. Inhibition of apparent photosynthesis by nitrogen oxides. *Atmos. Environ.* 4: 341-348
8. Knudson, L. L., T. W. Tibbitts and G. E. Edwards. 1977. Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. *Plant Physiol.* 60: 606-608
9. Logan, K. T. and G. Krotkov. 1968. Adaptations of the photosynthetic mechanism of sugar maple (*Acer saccharum*) seedlings grown in various light intensities. *Physiol. Plant.* 22: 104-116
10. Malhotra, S. S. and D. Hocking. 1976. Biochemical and cytological effects of sulphur dioxide on plant metabolism. *New Phytol.* 76: 227-237
11. Menser, H. A. and H. E. Heggestad. 1966. Ozone and sulphur dioxide synergism: Injury to tobacco plants. *Science* 153: 424-425
12. Mohanty, P. and J. S. Boyer. 1976. Chloroplast response to low leaf water potentials IV. Quantum yield is reduced. *Plant Physiol.* 57: 709
13. 中島 徹. 1973. 赤外カラー写真による環境と樹木活力の診断. 農業および園芸 48: 195 - 200
14. Omasa, K., F. Abo, Y. Hashimoto and I. Aiga. 1980. Evaluation of air pollution injury to plants by image processing. *Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud.* 11: 249-254
15. Reinert, R. A., A. S. Heagle and W. W. Heck. 1975. Plant responses to pollutant combinations. In "Responses of plants to Air Pollution" (Ed. by Mudd, J. B. and Kozlowski, T. T.) 159-178, Academic Press, New York.
16. 島崎研一郎・菅原 淳. 1978. 二酸化イオウの植物影響の作用機序に関する研究(1) 光合成電子伝達反応阻害とクロロフィル分解との関連について, 国立公害研究所特別研究成果報告第2号: 35-46
17. 田中 明. 1973. 作物葉の栄養生理. 化学と生物 6: 346 - 353
18. Thomas, M. D. 1961. Effect of air pollution on plants. WHO Monogr. Ser., No.46: 233-278
19. Tingey, D. T., W. W. Heck and R. A. Reinert. 1971. Effect of low concentrations of ozone and sulfur dioxide on foliage, growth and yield of radish. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 96: 369-371
20. Tingey, D. T., R. A. Reinert, J. A. Dunning and W. W. Heck. 1973. Foliar injury responses of eleven plant species to ozone/sulphur dioxide mixtures. *Atmos. Environ.* 7: 201-208
21. White, K. L., A. C. Hill and J. H. Bennett. 1974. Synergistic inhibition of apparent photosynthesis rate of alfalfa by combinations of sulfur dioxide and nitrogen dioxide. *Environ. Sci. Technol.* 8: 574-576
22. Wintermans, J. F. G. M. and A. DeMots. 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol. *Biochim. Biophys. Acta* 109: 448-453
23. 山家義人. 1971. 東京都内における樹木衰退の実態. 森林立地 13: 28-31.

Summary

Many workers have reported about the foliar injury caused by air pollutants. However, most workers have concentrated their efforts on the effect of single air pollutant and less is known about the effect of air pollutants in mixtures. In the present report, we investigated the foliar injury caused by NO₂ and O₃ mixture.

Sunflower plants (*Helianthus annuus* L. cv. Russian Mammoth) were grown in pots in a phytotron greenhouse for 4 to 5 weeks. Chlorophyll was extracted either by 80% acetone (acetone method) or by 100% ethanol (ethanol method). We compared these two extraction methods and

found no differences between these two methods. Then we used methanol method, because this method is more convenient than acetone method for the determination of the chlorophyll contents of a large amount of plant materials. We tried to estimate the degree of foliar injury by chlorophyll content.

No significant foliar injury was observed when sunflower plants were treated with 0.2 ppm O₃ or 0–4.0 ppm NO₂ singly for 5 hrs. When plants were treated with the mixture of O₃ and NO₂, the degree of foliar injury increased with increasing concentration of NO₂. The chlorophyll *a/b* ratio was reduced before the foliar injury was observed when plants were treated with higher concentrations of NO₂ singly. The changes of chlorophyll *a/b* ratio caused by the treatment of O₃ were similar with those caused by the treatment of the mixture of NO₂ and O₃. Furthermore, the symptom of O₃ treated leaves was resembled with that of NO₂ + O₃ treated leaves.

In the present report, we found that the degree of foliar injury could not be determined by the changes in chlorophyll contents or *a/b* ratios. The changes in chlorophyll contents were influenced not only by the concentrations of air pollutants but also by the species of air pollutants or by the plant age. This fact may suggest that the determination of chlorophyll content is not a suitable method to assess the air pollution effects or to estimate the activity of plants.

Key words: NO₂ - O₃ mixture – Foliar injury – Sunflower – Chlorophyll content

II-7

ヒマワリの生長に及ぼすオゾン長期暴露の影響

清水英幸¹・本橋 理²・岩城英夫²・古川昭雄¹・戸塚 績¹

Effects of chronic O₃ exposure on the growth of sunflower plants

Hideyuki SHIMIZU¹, Satoru MOTOHASHI², Hideo IWAKI²,
Akio FURUKAWA¹ and Tsumugu TOTSUKA¹

要 旨

一定の環境に制御した人工光型グロースキャビネットを用いて、ヒマワリを播種後14日めから12日間、0.1 ppmおよび0.2 ppmのオゾン (O₃) に暴露処理し、植物の乾物生長に及ぼすO₃の影響について検討した。O₃暴露開始日および6日め、12日めに植物を選出して葉面積、器官別乾重などを測定し、それをもとに生長解析法を用いて生長の各パラメータを算出した。0.1 ppmおよび0.2 ppm O₃暴露によって著しい可視障害が発現し、下位葉の枯死が観察された。植物個体の乾重は0.1 ppmおよび0.2 ppm O₃暴露開始後12日めで、各々対照より11%、32%減少した。O₃暴露によって各器官とも乾重の増加が抑制されたが、その程度は根で最も大きく、葉で最も小さかった。また葉面積増加も葉乾重増加と同程度にO₃によって抑制された。生長解析の結果、0.1 ppm O₃は暴露前半6日間に植物の相対生長率 (RGR) や純同化率 (NAR) を減少させたが、後半は減少させなかった。これに対して0.2 ppm O₃は暴露処理期間を通じRGR, NARを減少させたが、後半における減少率はNARの方がRGRよりも大きかった。また0.2 ppm O₃は植物の葉面積比 (LAR) や葉重比 (LWR) を増加させたが、一方茎重比 (SWR) や根重比 (RWR) を減少させた。これらの結果から、低濃度O₃の長期間暴露は植物の純光合成速度や光合成産物の分配率に影響することが示唆された。

緒 言

光化学オキシダントによる大気汚染は、1944年に Los Angeles において発見されて以来 (21)、それが植物に及ぼす影響について多くの研究がなされている (9, 22, 32, 35)。光化学オキシダント

-
1. 国立公害研究所 生物環境部
 2. 筑波大学 生物科学系
 1. Division of Environmental Biology, The National Institute for Environmental Studies, Tsukubagakuen, Ibaraki 305
 2. Institute of Biological Science, The University of Tsukuba, Sakura-mura, Ibaraki 305

の主要成分であり、植物に対する影響が最も大きいと考えられている物質はオゾン (O_3) であるが (11, 14, 29, 32, 35), 現在, 大都市や工業地帯においては1時間平均値で0.1 - 0.2 ppmの O_3 がしばしば観測されている (7, 10, 24, 33)。

O_3 の植物影響に関しては、高濃度汚染質の短時間暴露による急性障害と、比較的低濃度の汚染質に長期間暴露した場合に生じる慢性影響に大別される。 O_3 による急性障害については数多くの研究がなされており、植物葉面に可視障害を起こしたり (4, 10, 14, 34), 光合成 (6, 17, 31), 呼吸 (19, 26, 41), 蒸散速度 (13, 42) などに影響を与えることが報告されている。

ところで現在野外で観測されているような比較的低濃度の O_3 の長期間暴露によって、植物の生長や収量は影響を受けると考えられ、社会的にも問題化しつつある。最近多くの研究者が数種の植物を用いて、その生長や収量に及ぼす低濃度 O_3 長期暴露の影響について報告している。Heagleら (8) は低濃度 O_3 処理によってスイートコーンの収量が減少したと報告している。また Tingeyら (36) によれば O_3 によってハツカダイコンの生長が抑制されるという。同様の結果がポプラ (16), インゲン (20), ダイズ (27, 37), トマト (23) などにおいても報告されている。しかし Bennettら (1) によれば低濃度 O_3 によってオオムギやヤナギタデの生長は促進されるという。また Horward と Treshow (15) は数種の陰生植物の生長が O_3 によって促進されると報告している。このように低濃度 O_3 処理によって生じる慢性影響についてはいまだに明確にされていない。またこれらの報告では1回の収穫で、植物の乾物生長や収量の増減に及ぼす O_3 の影響を議論しており、生長の素過程に及ぼす影響の解析は行われていない。

植物が O_3 に暴露された場合、その個体の中で種々の異なる反応が起こり、それらの反応の組合せの結果として最終的に生長の増減が観察されると考えられる。 O_3 の慢性影響をより詳細に調べるためには、植物の生長を、生理機能に対応するようないくつかのパラメータに分け (5), その個々のパラメータに及ぼす O_3 の影響を検討する必要があると思われる。そこで本研究において、我々はヒマワリを0.1および0.2 ppmの O_3 に12日間連続暴露し、植物の生長に及ぼす O_3 の影響について、いわゆる生長解析の手法を用いて検討した。

材料と方法

植物材料：実験材料としてロシアヒマワリ (*Helianthus annuus* L. cv. Russian Mammoth) を用いた。種子を流水に12時間浸した後、ベンレート1000倍液に1時間浸漬して滅菌し、流水で2時間洗浄した。人工培土を詰めたプラスチック製の鉢 (直径11cm, 高さ20cm) に3粒ずつ播種し、人工光型グローブキャビネット (170×230×190 cm³, 小糸工業製) で12日間育成した。播種後7日めに幼植物を間引き、1鉢あたり1個体仕立てとした。人工培土としては、バーミキュライト、ピートモス、パーライト、小砂利を2:2:1:1 (容量化) に混合したものを用い、基肥として1鉢に5gのMagamp-Kを加えた。また約15gの苦土石灰を加えて培土をpH 6.7に調整した。液肥

として Hoagland No 2 の微量元素 (12) を加えた Hyponex 1000 倍液を定期的 (週 1-3 回) に与えた。灌水は適宜行い培土が乾燥しないようにした。

グロースキャビネット内は以下に示すような一定の環境条件に制御して植物を育成した。気温は $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、相対湿度は $75 \pm 5\%$ 、照明は 24 個のメタルハライドランプ (陽光ランプ, 東芝製) を用い、熱線カットフィルターによって 800 nm 以上の波長を除去した結果、植物上で平均 $420 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ (約 115Wm^{-2} , 30 klx) の照度であった。なお明暗周期は 14/10 時間とした。活性炭フィルターおよびマンガンフィルターを通して外気中に存在している大気汚染質を除去した空気をキャビネット内に供給した。キャビネット内の風速は $20-40 \text{cm s}^{-1}$ で、換気量は $75 \text{m}^3 \text{h}^{-1}$ (換気率: 約 10 回/時間) であった。キャビネット内の CO_2 濃度は赤外線 CO_2 分析計 (URA-2 S 型, 島津製作所製) を用いた制御系によって $400 \pm 4 \text{ppm}$ に制御した。キャビネット内ではターンテーブル上に植物を置き、位置による影響が少なくなるようにした。

O_3 暴露処理: 播種後 12 日めに環境条件を前述のグロースキャビネットと同一に制御した (ただし換気量: $800 \text{m}^3 \text{h}^{-1}$) 人工光型ガス暴露用グロースキャビネットに植物を移動し、2 日間前処理した後、播種後 14 日めから 12 日間 O_3 に暴露処理した。 O_3 は無声放電によって酸素 (O_2) から発生させ、浄化した外気と混合してキャビネット内に供給した。ケミルミネッセンス法による O_3 分析計 (806 型, 紀本製作所製) を用いた制御系によって、キャビネット内の O_3 濃度を連続的に測定し、制御した。 O_3 濃度を 0 ppm (対照), $0.1 \pm 0.002 \text{ppm}$, $0.2 \pm 0.004 \text{ppm}$ として生長実験を行った。 O_3 は昼夜連続暴露処理した。実験中のグロースキャビネット内の環境条件を測定した結果、 O_3 濃度以外は全て同一であった。また O_3 暴露処理の間、二酸化硫黄 (SO_2) と二酸化窒素 (NO_2) も測定したが、この期間にはほとんど検出されなかった。

サンプリングおよび生長解析: O_3 暴露処理を開始する直前と処理後 6 日めと 12 日めに 12 個体の植物をサンプリングした。各植物個体の葉位別に葉面の可視障害度と枯損の程度 (葉面積に対する割合) を 5% ごとに目視評価した後、葉面積を面積計 (3100 型, ライカー社製) で測定した。葉数、植物高を測定した後、植物を葉、茎 (葉柄を含む)、根、花芽に分け、 $80-90^\circ\text{C}$ で 3-5 日間乾燥し、乾重を測定した。なお、葉の枯死部乾重は葉乾重の値から除いた。

各器官別の乾重および葉面積のデータを用いて、以下に示す式によって、相対生長率 (RGR), 純同化率 (NAR), 葉面積比 (LAR), 比葉面積 (SLA), 葉重比 (LWR), 茎重比 (SWR), 根重比 (RWR) を算出した (5)。

$$RGR = (1/W) \cdot (dW/dt) = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$$

$$NAR = (1/\bar{F}) \cdot (dW/dt) = [(W_2 - W_1) (\ln \bar{F}_2 - \ln \bar{F}_1)] / [(t_2 - t_1) (\bar{F}_2 - \bar{F}_1)]$$

$$LAR = \bar{F}/W$$

$$SLA = \bar{F}/F$$

$$LWR = F/W$$

$$SWR = S/W$$

$$RWR = R/W$$

ただしここで W_i , \bar{F}_i は t_i 日め ($i = 1, 2$) の個体乾重, 葉面積を, また F , S , R は各々葉, 茎, 根の器官別乾重を示す。なお, 上式群より $RGR = NAR \times LAR$, $LAR = LWR \times SLA$ と表せる。

結 果

0.1 ppm および 0.2 ppm O_3 暴露開始後 1 - 2 日めには, 葉の先端や葉縁部の表側に O_3 による典型的な可視障害の一つである白斑状の害徴 (14) が観察された。 O_3 処理期間が長くなるに従って可視障害部の面積は広がり, また新しく展開した葉にも害徴が認められた。可視障害の発現は 0.2 ppm O_3 暴露処理の場合に顕著であった。また O_3 暴露処理期間が長くなるに従って植物個体の下位葉の枯死がみられるようになった (表 1)。

乾物生長に及ぼす O_3 暴露の影響

ヒマワリの個体あたりの乾重の増加に及ぼす O_3 暴露処理の影響を図 1 に示す。暴露処理開始後 6

表 1 ヒマワリの諸形質に及ぼす O_3 暴露の影響^{a)}
Table 1 Effects of O_3 exposure on some characteristics of sunflower plants^{a)}

	O_3 concentration (ppm)		
	0.0 (control)	0.1	0.2
Visible injury (%) ^{b)}	1.2 ± 0.4	9.5 ± 5.2*** ^{c)}	46.8 ± 7.3***
Withered leaves (%) ^{b)}	1.1 ± 0.4	3.4 ± 0.5***	12.0 ± 2.6***
Withered leaves dry weight (mg)	68.2 ± 23.8	206.5 ± 38.2***	695.2 ± 139.7***
Flower bud dry weight (mg)	17.3 ± 6.9	16.0 ± 5.8	10.6 ± 3.8**
Number of leaves	24.4 ± 1.2	23.7 ± 1.8	26.6 ± 2.2**
Plant height (cm)	48.2 ± 3.4	47.1 ± 3.0	42.8 ± 3.8**

a) 処理開始後 12 日めにおける 12 個体の平均値と標準偏差を示す。

b) 全葉乾重に対する百分率。

c) 各処理区の対照区に対する有意差検定 (t -検定), **: 危険率 1% で有意, ***: 危険率 0.1% で有意。

a) Plants were harvested at 12 days after exposure started. Mean of 12 plants and standard deviation are indicated for each sample.

b) Percentage of the total leaf dry weight.

c) Significance of difference from control (t-test), **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

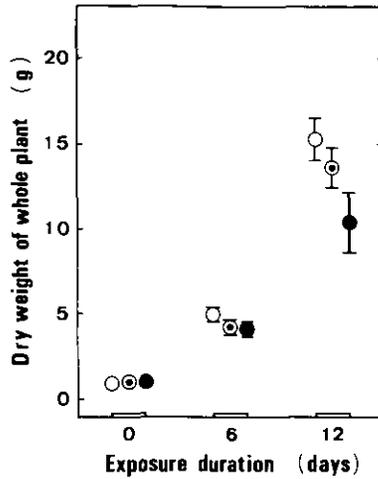


図1 ヒマワリ個体の乾物生長に及ぼす O_3 暴露の影響。枯死葉乾重を除く。播種後14日めから12日間 O_3 に暴露処理した。各記号は12個体の平均値、縦線は±標準偏差を示す。○：0 ppm (対照区)，◎：0.1 ppm，●：0.2 ppm O_3 処理区。

Fig. 1 Effect of O_3 exposure on the increase in dry weight of whole sunflower plant. Dry weight of withered leaves was excluded. O_3 exposure was started at 14 days after sowing and continued for 12 days thereafter. Each symbol is the mean of 12 plants and vertical bars indicate ± standard deviation of the mean. ○: 0 ppm (control), ◎: 0.1 ppm, ●: 0.2 ppm O_3 exposure treatment.

日めですでに植物個体の乾重は0.1および0.2 ppm O_3 によって有意に減少した。 O_3 暴露処理後12日めで対照区と比較し、0.1 ppm O_3 処理区で11%、0.2 ppm O_3 処理区では32%の減少が認められた。 O_3 暴露処理によって全ての器官(葉、茎、根、花芽)の乾物生長が抑制されていた(図2, 3, 4と表1)。茎乾重は O_3 暴露処理後12日めで対照区と比較し、0.1 ppm O_3 処理区で13%、0.2 ppm O_3 処理区で38%の減少が認められた(図2)。根の乾重増加に対する O_3 の影響は他の器官の生長に対する影響と比較して顕著であった。暴露処理終了時には対照区と比較して、0.1 ppm O_3 処理区で15%、0.2 ppm O_3 処理区では50%もの減少が観察された(図3)。これに対し葉部の乾物生長は他の器官ほど変化せず、暴露処理12日めで対照区と比較して、0.1 ppm O_3 は6%、0.2 ppm O_3 でも18%減少したにすぎなかった(図4)。 O_3 による葉面積生長の阻害率は最終的に葉乾重生長に対する阻害率とほぼ同程度であった(図5)。

0.1 ppm O_3 処理区の植物の葉数は対照区の植物の葉数と差が認められなかったが、0.2 ppm O_3 処理によってむしろ対照区の植物より葉数が増加していた(表1)。花芽形成は暴露処理後12日めのサンプリング時にほとんどの植物で観察されたが、対照区と比較して、0.1 ppm O_3 処理区の植物で

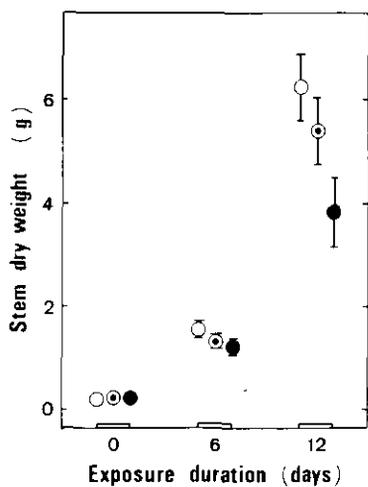


図2 ヒマワリの茎乾重増加に及ぼす O_3 暴露の影響。説明は図1と同じ。

Fig. 2 Effect of O_3 exposure on the increase in the weight of stem. Symbols and conditions are the same as in Fig. 1.

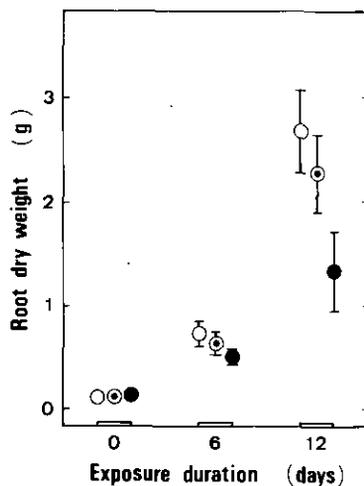


図3 ヒマワリの根乾重増加に及ぼす O_3 暴露の影響。説明は図1と同じ。

Fig. 3 Effect of O_3 exposure on the increase in dry weight of root. Symbols and conditions are the same as in Fig. 1.

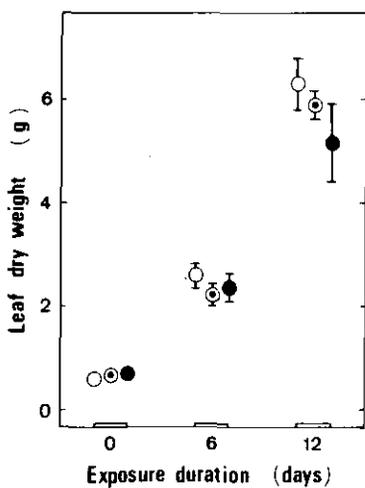


図4 ヒマワリの葉乾重増加に及ぼす O_3 暴露の影響。説明は図1と同じ。

Fig. 4 Effect of O_3 exposure on the increase in dry weight of leaves. Symbols and conditions are the same as in Fig. 1.

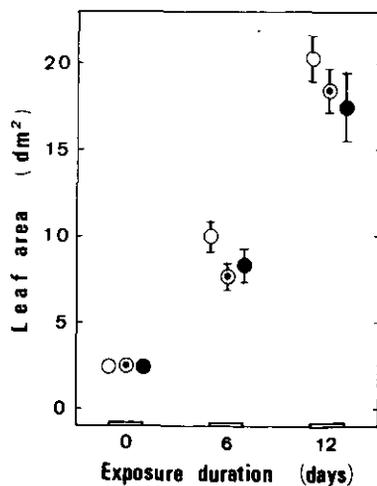


図5 ヒマワリの葉面積増加に及ぼす O_3 暴露の影響。説明は図1と同じ。

Fig. 5 Effect of O_3 exposure on the increase in leaf area. Symbols and conditions are the same as in Fig. 1.

は花芽乾重に差が認められなかったが、0.2 ppm O₃ 処理区の植物では花芽乾重は減少した(表1)。伸長生長(植物高)もO₃によって抑制されたが、茎乾重増加の抑制に比較して小さかった。

生長の各パラメータに及ぼすO₃暴露の影響

RGRとNARの変化を表2に示す。12日間の暴露処理の前半6日間では、0.1 ppmおよび0.2 ppm O₃ 処理区の植物のRGRは対照区と比較して、各々15%、19%減少した。しかしO₃暴露処理をさらに6日間行くと、0.2 ppm O₃ 処理は前半と同様にRGRを対照区より19%減少させたが、0.1 ppm O₃ 処理はRGRを減少させなかった。O₃暴露処理によるNARの変化はRGRの変化と同様な傾向を示した。O₃暴露処理前半6日間で0.1 ppmおよび0.2 ppm O₃によってNARは減少した。

表2 ヒマワリの相対生長率(RGR)と純同化率(NAR)に及ぼすO₃暴露の影響^{a)}
 Table 2 Effects of O₃ exposure on the relative growth rate (RGR) and the net assimilation rate (NAR) of sunflower plants^{a)}

	Exposure duration (days)	O ₃ concentration (ppm)		
		0.0 (control)	0.1	0.2
RGR (mg mg ⁻¹ d ⁻¹)	0 - 6	0.276	0.235	0.224
	6 - 12	0.189	0.196	0.154
NAR (mg cm ⁻² d ⁻¹)	0 - 6	1.232	1.149	1.058
	6 - 12	1.185	1.274	0.844

a) 枯死葉乾重を除いて算出した。

a) Dry weight of withered leaves was excluded to calculate these values.

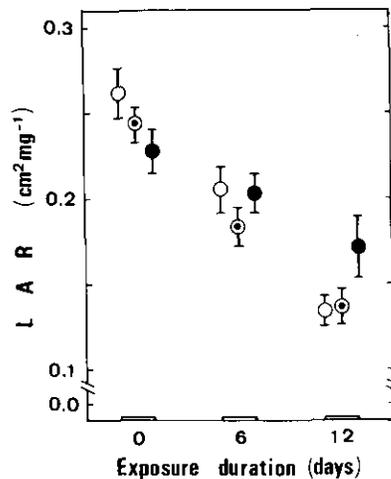


図6 ヒマワリの葉面積比(LAR)に及ぼすO₃暴露の影響。説明は図1と同じ。

Fig. 6 Effect of O₃ exposure on the leaf area ratio (LAR). Symbols and conditions are the same as in Fig. 1.

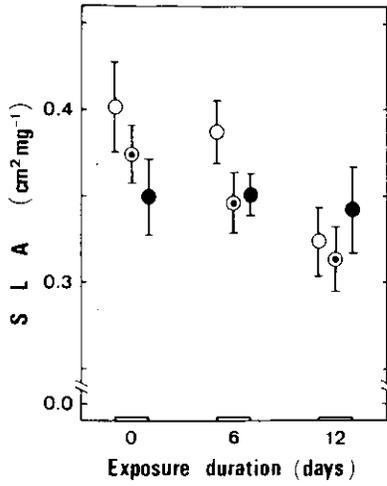


図7 ヒマワリの比葉面積 (SLA) に及ぼす O_3 暴露の影響。説明は図1と同じ。

Fig. 7 Effect of O_3 exposure on the specific leaf area (SLA). Symbols and conditions are the same as in Fig. 1.

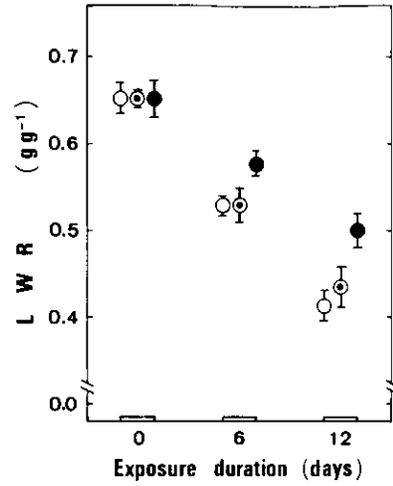


図8 ヒマワリの葉重比 (LWR) に及ぼす O_3 暴露の影響。説明は図1と同じ。

Fig. 8 Effect of O_3 exposure on the leaf weight ratio (LWR). Symbols and conditions are the same as in Fig. 1.

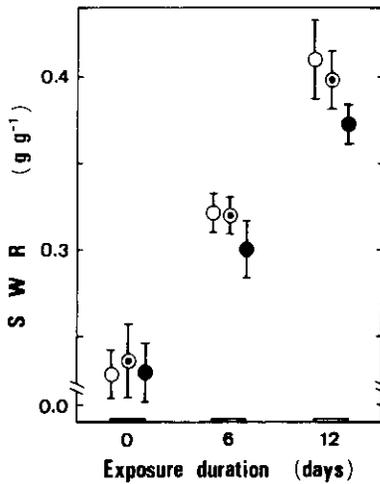


図9 ヒマワリの茎重比 (SWR) に及ぼす O_3 暴露の影響。説明は図1と同じ。

Fig. 9 Effect of O_3 exposure on the stem weight ratio (SWR). Symbols and conditions are the same as in Fig. 1.

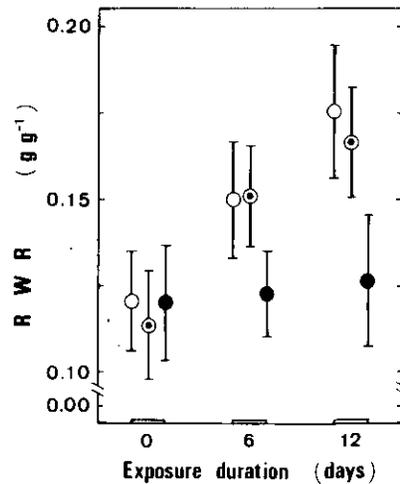


図10 ヒマワリの根重比 (RWR) に及ぼす O_3 暴露の影響。説明は図1と同じ。

Fig. 10 Effect of O_3 exposure on the root weight ratio (RWR). Symbols and conditions are the same as in Fig. 1.

処理後半6日間では O_3 の濃度によって NAR への影響は異なり、0.1 ppm O_3 は NAR を減少させなかった。しかし0.2 ppm O_3 は RGR よりも著しく NAR を減少させた(減少率29%)。

そこで RGR を左右する LAR の変化について調べた。 LAR は0.2 ppm O_3 の12日間暴露処理によって対照区と比較して最終的に28%増加した(図6)。さらに LAR を SLA と LWR に分解して調べた。 SLA は0.2 ppm O_3 によって若干の増加を示したにすぎなかったが(図7)、 LWR は0.2 ppm O_3 12日間処理によって対照区より21%増加した(図8)。次に植物個体の全乾重に対する茎の割合(SWR)と根の割合(RWR)について調べた。0.1 ppm O_3 12日間暴露処理によって SWR 、 RWR は対照区より各々3、5%減少したにすぎなかったが、0.2 ppm O_3 は最終的に対照区と比較して、 SWR を9%、 RWR を28%減少させた(図9、10)。

考 察

本実験においてヒマワリの乾物生長は、0.1 ppm および0.2 ppm O_3 の12日間連続暴露処理によって顕著に抑制されたが(図1)、これは RGR の減少に反映される(表2)。0.2 ppm O_3 に暴露処理した植物の RGR は処理期間を通じて対照区の RGR の81%となった。植物の生長、収量に対する O_3 の効果について数多くの論文が報告されているが(1, 8, 15, 16, 20, 23, 27, 36, 37)、Oshimaら(25)はパセリを用いた O_3 長期暴露の実験で、初期の RGR の低下とその後の回復について報告している。ヒマワリを用いた今回の我々の実験においても、0.1 ppm O_3 暴露処理によって RGR は処理前半に減少したが、処理後半には対照区の植物とほぼ同じ値を示した(表2)。そこで RGR の減少が何によってもたらされたのかを検討するため、 RGR を NAR と LAR に分けて解析した(表2および図6)。その結果 NAR の変化は RGR と同様な変化を示した。これは O_3 による生長の抑制が主として NAR の減少に帰因することを示唆する。植物の光合成が O_3 によって抑制されることは高濃度 O_3 の短時間暴露実験で報告されているが(6, 13, 17, 26, 31, 41, 42)、本実験のような低濃度 O_3 の長期暴露処理によっても植物の光合成速度が減少することをこの NAR の低下は示唆するものと思われる。

0.1 ppm O_3 暴露処理の場合、植物の NAR は RGR と同様に処理後半において回復している(表2)。TanakaとSugahara(30)はポプラを0.1 ppmの二酸化硫黄(SO_2)に20日間暴露した結果、 SO_2 毒性の1要因と考えられる活性酸素のスーパーオキシドアニオンラジカル(O_2^-)を除去する酵素スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)が誘導され SO_2 によるクロロフィル分解が軽減されたと報告している。本実験において、0.1 ppm O_3 に暴露された植物では、暴露開始後6日め以降で可視障害を発現した葉はあまり増加しなかった。 O_3 毒性の機作についてはいまだ解明されていないが、 O_3 がいくつかの酵素に影響を与えることは報告されている(3, 18, 39)。 O_3 に長期間暴露された植物でも O_3 毒性の防御に関与する酵素が誘導あるいは活性化されて、その結果 NAR や RGR が回復した可能性が考えられる。

一方0.2 ppm O₃に暴露された植物では処理後半には対照区の植物と比較してNARの減少が顕著であったが、同時にLARが増加したためにRGRの減少はNARの減少より緩和されたといえる(表2, 図6)。O₃暴露処理区の植物でみられたLARの増加は主としてLWRの増加で説明される(図8)。またO₃暴露によって特にRWRが、また若干ではあるがSWRも減少した(図9, 10)。これはO₃が植物個体における光合成産物の分配率を変化させたことを示す。BennettとOshima(2)もO₃に暴露されたニンジンのRWRが減少することを報告している。また他の植物でも根が最もO₃の影響をうけるという報告がいくつかある(25, 36, 37, 38)。これらもO₃が植物の光合成産物の分配率を変化させたことを示唆する。分配率の変化は、葉で生産された光合成産物の転流の割合が変化したか、または転流した後の各器官において呼吸などによる消費量に変化したことを示唆するが、最近前者の可能性を示唆する報告がなされている(40)。また本実験において、特に0.2 ppm O₃暴露処理区の植物で観察された、花芽乾重の減少、葉数の増加、枯死葉の増加といった現象も、O₃と植物体における転流、再転流といった面で興味深い問題である(表1)。

Shimizuら(28)は低濃度SO₂の長期暴露実験において、ヒマワリの生長を同様な方法で解析しているが、SO₂も植物の生長の各パラメータを変化させており、植物個体の種々の生理反応に影響することを示唆している。生長解析法はこのように植物の生長を追跡しながら大気汚染質の影響を解析するうえで有効な方法であると思われる。しかし大気汚染質の影響をよりよく理解するためには、生長解析法によって推測されたような植物の生理機能(光合成、転流など)の変化に関してより詳細に研究する必要がある。

引用文献

1. Bennett, J. P., H. M. Resh and V. C. Runeckles. 1973. Apparent stimulations of plant growth by air pollutants. *Can. J. Bot.* 52: 35-41
2. Bennett, J. P. and R. J. Oshima. 1976. Carrot injury and yield response to ozone. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101: 638-639
3. Dass, H. C. and G. M. Weaver. 1972. Enzymatic changes in intact leaves of *Phaseolus vulgaris* following ozone fumigation. *Atmospheric Environment* 6: 759-763
4. Dunning, J. A. and W. W. Heck. 1977. Response of bean and tobacco to ozone: Effect of light intensity, temperature and relative humidity. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 27: 882-886
5. Evans, G. C. 1972. *The quantitative analysis of plant growth*. William Clowes and Sons Ltd., London.
6. Furukawa, A. and M. Kadota. 1975. Effect of ozone on photosynthesis and respiration in poplar leaves. *Environ. Control in Biol.* 13: 1-7
7. 古川昭雄, 松岡義浩, 戸塚 續. 1979. 大気汚染地域におけるセイタカアワダチソウ群落の乾物生長と大気汚染浄化機能に関する野外調査. 国立公害研究所研究報告第10号: 177 - 210
8. Heagle, A. S., D. E. Body and E. K. Pounds. 1972. Effect of ozone on yield of sweet corn. *Phytopathology* 62: 683-687
9. Heck, W. W. 1968. Factors influencing expression of oxidant damage to plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 6: 165-188
10. Heggstad, H. E. and J. T. Middleton. 1959. Ozone in high concentrations as cause of tobacco leaf injury.

Science 129: 208-300

11. Heggstad, H. E. 1969. Consideration of air quality standards for vegetation with respect to ozone. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 19: 424-426
12. Hewitt, E. J. 1966. Sand and Water culture methods used in the study of plant nutrition. Common. Agric. Bur., Farnham Royal, Bucks, England
13. Hill, A. C. and N. Littlefield. 1969. Ozone. Effect on apparent photosynthesis, rate of transpiration, and stomatal closure in plants. *Environ. Sci. Tech.* 3: 52-56
14. Hill, A. C., H. E. Heggstad and S. N. Linzon. 1970. Ozone. In *Recognition of Air Pollution Injury to Vegetation: A Pictorial Atlas*. (Edit. by J. S. Jacobson and A. C. Hill) B1-B32, Air Pollut. Control. Assoc., Pittsburgh
15. Howard, M. and M. Treshow. 1975. Impact of ozone on the growth and reproduction of understory plants in the aspen zone of western U. S. A. *Environmental Conservation* 2: 17-23
16. Jensen, K. F. and L. S. Dochinger. 1974. Responses of Hybrid poplar cuttings to chronic and acute levels of ozone. *Environ. Pollut.* 6: 289-295
17. Koning, H. W. and Z. Jegier. 1968. Quantitative relation between ozone concentration and reduction of photosynthesis of *Euglena gracilis*. *Atmospheric Environment* 2: 615-616
18. Leffley, H. R. and J. H. Cherry. 1973. Destruction of enzymatic activities of corn and soybean leaves exposed to ozone. *Can. J. Bot.* 52: 1233-1238
19. Macdowall, F. D. H. 1965. Stages of ozone damage to respiration of tobacco leaves. *Can. J. Bot.* 43: 419-427
20. Manning, W. J., W. A. Feder, P. M. Papia and I. Perkins. 1971. Influence of foliar ozone injury on root development and root surface fungi of pinto bean plants. *Environ. Pollut.* 1: 305-312
21. Middleton, J. T., J. B. Kendrick, Jr. and H. W. Schwalm. 1950. Injury to herbaceous plants by smog or air pollution. *Plant Disease Repr.* 34: 245-252
22. Middleton, J. T. 1961. Photochemical air pollution damage to plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 12: 431-448
23. Oshima, R. J., O. C. Taylor, P. K. Braegelmann and D. W. Baldwin. 1975. Effect of ozone on the yield and plant biomass of a commercial variety of tomato. *J. Environ. Qual.* 4: 463-464
24. Oshima, R. J., M. P. Poe, P. K. Braegelmann, D. W. Baldwin and V. Van Way. 1976. Ozone dosage-crop loss function for alfalfa: A standardized method for assessing crop losses from air pollutants. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 26: 861-865
25. Oshima R. J., J. P. Bennett and P. K. Braegelmann. 1978. Effects of ozone on growth and assimilate partitioning in Parsley. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103: 348-350
26. Pell, E. J. and E. Brennan. 1973. Changes in respiration, photosynthesis, adenosine 5'-triphosphate, and total adenylate content of ozonated pinto bean foliage as they related to symptom expression. *Plant Physiol.* 51: 378-381
27. Reinert, R. A. and D. E. Weber. 1980. Ozone and sulfur dioxide-induced changes in soybean growth. *Phytopathology* 70: 914-916
28. Shimizu, H., A. Furukawa and T. Totsuka. 1980. Effects of low concentrations of SO₂ on the growth of sunflower plants. *Environ. Control in Biol.* 18: 39-47
29. Stephens, E. R. 1969. Chemistry of atmospheric oxidants. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 19: 181-185
30. Tanaka, K. and K. Sugahara. 1980. Role of superoxide dismutase in defense against SO₂ toxicity and an increase in superoxide dismutase activity with SO₂ fumigation. *Plant & Cell Physiol.* 21: 601-611
31. 谷山鉄郎, 山下和巳, 小池十七男. 1976. 作物のガス障害に関する研究. 第13報. 大気汚染質, オゾンガス (O₃) がトウモロコシ, 水稲および落花生の光合成におよぼす影響. 日本作物学会紀事 45: 9-16
32. Thomas, M. D. 1961. Effects of air pollution on plants. In *Air pollution* WHO Monograph (Geneva) No.46: 233-278

33. Thompson, C. R., G. Kats and J. W. Cameron. 1976. Effects of ambient photochemical air pollutants on growth, yield, and ear characters of two sweet corn hybrids. *J. Environ. Qual.* 5: 410-412
34. Ting, I. P. and W. M. Dugger, Jr. 1968. Factors affecting ozone sensitivity and susceptibility of cotton plants. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 18: 810-813
35. Ting, I. P. and R. L. Heath. 1975. Responses of plants to air pollutant oxidants. *Advances in Agronomy.* 27: 89-121
36. Tingey, D. T., W. W. Heck and R. A. Reinert. 1971. Effect of low concentrations of ozone and sulfur dioxide on foliage, growth and yield of radish. *Amer. Soc. Hort. Sci.* 96: 369-371
37. Tingey, D. T., R. A. Reinert, C. Wickliff and W. W. Heck. 1973. Chronic ozone or sulfur dioxide exposures, or both, affect the early vegetative growth of soybean. *Can. J. Plant Sci.* 53: 875-879
38. Tingey, D. T. and R. A. Reinert. 1975. The effect of ozone and sulphur dioxide singly and in combination on plant growth. *Environ. Pollut.* 9: 117-125
39. Tingey, D. T., R. C. Fites and C. Wickliff. 1976. Differential foliar sensitivity of soybean cultivars to ozone associated with differential enzyme activities. *Physiol. Plant.* 37: 69-72
40. Tingey, D. T., R. G. Wilhour and C. Standley. 1976. The effect of chronic ozone exposures on the metabolite content of ponderosa pine seedlings. *Forest Science* 22: 234-241
41. Todd, G. W. 1958. Effect of ozone and ozonated 1-hexene on respiration and photosynthesis of leaves. *Plant Physiol.* 33: 416-420
42. Todd, G. W. and B. Propst. 1963. Changes in transpiration and photosynthetic rates of various leaves during treatment with ozonated hexene or ozone gas. *Physiol. Plant.* 16: 57-65

Summary

Fourteen-days-old sunflower plants (*Helianthus annuus* L. cv. Russian Mammoth) were exposed to 0.1 or 0.2 ppm ozone (O₃) for 12 days in an artificially-lit growth cabinet. Plants were harvested at 0, 6 and 12 days after the start of exposure, and the growth analysis was performed. White fleck of injury developed on many leaves by the exposure to 0.1 or 0.2 ppm O₃ for 1-2 days, and subsequently old leaves were withered. At the final harvest, the dry weight of whole plant was reduced by 11 and 32% by the exposure to 0.1 and 0.2 ppm O₃, respectively. Root growth was severely inhibited by O₃, while leaf growth was slightly affected. The relative growth rate (RGR) and the net assimilation rate (NAR) were reduced by the exposure to 0.1 ppm O₃ for the first 6 days, while they were not affected for the following 6 days. In contrast, the RGR and the NAR were reduced by the exposure to 0.2 ppm O₃ through the course of exposure period. For the last 6 days, the reduction of the NAR was greater than that of the RGR. The leaf area ratio (LAR) and the leaf weight ratio (LWR) were increased by the exposure to 0.2 ppm O₃, whereas the stem weight ratio (SWR) and the root weight ratio (RWR) were decreased. These changes of growth parameters may indicate that chronic O₃ exposure affects the net photosynthesis and partitioning ratio of photosynthates in sunflower plants.

Key words: Ozone - Plant growth - Sunflower - Growth analysis.

II - 8

植物葉に吸収された NO₂ 窒素の移動と光合成産物の
転流に及ぼす NO₂ 暴露の影響

岡野邦夫¹・米山忠克^{1,2}・戸塚 績¹

Transfer of NO₂-nitrogen absorbed in the leaves and the effect of NO₂ fumigation
on CO₂ assimilates partitioning in plants

Kunio OKANO¹, Tadakatsu YONEYAMA^{1,2} and Tsumugu TOTSUKA¹

要 旨

植物の葉に吸収された NO₂ 窒素の他器官への移動、および葉からの光合成産物の転流に及ぼす NO₂ 暴露の影響を明らかにする目的で、以下の実験を行った。

第1実験ではヒマワリとトウモロコシを使い、約4 ppmの濃度の¹⁵NO₂を65分間暴露し、72時間後まで¹⁵Nの行方を追った。葉に吸収された¹⁵Nはまず80%エタノール可溶画分に取り込まれ、次いで不溶画分に移ったが、一部は他器官へ転流した。不溶画分に取り込まれた¹⁵Nも24時間から72時間の間再び分解して他器官へ転流を始めた。暴露葉から転流した¹⁵Nは最初に茎に、次いで生長中の葉や根に見い出された。しかし下位の成熟葉にはほとんど転流しなかった。

第2実験ではヒマワリを使い、300-400 ppmの¹³CO₂を90分間同化させ、葉からの光合成産物の転流に及ぼす2 ppm NO₂暴露の影響を調べた。¹³CO₂同化前2日間と同化後1日間のNO₂暴露処理はヒマワリ各部位の全窒素濃度を高めたが、葉からの¹³Cの転流速度、各部位への¹³Cの分配、および各部位の全炭素濃度に対する影響は、この実験からはほとんど認められなかった。

緒 言

二酸化硫黄 (SO₂)、二酸化窒素 (NO₂)、オゾン (O₃) などの大気汚染物質が、植物の基本的な生理作用である光合成や蒸散作用に悪影響を与えることはよく知られている。さらに大気汚染物質に暴露された植物では、葉からの同化産物の転流が抑制されるとともに分配も変化し、特に根への

-
1. 国立公害研究所 生物環境部
 2. 現在、農林水産省農業技術研究所 化学部
 1. Division of Environmental Biology, The National Institute for Environmental Studies, Tsukuba-gakuen, Ibaraki 305
 2. Present address; Division of Plant Nutrition, National Institute of Agricultural Sciences, Tsukuba-gakuen, Ibaraki 305

同化産物の分配が低下することを示唆する報告がいくつかある（1, 2, 3, 5, 8, 10, 11）。

都市型大気汚染の代表物質であるNO₂は、それ自身植物の葉に吸収されやすいことは以前から認められていた。最近の¹⁵N標識のNO₂を使った研究（7, 14, 15）によって、葉の気孔を通じて吸収されたNO₂は細胞液中で硝酸と亜硝酸になり、これらは明条件下では硝酸還元酵素や亜硝酸還元酵素の働きによりすみやかにアンモニアに還元され、アミノ酸合成やタンパク合成の素材となることが明らかとなった。しかし葉中で代謝されたNO₂に由来する窒素のその後の挙動、すなわち他器官への移動などについては、植物体全体に¹⁵NO₂を暴露した後の各部位の¹⁵N量の量的変動からの推定（7）がなされているのみである。

以上のような問題点を検討する目的で、2種類の安定同位体¹⁵Nと¹³Cを使い、1枚の葉に¹⁵NO₂と¹³CO₂の形態で与え、葉からの窒素化合物と炭素化合物の転流に関する実験を行った。第1実験として、ヒマワリとトウモロコシの1枚の葉に¹⁵NO₂を暴露し、大気NO₂同化産物の他器官への移動を検討した。第2実験として、1枚のヒマワリ葉に¹³CO₂を与え、葉からの¹³C光合成産物の転流に及ぼすNO₂暴露の影響を検討した。

材料と方法

実験植物としてロシアヒマワリ (*Helianthus annuus* L. cv. Russian Mammoth) とトウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Dent) を使用した。ベンレート1000倍液で滅菌した種子を人工培土を詰めた1/10000aポットに3粒ずつ播種し、自然光型ファイトロン温室（昼/夜温 25/20±0.5°C, 相対湿度70%）で育成した。播種後1週間目に幼植物を間引き、1ポット当り1個体仕立てとした。人工培土としてはパーミキュライト、ピートモス、パーライト、小砂利を2:2:1:1（容量比）に混合したものを用い、培土1.8lに苦土石灰15g、マグアンプK（N:P₂O₅:K₂O = 6:40:5, W. R. Grace Co. Tennessee, U. S. A）5gを均一に加えた。培土が乾燥しないよう灌水を適宜行い、液肥としてハイポネックス1000倍液を1ポット当り100～200mlずつ週2回与えた。

実験1 均一な形と大きさをした植物を12個体ずつ選び、暴露実験を開始する2時間前に人工光型グロースキャビネット（30klx, 25°C, R. H. 70%, 明/暗期 14/10時間）内に搬入した。

¹⁵NO₂の暴露にはこのキャビネット内に設置した、内法がたて130cm×横50cm×高さ30cmの透明アクリル樹脂製の同化箱を用いた。同化箱の側面にあけた直径2cmの穴から12個体の植物のそれぞれ1枚の葉をさし込み、葉柄部をウレタン製スポンジでつつみ密閉した。葉は光を十分受けられるように光源に対し垂直に配置した。同化箱内の空気は内部に設置された三つのファンにより絶えずかくはんされ、風速は20～40cm/s程度であった。空気のかくはんが十分なされていたことはNO_x分析計によるモニター結果、および各葉の¹⁵N吸収量がほぼ等しかったことから裏付けられた。この同化箱内にすでに報告した方法（13）で合成した¹⁵N標識のNO₂ガスを注射器で少しずつ注入し、化学発光式NO_x分析計（紀本電子Model 258）によってNO₂濃度を1分ごとにモニターしながら

ら制御した。

以上のような方法により播種後23日目のヒマワリの第6葉（展開完了直後の葉）と播種後24日目（第9葉抽出中で節間伸長開始前）のトウモロコシの第6葉に、それぞれ平均4.1 ppmと3.8 ppmの濃度の $^{15}\text{NO}_2$ （99.7 atom% ^{15}N ）を明条件下で65分間暴露した。暴露期間中および終了後も暴露葉には葉面可視害は発生しなかった。暴露終了後直ちに2個体の植物を採取し、他はグロースキャビネット内に残した。そしてヒマワリは2, 4, 6, 24, 72時間後に、トウモロコシは4, 24, 72時間後に2個体ずつ採取した。採取したヒマワリは図1に示す部位に切り分け、その際葉柄部は葉に含めた。トウモロコシは暴露葉および各葉位の葉と茎、根に切り分けた。トウモロコシは実験期間中に第10葉が抽出し始めた。暴露葉は80%熱エタノールで処理した後ホモゲナイザー（Kinematica, ポリトロン）で磨砕し、濾紙（東洋NO. 5A）で濾過しエタノール可溶画分と不溶画分に分画した。その他の部位は80°Cで2日間乾燥した後、粉碎機（平工製作所T1-200）で粉末化した。試料中の全窒素量はケルダール法で定量し、 ^{15}N 濃度は発光分光分析法（7）により測定した。

実験2 播種後40日目の生育の均一なヒマワリを12個体選び、人工光型グロースキャビネット（30klx, 25°C, R. H. 70%, 明/暗期 14/10時間）2室に6個体ずつ分けて搬入した。一室は $^{13}\text{CO}_2$ 同化前48時間と同化後24時間2 ppmの濃度の NO_2 を連続暴露し（ NO_2 区）、他室は NO_2 を暴露しない対照区とした。48時間の NO_2 暴露処理の後、両区のヒマワリを対照区の一室に集め、2時間後に実験1と同じ同化箱を用いて、展開完了直後の葉から下へ3枚目の葉に $^{13}\text{CO}_2$ を300-400 ppmの濃度で90分間同化させた。同化開始前に同化箱内の空気をエアーポンプで循環させ、エアーポンプにソーダライムを取り付けて CO_2 を吸着させることにより、 CO_2 濃度を約50 ppmまで低下させた。その後 $\text{Ba}^{13}\text{CO}_3$ （90.7 atom% ^{13}C ）に1N HClを加えて $^{13}\text{CO}_2$ を発生させた。同化箱内

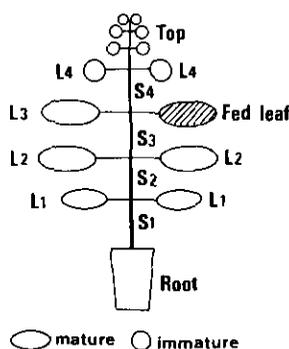


図1 実験1で使用したヒマワリの各部位の名称
Fed leaf: $^{15}\text{NO}_2$ 暴露葉, Ln: 葉, Sn: 茎, Top: 展開中の新葉。

Fig. 1 Schematic diagram of the sunflower plant used in Experiment 1. Fed leaf: $^{15}\text{NO}_2$ -fed leaf, L₁₋₄: leaf, S₁₋₄: stem, Top: expanding leaves.

のCO₂濃度は赤外線ガス分析計（富士電機 Type ZFD）でモニターし、時々Ba¹³CO₃に1N HClを加えることにより300-400 ppmに維持した。同化終了時に同化箱内に残っている¹³CO₂はソーダライムに約10分間吸収させ、30 ppmの濃度まで低下させた後に同化箱を開け、各区3個体ずつの植物を採取した。残りは再び2室の人工光型グロースキャビネットにそれぞれ戻し、24時間のNO₂暴露の後さらに3個体ずつの植物を採取した。植物体は¹³CO₂同化葉、上位葉（花芽も含む）、下位葉、上位茎、下位茎、根に切り分け、80°Cで乾燥した後粉碎した。全炭素量はCNコーダー（柳本MT 500）によって求め、¹³C濃度の測定は理化学研究所に依頼し、質量分析計（日立RMI-2）で測定した。

結 果

実験1 ヒマワリ各部位の¹⁵N濃度と各部位への¹⁵Nの分布割合の変化を表1に、暴露葉中の¹⁵N量の変化を図2に示した。¹⁵NO₂暴露直後には暴露葉中のエタノール可溶画分の¹⁵N濃度が非常に高かった。亜硝酸は検出されなかったことから、この画分は主として遊離アミノ酸と硝酸から成っており、吸収されたNO₂-Nの主要なプールと考えられる。エタノール不溶画分の¹⁵N濃度と分布割合は可溶画分の減少につれて増加した。これは¹⁵Nで標識された遊離アミノ酸が不溶画分に取り込まれ、タンパク質の合成に使われたことを示している。暴露24時間後には暴露葉中の¹⁵Nの88%が不溶画分に存在した。暴露葉中の全¹⁵N量は時間とともに減少したが、そこには数時間の急速な減少と、その後のよりゆるやかな減少の二つの phase が認められた。後者は不溶画分中の¹⁵N量の減少傾向と一致していた。暴露葉以外の器官ではまず最初に通導組織である茎に¹⁵Nが検出され、次いで生長中の器官（新葉、根）に見い出された。72時間後には新葉、根に¹⁵Nが量的に多く存在した。しかしながら、すでに伸長を完了した下位葉には72時間後においても¹⁵Nはほとんど検出されなかった。

次にトウモロコシ各部位の¹⁵N濃度と各部位への¹⁵Nの分布割合の変化を表2に、暴露葉中の¹⁵N量の変化を図3に示した。ヒマワリの場合と同様に、¹⁵NO₂暴露直後には暴露葉中のエタノール可溶画分の¹⁵N濃度が非常に高かった。エタノール不溶画分の¹⁵N濃度と分布割合は可溶画分の減少につれて増加したが、可溶画分から不溶画分への取り込みはヒマワリに比べて遅く、暴露24時間後には暴露葉中の¹⁵Nの48%が不溶画分に存在した。暴露葉中の全¹⁵N量は時間とともに直線的に減少し、ヒマワリの場合のような二つの phase は認められなかった。また24時間目から72時間目の間の全¹⁵N量の減少は、不溶画分中の¹⁵N量の減少より急速であった。¹⁵Nは暴露葉から茎に入り、上位葉（新葉）、根に多く移動したが、5葉以下の下位葉にはほとんど移動しなかった。

実験2 ¹³CO₂同化終了直後に植物体全体から回収された¹³C量をもとに計算した葉面積当りの¹³C固定量は、対照区で $90.3 \pm 6.5 \mu\text{g}^{13}\text{C}/\text{cm}^2$ 、NO₂区で $86.4 \pm 6.8 \mu\text{g}^{13}\text{C}/\text{cm}^2$ であり、両区に有意な差は認められなかった。また暴露直後から24時間の間の呼吸による¹³Cの損失割合を同じ

表1 ヒマワリ各部位の¹⁵N濃度と各部位への¹⁵Nの分布割合^a(実験1)
¹⁵N標識のNO₂は第6葉(L3の対生葉)に暴露した。

Table 1 ¹⁵N content (atom % excess) and ¹⁵N distribution (%) in the sunflower plants fed with ¹⁵N-labelled NO₂ from the sixth leaf (counterpart leaf of L3).^a (Experiment 1)

Plant part ^b	¹⁵ N content (atom % excess)						¹⁵ N distribution (%) in the plant					
	0 ^c	2	4	6	24	72	0	2	4	6	24	72
Top	0.02	0.05	0.15	0.23	0.29	0.27	0.6	2.2	4.7	7.7	17.8	36.6
L4	0.01	0.04	0.02	0.03	0.03	0.04	0.7	1.7	0.7	1.5	2.0	2.5
S4	0.03	0.07	0.13	0.21	0.15	0.16	0.1	0.3	0.3	0.7	0.8	1.1
Fed L Soluble F. ^d	12.32	10.36	8.24	5.20	1.75	0.79	83.8	57.4	49.9	37.2	8.0	4.3
Insoluble F. ^d	0.48	1.30	1.55	1.78	2.27	1.92	12.3	32.5	37.2	43.7	60.6	44.0
L3	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.2	0.2	0.4	0.2	0.1	0.2
S3	0.05	0.16	0.27	0.27	0.27	0.27	0.7	1.5	2.4	2.8	2.9	3.7
L2	0.01	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.6	0.7	0.2	0.0	0.0	0.0
S2	0.02	0.05	0.08	0.10	0.07	0.07	0.3	1.0	1.5	1.8	1.0	0.8
L1	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S1	0.01	0.05	0.07	0.09	0.12	0.11	0.3	1.2	1.5	2.1	2.6	2.9
Root	0.02	0.05	0.06	0.10	0.15	0.18	0.4	1.5	1.3	2.5	4.2	5.5

- a: 2個体の平均値。
 b: 図1を参照。
 c: ¹⁵NO₂暴露後の時間。
 d: 80%エタノール可溶画分と不溶画分。
 a: Averages of duplicates are indicated.
 b: For designation, see Fig. 1.
 c: Hours after the termination of ¹⁵NO₂ feeding.
 d: 80% ethanol soluble fraction and insoluble fraction.

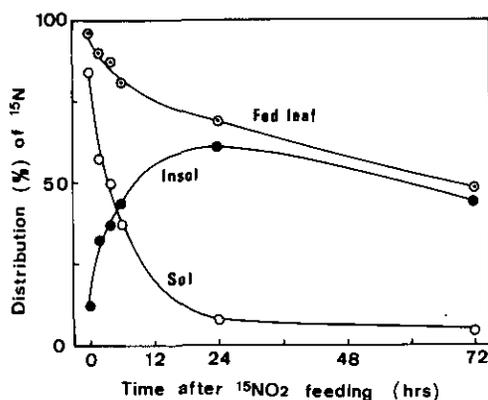


図2 ヒマワリの暴露葉中のエタノール可溶画分と不溶画分への¹⁵Nの分布割合(実験1)

Fig. 2 Percentage distribution of ¹⁵N in ethanol soluble and insoluble fraction of the ¹⁵NO₂ fed leaf of sunflower plant (Experiment 1)

表2 トウモロコシ各部位の¹⁵N濃度と各部位への¹⁵Nの分布割合^a(実験1)
¹⁵N標識のNO₂は第6葉に暴露した。

Table 2 ¹⁵N content (atom % excess) and ¹⁵N distribution (%) in the corn plants fed with ¹⁵N-labelled NO₂ from the sixth leaf.^a (Experiment 1)

Plant part ^b	¹⁵ N content (atom % excess)				¹⁵ N distribution (%) in the plant			
	0 ^c	4	24	72	0	4	24	72
L10	—	—	—	0.89	—	—	—	11.0
L9	0.00	0.13	0.78	0.69	0.0	0.9	5.2	14.7
L8	0.00	0.01	0.33	0.23	0.0	0.2	5.1	8.6
L7	0.00	0.00	0.01	0.03	0.0	0.0	0.0	1.2
Fed L Soluble F. ^d (L6) Insoluble F.	7.80	6.51	3.28	1.08	93.8	77.5	43.6	12.7
L5	0.34	1.00	2.33	2.07	6.0	20.3	40.5	38.7
L5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0
L4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0
L3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0
L1 + L2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0
Stem	0.02	0.06	0.27	0.34	0.2	1.2	3.8	8.3
Root	0.00	0.00	0.08	0.18	0.0	0.0	1.7	4.9

- a: 2個体の平均値。
 b: 材料と方法を参照。
 c: ¹⁵NO₂暴露後の時間。
 d: 80%エタノール可溶画分と不溶画分。
 a: Averages of duplicates are indicated.
 b: For designation, see Materials and Methods.
 c: Hours after the termination of ¹⁵NO₂ feeding.
 d: 80% ethanol soluble and insoluble fraction.

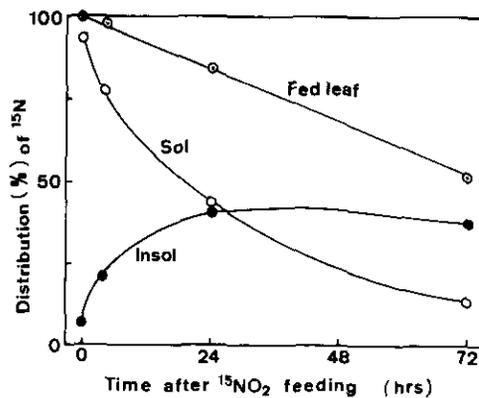


図3 トウモロコシの暴露葉中のエタノール可溶画分と不溶画分への¹⁵Nの分布割合(実験1)

Fig. 3 Percentage distribution of ¹⁵N in ethanol soluble and insoluble fraction of the ¹⁵NO₂ fed leaf of corn plant (Experiment 1)

く個体全体からの¹³C回収量から計算したところ、対照区で25.8%、NO₂区で29.1%とNO₂区で大きい傾向が認められたが、有意な差ではなかった。

表3に植物体各部位の全窒素濃度と全炭素濃度を示した。2 ppm NO₂の2日または3日間暴露により、どの部位においても全窒素濃度は10~30%高まった。下位葉や下位茎においても全窒素濃度は高まった。これは暴露されたNO₂が葉面より吸収され、体内で同化されたことを示している。全炭素濃度は新葉や根で高く、茎や下位葉で低い傾向があるが、NO₂暴露の影響はどの部位においてもほとんど認められなかった。

表4に植物体各部位への¹³Cの分布割合を示した。¹³CO₂同化葉からの¹³Cの転流速度や各部位への¹³Cの分配は、対照区とNO₂区ではほとんど同様で、NO₂暴露による影響は認め難かった。90分の同化終了直後には個体中に残存している¹³Cの約60%が同化葉に存在し、30%が下位茎に、残り10%が新葉、根、上位茎に移動した。同化終了24時間後には約20%が同化葉に残存し、50%が下位茎に、15%が根に、残り15%が上位の茎葉に移動した。¹⁵Nと同様に¹³Cも下位葉へはほとんど移動しなかった。

表3 ヒマワリ各部位の全窒素濃度および全炭素濃度に及ぼすNO₂暴露の影響
(実験2) NO₂は2 ppmの濃度で¹³CO₂同化前2日間と同化後1日間暴露した^a。

Table 3 Effect of NO₂ fumigation on total nitrogen content and total carbon content in the various parts of sunflower plant (Experiment 2). Sunflower plants were fumigated with 2 ppm NO₂ for 2 days before ¹³CO₂ feeding and 1 day after ¹³CO₂ feeding.^a

Plant part	Total nitrogen (% on D.W.basis)				Total carbon (% on D.W.basis)			
	0 h ^b		24 h		0 h		24 h	
	Cont	NO ₂	Cont	NO ₂	Cont	NO ₂	Cont	NO ₂
Upper leaves + Flower bud	4.40	5.09	4.07	4.51	44.9	45.6	44.6	45.0
Upper stem	1.79	2.38	1.70	1.92	40.8	41.1	39.3	42.2
Fed leaf ^c	4.15	4.66	3.83	4.33	43.0	43.0	41.4	42.9
Lower stem	0.79	1.10	0.70	0.93	42.6	41.5	41.7	42.5
Lower leaves	4.10	4.35	3.35	4.02	40.8	41.1	39.9	41.1
Root	1.42	1.56	1.49	1.71	44.0	43.4	42.9	44.7

a: 3個体の平均値。

b: ¹³CO₂同化後の時間。

c: ¹³CO₂同化葉。

a: Averages of 3 replicates are indicated.

b: Hours after the termination of ¹³CO₂ feeding.

c: ¹³CO₂ fed leaf.

表4 ヒマワリ各部位への¹³Cの分布割合に及ぼすNO₂暴露の影響(実験2)
NO₂は2 ppmの濃度で¹³CO₂同化前2日間と同化後1日間暴露した^a

Table 4 Effect of NO₂ fumigation on the percentage distribution of ¹³C in various parts of sunflower plant (Experiment 2). Sunflower plants were fumigated with 2 ppm NO₂ for 2 days before ¹³CO₂ feeding and for 1 day after ¹³CO₂ feeding. ^a

Plant part	0 h ^b		24 h	
	Cont	NO ₂	Cont	NO ₂
Upper leaves + Flower bud	2.4 ± 0.5 ^c	4.8 ± 1.7	7.2 ± 3.2	12.2 ± 2.5
Upper stem	1.9 ± 0.8	1.5 ± 0.7	2.9 ± 0.4	2.6 ± 1.4
Fed leaf ^d	64.7 ± 5.4	58.5 ± 4.5	21.9 ± 5.9	21.1 ± 1.0
Lower stem	27.5 ± 5.0	31.5 ± 2.4	52.7 ± 3.7	49.9 ± 2.2
Lower leaves	0	0	0	0
Root	3.4 ± 0.4	3.5 ± 1.5	15.3 ± 1.5	14.2 ± 2.2

a: 3個体の平均値。

b: ¹³CO₂同化後の時間。

c: 標準偏差。

d: ¹³CO₂同化葉。

a: Averages of 3 replicates are indicated.

b: Hours after the termination of ¹³CO₂ feeding.

c: Standard deviation.

d: ¹³CO₂ fed leaf.

考 察

1. 暴露葉における¹⁵NO₂-Nの代謝と他器官への移動(実験1)

植物の葉から直接窒素化合物を取り込ませる方法として、ヒマワリ葉へのK¹⁵NO₃溶液や(¹⁵NH₄)₂SO₄溶液の真空浸潤(6)、大麦葉身への¹⁵NH₃ガスの投与(4)、ヒマワリ葉やホウレンソウ葉への¹⁵NO₂ガスの暴露(7)、イネ葉身の尿素溶液への浸漬(9)などが行われてきた。その結果、これらの無機態窒素はいずれも葉において同化されること、すなわちグルタミンを通じてアミノ酸へと同化されることが明らかになった。ヒマワリおよびトウモロコシ葉に¹⁵NO₂ガスを暴露した実験1においても、エタノール可溶画分中の¹⁵Nの大部分が遊離アミノ酸の形態と考えられる(7)。ヒマワリ葉からの¹⁵Nの流出には、暴露直後の急速な流出とその後の不溶性画分中の¹⁵Nの減少と平行した緩慢な流出の2つのphaseが認められた(図2)。前者はアミノ酸に同化された¹⁵NO₂-Nの一部が短時間のうちに師部を通して他の器官へ移動した結果であると考えられる。後者はおそらくタンパク質のターンオーバーと関係しているであろう。不溶画分に取り込まれた¹⁵Nも24から72時間の間に減少した。これは暴露葉の構成成分として取り込まれ、タンパク質その他の窒素化合物を

形成した $^{15}\text{NO}_2\text{-N}$ が再び加水分解されてアミノ酸となり、葉から流出したことを示すものと考えられる。同様のことは水耕したイネ幼植物を使い、根から ^{15}N を短時間吸収させて成熟葉からの ^{15}N の消失を追跡した実験(12)でも認められている。トウモロコシ葉からの ^{15}N の流出には、ヒマワリのような二つの phase が認められず、全 ^{15}N 量の減少傾向と不溶画分中の ^{15}N 量の減少傾向も一致しなかった(図3)。トウモロコシはヒマワリに比べて吸収された NO_2 が遊離アミノ酸として葉中に存在する割合が高く、タンパク質への取り込みがおそかった。

暴露葉から流出した ^{15}N はまず上下の茎に見い出され、次いで新葉や根へ移動した。量的に多く ^{15}N が移動した新葉は生長中であり、生長に伴い全窒素量も ^{15}N 量ともに著しく増加した。新根が発生しつつある根にもかなりの ^{15}N が分布した。茎は乾重量の増加が著しいにもかかわらず全窒素量の増加は少なく、わずかな ^{15}N しか分布しなかった。そしてすでに生長を完了した下位の成熟葉には ^{15}N はほとんど移動しなかった。これらの結果から、暴露葉に吸収された $^{15}\text{NO}_2\text{-N}$ は生長が盛んでかつ窒素を多量に要求する部位へ多く転流するといえる。またこのような分布パターンは根から吸収され葉に入った後に再転流する ^{15}N の分布パターン(12)と類似している。従って NO_2 に由来する窒素もアミノ酸に同化された後は根からの窒素と区別なく生長に利用されるものと考えられる。

2. 葉からの光合成産物の転流に及ぼす NO_2 暴露の影響(実験2)

ヒマワリを使った従来の研究によれば、4または8 ppm NO_2 の2日間暴露で葉の全炭素濃度は高まり、茎の全炭素濃度は低下した(11)。1.0 ppm以下の NO_2 の24日間暴露では、各部位の全炭素濃度は変化しなかったが、根の割合が減少し葉の割合が若干高まった(11)。また0.2 ppm O_3 の12日間暴露により葉重比が増大し、根重比が低下した(8)。その他の植物でも、大気汚染ガスの暴露により根の生長が最も影響を受けやすいとの報告は数多い(1, 2, 3, 5, 10)。これらの現象は、葉で固定された光合成産物の根や茎への転流が、大気汚染ガス暴露によって抑制され葉に蓄積した結果であろうと考えられている。このような推測をトレーサーを使って直接証明する目的で、実験2においてヒマワリの1枚の葉に $^{13}\text{CO}_2$ を与え、葉からの ^{13}C の転流や各部位への ^{13}C の分配に対する2 ppm NO_2 の2日ないし3日間暴露の影響を調べた。しかし NO_2 の暴露により各部位の全窒素濃度は高まったが、全炭素濃度は変化せず、また葉からの ^{13}C の転流や各部位への ^{13}C の分配に対する NO_2 暴露の影響もほとんど認められなかった。この原因として、2 ppm NO_2 の2日ないし3日間暴露では葉面可視害も発生せず、転流に対する急性影響をみるには低濃度すぎ、また慢性影響をみるには短期間すぎたであろうこと、 $^{13}\text{CO}_2$ を同化させる前後には NO_2 暴露を行ったが、実験装置の制約から $^{13}\text{CO}_2$ 同化時には NO_2 暴露を行っていないこと、 NO_2 暴露の影響はたとえあったとしてもわずかなものであり、それ以上に使用したヒマワリの個体差が大きかったため差が検出できなかったこと、などが考えられる。現在これらの点を考慮した新たな実験を計画中である。

引用文献

1. Adedipe, N. E., G. Hofstra and D. P. Ormrod. 1972. Effects of sulfur nutrition on phytotoxicity and growth responses of bean plants to ozone. *Can. J. Bot.* 50: 1789-1793
2. Bennett, J. P. and R. J. Oshima. 1976. Carrot injury and yield response to ozone. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 101: 638-639
3. Bennett, J. P. and V. C. Runeckles. 1977. Effects of low levels of ozone on growth of crimson clover and annual ryegrass. *Crop Sci.* 17: 443-445
4. Hanson, A. D. and R. E. Tully. 1979. Amino acids translocated from turgid and water-stressed barley leaves. II. Studies with ^{13}N and ^{14}C . *Plant Physiol.* 64: 467-471
5. Horsman, D. C., A. O. Nicholls and D. M. Calder. 1980. Growth responses of *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne* and *Phalaris aquatica* to chronic ozone exposure. *Aust. J. Plant Physiol.* 7: 511-517
6. Ito, O. and K. Kumazawa. 1976. Nitrogen assimilation in sunflower leaves and upward and downward transport of nitrogen. *Soil Sci. Plant Nutr.* 22: 181-190
7. Kaji, M., T. Yoneyama, T. Totsuka and H. Iwaki. 1980. Absorption of atmospheric NO_2 by plants and soils. VI. Transformation of NO_2 absorbed in the leaves and transfer of the nitrogen through the plants. *Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud.* R-11-80: 51-58
8. 清水英幸・本橋 理・岩城英夫・古川昭雄・戸塚 績. 1981. ヒマワリの生長に及ぼすオゾン長期暴露の影響. 国立公害研究所研究報告第28号: 99-110
9. Tatsumi, J. and Y. Kono. 1981. Translocation of foliar applied nitrogen to rice roots. *Japan J. Crop Sci.* 50: (in press)
10. Tingey, D. T., W. W. Heck and R. A. Reinert. 1971. Effect of low concentrations of ozone and sulfur dioxide on foliage, growth and yield of radish. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 96: 396-371
11. 戸塚 績・米山忠克・名取俊樹・滝本道明. 1978. 高等植物の生長に及ぼす二酸化窒素の影響. (1) NO_2 暴露によるヒマワリの乾物生長変化と NO_2 吸収について. 国立公害研究所研究報告. 第10号: 67-76
12. Yomeyama, T. and C. Sano. 1978. Nitrogen nutrition and growth of rice plant. II. Consideration concerning the dynamics of nitrogen in rice seedlings. *Soil Sci. Plant Nutr.* 24: 191-198
13. 米山忠克・笹川英夫・戸塚 績・山本幸男. 1978. 高等植物の生長に及ぼす二酸化窒素の影響. (5) 草本植物による $^{15}\text{NO}_2$ の吸収, 亜硝酸の蓄積, 亜硝酸還元酵素活性の変化. 国立公害研究所特別研究成果報告. 第2号: 103-111
14. Yoneyama, T. and H. Sasakawa. 1979. Transformation of atmospheric NO_2 absorbed in spinach leaves. *Plant & Cell Physiol.* 20: 263-266
15. Yoneyama, T., H. Sasakawa, S. Ishizuka and T. Totsuka. 1979. Absorption of atmospheric NO_2 by plants and soils. II. Nitrite accumulation, nitrite reductase activity and diurnal change of NO_2 absorption in leaves. *Soil Sci. Plant Nutr.* 25: 267-275

Summary

To investigate the transfer of NO_2 -nitrogen absorbed in plant leaves to the other parts, and the effect of NO_2 fumigation on the translocation of photosynthates from the leaf, two stable isotopes, ^{15}N and ^{13}C , were introduced to a single leaf for less than 2 hours in the forms of NO_2 and CO_2 , and the fate of ^{15}N and ^{13}C in plant was followed.

In the first experiment, about 4 ppm $^{15}\text{NO}_2$ was supplied to a single leaf of sunflower and corn for 65 min. in light, and the fate of ^{15}N was followed over 72 hr. $^{15}\text{NO}_2$ absorbed in leaf

was first incorporated into the ethanol-soluble fraction, then gradually incorporated into the ethanol-insoluble fraction. Some ^{15}N was directly exported from the fed leaf. ^{15}N incorporated into ethanol-insoluble fraction was hydrolyzed later and transferred to the other organs. ^{15}N exported from the fed leaf was first found in the stem and next in the young growing leaves and roots, although negligible transfer to the other mature leaves was detected.

In the second experiment, 300–400 ppm ^{13}CO was fed for 90 min. in light to the single leaf in sunflower plants which were previously fumigated with 2 ppm NO_2 for 2 days, and the plants were further kept in NO_2 atmosphere (2 ppm) for 1 day. NO_2 fumigation for 2 to 3 days caused an increase of nitrogen content of all plant parts, but no change in carbon contents. The effect of NO_2 fumigation on the transfer of ^{13}C from the fed leaf and the partitioning of ^{13}C in the various parts was not detected in this experiment.

Key words: Nitrogen dioxide – Transfer of NO_2 - Nitrogen – Translocation of photosynthates – ^{15}N – ^{13}C .

II-9

植物の NO₂ 収着速度を支配する植物側の要因に対する NO₂ の暴露期間
および暴露時の光条件の影響

名取俊樹¹・大政謙次²・安保文彰²・戸塚 績¹

Effects of fumigation periods and light condition during NO₂ fumigation on
plant's factors controlling NO₂ sorption rate

Toshiki NATORI¹, Kenji OMASA², Fumiaki ABO² and Tsumugu TOTSUKA¹

要 旨

NO₂ の高濃度短期暴露 (実験 1) および低濃度長期暴露 (実験 2), さらに NO₂ 暴露時の光条件を変えて (実験 3) 植物側のガス収着を支配する要因について検討した。人工光型ガス暴露実験グロースキャビネット内で、ヒマワリ、トウモロコシ、キュウリ、トマト、トウゴマ、アサガオに 0.8~1.2 ppm NO₂ を 5 時間暴露し、その間の NO₂ 収着速度と蒸散速度を同時に測定した。その結果、植物の種類に関係なく NO₂ 収着速度と単位水蒸気飽差当たりの蒸散速度との間に直線的関係が認められた。さらにヒマワリ、トマト、キュウリに自然光型ガス暴露グロースキャビネット内で、0.2 ppm NO₂ を暴露しながら 1~2 か月間育成した。これを NO₂ 暴露区とした。同時に対照区として、同一環境条件下で NO₂ を暴露せずに、前記の三種の植物を育成した。その後ただちに、両区の植物について 1.0~1.3 ppm NO₂ で 5 時間暴露を行い、その間の NO₂ 収着速度と蒸散速度を同時に測定した。その結果、蒸散速度と NO₂ 収着速度の値は NO₂ 暴露区と対照区で同程度であった。しかし、NO₂ 暴露区ではトマトの葉面積が対照区の 69% に減少し、葉中窒素含有量は対照区の 136% に増加していた。一方、光条件をそれぞれ 32.9×10^3 lx, 16.0×10^3 lx, 8.3×10^3 lx, と変えた人工光型ガス暴露グロースキャビネット内でヒマワリに 0.8~1.2 ppm NO₂ を 5 時間暴露し、その間の NO₂ 収着速度と蒸散速度を同時に測定した。その結果、光が 16.0×10^3 lx まで蒸散速度は減少しなかった。葉面の NO₂ 収着速度を支配する植物側の要因を検討した結果、実験 1)~3) のいずれの植物についても気孔腔内の NO₂ 濃度は 0 ppm と仮定できた。

-
1. 国立公害研究所 生物環境部
 2. 国立公害研究所 技術部
 1. Division of Environmental Biology, The National Institute for Environmental Studies, Tsukuba-gakuen, Ibaraki 305
 2. Division of Engineering, The National Institute for Environmental Studies, Tsukuba-gakuen, Ibaraki 305

緒言

植物の種類やNO₂暴露時の光条件および生育時の窒素条件の変化にかかわらず、植物葉によるNO₂収着速度は、蒸散速度、気孔抵抗あるいは水蒸気の拡散に関する全抵抗との間に高い相関関係が認められ、さらに、直線関係の成立することが知られている。(2・3・5・7・8・9)しかし、植物のNO₂収着速度を支配する植物側の支配要因である気孔腔内のNO₂濃度について検討した報告は少ない。大政ら(2)はSO₂、O₃、NO₂の単一あるいは混合ガス暴露下でヒマワリのガス収着を支配する植物側の濃度境界条件(気孔腔内でのガス濃度)について報告している。しかし、これまで植物の種類を変えた場合、暴露時の光条件を変えた場合、あるいはNO₂を長期間暴露した場合の気孔腔内のNO₂濃度については検討されていない。

本論文では、制御環境下で数種の草本植物を用いて短期および長期NO₂暴露実験を行い、光条件の検討についてはヒマワリを用いてNO₂暴露実験を行い、植物によるNO₂収着を支配する要因について検討を行った。

材料と方法

実験 1. 短期 NO₂ 暴露実験

NO₂に対する抵抗性の異なる植物として、ロシアヒマワリ (*Helianthus annuus* L. cv. Russian Mammoth), トマト (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Fukuju No. 2), キュウリ (*Cucumis sativus* L.) アサガオ (*Pharbitis nil* choisy cv. Scarlet Ohara), トウゴマ (*Ricinus communis* L.) トウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Yellow dent corn) をこれまで報告されている資料(3)より選定し、人工培養土(ピートモス、パーミキュライト、パーライト、小砂利(2:2:1:1, 容積比))を含むポットに播種した。それぞれ1鉢当たり一団体仕立として、ファイトロン温室(気温25℃, 相対湿度75%)で育成した。これらの植物を人工光型ガス暴露実験用グロースキャビネット(気温30℃, 相対湿度50~60%, 照度約40 klx)に設置し、各実験により多少異なるが、0.8~1.2 ppm NO₂を5時間連続暴露し、その間のNO₂収着速度と蒸散速度の経時変化を大政ら(1)の報告した方法により同時測定した。一回の暴露実験にはロシアヒマワリ、トマト、キュウリ、アサガオ、トウモロコシを各植物について10鉢、トウゴマでは4鉢を使用した。

実験 2. 長期 NO₂ 暴露実験

実験1)の結果をもとに、実験材料として、キュウリ、トマト、ヒマワリを選定した。キュウリ、トマトは播種直後に、ヒマワリはファイトロン温室で17日間育てた植物を2台の自然光型ガス暴露グロースキャビネットに移して、気温25℃, 相対湿度75%, 相対照度約50%のもとで生育させた。一方のキャビネットではNO₂暴露区として0.2 ppm NO₂を生育期間中連続暴露し、他方

は、NO₂を暴露せず対照区とした。NO₂暴露区について、NO₂暴露日数は、ヒマワリ、トマト、キュウリについて、それぞれ38日、60日、67日であった。その後、ただちにNO₂暴露区、対照区のそれぞれの植物を他の人工光型ガス暴露実験用グロースキャビネットに移して、各実験により異なるが、1.0～1.3 ppm NO₂の5時間暴露を実施した。その間のNO₂収着速度と蒸散速度を実験1)と同様な方法により同時測定した。また暴露終了後個体当たりの葉面積と葉中空素含有量を測定した。なお、キュウリでは、暴露区、対照区ともNO₂短時間暴露の実験開始前にすでに一部の葉が黄化していたので黄化した葉を除いて使用した。1回の実験には各植物について10鉢を使用した。

実験 3. NO₂暴露時の光条件を変えた実験

実験材料としてヒマワリを選び、ファイトトロン温室（気温25℃、相対湿度75%）で育成した。光条件を 32.9×10^3 lx、 16.0×10^3 lx、 8.3×10^3 lxとそれぞれ変えた人工光型ガス暴露グロースキャビネット内に上記ヒマワリを設置し、0.8～1.2 ppm NO₂で5時間暴露し、その間のNO₂収着速度と蒸散速度を実験1)と同様な方法で測定した。1回の暴露実験にはヒマワリ10鉢を使用した。

植物の単位飽差当たりの蒸散速度を算出するために必要な葉温は、各植物および各光条件についてNO₂収着実験と同一条件下で前もって葉-気温差と蒸散速度の関係式を求めておき、この式に暴露時の蒸散速度と気温の実測値を代入して推定した。

結果

1) 短期NO₂暴露実験

実験1)に使用した6種の植物について、NO₂暴露開始後2～3時間目、3～4時間目、4～5時間目それぞれの1時間平均値として得られた単位濃度当たりのNO₂収着速度と単位飽差当たりの蒸散速度を表1に示す。なおヒマワリについては、機器のトラブルのため4～5時間目の値を欠測した。蒸散速度とNO₂収着速度は2～3時間値で比較すると、ヒマワリが最も大きく、次いでトマト、アサガオ、トウゴマ、キュウリ、トウモロコシの順であった。図1には、NO₂暴露開始後2～3時間目に得られた単位濃度当たりのNO₂収着速度と単位飽差当たりの蒸散速度を示す。気孔開度の一指標とみなされる単位飽差当たりの蒸散速度と単位濃度当たりのNO₂収着速度との間には、植物の種と無関係に直線関係が認められた。それぞれの植物について単位飽差当たりの蒸散速度と単位NO₂濃度当たりのNO₂収着速度との比を、NO₂暴露開始後2～3時間目、3～4時間目、4～5時間目のそれぞれについて求め、さらにそれらを平均して表1に示した。実験に用いたすべての植物で $1.2 \sim 1.4 \times 10^{-3}$ mm Hg · volppm⁻¹の間に含まれていた。

表 1 6種類の植物の蒸散速度とNO₂ 収着速度。表中の2-3, 3-4, 4-5の
カラムは、それぞれの時間の1時間平均値を示す。NO₂ 収着速度と単位飽
差当たりの蒸散速度の比は、ヒマワリを除いて2-3時間目, 3-4時間目,
4-5時間目に得られた三つの平均値で示す。

Table 1 Transpiration rate and NO₂ sorption rate of six different plants. The values in 2-3,
3-4 and 4-5 columns show respectively mean values for one hour during 2-3, 3-4
and 4-5 hours after initiation of fumigation. The N/T ratio is mean value of data
which were obtained during 2-3, 3-4 and 4-5 hours after initiation of fumigation.

	Transpiration rate ¹ (T)			NO ₂ sorption rate ² (N)			The N/T ratio ³
	2-3	3-4	4-5	2-3	3-4	4-5	
Morning glory	0.283	0.290	0.297	0.349	0.360	0.364	1.2
Tomato	0.361	0.376	0.355	0.526	0.451	0.486	1.3
Sunflower	0.506	0.490		0.721	0.708		1.4
Cucumber	0.177	0.180	0.171	0.201	0.211	0.198	1.2
Maize	0.149	0.152	0.161	0.186	0.191	0.202	1.3
Caster-oil plant	0.278	0.300	0.293	0.342	0.369	0.366	1.2

1: $\times 10^{-6} \text{ gH}_2\text{O}/\text{cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{mmHg}$.

2: $\times 10^{-9} \text{ gNO}_2/\text{cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{ppm}$.

3: $\times 10^{-3} \text{ gNO}_2 \cdot \text{mmHg}/\text{gH}_2\text{O} \cdot \text{ppm}$.

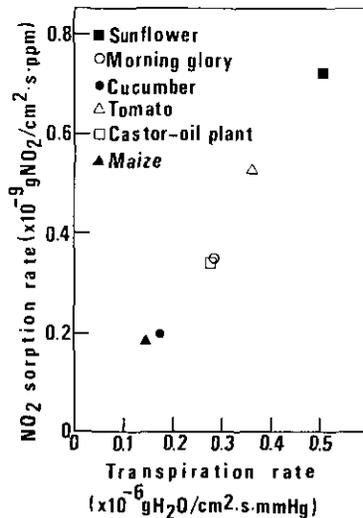


図 1 6種類の植物のNO₂ 収着速度と蒸散速度の関係。測定条件は、NO₂濃度0.8
- 1.2 ppm, 温度30°C, 相対湿度50-60%, 照度30-40 klx。それぞれの
測定値は、NO₂ 暴露開始後2-3時間目の一時間平均値を示す。

Fig. 1 The relation between NO₂ sorption rate and transpiration rate of six different plants
treated with 0.8-1.2 ppm NO₂ at 30°C, 50-60% R. H. and 30-40 klx. Each plot
shows the mean value during 2-3 hours after initiation of fumigation.

2) 長期 NO₂ 暴露実験

前処理として、生育期間を通じて 0.2 ppm NO₂ に長期間暴露されたヒマワリ、トマト、キュウリについて、前処理暴露終了後、約 1.0 ppm NO₂ 暴露を行った。対照区の植物についても同様に暴露を行った。暴露開始後 2～3 時間目、3～4 時間目、4～5 時間目にそれぞれ得られた 1 時間平均値の単位濃度当たりの NO₂ 収着速度、単位飽差当たりの蒸散速度と暴露終了時の乾燥重量当たりの葉中窒素含有量、および 10 個体を平均して得られた 1 個体当たりの葉面積を表 2 に示す。前処理期間中の NO₂ 暴露区と対照区の間では、前処理直後の 1.0 ppm NO₂ 暴露時の蒸散速度、NO₂ 収着速度とも差がなかった。しかし、葉中窒素含有量は 3 種とも対照区より NO₂ 暴露区の方が高くなっていた。葉面積については、ヒマワリ、キュウリでは t 検定の結果 5% で NO₂ 暴露区と対照区の間で差がなかった。しかし、トマトでは有意差が認められ、NO₂ 暴露区の葉面積が対照区の 69% に低下していた。暴露開始後 2～3 時間目に得られた単位飽差当たりの蒸散速度と単位濃度当たりの NO₂ 収着速度の値を図 2 に示した。その結果、植物の種間差異や NO₂ 暴露前歴の有無にかかわらず、単位飽差当たりの蒸散速度と単位濃度当たりの NO₂ 収着速度との間に直線関係が認められた。表 3 には、NO₂ 暴露開始後、2～3 時間目、3～4 時間目、4～5 時間目のそれぞれについて得られた単位濃度当たりの NO₂ 収着速度と単位飽差当たりの蒸散速度の比を平均した値を示した。NO₂ 暴露区および対照区いずれも $1.2 \sim 1.4 \times 10^{-3} \text{ mm Hg} \cdot \text{volppm}^{-1}$ の間にあり表 1 の値と一致していた。

3) NO₂ 暴露時の光条件を変えた実験

NO₂ 暴露時の光条件を変えたヒマワリについて、NO₂ 暴露開始後 2～3 時間目に、1 時間平均値として得られた単位濃度当たりの NO₂ 収着速度と単位飽差当たりの蒸散速度を図 3 に示した。 $32.9 \times 10^3 \text{ lx}$ の値は、実験 1) のヒマワリのデータと同一である。照度が $8.3 \times 10^3 \text{ lx}$ では蒸散速度が顕著に減少していた。単位濃度当たりの NO₂ 収着速度と単位飽差当たりの蒸散速度の比は、NO₂ 暴露開始後 2～3 時間目、3～4 時間目、4～5 時間目それぞれについて求め、それらを平均して表 4 に示した。

表2 0.2 ppm NO₂ 長期暴露後の約 1.0 ppm NO₂ 暴露時のヒマワリ, トマト, キュウリの蒸散速度と NO₂ 収着速度

表中の 2-3, 3-4, 4-5 のカラムの説明は表 1 と同じである。

Table 2 Transpiration rate and NO₂ sorption rate of sunflower, tomato and cucumber shown in Fig. 2. The values of transpiration rate and NO₂ sorption rate indicate mean values for one hour during 2-3, 3-4 and 4-5 hours after initiation of fumigation.

	Leaf area ¹	Transpiration rate ²			NO ₂ sorption rate ³			Leaf nitrogen content ⁴
		2-3	3-4	4-5	2-3	3-4	4-5	
Sunflower								
Fumigated	1676	0.430	0.392	0.393	0.568	0.568	0.543	5.12
Non-fumigated	1510	0.374	0.371	0.356	0.560	0.530	0.501	4.53
Tomato								
Fumigated	2043	0.348	0.363	0.339	0.408	0.472	0.434	5.40
Non-fumigated	2980	0.327	0.339	0.329	0.381	0.434	0.420	3.97
Cucumber								
Fumigated	2254	0.095	0.108	0.075	0.110	0.126	0.088	2.78
Non-fumigated	1931	0.102	0.102	0.099	0.125	0.121	0.128	1.69

1: cm²/plant.

2: $\times 10^{-6}$ gH₂O/cm² · s · mmHg.

3: $\times 10^{-9}$ gNO₂/cm² · s · ppm.

4: % on dry weight basis.

表3 図2に示した植物のNO₂ 収着速度と単位飽差当たりの蒸散速度比。この比の求め方は表1と同じである。

Table 3 The ratio of NO₂ sorption rate to transpiration rate per unit water saturation deficit of plants shown in Fig. 2. The ratio was obtained in the same way as in Table 1.

	The ratio of NO ₂ sorption rate to transpiration rate per unit water saturation deficit ($\times 10^{-3}$ gNO ₂ · mmHg/gH ₂ O · ppm)	
	Fumigated	Non-fumigated
Cucumber	1.2	1.2
Tomato	1.3	1.3
Sunflower	1.4	1.4

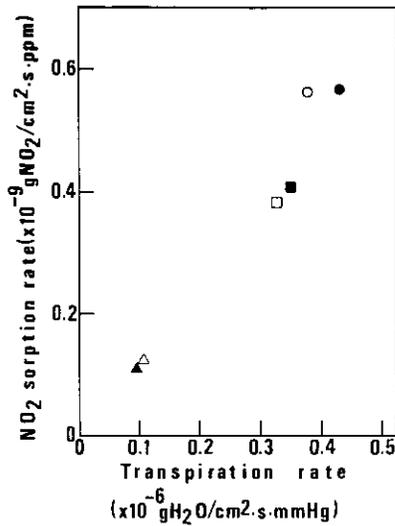


図2 キュウリ (△, ▲), トマト (□, ■), ヒマワリ (○, ●) の NO₂ 収着速度と蒸散速度の関係。測定条件は、NO₂ 濃度を除いて図1と同じである。NO₂ 濃度は 1.0 - 1.3 ppm, 測定開始前に 0.2 ppm NO₂ で、ヒマワリで 38 日、トマトで 60 日、キュウリで 67 日間暴露した。空白の符号は対照区の値を示す。

Fig. 2 The relation between NO₂ sorption rate and transpiration rate of cucumber (△, ▲), tomato (□, ■) and sunflower (○, ●). Measuring conditions were the same as in Fig. 1 except for NO₂ concentration. NO₂ concentration was 1.0-1.3 ppm. Before the measurements, the fumigated plants (closed marks) had exposed to 0.2 ppm NO₂ for 38 days (sunflower), 60 days (tomato) and 67 days (cucumber). Open marks are the control plants.

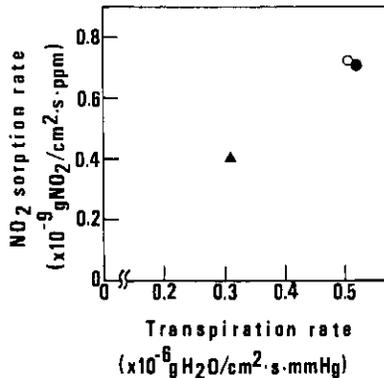


図3 NO₂ 暴露時の光条件を変えた場合のヒマワリの蒸散速度と NO₂ 収着速度の関係。32.9 × 10³ lx の値は、図1の値と同じである。

光条件 ○: 32.9 × 10³ lx ●: 1.6 × 10³ lx ▲: 8.3 × 10³ lx

Fig. 3 The relation between NO₂ sorption rate and transpiration rate of sunflower obtained under different light conditions during NO₂ fumigation. The value at 32.9 × 10³ lx was the same as that in Fig. 1.

(○): 32.9 × 10³ lx, (●): 1.6 × 10³ lx, (▲): 8.3 × 10³ lx

表4 NO₂ 暴露時の光条件を変えた場合の蒸散速度とNO₂ 収着速度の比。値は 2-3, 3-4, 4-5 時間目にそれぞれ得られた値の平均値で示してある。
32.9 × 10³ lx の値は表1のヒマワリの値と同じである。

Table 4 The ratio of NO₂ sorption rate to transpiration rate per unit water saturation deficit of sunflower. The measuring conditions were the same as in Fig. 1 except for light conditions. The value at 32.9 × 10³ lx was the same as that of sunflower in Table 1.

Light intensity (×10 ³ lx)	The ratio of NO ₂ sorption rate to transpiration rate per unit water saturation deficit (× 10 ⁻³ NO ₂ mmHg/gH ₂ O · ppm)
32.9	1.4
16.0	1.4
8.3	1.2

考 察

植物葉によるNO₂ 収着速度は、植物の種間差異、更にNO₂ を暴露する際の光条件、生育時の窒素条件にかかわらず、蒸散速度（間接的な気孔開度の指標）、ガス拡散に関する気孔抵抗あるいは葉面におけるガス拡散抵抗（気孔抵抗+葉面境界層抵抗）の値との間に高い相関関係のあることが報告され、更にもっと明確に、直線的関係のあることが認められている。(2・3・5・7・8・9) 図1～3に示されているように、植物の種類にかかわらず、またヒマワリ・トマト・キュウリでは、前処理として0.2 ppm NO₂ を長期暴露しても、さらに、ヒマワリでは暴露時の光条件にかかわらず、単位飽差当たりの蒸散速度と単位濃度当たりのNO₂ 収着速度との間に直線的関係が認められた。この結果は、植物の種類に関係なく、あるいはNO₂ 長期間暴露にかかわらず、さらに、NO₂ 暴露時の光条件にかかわらず、葉面におけるNO₂ 収着を律速する主な要因は、ガス拡散に関する気孔抵抗であることを示している。ところで、単位飽差当たりの蒸散速度と単位濃度当たりのNO₂ 収着速度との間に直線的関係が成立する場合には次の2通りが考えられる。1) 気孔腔内でのNO₂ 濃度が0 ppm となる 2) 気孔腔内でのNO₂ 濃度が大気中のNO₂ 濃度に比例して変化する。この1) と2) は、前述の単位飽差当たりの蒸散速度と単位濃度当たりのNO₂ 収着速度との間の直線のこう配の差としてあらわれる。大政らは葉面における蒸散速度およびNO₂ 収着速度に関するモデルにより、ガス収着速度を支配する植物側の大きな要因であるガス濃度境界条件（気孔腔内でのガス濃度）を検討した。その結果によると、気孔腔内でNO₂ 濃度を0 と仮定すると、単位飽差当たりの蒸散速度と単位濃度当たりのNO₂ 収着速度の比は1.2～1.4 × 10⁻³ mmHg · volppm⁻¹ となる。表1、表3および表4に示されているように、本実験結果では、植物の種間差異、0.2 ppm NO₂ 長期暴露、さらに、NO₂ 暴露時の光条件の変化にかかわらず、単位飽差当たりの蒸散速度と単位濃度当たりのNO₂ 収着速度の比は、1.2～1.4 × 10⁻³ mmHg · volppm⁻¹ であった。この結果は実験に使用したいずれ

の植物も気孔腔内の NO_2 濃度を0と仮定できることを示している。また、低濃度長期暴露の場合でも、ヒマワリ、キュウリ、トマトでは気孔腔内の NO_2 濃度を0と仮定できることを示している。さらにヒマワリでは NO_2 暴露時の光条件にかかわらず同様な仮定が成立することが認められた。

ところで、大政らによると、気孔腔内の NO_2 濃度が0と仮定できることは、 NO_2 の代謝経路が円滑に作動していることを示している(2)。米山によれば、昼間に気孔から侵入した NO_2 は細胞液中で分解し、硝酸と亜硝酸になり、これらの窒素は最終的に各種のアミノ酸に合成される。しかし、夜間では、光が存在しないので NO_2 代謝経路内に存在する各酵素活性作動のために必要な還元剤の供給が不足するために十分な活性が発現しないだろうと推論している(4)。上記の結果は、光が弱く、 $8 \times 10^3 \text{ lx}$ 程度でも、葉内に $0.417 \times 10^{-9} \text{ g NO}_2/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$ の速度で吸収される NO_2 を十分代謝できることも示唆している。

引用文献

1. 大政謙次・安保文彰・相賀一郎. 1979. 環境制御装置内植物の NO_2 および O_3 収着速度の同時測定について. 農業気象 35: 31-40
2. 大政謙次・安保文彰・名取俊樹・戸塚 績. 1979. 植物による大気汚染物質の収着に関する研究(II) NO_2 , O_3 , あるいは $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 暴露下における収着について. 農業気象 35: 77-83
3. 日本化学会編. 1977. 窒素酸化物, 丸善株式会社
4. 米山忠克. 1979. 高等植物による大気二酸化窒素(NO_2)の吸収と代謝. 国立公害研究所研究報告 第10号: 343-350
5. A. C. Hill. 1971. Vegetation: A sink for atmospheric pollutants. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 21: 341-436
6. G. E. Taylor, Jr.. 1978. Plant and leaf resistance to gaseous air pollution stress. *New Phytol.* 80: 523-534
7. H. H. Rogers. 1975. Uptake of nitrogen dioxide by selected plant species. University of North Carolina, Chapel Hill, N. C.
8. H. H. Rogers, H. E. Jeffries, E. P. Stahel, W. W. Heck, L. A. Ripperton and A. M. Witherspoon. 1977. Measuring air pollutant uptake by plants: A direct kinetic technique. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 27: 1192-1197
9. H. S. Srivastava, P. A. Jolliffe and V. C. Runeckles. 1975. Inhibition of gas exchange in bean leaves by NO_2 . *Can. J. Bot.* 53: 466-474
10. J. L. Monteith. 1973. Principles of Environmental Physics. Edward Arnold, London

Summary

NO₂ sorption rate of plants was investigated using sunflower, maize, cucumber, tomato, castor-oil plant and morning glory (Exp. 1). Plants were fumigated with 0.8–1.2 ppm NO₂ for 5 hours in an artificially-lit growth cabinet. A linear relationship between NO₂ sorption rate and transpiration rate per unit water saturation deficit, regardless of plant species tested, was observed.

Effects of long-term fumigation with 0.2 ppm NO₂ on the sorption rate of NO₂ were examined (Exp. 2). Sunflower, tomato and cucumber were grown for 1–2 months in naturally-lit growth cabinets with NO₂ and without NO₂. Immediately after the long-term NO₂ fumigation, NO₂ sorption rate and transpiration rate were measured under the fumigation with 1 ppm NO₂ for 5 hours in artificially-lit growth cabinet. Both rates were similar in the long-term treated plants and in control plants. In tomato plants, long-term fumigation caused decrease in leaf area per plant to 69% of control.

Effects of light condition during NO₂ fumigation on the sorption rate of sunflower also examined (Exp. 3). Transpiration rate was clearly decreased at 8.0×10^3 lx.

In experiments 1), 2) and 3), NO₂ concentration in stomatal cavity of leaf surface was estimated to be 0 ppm, even though plants were injured as seen in tomato plants of experiment 2).

Key words: NO₂ sorption – Transpiration – Long-term fumigation – Light condition.

II-10

汚染ガスに被曝した植物の葉温パターンの計測

(II) 種々の汚染ガスによる葉の可視害症状の発現に寄与する主要な要因について

大政謙次¹・橋本 康²・相賀一郎¹

Measurement of the thermal patterns of plant leaves under fumigation
with air pollutants

(II) The major factors caused the appearance of characteristic visible
injuries on leaves by air pollutants

Kenji OMASA¹, Yasushi HASHIMOTO² and Ichiro AIGA¹

要 旨

汚染ガスに被曝した植物葉には、ガスの種類により異なる特徴ある症状の可視害が発現する。これらの可視害症状の発現に寄与する要因について、ガス暴露期間中の葉温分布と1日後に発現する可視害を比較することにより検討した。気温、湿度、放射、気流などの熱環境要因が一定の条件での葉温分布の計測であるので、葉温分布は、較正曲線を用いて、ガス収着の葉面分布に変換することができた。その結果、SO₂あるいはNO₂暴露の場合、ガス収着量がしきい値を越える領域に可視害の発現する傾向がみられた。このことは、一枚の葉における組織の構造的・生理的抵抗性および代謝能力は均一で、SO₂あるいはNO₂による特徴ある可視害は、葉面の各部位における気孔開度や葉面境界層の状態などの汚染ガス収着を支配する要因の違いにより生じることを示している。他方、O₃暴露の場合、ガス収着量の葉面分布と、葉面に発現した可視害の特徴との間には、ほとんど相関が認められなかった。このことは、O₃による特徴ある可視害発現は、ガス収着だけでなく、葉の各部位における構造的・生理的状态および代謝能力の違いなどに関係して生じることを示している。

1. 国立公害研究所 技術部

2. 愛媛大学 農学部

1. Division of Engineering, The National Institute for Environmental Studies, Tsukuba-gakuen, Ibaraki 305

2. Faculty of Agriculture, Ehime University, Matsuyama 790

緒言

汚染ガスの種類、植物の種類、生育状態、エイジ、生育環境などによって、その発現の程度は異なるが、0.1～数 volppm 程度の比較的高濃度の汚染ガスに被曝した植物葉には、急性の可視害が発現する。この可視害は、汚染ガスによる植物被害の最も顕著な症状であり、その特徴は、ガスの種類により異なる(13, 27)。主要な汚染ガスであるSO₂、NO₂、O₃について、可視害の症状の特徴をみると、SO₂、NO₂では、葉の表裏の組織が破壊、収縮し、白色、象牙色、赤褐色などの比較的ブロードな陥没斑を生じる。そして、被害領域と健全な領域に明らかに分離される。また、O₃では、葉の表側の柵状組織が特異的に破壊され、白色や赤褐色などの小斑点症状が現れる(11, 13, 27)。これらの症状は、気孔を通してのガスの収着量、細胞間隙、細胞壁の構造的・生理生化学的性質、生体内の代謝能力、水分状態、物質の移動拡散能力、その他の要因の総合的作用の結果として生じるものと考えられるが(8, 9, 12, 18, 28)、汚染環境下で生育している植物の葉において、これらの特徴ある可視害の症状発現に寄与する要因について定量的かつ統一的に論じた報告はみあたらない。その主要な原因の一つに、汚染ガス収着を支配する葉面境界層を葉面で均一かつ一定に調節し、気孔反応や汚染ガス収着量の葉面分布を非接触、非破壊で計測する手法がなかったことが考えられる。汚染ガスに被曝した植物葉の気孔反応は、葉面の各部位で不均一で、時間とともに変化する(22, 23)。また、葉面境界層も、通常の汚染環境では、気流の状態や葉面の位置により異なる(17, 26)。それ故、数点の位置での気孔抵抗を接触測定するポロメータ法や葉面の平均蒸散を測定する重量法では、葉面の部位により異なる可視害の症状と気孔反応や汚染ガス収着速度との関係を直接的かつ定量的に検討することはできない。そして、特徴ある症状の発現に寄与する要因について論じることはできない。

上記の問題を解決するために、筆者らは、走査型赤外線カメラと計算機を結合した画像計測システムを開発し、葉温分布を計測する手法について検討した(7, 22, 24)。そして、葉温を指標として、面領域における気孔反応、蒸散速度、汚染ガス収着速度を推定する手法を提案した(22, 23)。さらに、この手法の一つの適用例として、SO₂に被曝した植物葉の葉温分布を計測し、可視害の症状と比較検討した(22)。本報では、SO₂に加えて、NO₂、O₃について検討し、植物葉の葉温分布、すなわち、気孔反応およびガス収着速度の葉面分布と可視害症状との関係について興味ある結果を得たので報告する。

材料および方法

材料；実験材料としては、ファイトトロン（昼間：25°C，夜間：20°C，70%RH，自然光）で、パーミキュライト，パーライト，ピートモス，小礫を4：2：4：1の比でつめたポット（直径10 cm，高さ20 cm）に播種後6～7週間栽培したロシアヒマワリ（*Helianthus annuus* L. cv. Russian Mammoth，1個体の葉面積；1800～2500 cm²，葉数：20～25枚）を用いた。計測対象とした葉は，子葉を除いて下から第10葉前後（葉面積130～140 cm²）の比較的活発に蒸散しているものを選んだ。

装置；環境制御装置は，当研究所に設置されている汚染ガス暴露実験用の装置を用いた（1）。装置内の気温，湿度は，それぞれ，25.0 ± 0.1°C，62 ± 1%RHであった。また，汚染ガス濃度分析計の精度は，設定値の±0.5%以内であった。環境制御装置内には，植物葉を水平に固定するための固定装置と葉面において均一な気流を得るための攪拌ファンを設置した。植物葉は，葉形に切り抜かれた20×20 cm²（切り抜き部分の面積，約100 cm²）の合成樹脂の薄い板に接着し，釣糸を張った固定装置の固定面にセットした。光源としては，約800 nm以上の熱線を除去する熱線カットフィルタを付けた陽光ランプを用いたが，葉面への短波放射の直達を防ぐために，光源と固定装置との間の空気層に散乱膜を入れた。また，装置内の壁面は，黒色のウールペーパーおよび寒冷紗で覆った。以上の処置により，固定面にセットされた葉の放射および気流分布を均一に保つことができた（23）。本実験における葉面での放射環境および熱伝達に対する葉面境界層抵抗は固定板との境界である葉のごく周辺部を除いて，それぞれ， $2.47 \pm 0.01 \times 10^{-2} \text{ cal} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ， $1.5 \pm 0.1 \text{ s} \cdot \text{cm}^{-1}$ （湿面で）であった。

葉温分布の計測は，走査型赤外線カメラと計算機を結合した画像計測システムを用いた（22，23）。このシステムは，256^H×240^Vの画像を得ることができ，温度分解能は，0.05°Cである。

実験方法；ファイトトロンで生育させた実験材料の計測対象とする葉を固定板に張り付け，固定面にセットする。そして，葉温分布が十分定常になるまで馴らした後，SO₂（約2 vol ppm），NO₂（約7 vol ppm），O₃（約1 vol ppm，1.2 vol ppm）を約1時間暴露する。その間，葉の表側の葉温分布（256×240画素）の経時変化を2分毎に画像計測システムで計測し，データを磁気テープに格納する。暴露処理後，約1日間光照射し，植物色素の退色現象が十分進行し，可視害が安定した状態になるのを確認した後，写真撮影をする。これらの一連の暴露実験が終了した後，磁気テープに格納された上記の実験で得た画像データを画像処理することにより背景を除去し，対象とする葉の2分毎の最高，最低，平均葉温を自動的に求める。

実験結果

ヒマワリ葉にSO₂による可視害の典型的な症状が発現する場合の葉温変化と被害葉の例を図1および図2に示す。図1は、約2 volppmのSO₂に暴露したときの葉の最高最低および平均葉温の経時変化であり、図2は、その代表的な時点における葉温分布と暴露後約1日経過した時点における被害葉の写真である。SO₂の暴露前に22.8~24.0°Cであった葉温が、時間の経過に伴って上昇し、暴露開始後60分経過した時点で、23.1~25.3°Cになった。概して、葉脈の近傍の葉温が高く、葉肉部が低かった。しかし、葉肉部でも部位により葉温は異なっていた。なお、暴露開始後60分頃から、葉温が低い領域に水滲が発現し始めた。暴露期間中の葉温分布と被害葉の写真と比較すると、期間中葉温の低い領域に可視害の発現がみられる。水滲と可視害が発現した領域は一致していた。暴露開始後30分の時点での葉温分布を代表例として、可視害発現領域とそうでない領域のしきい値温度を求めるとおおよそ23.6°Cである。このしきい値温度は、他の時点での葉温分布にもみられる。

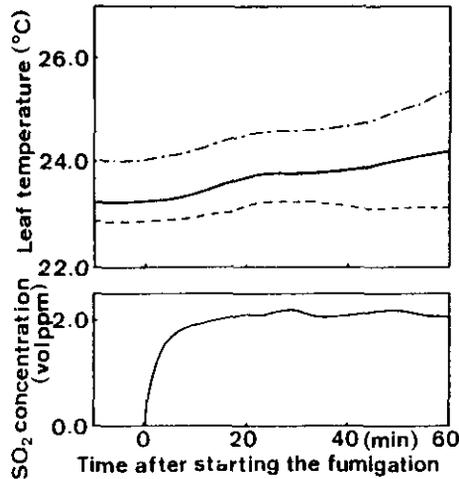


図1 SO₂暴露に伴うヒマワリ葉の最高(---)、最低(.....)および平均葉温(—)の経時変化。環境条件：気温；25.0°C、相対湿度；62%、放射； $2.47 \times 10^{-2} \text{ cal} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、照度；25 klx、熱伝達に対する葉面境界層抵抗； $1.5 \text{ s} \cdot \text{cm}^{-1}$

Fig. 1 Time courses of maximum (---), minimum (.....) and mean (—) leaf temperatures of a sunflower leaf during SO₂ fumigation. Environmental conditions: air temperature; 25.0°C, relative humidity; 62%, radiation; $2.47 \times 10^{-2} \text{ cal} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, illumination; 25 klx, boundary layer resistance to heat transfer; $1.5 \text{ s} \cdot \text{cm}^{-1}$.

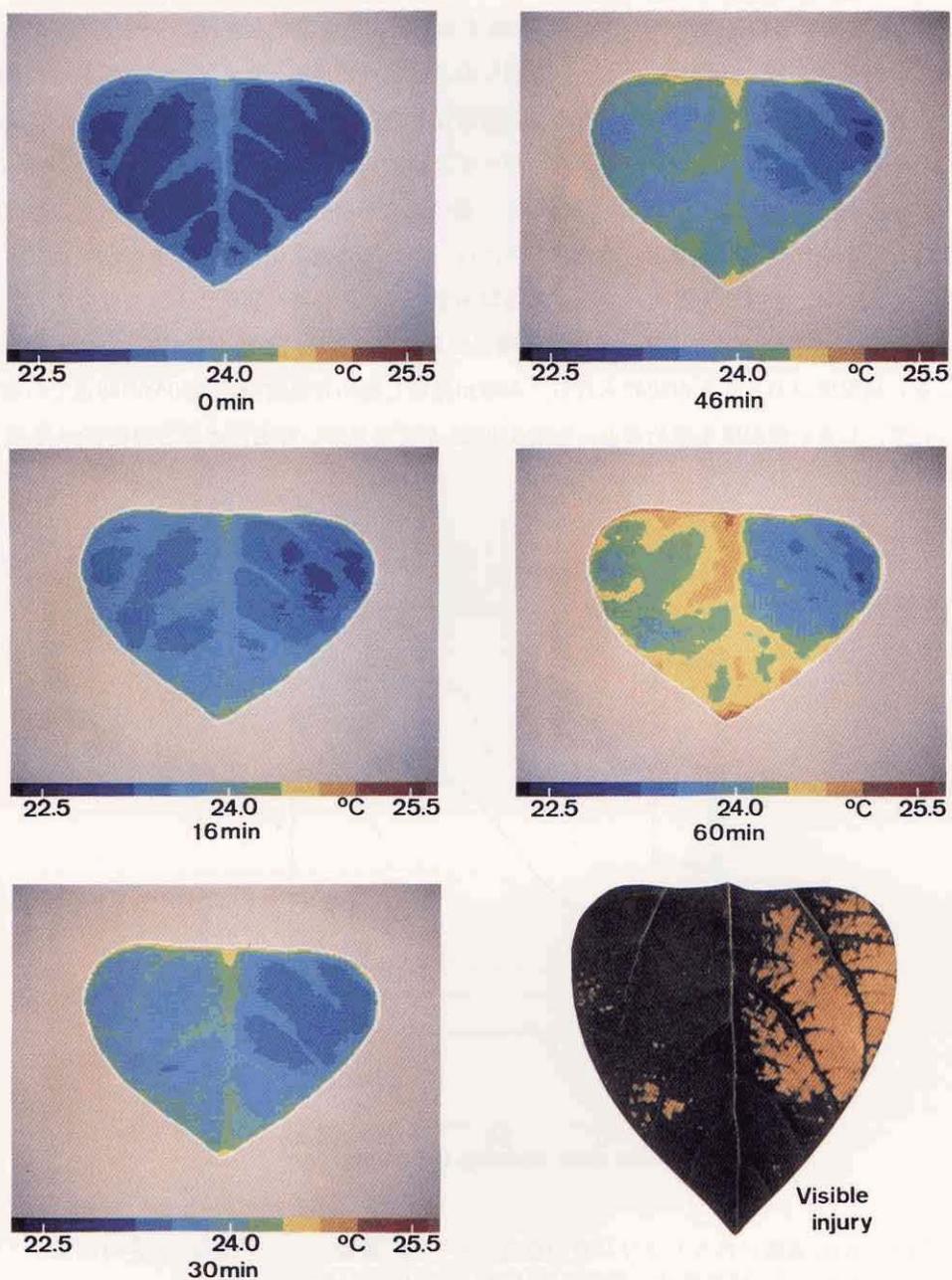


図2 図1のSO₂暴露期間中の葉温分布の変化と約1日後に観察される葉面の可視害写真の下の数字は、暴露開始後の経過時間 (min) を表す。

Fig. 2 Changes in leaf temperature distribution during SO₂ fumigation in Fig. 1 and visible injury on the leaf observed ca. 1 day later. Numerals under the pictures show time in minutes after starting the fumigation.

次に、 NO_2 による可視害の典型的な症状が発現する場合の葉温変化と被害葉の例を図3および図4に示す。図3は、約7 vol ppmの NO_2 に暴露したときの葉の最高最低および平均葉温の経時変化であり、図4は、その代表的な時点における葉温分布と被害葉の写真である。 NO_2 の暴露前に22.8～23.9°Cであった葉温が、時間の経過に伴って上昇し、暴露開始後60分経過した時点で、26.0～27.6°Cになった。葉脈、葉肉に関係なく、葉の中央部が低く、周辺部が高かった。暴露開始後30分頃から中央部に水滲が発現し始め、40分には、中央部の低温領域全面が水滲状態になった。そして、50分頃には、水滲が少なくなった。暴露期間中の葉温分布と被害葉の写真を比較すると、 SO_2 の場合と同様、期間中葉温の低い領域に可視害の発現がみられ、可視害発現領域とそうでない領域にしきい値温度があることが認められる。水滲が発現し始めた暴露開始後30分の時点での葉温分布について、しきい値温度を求めると、おおよそ25.5°Cである。なお、水滲と可視害が発現した領域は一致していた。

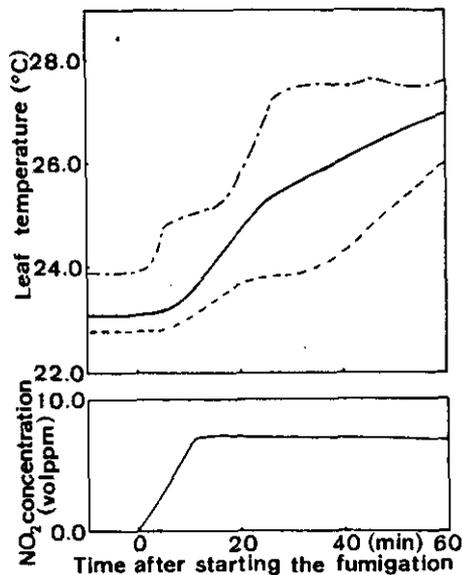


図3 NO_2 暴露に伴うヒマワリ葉の最高 (---), 最低 (.....) および平均葉温 (—) の経時変化。環境条件は図1と同じである。

Fig. 3 Time courses of maximum (---), minimum (.....) and mean (—) leaf temperature of a sunflower leaf during NO_2 fumigation. Environmental conditions were the same as those in Fig. 1.

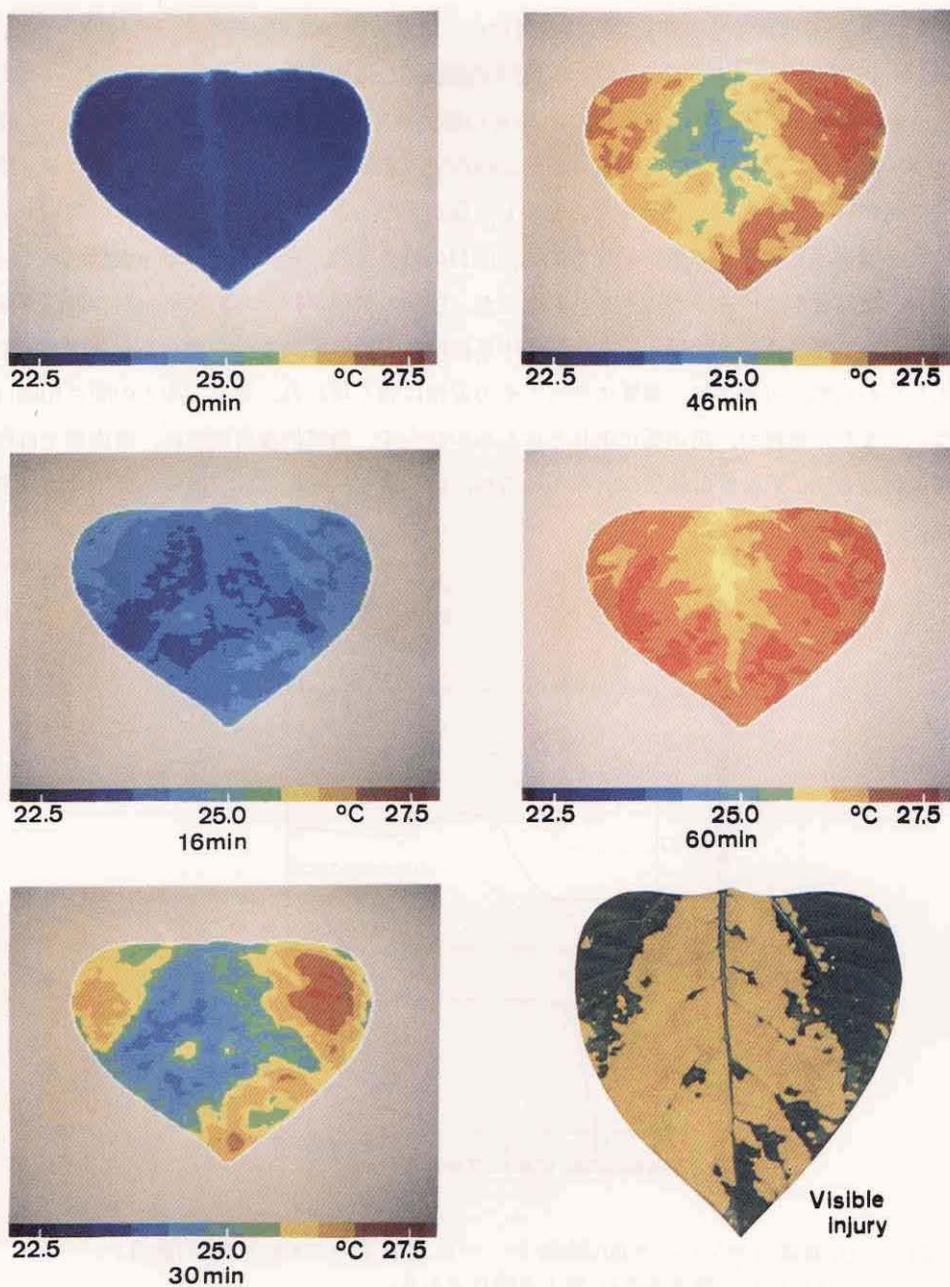


図4 図3のNO₂暴露期間中の葉温分布の変化と約1日後に観察される葉面の可視害。写真の下の数字は、暴露開始後の経過時間 (min) を表す。

Fig. 4 Changes in leaf temperature distribution during NO₂ fumigation in Fig. 3 and visible injury on the leaf observed ca. 1 day later. Numerals under the pictures show time in minutes after starting the fumigation.

最後に、 O_3 による可視害の典型的な症状が発現する場合の例を図5～図8に示す。図5は、約1.2 volppmの O_3 に暴露したときの葉の最高最低および平均葉温の経時変化であり、図6は、その代表的な時点における葉温分布と被害葉の写真である。 O_3 の暴露前に22.7～23.8°Cであった葉温が、時間の経過に伴って上昇し、暴露開始後60分経過した時点で、23.6～25.7°Cになった。概して、葉脈の近傍の葉温が高く、葉肉部が低かった。しかし、葉肉部でも部位により葉温は異なっていた。暴露開始後50分頃から葉肉部に水滲が発現し始め、60分の時点では、葉肉部全面が水滲状態になった。この時点で、葉脈近傍には水滲が認められず、また、色素の退色は認められなかった。暴露期間中の葉温分布と被害葉の写真を比較すると、期間中葉温は、一貫して葉脈近傍が高く、葉肉部が低かったにもかかわらず、可視害は、葉脈にそってその近傍に強く現われ、葉温分布との間に相関は認められない。また、水滲が、葉肉部に生じたにもかかわらず、最終的な可視害は、葉肉部では弱く、水滲と可視害との間に直接的な関係は認められなかった。なお、可視害は、表側の柵状組織に現われ、裏側には発現しなかった。

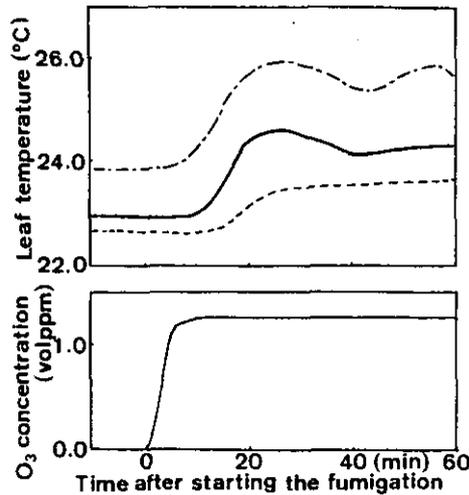


図5 O_3 暴露に伴うヒマワリ葉の最高(---),最低(.....)および平均葉温(——)の経時変化。環境条件は図1と同じである。

Fig. 5 Time courses of maximum (---), minimum (.....) and mean (——) leaf temperature of a sunflower leaf during O_3 fumigation. Environmental conditions were the same as those in Fig. 1.

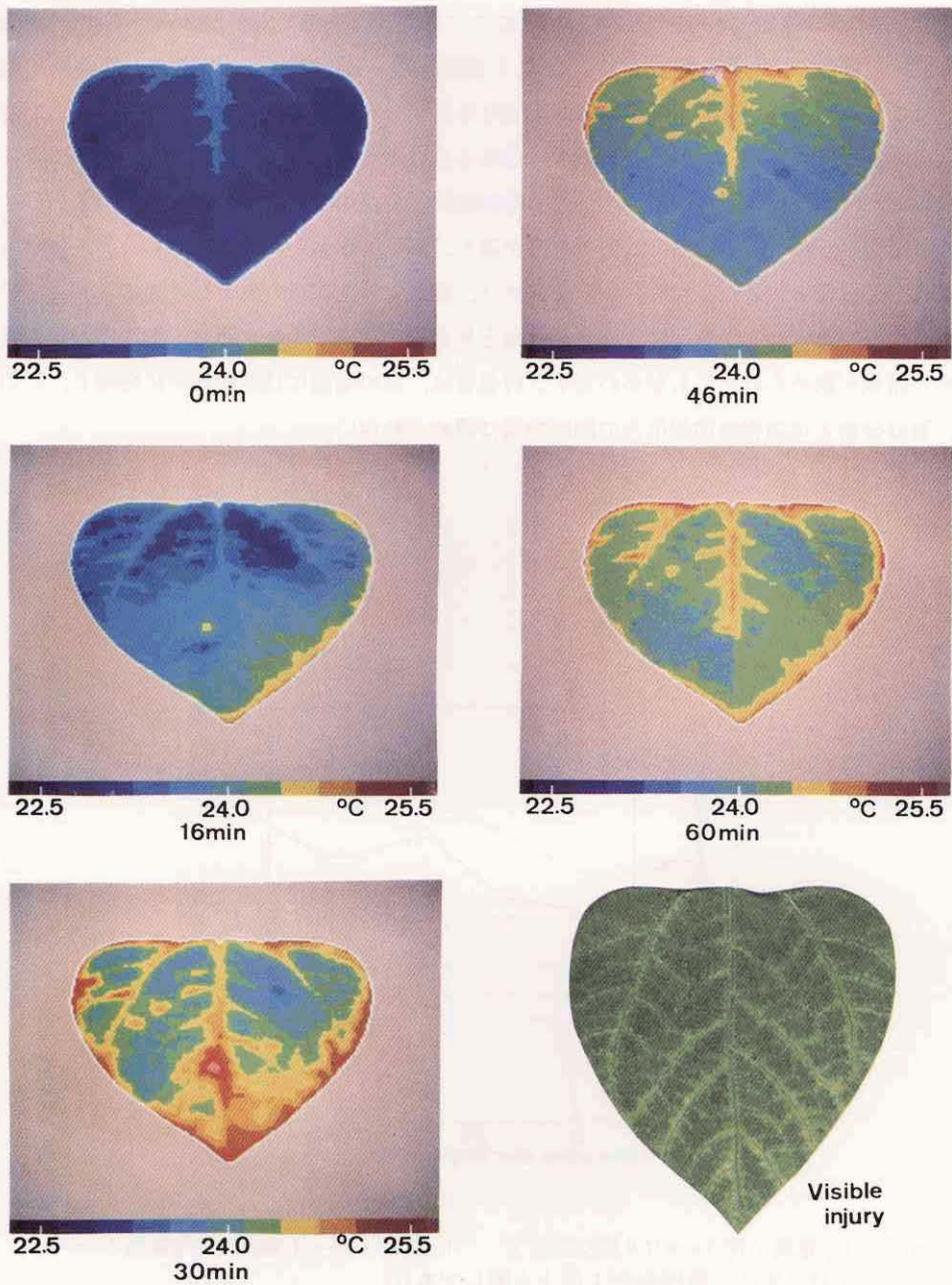


図6 図5のO₃暴露期間中の葉温分布の変化と約1日後に観察される葉面の可視害写真の下の数字は、暴露開始後の経過時間 (min) を表す。

Fig. 6 Changes in leaf temperature distribution during O₃ fumigation in Fig. 5 and visible injury on the leaf observed ca. 1 day later. Numerals under the pictures show time in minutes after starting the fumigation.

次に、 O_3 による可視害のもう一つの典型的な症状である葉の全面に比較的均一に可視害が発現する場合について述べる。図7は、約1 volppmの O_3 に暴露したときの葉の最高最低および平均葉温の経時変化であり、図8は、その代表的な時点における葉温分布と被害葉の写真である。この場合にも、表側の柵状組織に障害が現われ、裏側には認められなかった。 O_3 の暴露前に22.8~23.8°Cであった葉温が、時間の経過に伴って上昇し、暴露開始後60分経過した時点で、23.6~25.9°Cになった。この場合も、概して、葉脈の近傍の葉温が高く、葉肉部が低かった。しかし、葉肉部でも部位により葉温が異なっていた。なお、この場合には、葉温の計測期間である暴露開始後60分まで、水滲は認められなかった。暴露期間中の葉温分布と被害葉の写真と比較すると、期間中葉温の高い領域と低い領域が認められたにもかかわらず、可視害は、葉の全面に比較的均一に発現し、この場合にも、葉温分布と可視害発現部位との間に相関は認められない。

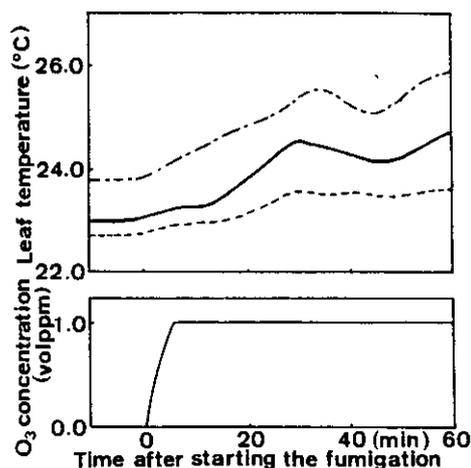


図7 O_3 暴露に伴うヒマワリ葉の最高(---), 最低(.....) および平均葉温(——)の経時変化。環境条件は図1と同じである。

Fig. 7 Time courses of maximum (---), minimum (.....) and mean (——) leaf temperature of a sunflower leaf during O_3 fumigation. Environmental conditions were the same as those in Fig. 1.

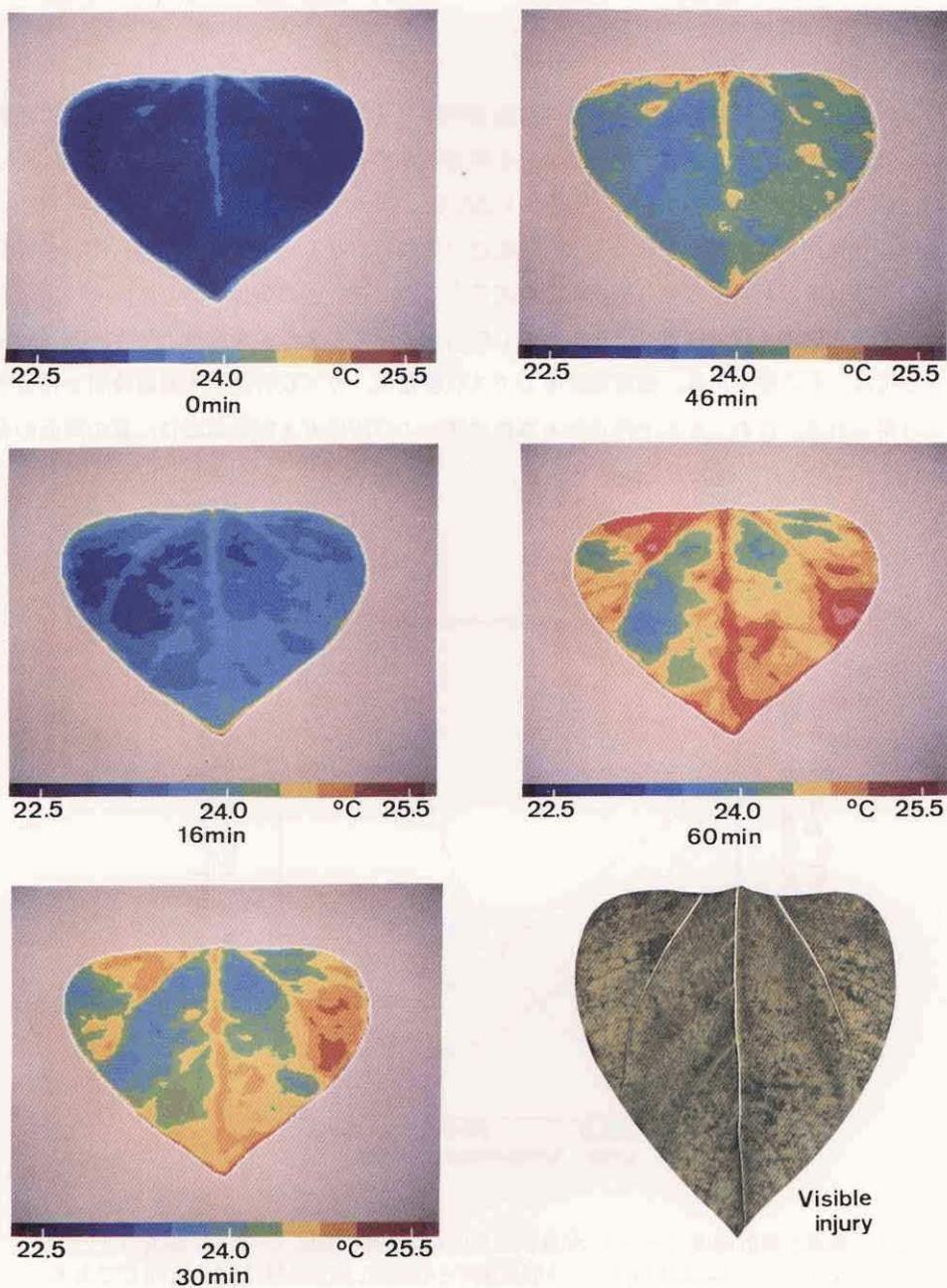


図8 図7の O_3 暴露期間中の葉温分布の変化と約1日後に観察される葉面の可視害。写真の下の数字は、暴露開始後の経過時間 (min) を表す。

Fig. 8 Changes in leaf temperature distribution during O_3 fumigation in Fig. 7 and visible injury on the leaf observed ca. 1 day later. Numerales under the pictures show time in minutes after starting the fumigation.

考 察

植物の葉の局所部位における葉温と蒸散速度あるいは気孔開閉の指標である水蒸気拡散に対する気孔抵抗との関係は、葉面の熱収支式を解くことにより求めることができる(23)。また、 SO_2 、 NO_2 、 O_3 などの汚染ガス収着速度も、大政ら(20, 21)により蒸散速度との関係が得られているので、葉温から推定することができる(23)。前述の実験におけるヒマワリ葉の局所部位の葉温と蒸散速度、水蒸気拡散に対する気孔抵抗および汚染ガス収着速度との関係を図9に示す。図において、蒸散速度と汚染ガス収着速度は、葉温が低い場合において大きく、葉温の上昇とともに減少する。気孔抵抗は、その逆である。暴露期間中のガス収着量は、ガス収着速度を暴露時間で積分することにより得られる。なお、ここで得られる蒸散速度および汚染ガス収着速度は、葉の両面の合計の値であり、気孔抵抗は、両面の平均値である。

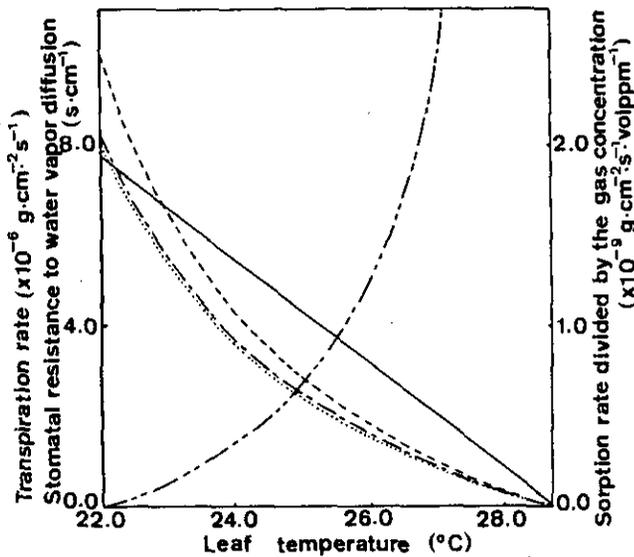


図9 葉温と蒸散速度(—)、水蒸気拡散に対する気孔抵抗(---)、 SO_2 (-----)、 NO_2 (.....)および O_3 (- - -)収着速度との関係。環境条件は図1と同じである。

Fig. 9 Relationships between leaf temperature and transpiration rate (—), stomatal resistance to water vapor diffusion (---) or sorption rates of SO_2 (-----), NO_2 (.....) and O_3 (- - -). Environmental conditions are the same as those in Fig. 1.

上記の葉温と蒸散速度、気孔抵抗および汚染ガス収着速度の関係によれば、汚染ガスの暴露に伴う葉温上昇は、気孔の閉鎖と、それに伴う蒸散速度および汚染ガス収着速度の減少を意味している。それ故、SO₂、NO₂に被暴した葉の葉温の低い領域と可視害発現領域の一致は、これらのガスによる可視害の症状の特徴が葉面の各部位のガスに対する気孔の感受性の違いによる気孔閉鎖の速度とそれに伴うガス収着量（速度）の違いにより生じることを示している。さらに、可視害発現領域とそうでない領域にしきい値温度が存在することは、ガス収着量（速度）に対してもしきい値が存在することを意味し、植物葉は、一定量（速度）以上SO₂あるいはNO₂を収着した場合のみ可視害を発現することを示している。逆に、植物葉の可視害の発現に対する細胞組織の構造的・生理的抵抗性あるいは無毒化の能力（14, 15, 18, 30）という観点からみれば、一枚の葉におけるこれらの抵抗性および能力は、葉の各部位において、ほぼ一定であることが示唆される。なお、フィールドなど通常の汚染環境下での植物葉面の局所部位におけるガス収着量は、気孔の開度や数など気孔抵抗に関係する要因だけでなく、葉面境界層の状態などの微気象的要因によっても影響される。それ故、通常の汚染環境下では、これらの要因の違いによる葉面の各部位のガス収着量の差異が、特徴ある可視害症状を生じる要因となる。

他方、O₃に被暴した葉において、葉温分布と可視害発現との間に相関が認められないということは、O₃の可視害の症状の発現が、単に葉面の各部位のガス収着量（速度）のみに依存するのではなく、細胞組織の構造的要因や生理生化学的要因に影響されることを示している。O₃の毒性作用機構や代謝機構については、いくつかのレビューが書かれているが（2, 3, 8, 10, 19, 25）、O₃により生じる現象を矛盾なく説明する統一的な結論は導かれていない（8）。O₃の生体への作用機構は、基本的には、O₃自身の強力な酸化作用とラジカルの連鎖反応により種々の膜構造の脂質の構成成分である不飽和脂肪酸を過酸化脂肪酸に変えたり（6）、脂質の合成に関する酵素のSH基を破壊し、新たな脂質の合成を阻害する（25）。また、膜の破壊はないまでも、膜の透過性が増し、イオン（K⁺など）や代謝物質の流出、ひいては水の過大な流出を生じる（4, 8）。そして、これらの細胞からの水の流出は、イオン-水バランスを変化させ、各種の生理機能を阻害すると考えられている。しかし、植物のO₃に対する抵抗性は、膜の損傷を防ぐ効果があると考えられている葉中の糖濃度（16, 29）、O₃との接触面積に関係する細胞の表面積/体積比（5）、作用部位までのO₃の移動拡散や毒性にかかわる細胞間隙および膜近傍の水分状態とその性質（5, 8）、その他の違いにより変化し複雑である。なお、O₃による障害が、柵状組織に特異的に現われる現象は、細胞の表面積/体積比や水分状態が重要な要因とされている（5）。本実験において、水滲が発現した領域の方がそうでない領域よりも可視害発現の程度が小さかったということは、気孔の呼吸腔や細胞間隙内に充満した水が可視害発現の軽減に寄与していることになる。ここでの細胞からの水の流出は、細胞内のイオン-水バランスを変化させるが、それと同時にO₃の作用を軽減させる役割を生じることを示唆している。しかし、このことは、汚染ガス環境下で生育している植物生体内での微妙なバラン

スの上に生じる現象であろう。また、 O_3 に対する抵抗性として、糖濃度が、膜の損傷を防ぐ以外に気孔の開閉に関係し、重要な役割をしているという報告がある(16, 25)。しかし、気孔閉鎖の早い部位にも顕著な可視害の発現がみられたことは、 O_3 に対する気孔反応や抵抗性の機構の考え方について新たな問題を提起するものと考えられる。なお、ここでは、葉の両面の平均としての意味を持つ気孔反応および汚染ガス収着量に着目して、可視害の症状との関係について検討したが、今後、 O_3 の移動拡散経路の問題も含めて議論するために表裏の気孔反応およびガス収着量の分布を分離して計測する必要があるだろう。

以上の実験により得られた結論は、汚染環境下で生育している植物葉の汚染ガスに対する抵抗性や生理的な反応の解明に気孔反応やガス収着量の葉面分布の計測が必要不可欠であることを示している。ここで述べた画像計測システムによる葉温分布の計測は、気孔反応や汚染ガス収着量の葉面分布を、非破壊、非接触で、かつ、連続的に得る手段であり、今後、汚染ガスに対する植物の抵抗性や生理的な反応の解明に効果を発揮するであろう。

謝 辞

本研究にあたって、実験に協力していただいた筑波大学学生の伊藤 中氏、また、装置の維持管理および材料植物の栽培に携わっている技術部の関係諸氏に心からの謝意を表す。

引 用 文 献

1. 相賀一郎・大政謙次・小林雄一. 1980. 国立公害研究所植物実験用環境調節施設. 最新空調設備・空調方式実例集. p315 - 363. 経営開発センター, 横浜
2. Dugger, W. M. and I. P. Ting. 1970. Air pollution oxidants-Their effects on metabolic process in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21:215-234
3. Dugger, W. M. and I. P. Ting. 1970. Physiological and biochemical effect of air pollution oxidants on plants. *Recent Advan. Phytochem.* 3:31-58
4. Evans, L. S. and I. P. Ting. 1973. Ozone-induced membrane permeability changes. *Amer. J. Bot.* 60:155-162
5. Evans, L. S. and I. P. Ting. 1974. Ozone sensitivity of leaves: Relationship to leaf water content, gas transfer resistance, and anatomical characteristics. *Amer. J. Bot.* 61:592-597
6. Goldstein, B. D. and O. J. Balchum. 1967. Effect of ozone on lipid peroxidation in the red blood cell. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126:356-358
7. 橋本 康・五百木啓三・船田 周・丹羽 登・杉 二郎. 1979. 植物生育プロセス同定とその最適制御 (VI) 葉温の画像処理. 生物環境調節 17:27-33
8. Heath, R. L. 1975. Ozone. In *Responses of plants to air pollution* (Edit. by J. B. Mudd and T. T. Kozlowski), p.23-55. Academic Press, New York
9. Heath, R. L. 1980. Initial events in injury to plants by air pollutants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:395-431

10. Heck, W. W. 1968. Factors influencing expression of oxidant damage to plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 6:165-188
11. Hill, A. C., M. R. Pack, M. Treshow, R. J. Downs and L. G. Transtrum. 1961. Plant injury induced by ozone. *Phytopathol.* 51:356-363
12. Horsman, D. C. and A. R. Wellburn. 1976. Guide to the metabolic and biochemical effects of air pollutants on higher plants. In *Effects of air pollutants on plants* (Edit. by T. A. Mansfield). p.185-199. Cambridge Univ. Press, Cambridge
13. Jacobson, J. S. and A. C. Hill (edit.). 1970. *Recognition of air pollution injury to vegetation: A pictorial atlas.* Air Pollut. Cont. Assoc. Pennsylvania
14. 加藤俊博・橋 昌司・位田藤久太郎. 1974. 被覆下における有害ガスによる作物の障害に関する研究Ⅱ. 亜硝酸ガスによる作物の障害の機作について. *生物環境調節* 12:103-107
15. 近藤矩郎. 1979. SO₂ 毒性に対する植物の防御機構. *国立公害研究所研究報告* 第10号:309-315
16. Lee, T. T. 1965. Sugar content and stomatal width as related to ozone injury in tobacco leaves. *Can. J. Bot.* 43:677-685
17. Monteith, J. L. 1973. *Principles of environmental physics.* p.78-149. Edward Arnold, London
18. Mudd, J. B. 1975. Sulfur dioxide. In *Responses of plants to air pollution* (Edit. by J. B. Mudd and T. T. Kozlowski). p.9-22. Academic Press, New York
19. 野内 勇. 1976. 光化学オキシダントの植物におよぼす生理生化学的影響. *遺伝* 30(7):37-46
20. 大政謙次・安保文彰. 1978. 植物による大気汚染物質の収着に関する研究(Ⅰ) SO₂ の局所収着と可視障害発現との関係. *農業気象* 34:51-58
21. 大政謙次・安保文彰・名取俊樹・戸塚 績. 1979. 植物による大気汚染物質の収着に関する研究(Ⅱ) NO₂, O₃ あるいは NO₂+O₃ 暴露下における収着について. *農業気象* 35:77-83
22. Omasa, K., F. Abo, Y. Hashimoto and I. Aiga. 1980. Measurement of the thermal pattern of plant leaves under fumigation with air pollutant. *Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud.* No.11, 239-247
23. 大政謙次・安保文彰・相賀一郎・橋本 康. 大気汚染環境下の植物の画像計測-熱赤外画像に含まれる生体情報の定量化について-計測自動制御学会論文集. 17(6)印刷中
24. 大政謙次・相賀一郎. 1981. 画像処理による植物の生育・生理反応の評価. *遺伝* 35(1):64-70
25. Rich, S. 1964. Ozone damage to plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2:253-266
26. Schuepp, P. H. 1972. Studies of forced-convection heat and mass transfer of fluttering realistic leaf models. *Boundary-Layer Meteorol.* 2:263-274
27. 大気汚染研究全国協議会編. 1973. 大気汚染植物被害写真集. 日本公衆衛生協会
28. Taylor, O. C., C. R. Thompson, D. T. Tingey and R. A. Reinert. 1975. Oxides of nitrogen. In *Responses of plants to air pollution* (Edit. by J. B. Mudd and T. T. Kozlowski). p.121-139. Academic Press, New York
29. Ting, I. P. and S. K. Mukerji. 1971. Leaf ontogeny as a factor in susceptibility to ozone: Amino acid and carbohydrate changes during expansion. *Amer. J. Bot.* 58:497-504
30. 米山忠克. 1979. 高等植物による大気二酸化窒素(NO₂)の吸収と代謝. *国立公害研究所研究報告* 第10号:343-350

Summary

Visible injuries on intact plant leaves caused by fumigation with various air pollutants, SO_2 , NO_2 or O_3 , reveals respective characteristic symptoms. Factors caused these characteristic injuries were examined from comparing distribution patterns of leaf temperature during the gas fumigation with visible injury pattern observed ca. 1 day later. The distribution patterns of leaf temperature were able to be converted into distribution patterns of the gas sorption rate using the calibration curve because they were measured under the uniform environmental conditions of air temperature, humidity, radiation and air current on the leaf.

As the results, in the cases of SO_2 or NO_2 fumigation, it was recognized that there was a tendency for appearance of injuries to be occurred in the sites where gas sorption was over a threshold value. These results suggest that structural and physiological resistance of the leaf tissues and metabolic capacities are uniform at the sites on the leaf, and the characteristic injury by SO_2 or NO_2 is caused by differences among factors governing the gas sorption such as stomatal aperture and boundary layer conditions at the sites.

On the other hand, in the cases of O_3 fumigation, the distribution patterns of gas sorption on the leaf were scarcely related to characteristics of visible injuries occurred on the leaf. These results suggest that factors caused the characteristic injury by O_3 are not only gas sorption into the leaf but also differences at the sites concerning to structural and physiological conditions, metabolic capacities and so on.

Key words: Air pollution – Image processing – Thermal pattern – Visible injury – Sunflower plant

II-11

大気汚染物質に対する感受性のポプラ品種間差異

藤沼康実¹・戸塚 績²・相賀一郎¹

Interclonal variation in responses to air pollutants of hybrid poplar trees

Yasumi FUJINUMA¹, Tsumugu TOTSUKA² and Ichiro AIGA¹

要 旨

ポプラ品種群を用いて、大気汚染物質の暴露による可視障害の発現程度と蒸散速度の変化を測定し、品種群の特性を調査した。

73品種のポプラをO₃: 0.2 ppm・6hと0.5 ppm・6h, およびSO₂: 0.5 ppm・6hと2.0 ppm・6hのドースで暴露した。可視障害の発現程度は品種により大きな差があり、品種でO₃とSO₂それぞれに対する感受性が異なっていた。また、大部分の品種(約80%)でO₃とSO₂に対する感受性は同程度であったが、約20%の品種では両ガスに対する感受性が異なり、大気汚染物質に対して特異的に反応する品種が見い出せた。

O₃に対して可視障害の発現程度が異なる20品種を選抜して、O₃暴露(0.1 ppm 4h)による蒸散速度の変化を測定した。暴露前の値に比べ、70%の品種では暴露することにより最大35%も低下したが、30%の品種では変化が認められなかった。また、可視障害の発現程度が大きくなるに従い、蒸散速度の阻害が少なく、O₃の収着速度が大きくなる傾向が見られたが、障害程度の小さい品種群には、O₃の収着速度が大きい品種があった。O₃に対し抵抗性の高い品種を葉中への取り込み量が少ないものと、多いものに類別できた。後者の品種群では取り込まれた汚染物質を解毒化する機能の高いことが推察された。本実験では、収着速度が大きく、かつ、感受性の高い品種は認められなかった。

緒 言

最近のわが国の大気汚染の状況は、全体に改善の方向にある。しかし、都市域の二酸化窒素濃度

-
1. 国立公害研究所 技術部
 2. 国立公害研究所 生物環境部
 1. Division of Engineering, The National Institute for Environmental Studies, Tsukuba-gakuen, Ibaraki 305
 2. Division of Environmental Biology, The National Institute for Environmental Studies, Tsukuba-gakuen, Ibaraki 305

やオキシダント濃度は依然として社会問題となっており、減少の傾向にあるとはいいがたい。これらの大気汚染に帰因する環境悪化が植物に与える影響について、今までに様々な調査・研究が行われてきた。特に、大気汚染物質が植物の生理機能、あるいは農作物の生産性に及ぼす影響について広範な知見が、我が国でも、環境庁や農林水産省を中心とした研究プロジェクトにより報告されている。

一方、それらの成果を基礎として、現実の大気汚染環境の評価と改善に対し植物に積極的な役割を持たせた応用研究や技術が提案されている。その一つは大気汚染によって植物に生じる諸反応・現象を指標として大気汚染環境を評価する手法である（6, 7, 22）。他は植物の持つガス吸収能から、植物による大気汚染物質の収着能力を推定し、大気汚染環境の浄化に対する植物のエアフィルター効果を積極的に評価しようという考えである（5, 16, 21）。

しかし、上述の二つの手法、考えは根本的に相反するものである。植物指標としては大気汚染物質に対し感受性が高いことが必須であるが、植物の大気汚染浄化能からすれば大気汚染環境下でも十分に生育し、大気汚染物質の収着能力が大きいことが必須となる。

一般に、植物体のガス交換は気孔を界して行われているが、その気孔の開閉運動、すなわち、ガス交換速度は植物種とその植物の生理的状态、あるいは置かれている環境によって大きく異なり、大気汚染物質の植物体中への収着量もそれらに応じて異なっている（1, 10, 12）。また、収着された大気汚染物質の植物体中での挙動も、無毒化あるいは解毒化機構という生理化学的な代謝系の有無や代謝速度の違いによって変化し、植物種やその植物の生理的状态によって変化する（9, 18）。故に、大気汚染物質に対する気孔開度の変化と収着された大気汚染物質の解毒能力を推定することが植物指標や植物の大気汚染浄化能を評価する最良の方法と考えられる。

しかし、作用点の一つである植物体中の生理化学的な代謝系に及ぼす大気汚染物質の影響の解析には繁雑な実験操作を伴い、簡便には行えない。しかし、大気汚染物質の暴露によって葉に生じる可視障害の発現程度が植物体中で生じている様々な代謝の総括された生理的な反応量を表していると考えられる。また、他の作用点である気孔の開閉運動・大気汚染物質の収着量を蒸散速度から推定する方法が大政ら（14）によって確立されている。この二つの反応量を測定することが、植物指標、植物の大気汚染浄化能を評価する方法として現実に即した方法と考えられる。

本報告では、この考え方をもとに、緑化樹・街路樹として比較的良く利用されているポプラ品種群を用いて、大気汚染物質の暴露による可視障害の発現程度と蒸散速度を測定し、これらの品種間差異を調査した。その結果から、大気汚染物質に特異的に反応する品種群によって、大気汚染環境を質的、量的に評価する可能性を検討した。また、大気汚染物質の収着能力の高い品種群を検索し、大気汚染物質に対する特性をもとに、ポプラ品種群を類別した。

材料と方法

材料…実験材料のポプラ品種群 (*Populus sp.*) は東京大学農学部田無演習林と王子製紙株式会社亀山林木育種場より委譲された品種群を当研究所実験ほ場で育成・繁殖しているものを用いた。これらのポプラの穂木 (長さ約 15 cm) を 1/1 万アールプラスチックポットに挿木し、ファイトロン温室で温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $70 \pm 5\%$ 、14 時間日長の条件下で、当研究所の標準育成方法 (3) により育成した。実験には葉数が 25 ~ 30 枚に生長した個体を用いた。

大気汚染物質の暴露…当研究所に設置されている人工光型のグロースキャビネット (KG 特殊型; 小糸工業製) を温度 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $70 \pm 3\%$ 、照度 $30 \pm 3 \text{ klx}$ 、風速 $30 \pm 10 \text{ cm/s}$ の条件下でガス暴露を行った。尚、光源には熱線吸収ガラスを装着したメタルハライドランプ (陽光ランプ D-400 N 型; 東芝製) を用いている。またポプラはガス暴露時と同条件下で 3 ~ 4 時間馴化させた後に、水ストレスを受けない状態でガス暴露を行った。

可視障害度の調査…ガス暴露による可視障害の発現程度はガス暴露後、明条件下に 12 ~ 24 時間放置し、可視害徴が安定してから葉に生じた可視障害の面積を目視により 5 段階 (一; 障害無し, 土, +, 卍, 卍; 障害極めて激しい) (表 1) に分類し、3 ~ 9 個体の全葉で得られた値の平均値で表した。また、実験の都合上、ガス暴露の時期による可視障害度の差異は基準品種を設定し、判定した。

表 1 ポプラ品種群の可視障害度の判定基準
Table 1 Index as degrees of visible injury in poplar cultivars

Degree of visible injury	No. of damaged leaves	Necrotic area (%)
(-)	no	no
(土)	a few leaves	trace
(+)	a few leaves	< 10
(++)	< half of leaves	10 ~ 30
(卍)	> half of leaves	> 30

蒸散速度の測定…蒸散速度は Steady state porometer (LI-1600 C 型; LI-COR 社製) で測定し、飽差 10 mm Hg 当たり換算し、 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{s}$ で表した。測定には、蒸散速度が安定し、最大値を示す頂芽より 6・7 葉位の葉の主葉脈をはずした裏面の中央の部位の 2 cm^2 を用いた。グロースキャビネットで 3 ~ 4 時間馴化させた後の安定した蒸散速度を初期値とし、10 ~ 12 個体の 20 ~ 24 枚の葉の平均値と標準誤差を求めた。また、ガス暴露後の蒸散速度は、可視障害の発現しない暴露ドースでガス暴露を行った後に、3 ~ 6 個体の 6 ~ 12 枚の葉で測定した。また、蒸散速度の初期値と暴露後の値の差を初期値で割って、蒸散速度の阻害率を求めた。

結果と考察

可視障害の発現程度と品種間差異

当研究所実験は場で系統保存されている品種群から73品種について、 O_3 と SO_2 で暴露処理した。暴露ドースは藤沼・相賀(2)のイネのガススクリーニングの結果を参考にし、両ガスそれぞれについて同程度の可視障害が発現すると思われる暴露ドースを選定した。

表2 可視障害度から見たポプラ品種群の O_3 と SO_2 に対する感受性の比較
暴露時間はいずれも6時間とした。可視障害の表示は表1を参照。

Table 2 Comparison of foliar damage in poplar cultivars, exposed to O_3 or SO_2 for 6 hr
Symbols of degree of visible injury of leaves are expressed in Table 1.

Sample No.	*Degree of visible injury				Sample No.	*Degree of visible injury			
	O_3		SO_2			O_3		SO_2	
	0.2 ppm	0.5 ppm	0.5 ppm	2.0 ppm		0.2 ppm	0.5 ppm	0.5 ppm	2.0 ppm
1	-	-	-	+	31	±	+	+	++
2	-	±	-	++	32	±	++	-	++
3	±	-	-	++	33	-	+	-	+
4	±	+	-	++	34	-	-	-	++
5	-	±	++	+++	35	-	++	-	+++
6	-	-	-	+	36	±	+++	-	+++
7	-	±	-	+++	37	-	-	-	+
8	-	+	-	+++	38	+	+++	-	+++
9	+	+	±	+++	39	-	-	-	++
10	++	+++	+	+++	40	-	+	-	++
11	-	+	-	++	41	++	++	-	++
12	+	+	-	++	42	+	++	-	++
13	++	+++	-	++	43	++	+++	-	+++
14	-	-	-	+	44	-	±	-	+
15	-	-	-	+	45	-	+	+	+++
16	+	+	-	±	46	+	++	-	+++
17	±	-	-	++	47	±	+	-	+++
18	±	±	-	±	48	-	+	+	+++
19	±	±	-	±	49	++	+++	±	++
20	-	+	-	++	50	-	±	-	++
21	-	+	-	++	51	+	++	+	+++
22	-	-	-	++	52	+	+	-	-
23	+	±	-	+	53	+	+++	-	++
24	±	-	-	++	54	+	+	-	++
25	++	++	-	++	55	-	±	-	++
26	+	+	+	++	56	-	±	-	+
27	-	±	±	++	57	-	-	-	++
28	-	±	-	++	58	-	-	-	++
29	±	±	-	++	59	-	-	-	+
30	±	+	-	+	60	-	+	-	++

* : 値は3~9個体の平均値を示す。

* : Each value is the mean of 3~9 plants.

表2 (つづき)
Table 2 (continued)

Sample No.	*Degree of visible injury				Sample No.	*Degree of visible injury			
	O ₃		SO ₂			O ₃		SO ₂	
	0.2 ppm	0.5 ppm	0.5 ppm	2.0 ppm		0.2 ppm	0.5 ppm	0.5 ppm	2.0 ppm
61	-	-	-	++	71	+	++	±	++
62	-	++	-	++	72	-	++	-	++
63	±	±	-	±	73	-	-	-	+
64	+	+	-	++					
65	±	±	-	+					
66	-	-	-	++					
67	-	±	-	++					
68	-	+	-	++					
69	-	±	-	++					
70	+	++	±	++					

O₃による可視障害は葉表面に黒褐色あるいは黒紫色の小さな斑点状に発現し、それが次第に拡大し、主葉脈を除いた部位に面的なネクロシスとなる例が多く認められた。また、SO₂によるものは葉裏面に茶褐色の部分的なネクロシスが発現し、それが次第に拡大し、葉全面のネクロシスになる例が多く認められ、今までに報告されている結果(8, 17)と同様であった。しかし、サンプル番号9の品種では、上述の障害は認められず、O₃とSO₂で同様に障害部位に脱水症状が発現した。葉令による可視障害の発現程度の差異は、両ガス共に成熟葉>老葉>若葉の順で障害程度が大きく、例外は認められなかった。

73品種の暴露結果を表2に示す。O₃での可視障害の発現程度の品種間差異は0.2 ppm・6 hの低暴露ドースでは約50%の品種に可視障害が発現せず、顕著な可視障害は約10%の品種で発現したにすぎない。しかし、0.5 ppm・6 hの高暴露ドースにすると、低暴露ドースで可視障害の発現しなかった品種の約50%に可視障害が発現し、同様に、低暴露ドースでのそれぞれの障害程度に分別した品種の約50%で障害程度が増大した。また、SO₂では0.5 ppm・6 hの低暴露ドースで約85%の品種で可視障害が発現せず、1品種で顕著に可視障害が発現したにすぎない。しかし、2.0 ppm・6 hの高暴露ドースにすると、1品種を除いて、何んらかの可視障害が発現し、約75%の品種で顕著に可視障害が発現した。この結果より、O₃、SO₂のそれぞれに対するポプラ品種間の感受性・抵抗性を可視障害の発現程度から分別することが十分可能であることが示唆された。

また、同一品種内でO₃あるいはSO₂に対する感受性が特異的であるか否か表2の結果から調べた(表3)。2種類の暴露ドースに対する結果より、O₃とSO₂それぞれの総括的な感受性を求め、該当する品種数を記載した。両ガスに対して同程度の感受性を示す品種数は約80%になるが、一概に、O₃とSO₂それぞれに対する感受性が相関するとはいえない。(r = 0.353)。このことは、

表3 ポプラ品種間のO₃とSO₂に対する感受性の比較。数値は品種数を示す。
 Table 3 The variations of O₃ and SO₂ sensitivities in poplar cultivars.
 Numerals in the table are the number of cultivars.

SO ₂	Degree of visible injury					Total
	-	±	O ₃ +	++	+++	
-	10	7	2	0	0	19
±	14	10	5	3	1	33
+	3	3	1	2	2	11
++	0	1	4	0	0	5
+++	1	2	1	0	1	5
Total	28	23	13	5	4	73

日本在来稲品種間(2)や樹木種間(13)の結果と同様であった。しかし、ここで興味あることは、O₃とSO₂に対して感受性の異なる品種群が存在することであろう。SO₂に対しては高感受性であるが、O₃に対しては抵抗性である品種、その反対である品種が、今回のガススクリーニングで数品種見い出せた。このことは、今回は行ってないが、数種の大気汚染物質が複合状態で存在している条件下でも、それぞれの大気汚染物質に特異的に反応する品種群によって、大気汚染環境を質的、量的に評価できることを示唆している。しかも、同じ *Populus* 属内の品種群を指標植物として利用できるのも、栽培の均一さ、大気汚染環境以外の環境要因に対する反応の把握および評価の判定等に多大な利点が考えられる。

O₃ 暴露による蒸散速度の変化

可視障害の発現程度を調査した73品種から、O₃に対して障害程度が異なる20品種を選抜して、O₃暴露による蒸散速度の変化を調査した(表4)。O₃暴露前の蒸散速度の平均値は9.4~13.4 μg/cm²/s/10mmHg 飽差の範囲で存在し、標準誤差も平均値の5~18%であり、葉による差は少なかった。0.1 ppm O₃を4時間暴露すると、暴露前の値に比べ、品種により蒸散速度は様々なに変化した。6品種では変化が認められなかったが、他の14品種では最大35%も暴露前に比べ低下した。また、暴露により、標準誤差も大きくなり、蒸散速度の変化が一様ではないことを示し、走査型放射温度計による葉温計測による結果(15)とも一致した。

O₃暴露による蒸散速度の変化は、Steady state porometerによる測定方法の特性から葉面の境界層抵抗をほぼ無視できる(11)ので、気孔抵抗の変動に帰因すると考えられる。そこで、O₃暴露による蒸散速度の阻害率と可視障害の発現程度との関係を図1に示した。顕著な可視障害が発現した品種群では、蒸散速度の阻害率が小さい傾向が見られ、暴露前の気孔が開いている状態が続

表4 ポプラ品種群の蒸散速度に及ぼすO₃暴露の影響
Table 4 Effects of O₃ exposure on transpiration rate in poplar cultivars

Sample No.	Transpiration rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{sec}/10\text{mmHg S.D.}$)		% of initial
	Initial	0.1 ppm 4 h exposed	
5	13.4 ± 1.1	13.7 ± 1.5	102 ± 11
7	10.2 ± 1.1	9.4 ± 1.5	92 ± 15
10	11.5 ± .8	10.2 ± 1.2	89* ± 12
15	11.9 ± .9	7.9 ± 1.7	66*** ± 14
18	11.2 ± 1.4	11.4 ± .7	102 ± 6
24	11.0 ± 1.5	8.6 ± 1.4	78*** ± 18
26	11.9 ± 1.1	9.5 ± 1.0	80*** ± 8
29	9.3 ± 1.2	7.5 ± .9	81*** ± 10
30	10.5 ± 1.0	6.8 ± 1.6	65*** ± 15
32	10.3 ± 1.1	7.4 ± 2.7	72*** ± 26
38	9.9 ± .8	8.4 ± .4	84*** ± 4
43	12.4 ± 1.6	11.2 ± 1.4	90 ± 11
44	10.9 ± 1.0	9.6 ± 1.2	88** ± 11
46	11.8 ± .8	9.8 ± 1.7	83*** ± 14
49	9.3 ± 1.0	9.4 ± .6	101 ± 6
51	12.2 ± 1.1	11.5 ± 1.0	94 ± 8
53	11.3 ± .7	10.6 ± .9	94* ± 8
67	9.4 ± 1.0	8.0 ± 1.3	84** ± 14
69	9.6 ± 1.1	8.2 ± 1.2	85* ± 12
70	10.3 ± 1.9	6.9 ± 2.6	67*** ± 25

測定値は6~20葉の平均±標準誤差を示す。

*, ** および *** はそれぞれ5%, 1% および 0.1% の危険率で有意差を示す。

Each value is the mean ± standard error of 6 ~ 20 leaves.

*, ** and *** indicate mean values that are significantly different from initial values at the 0.05, 0.01 and 0.001 levels, respectively.

いていると考えられる。しかし、可視障害の発現が小さい品種群では、蒸散速度の阻害率は広い範囲にまたがり、ガス暴露によって気孔の閉鎖を伴う品種と伴わない品種が混在していると考えられる。この結果から、可視障害の発現程度が小さい一部の品種を除いて、ガス暴露時の気孔開度の変化が、可視障害の発現に大きく関与しているといえる。しかし、一般に大気汚染物質による可視障害の発現には葉の大気汚染物質収着速度に依存することが古くから知られている(20)。また、その収着速度を気孔の開閉運動が支配している(10, 19)。従って、ガス暴露に対する気孔の開閉運動の速さや程度からだけでは、可視障害の発現程度は説明できず、実際に葉に収着された大気汚染物質量を考える必要がある。

大政ら(14)によって、大気汚染物質の収着速度を蒸散速度より推定する方法が確立されており、単位飽差当たりの蒸散速度に対する葉の単位大気汚染物質濃度当たりの大気汚染物質収着速度は一定の値をとり、O₃の場合は 1.5×10^{-3} mmHg/ppm である。そこで、この係数とガス暴露

時の蒸散速度と O_3 暴露濃度より推定された葉の O_3 収着速度と可視障害の発現程度との関係を求めた(図2)。ただし、ガス暴露時の蒸散速度を暴露前と暴露4時間後の値の相加平均と仮定して収着速度を計算しており、測定方法の特性からも、収着速度の程度(大きい小さいか)の参考にすぎない。しかし、図2に見られるように、一品種を除いて、 O_3 収着速度が大きくなるに従いがい、可

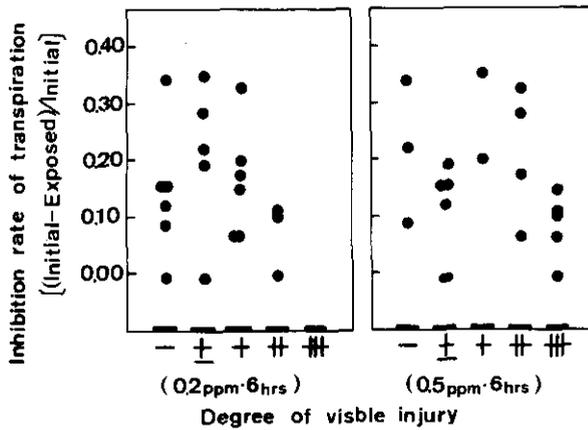


図1 ポプラ品種群の O_3 暴露による蒸散速度の阻害率と可視障害の発現程度との関係

Fig. 1 Relation between the inhibition rate of transpiration and the degree of visible injury in poplar cultivars exposed to O_3

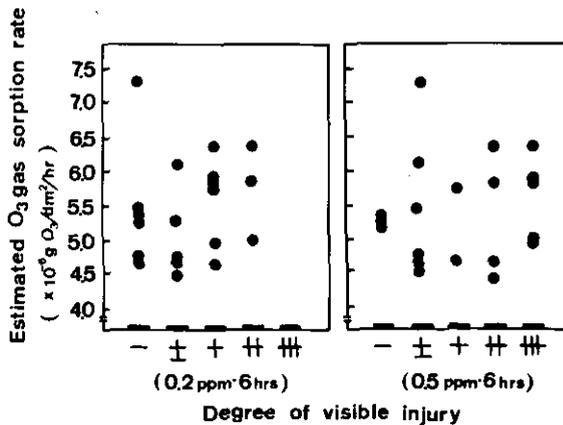


図2 ポプラ品種群の O_3 暴露による O_3 収着速度と可視障害の発現程度との関係

Fig. 2 Relation between the O_3 sorption rate and the degree of visible injury in poplar cultivars exposed to O_3

視障害の発現程度が大きくなる傾向が見られた。この関係は古川ら（4）により、SO₂で植物種を変えて行った実験でも報告されており、O₃についても同様な関係があることが確認できた。

大気汚染指標性と大気汚染浄化能

以上の結果から、ポプラ品種間で可視障害から見た大気汚染物質に対する感受性および大気汚染物質の収着能力が大幅に異なり、特異的であることが明らかとなった。この2つの特性をもとに、蒸散速度を測定した20品種を類別した（図3）。図3より、大気汚染物質に対して抵抗性である品種間で大気汚染物質の収着量が大幅に異なっていることが分かる。つまり、大気汚染物質に対する抵抗性の品種間の差異は次の二つの特性に大別できる。1：ガス暴露により気孔が閉鎖し、大気汚染物質を葉中に取り込まないもの。2：大気汚染物質を葉中に取り込むが、解毒作用により被害を生じないもの。また、大気汚染物質の取り込み量をほぼ一定にして、大気汚染物質に対する感受性を比較すると、感受性あるいは抵抗性の違いは、大なり小なり取り込んだ大気汚染物質の解毒作用の反応量の差によるものと推定できる。しかし、今回の実験では、収着速度が大きく、かつ、感受性の高い品種は認められなかった。

これらのポプラ品種群を大気汚染の評価と改善のために利用することを考えると、大気汚染環境評価のための指標植物としては、感受性の高いことが必須となる。また、大気汚染浄化に対しては、大気汚染環境に対して抵抗性があり、かつ、大気汚染物質の収着能力の高いことが望ましい。今回の実験はO₃を中心として、短期間の植物への影響を調査したにすぎず、複合大気汚染環境、あるいは実際の野外条件下での影響とは大きな隔たりがあり、それらの説明は今後の課題である。しかし、植物種、品種それぞれについて、大気汚染環境に対する反応特性を調査し、記載することは、植物と大気汚染環境下の関連で行われる研究とその応用化に対して必須事項と考えられる。

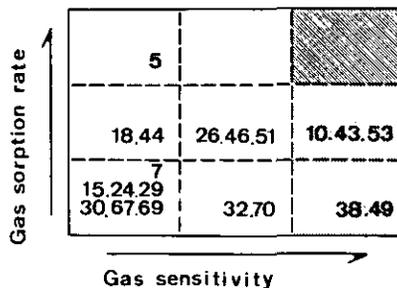


図3 大気汚染指標性と大気汚染浄化能から類別したポプラ品種群
図中の数値はポプラ品種のサンプル番号を示す。

Fig. 3 Groupings of poplar cultivars based on the sink factor to air pollutants and the gas sensitivity of the plants. Numerals in the figure show sample No. of poplar cultivars expressed in Table 2.

なお、ポプラ品種群の母樹を移譲していただいた東京大学農学部田無演習林、王子製紙株式会社亀山林木育種場、ポプラの栽培に携わった本研究所実験ほ場、および、実験装置の維持・管理に携わった本研究植物実験施設の関係諸氏に心からの謝意を表します。

参 考 文 献

1. Crakar, L. E. and J. S. Starbuck. 1973. Leaf age and air pollutant susceptibility: Uptake of ozone and sulfur dioxide. *Environ. Res.* 6: 91-94
2. Fujinuma, Y. and I. Aiga. 1980. Selected rice strains as an indicator plant for air pollution. *Res. Rep. from the National Inst. for Environ. Studies* No.11: 255-262
3. 藤沼康実・町田 孝・相賀一郎. 1979. 国立公害研究所植物実験施設における実験材料植物の育成方法について。陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究。昭和51/53年度特別研究報告 国立公害研究所研究報告 第10号: 387-395
4. Furukawa, A., O. Isoda, H. Iwaki and T. Totsuka. 1979. Interspecific differences in responses of transpiration to SO₂. *Environ. Control in Biol.* 17: 153-159
5. Hill, A. C. 1971. Vegetation: a sink for atmospheric pollutants. *J. Air. Pollut. Cont. Assoc.* 21: 341-346
6. Hawsworth, D. L. and F. Rose. 1970. Qualitative scale for estimating sulfur dioxide air pollution in England and Wales using epiphytic lichens. *Nature* 227: 145-148
7. Jacobson, J. S. and W. A. Feder. 1974. A regional network for environmental monitoring: Atmospheric oxidant concentrations and foliar injury to tobacco indicator plant in the Eastern United States. *Univ. Massachusetts Bulletin* No.604
8. 関東地方公害対策推進本部大気汚染部会編 1980. 植物からみた関東地方の光化学スモッグ被害の実態: 資料編 p. 21 - 27. 関東地方公害対策推進本部大気汚染部会
9. Klein, H. and H. J. Jäger, W. Domes and C. H. Wong. 1978. Mechanisms contributing to differential sensitivities of plant to SO₂. *Oecologia (Berl.)* 33: 203-208
10. Kondo, N. and K. Sugahara. 1978. Changes in transpiration rate of SO₂-resistant and -sensitive plants with SO₂ fumigation and the participation of abscisic acid. *Plant & Cell Physiol.* 19: 365-373
11. LI-COR, Inc. ed. 1980. Instruction manual; LI-1600 steady state porometer. p.3: 1-9. LI-COR, Inc.
12. 名取俊樹・戸塚 績. 1980. 二酸化窒素の短期および長期暴露に伴う植物のガス収着速度を支配する植物側の要因について。大気汚染研究 15: 329-333
13. 小川 章 1978. 亜硫酸ガスおよびオゾンに対する樹種別感受性比較。第19回大気汚染学会, 植物影響分科会講演資料
14. 大政謙次・安保文彰・名取俊樹・戸塚 績. 1979. 植物による大気汚染物質の収着に関する研究(II) NO₂, O₃あるいはNO₂+O₃暴露下における収着について。農業気象 35: 77-83
15. Omasa, K., F. Abo, Y. Hashimoto and I. Aiga. 1980. Measurement of the thermal pattern of plant leaves under fumigation with air pollutant. *Res. Rep. from the National Inst. for Environ. Studies* No.11: 239-254
16. Roberts, B. R. 1974. Foliar sorption of atmospheric sulfur dioxide by woody plants. *Environ. Pollut.* 7: 133-140
17. 大気汚染研究全国協議会第7小委員会編 1973. 大気汚染植物被害写真集。日本公衆衛生協会
18. Tanaka, K. and K. Sugahara. 1980. Role of superoxide dismutase in defense against SO₂ toxicity and an increase in superoxide dismutase activity with SO₂ fumigation. *Plant & Cell Physiol.* 21: 601-611
19. Taylor, O. C. 1973. Acute responses of plants to aerial pollutants. In *Air Pollution Damage to Vegetation* (edit. by J. A. Naegele), p.9-20. American Chemical Society, Washington, D. C.

20. Thomas, M. D. and G. H. Hill, 1935. Absorption of sulfur dioxide by alfalfa and its relation to leaf injury. *Plant Physiol.* 10: 291-307
21. 戸塚 績・門司正三 1973. 植物の汚染環境改善機能について —とくに大気汚染との関係—。「人間の生存にかかわる自然環境に関する基礎的研究」研究報告集録, p. 31 - 45. 文部省研究報告集録 (昭 47 人間生存と自然環境)
22. 全国都道府県・読売新聞社編 1975. アサガオによる光化学スモッグ観察全国調査報告, 読売新聞社

Summary

Responses of hybrid poplar trees to air pollutants were examined concerning the appearance of foliar injury and the change of transpiration rate.

73 cultivars of poplar trees were fumigated with 0.2 or 0.5 ppm O₃ for 6 h and 0.5 or 2.0 ppm SO₂ for 6 h. The extent of foliar necrosis appeared by O₃ or SO₂ exposure was quite different among cultivars. The sensitivity to O₃ and SO₂ was almost the same in 80% of the cultivars tested, but in the rest 20% was quite different. Several cultivars which responded specifically to each air pollutants could not be found.

20 cultivars, selected on the basis of the sensitivity to O₃, were used for measuring changes of transpiration rate under fumigation with 0.1 ppm O₃ for 4 h. In 70% of the cultivars the transpiration rate was declined to 65% of the initial values, but in the rest 30% there was no decline of the transpiration. With increase of the foliar damage, the inhibition of transpiration rate became lower and the gas sorption rate tended to increase in most cultivars. However, there was only one cultivar which exhibited the higher gas sorption rate without any visible damage during the fumigation with O₃. Among poplar cultivars resistant to O₃ exposure there were two groups: the one had low sorption rate of O₃ and the other had the higher sorption rate. In this experiment, we could not find any cultivars which were highly sensitive to O₃ with the high gas sorption rate.

Key words; Air pollution - Gas sorption - Indicator plant - Ozone (O₃) - Poplar - Transpiration rate.

国立公害研究所特別研究成果報告

- 第 1 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 — 霞ヶ浦を対象域として。(1977)
- 第 2 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究 — 昭和51/52年度研究報告。(1978)

(改 称)

国立公害研究所研究報告

- 第 3 号 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) (1978)
(日本産ユスリカ科 *Chironomus* 属 9 種の成虫, サナギ, 幼虫の形態の比較)
- 第 4 号 スモッグチャンバーによる炭化水素 — 窒素酸化物系光化学反応の研究 — 昭和52年度中間報告。(1978)
- 第 5 号 芳香族炭化水素 — 窒素酸化物系の光酸化反応機構と光酸化二次生成物の培養細胞に及ぼす影響に関する研究 — 昭和51/52年度研究報告。(1978)
- 第 6 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅱ) — 霞ヶ浦を中心として。(1979)
- 第 7 号 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
(日本産ユスリカ科20種の成虫, サナギ, 幼虫の形態学的研究)
- 第 8 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和52/53年度研究報告。(1979)
- 第 9 号 スモッグチャンバーによる炭化水素 — 窒素酸化物系光化学反応の研究 — 昭和53年度中間報告。(1979)
- 第 10 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究 — 昭和51/53年度特別研究報告。(1979)
- 第 11 号 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
(大気汚染物質の植物影響およびその植物毒性の機構に関する研究)
- 第 12 号 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
(コンピュータ制御装置を利用したフレイムおよび誘導結合プラズマ分光法による多元素同時分析)
- 第 13 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
(多摩川に発生するユスリカの研究
— 第 1 報 その一支流に見出されたユスリカ各種の分布と下水による汚染度との関係 —
— 第 2 報 その一支流に見出された *Chironominae* 亜科の20種について —)
- 第 14 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭和53, 54年度特別研究報告。(1980)
- 第 15 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和54年度特別研究報告。(1980)
- 第 16 号 計測車レーザーレーダーによる大気汚染遠隔計測。(1980)
- 第 17 号 流体の運動および輸送過程に及ぼす浮力効果 — 臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究

— 昭和53/54年度 特別研究報告. (1980)

- 第 18 号 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
(環境標準試料「リョウブ」の調製, 分析および保証値)
- 第 19 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(III) — 霞ヶ浦(西浦)の湖流 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 20 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(IV) — 霞ヶ浦流域の地形, 気象水文特性およびその湖水環境に及ぼす影響 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 21 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(V) — 霞ヶ浦流入河川の流出負荷量変化とその評価 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 22 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(VI) — 霞ヶ浦の生態系の構造と生物現存量 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 23 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(VII) — 湖沼の富栄養化状態指標に関する基礎的研究 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 24 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(VIII) — 富栄養化が湖利用に及ぼす影響の定量化に関する研究 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 25 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(IX) — *Microcystis* (藍藻類) の増殖特性 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 26 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(X) — 藻類培養試験法によるAGPの測定 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 27 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(XI) — 研究総括 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 28 号 複合大気汚染の植物影響に関する研究 — 昭和54/55年度特別研究報告. (1981)

Report of Special Research Project the National Institute for Environmental Studies

- No. 1* Man activity and aquatic environment – with special references to Lake Kasumigaura – Progress report in 1966. (1977)
- No. 2* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants – Progress report in 1976-1977. (1978)

[Starting with Report No. 3, the new title for NIES Reports was changed to:]

Research Report from the National Institute for Environmental Studies

- No. 3 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)
- No. 4* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1977. (1978)
- No. 5* Studies on the photooxidation products of the alkylbenzene-nitrogen oxides system, and on their effects on Cultured Cells – Research report in 1976-1977. (1978)
- No. 6* Man activity and aquatic environment – with special references to Lake Kasumigaura – Progress report in 1977-1978. (1979)
- No. 7 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
- No. 8* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1977-1978. (1979)
- No. 9* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1978. (1979)
- No.10* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants – Progress report in 1976-1978. (1979)
- No.11 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
- No.12 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
- No.13 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
- No.14* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – Progress report in 1978-1979. (1980)
- No.15* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1979. (1980)
- No.16* Remote measurement of air pollution by a mobile laser radar. (1980)
- No.17* Influence of buoyancy on fluid motions and transport processes – Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region. (1980)
- No.18 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
- No.19* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Lake current of Kasumigaura (Nishiura) – 1978-1979. (1981)
- No.20* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Geomorphological and hydro-meteorological characteristics of Kasumigaura watershed as related to the lake environment – 1978-1979. (1981)
- No.21* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Variation of pollutant load by influent rivers to Lake Kasumigaura – 1978-1979. (1981)

- No.22* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Structure of ecosystem and standing crops in Lake Kasumigaura – 1978-1979. (1981)
- No.23* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Applicability of trophic state indices for lakes – 1978-1979. (1981)
- No.24* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Quantitative analysis of eutrophication effects on main utilization of lake water resources – 1978-1979. (1981)
- No.25* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Growth characteristics of *Microcystis* – 1978-1979. (1981)
- No.26* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Determination of algal growth potential by algal assay procedure – 1978-1979. (1981)
- No.27* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Summary of Researches – 1978-1979. (1981)
- No.28* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Progress report in 1979-1980. (1981)

* in Japanese

RESEARCH REPORT FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES
No. 28

国立公害研究所研究報告 第28号
(R-28-'81)

昭和56年8月25日発行

編集・発行 国立公害研究所

茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

印刷 株式会社イセブ印刷
茨城県新治郡桜村天久保2-11-20

Published by the National Institute for Environmental Studies
Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
August 1981