

短時間のオゾン (O₃) 暴露が ブナ苗の転流パターンおよび生理活性に及ぼす影響調査

関 達哉*

Effect of ozone (O₃) gas on the translocation profile
and transpiration of seedlings of *Fagus crenata*

Tatsuya SEKI*

要 旨

関 達哉：短時間のオゾン(O₃)暴露がブナ苗の転流パターンおよび生理活性に及ぼす影響調査 神奈川県自環保セ報告9:73-79, 2012 ブナ(*Fagus crenata*) の苗木に対し、7月および9月にオゾンガスを人工的に数時間暴露し、その後の同化産物の転流パターンの変化について調べた。7月の6時間1回暴露では、葉、1年枝、旧枝におけるRSA(寄与率)が、オゾン処理区でやや高かったが有意ではなく、逆に細根においてはオゾン処理により低下していた。幹ではオゾン処理により有意にRSAが低下した。太根においては、逆にオゾン処理区が対照区に比べて有意に増加した。9月の7時間1回暴露では、貯蔵器官である太根への転流量を低下させたことが示唆された。また、今回、芽においても対照区より寄与率が低い傾向であった。また、9月にオゾン暴露を1日6時間、間隔を開けて3日間にわたり行ったところ、葉緑素含量の指標であるSPAD値に対する有意な影響が認められ、対照区の89%に低下していた。蒸散速度に対するオゾン暴露の影響は認められなかった。これらのことから、7月および9月におけるブナ苗に対する人工的なオゾン暴露が、各器官への分配パターンの変化を引き起こしたと、9月の複数回にわたるオゾン暴露がSPAD値を低下させたことが明らかとなった。

キーワード：ブナ、オゾンガス、転流、蒸散速度、SPAD

I はじめに

1980年代以降、神奈川県丹沢山地の南斜面においてブナ林の衰退が観察されており、その原因として首都圏から移流するオゾンなどの大気汚染物質と、乾燥ストレスが複合的に作用している可能性が指摘されている(武田ら 2000)。衰退地域においては、春から夏にかけて、100ppbを超えるオゾン(O₃)濃度が観測されている(相原ら, 2004)。

武田・相原(2007)は西丹沢犬越路でブナ苗木に

環境大気と浄化大気を3年間にわたり暴露したところ、環境大気を暴露することでクロロフィルの減少と落葉の早期化が生じ、成長量が約60%低下することを報告した。

これまで、ブナに関しては、葉の生理活性、糖やデンプンの濃度という観点からの研究がある。2年生ブナ苗に対して、オゾン暴露と土壤中への窒素負荷(最大50 kg・ha⁻¹・year⁻¹)を組み合わせ、大気中オゾン濃度の1.5倍および2.0倍のオゾン濃度を2年間暴露した結果、1年間の暴露においては、

* 神奈川県農業技術センター果樹花き研究部(〒神奈川県平塚市上吉沢 1617)

純光合成速度の低下、炭素同化効率 (carboxylation efficiency)、光合成関連酵素 (ribulose⁻¹, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)) および葉内可溶性タンパクの低下と葉内の酸性アミノ酸の増加が認められ、葉内タンパクがオゾンにより分解されている可能性が示唆された (Yamaguchi *et al.*, 2007 a)。また2年間の暴露後の個体乾重量に対するオゾンと窒素負荷による交互効果が認められ、窒素負荷が増すことによりオゾンによるブナ苗の個体乾重量の低下の程度が大きくなり、原因として純光合成速度の低下、窒素利用効率の低下が指摘されている (Yamaguchi *et al.*, 2007 b)。また、60ppb オゾンを5月から10月にかけて長期暴露した試験では、9月における葉内の遊離糖やデンプンの濃度低下、早期落葉や翌年の発芽遅延と葉数の減少を認めている (Yonekura *et al.*, 2004)。平成13年度より18年度まで行われた丹沢大山自然環境保全対策推進事業による「丹沢山地のブナ林衰退機構の解明に関する研究調査」では、9月下旬における2年生ブナ苗へのオゾン暴露により、暴露72時間後の葉を除く各器官への転流の度合いを示すRSA (寄与率) が相対的に低下した。特に地下部への転流の減少が著しかったという知見が得られている。

一般に、オゾンは、葉面に可視被害が現れないような比較的低い濃度 (150ppb以下) であっても、生長を阻害したり (野内ら, 2001)、同化産物の各器官への分配パターンを変化させる (伊豆田ら, 2006)。生長阻害は光合成能力や物質代謝の乱れが原因と考えられている。また、分配パターンの変化が引き起こされた結果、地上部 (茎葉) に比べて地下部 (根) の生長が著しく阻害され、茎葉に対する根の重量比 (root/shoot ratio) は低下する (Cooley and Manning, 1987)。Nouchi *et al.* (1991) は、水耕栽培の水稻を50ppbと100ppbのオゾンに8週間暴露 (発芽後1か月後の幼苗から出穂期まで) したところ、50ppbの暴露では個体乾物重にあまり大きな変化はないが、100ppbでは個体乾物重が大きく低下し、5週間および6週間で50%にまで低下することを認めている。この時、根と茎葉の比率 (root/shoot ratio) は50ppbと100ppbとも8週間の暴露期間中、常に低下している。このことは、葉で生産された光合成産物の根への分配が少なくなり、茎葉への分配

率を高めていることを示している。カバノキやマツの苗に、約100ppbのオゾンを暴露すると、葉肉細胞や篩部細胞が破壊され、葉の糖濃度の増加、葉脈細胞や篩部組織におけるデンプンの蓄積が引き起こされる (Gunthardt-Georg *et al.*, 1993)。また、インゲンマメにおける安定同位体を用いたトレーサー実験からは、オゾンストレス下では葉から同化産物が他の器官へ転流するのが抑制され、特に根への転流量が低下することが確認されている (Okano *et al.*, 1984)。これは、オゾン暴露が葉で生産された光合成産物の各器官への分配に変化を与え、結果として根の生長を阻害するためと考えられている。

ブナについてもオゾン影響により同化産物の分配パターンが変化する可能性がある。実際に関 (2007) は、9月下旬における2年生ブナ苗への6時間の150ppb オゾン暴露により、暴露72時間後の分配パターンが変化し、葉を除く各器官への転流の相対的な低下と地下部への転流の顕著な減少を認めている。しかし、この報告は1時期の1回の試験に基づくものであり、ブナの同化産物の分配パターンを議論するにはデータが不足している。また、ブナ苗木において長期の暴露ではクロロフィルの減少 (武田・相原, 2007) が生じるものの、短時間暴露のクロロフィルや蒸散への影響は明らかとなっていない。

そこで、新たに7月と9月の2時期にオゾン暴露を行い、暴露の有無によるブナの同化産物の転流パターンの違いを調査し、また9月暴露では短期暴露後の蒸散速度と葉緑素含量 (SPAD 値) に及ぼす影響を調査したので報告する。

II 材料と方法

1 オゾンガスが7月におけるブナ苗の転流に及ぼす影響

(1) ブナ苗へのオゾンおよび¹³CO₂の暴露方法

ア 実験施設と供試材料

オゾン暴露実験は、神奈川県平塚市上吉沢にある神奈川県農業技術センターの作物実験棟内に設置した¹³CO₂同化システムチャンバー (60 cm × 60 cm × 100 cm) (以下、チャンバー) に行った。このチャンバーは閉鎖空間 (0.36 m³) において、光強度、温度、相

対湿度、二酸化炭素濃度を一定にした条件下で¹³CO₂同化を行うことができる。実施時期は2009年7月および2008年9月とした。供試ブナ苗は、各年の3月に2年生苗木を12cmポット(苗高約50cm)に植栽し、実験に供試するまで農業技術センター内で通常管理した。

イ 7月の暴露実験

7月暴露では、2009年7月20日午後にチャンバーにブナ苗を入れて照明を点灯し、18:00に消灯した。オゾン暴露日である7月21日は8:00に点灯し、9:00からオゾンを導入し始めて11:00に150ppbに達し、17:00までの6時間暴露を行った。暴露終了後、17:30にブナ苗をチャンバーから出し、¹³CO₂施用まで露地で通常管理を行った。¹³CO₂施用は、7月24日11:00~17:00の間、チャンバー内にブナ苗を置き、¹³CO₂および¹²CO₂を導入し、それぞれ¹³CO₂ 100ppm、¹²CO₂ 300ppmに制御し、ブナ苗に施用した。終了後は、同化産物の移行量測定まで露地で通常管理を行った。オゾン暴露時および¹³CO₂同化時のチャンバー内気象条件は、温度20℃、相対湿度80%、光量子密度 $693.6 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ とし、反復は各区10個体とした。対照区はオゾンおよび¹³CO₂暴露を行わないブナ個体10個体とした。

ウ 9月の暴露実験

9月暴露では、2008年9月24日13:00にブナ苗をチャンバーに入れて照明を点灯し、18:00に消灯した。オゾン暴露日である9月25日は7:00に点灯し、9:30からオゾンを導入し始めて10:00に150ppbに達した。17:00に暴露を終了した。暴露後は¹³CO₂施用まで露地で通常の管理を行った。¹³CO₂施用は9月29日にチャンバーにブナ苗を置き、11:45から17:45まで、チャンバー内を¹²CO₂ 200ppm、¹³CO₂ 100ppmの条件に設定して¹³CO₂を同化させた。17:45に同化を終了し、チャンバーからブナ苗を取り出し、その後は同化産物の移行量測定まで通常管理を行った。オゾン暴露時および¹³CO₂同化時のチャンバー内気象条件は、温度20℃、相対湿度60%、光量子密度 $472.5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ とし、反復は各区10個体とした。また、対照区はオゾンおよび¹³CO₂暴露を行わないブナ個体10個体とした。

(2) 同化産物の各器官への移行量測定

7月暴露では2009年7月27日に各個体を器官別(葉、当年枝、旧枝、幹、太根、細根)、9月暴露では2008年10月1日に器官別(葉、芽、枝、太根、細根)に解体し、温風乾燥機内(80℃)にて1週間乾燥し、乾燥後に粉砕器(C.M.T, T1-100)で粉砕し、粉末試料とした。試料に含まれる¹³C含量を赤外線アナライザー(JASCO EX-130S)で分析した。得られた測定値から、¹³CO₂無施用個体の各器官の¹³C含量を差し引き、¹³C・atom%・excessとし、各部位における施用¹³Cの占める割合すなわち¹³C寄与率(RSA、寄与率(%))=部位別atom%excess/施用atom%excessを求め、各部位への同化産物の移行量を算出し、施用¹³Cの転流・分配量を求めた。

(3) オゾン単木暴露苗の葉緑素含量(SPAD値)および蒸散速度測定

供試材料として、ブナ2年生苗を2010年3月4日に18cmポットに植栽したものをを用いた(苗高約50cm)。9月13日にチャンバーにブナ苗を置き、9月14日(10:15-16:15)、9月17日(10:15-16:15)、9月22日(9:30-15:30)の6h×3回にわたってオゾンガスを暴露した。チャンバー内気象条件は温度25℃、相対湿度80%、光量子密度 $387.8 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であった。対照区として、暴露を行わない個体を用いた。暴露後は露地で通常の管理を行った。オゾン暴露前日(9月13日)にブナ苗をチャンバーに入れて照明を点灯し、18:00に消灯した。オゾン暴露日(9月14日)は8:20に点灯し、葉をサンプリングした後、9:30からオゾンを導入し始めて10:15に150ppbに達した。反復は各区10個体とした。

9月27日(3回目のオゾン暴露5日後)に、各処理区に供試した10個体のうち5個体について、それぞれランダムに選んだ10葉の葉緑素計(SPAD-502 KONICA MINOLTA)によりSPAD値を測定した。

9月27日および10月5日に、スーパーポロメーター(LI-1600, LI-COR)を用いて各区10個体のうち5個体についてランダムに選んだ3葉の蒸散速度を測定した。

Ⅲ 結果および考察

1 7月の暴露実験

暴露後のブナ苗を観察したところ、可視害とみられる症状は認められなかった。

器官別の ^{13}C atom% (図1) およびRSA (図2) に及ぼすオゾンの影響は、葉、1年枝、旧枝 (Branch) においてはオゾン処理区がやや高かったが有意ではなく、逆に細根においてはオゾン処理により低下していた。一方、幹ではオゾン処理により有意にRSAが低下していた。太根においては、逆にオゾン処理により有意に増加していた。

このことから、幹におけるRSAのオゾン処理による低下は、ブナ苗のオゾン暴露により72時間後の各器官への分配パターンが変化したことが明らかとなった。

2006年に行った9月の暴露試験においても、地下部の有意な低下も認められた (関, 2007) が、今回

とは異なる部分も認められた。いずれにしても、RSAの絶対値の高い地下部において、転流パターンの変化が認められた。

結論として、7月の150ppb 6時間暴露により、ブナ苗の転流パターンに変化が生じていた。この変化が最終的にブナ苗の長期的な生育に及ぼす影響は不明である。しかし、RSAの絶対値としては地下部が高かったことから、このような転流パターンの変化が積み重なることで、貯蔵器官における貯蔵養分の量などに及ぼす影響が生じることも推測される。

2 9月の暴露実験

暴露後のブナ苗を観察したところ、可視害とみられる症状は認められなかった。

ブナ苗に対するオゾンガスの影響は、寄与率 (RSA) によれば、葉を除く全ての器官において、対照区に比べ低下していた (図3、4)。特に、細根、芽、太根において対照区より低下しており、太根で

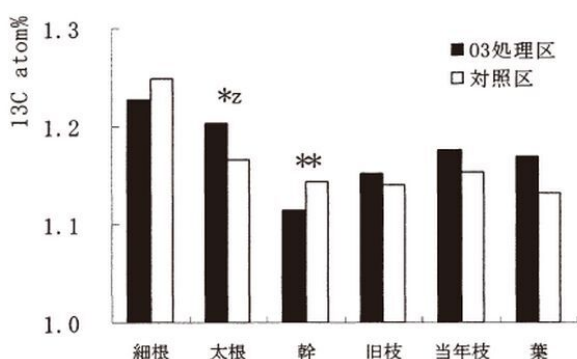


図1 ブナ苗へのオゾン暴露が各部位の ^{13}C atom%に及ぼす影響

z t検定による有意性 (* ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$)

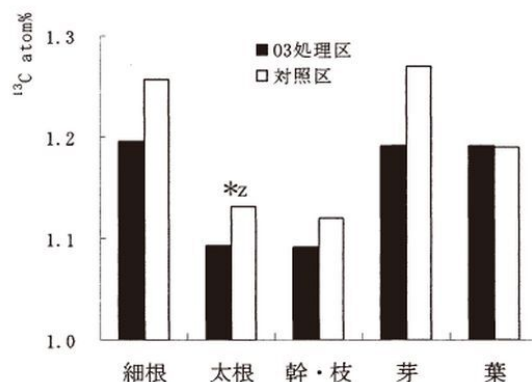


図3 ブナ苗への9月オゾン暴露が各部位における ^{13}C atom%に及ぼす影響

z t検定による有意性 (* ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$)

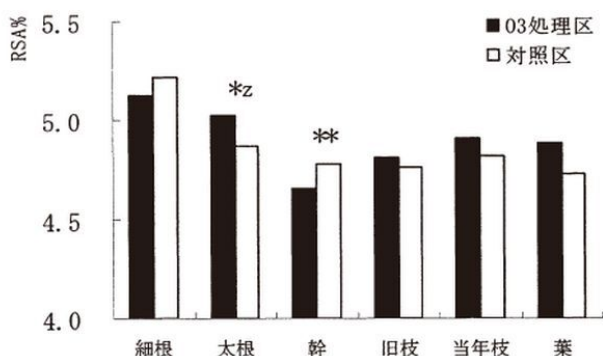


図2 ブナ苗へのオゾン暴露が各部位のRSA(%)に及ぼす影響

z t検定による有意性 (* ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$)

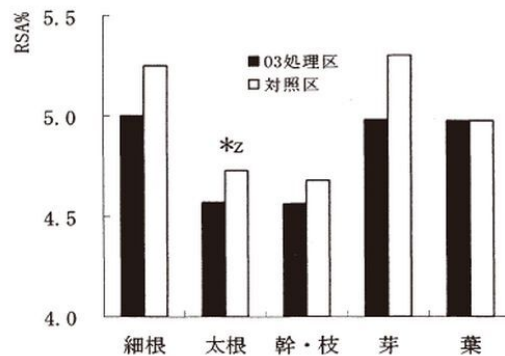


図4 ブナ苗への9月オゾン暴露が各部位におけるRSA(%)に及ぼす影響

z t検定による有意性 (* ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$)

は、対照区より有意に低下していた。このことから、ブナ苗に対するオゾンガスが、転流パターンに影響を及ぼしていることと、特に貯蔵器官である太根への転流量を低下させたことが示唆された。また、今回、芽においても対照区より寄与率が低い傾向にあったことが明らかとなった。このことから、ブナ苗に対するオゾンガスの人工的な暴露により、転流パターンが変化していることが示唆された。

3 葉緑素含量 (SPAD値) および蒸散速度

オゾン暴露を9月に3回にわたって行ったところ、可視害とみられる症状は認められなかった。

暴露5日後の9月27日のSPAD値で、オゾン暴露区における値が、無処理区と比較して有意に低かった。蒸散速度については、暴露5日後の9月27日、および暴露13日後の10月5日において、オゾン処理区が無処理区よりもやや低い傾向であったが、有意な差ではなかった(表1)。

結論として、9月に150ppbのオゾンを6時間×3回暴露することにより、ブナ苗のSPAD値に何らかの影響が生じていることが示唆された。これまでの試験成績で示唆されている転流パターンの変化や、推定される地下部への転流量の減少により、貯蔵養分の量や春先の発芽に影響が生じることも考えられるが、今後の課題と考えられる。

4 総合考察

今回は、丹沢大山において大気中オゾン濃度の高まる時期を考慮し、7月および9月にオゾン暴露を行った。

まず、7月においては地上部および太根でオゾン暴露区の¹³C含量およびRSAが上昇し、幹と細根においてはオゾン暴露区の値が対照区のそれらより低下していた。特に幹におけるRSAはオゾン暴露区において有意に低下し、逆に太根では上昇していた。このことから、樹体の骨格部分にあたる幹および太根における同化養分の転流パターンが変化した可能性がある。

9月暴露においては、地上部においては、葉において殆どオゾン暴露区と対照区の差が認められなかったが、他のすべての部位(芽、幹、太根、細根)においてオゾン暴露区が対照区よりも¹³C含量およびRSAが低下していた。

今回の試験においては、7月の暴露試験を行った時点では、葉の付け根に当たる部分に着生する翌年の芽が小さいことから、当年枝に含めて解析を行った。9月の暴露試験では、芽を分離して解析したところ、¹³C含量およびRSAが有意ではないが低下していることが明らかとなった。

オゾン暴露試験の環境条件については、7月暴露と9月暴露を比較すると、相対湿度、光量子密度、オゾン暴露後の¹³CO₂施用までの時間が異なっており、両方の試験結果をそのまま単純に比較することは不可能であるが、どちらの試験結果からも、オゾンの暴露により転流のパターンが変化する可能性があることが明らかとなった。このことから、丹沢大山で観測される高濃度オゾンが、ブナの同化産物の分配パターンに影響を及ぼす可能性が示唆された。

植物の開花期やその後の種子と果実の発達の生殖生長期では、種子あるいは果実が肥大するにつれて、これらの生殖器官は正常な状態の下では光合成

表1 ブナ苗に対するオゾン暴露がSPAD値および蒸散速度に及ぼす影響

測定項目および 測定日	SPAD 値	蒸散速度 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	
		9/27	10/5
オゾン暴露区	38.4(89) ^z	4.20(95)	11.5(91)
無処理区	43.1(100)	4.41(100)	12.7(100)
有意性 ^y	**	n.s.	n.s.

^z 無処理区を100としたときのオゾン暴露区における相対値

^y t検定による有意性(**; $p < 0.01$, *; $p < 0.05$, n.s.; not significant)

産物のシンクとして要求度が高く、葉や根からの光合成産物の転流を増やすとされる。オゾンによってバイオマスが低下する中で、栄養生長期には光合成産物の葉への転流を増加して葉の生長を維持し、生殖生長期には種子への転流を促進することは、オゾンストレスに対する植物の適応反応とされる(野内ら, 2001)。9月の暴露において、葉のRSAが殆ど変わらず、他のすべての器官で低下したことは、ブナ苗がまだ結実のみられない若齢樹であることから、葉の生長において、光合成産物に対する要求が高いことを示している。

また、9月に3回にわたってオゾン暴露を行ったブナ苗において、最終暴露5日後のオゾン暴露区におけるSPAD値が対照区よりも有意に低下していたことは、9月における複数回のオゾン暴露が、SPAD値に影響を及ぼしている可能性を示唆している。

今回のブナを用いた試験において、1回のオゾン暴露により、9月暴露においては葉をのぞくすべての器官においてRSAが低下していたが、7月暴露においては幹のRSAが有意に対照区より低下したのに対し、太根のRSAは増加していた。このように暴露の時期が異なることで転流パターンの変化に違いが見られる要因は不明である。生育ステージや環境条件、シンク器官などが関わっていることが推測されるが、今後の詳細な検討が必要である。

今回の試験は、短時間暴露であり、光合成速度や関連酵素の濃度などについては未調査であるが、今後ブナに対するオゾン影響の試験研究を考える上で重要な示唆を与えている。

今後は、ブナに対するオゾン影響を、苗木による人工的な暴露試験と併せ、屋外試験により長期的な視点で捉えていく必要がある。犬越路の環境省ステーションのオーブントップチャンバー(OTC)にブナ苗を植え、これまでと同様、環境中のオゾンガスがブナの成長、光合成速度や蒸散速度に対する影響を定期的に調査し、ブナに対するオゾンの影響について捉えていく必要があると考えられる。また、試験にあたっては、ブナ苗が実生苗であることから、系統間変異や生育のばらつきを考慮し、十分な反復と、均一な生育管理に注意する必要があると考えられる。

結論として、ブナ苗に対するオゾンの短期的な暴

露は、同化産物の転流パターンを変化させ、SPAD値を低下させる可能性が示唆された。

IV 引用文献

- Cooley, D. R., Manning, W. J., (1987) The impact of ozone on assimilate partitioning in plants. A review. *Environ. Pollut.* 47:95-113.
- Gunthardt-Georg, M., Matyssek, R., Scheidegger, C., Keller, T (1993) Differentiation and structural decline in the leaves and bark of birch (*Betula pendula*) under low ozone concentrations. *Trees*. 7: 104-114.
- 伊豆田猛編(2006) 植物と環境ストレス. コロナ社. pp14.
- 関 達哉(2007) オゾン(CO₃) ガスが、ブナ苗の転流パターンに及ぼす影響調査. 丹沢山地のブナ林衰退機構の解明に関する研究調査. pp89.
- 相原敬次・阿相敏明・武田麻由子・越地 正(2004) 森林衰退の現状と取り組み(II). 神奈川県丹沢山地における樹木衰退現象. 大気環境学会誌. 39(2): 29-39.
- 武田麻由子・相原敬次(2007) 丹沢山地の大気中オゾンがブナ(*Fagus crenata*) 苗に及ぼす影響. 大気環境学会誌. 42: 107-117.
- 野内 勇編(2001) 大気環境変化と植物の反応. 養賢堂. pp88-89.
- Nouchi, I., Ito O., Harazono, Y., Kouchi, H. (1995) Acceleration of ¹³C-labelled photosynthase partitioning from leaves to panicles in rice plants exposed to chronic ozone at the reproductive stage. *Environ. Pollut.* 88: 253-260.
- Okano, K., Ito, O., Takeba, G., Shimizu, A., Totsuka, T. (1984) Alteration of ¹³C-acclimate partitioning in plants of *Phaseolus vulgaris* exposed to ozone. *New Phytol.* 97: 155-163.
- 武田麻由子・相原敬次(2000) 酸性霧の樹木葉への影響について. 神奈川県環境科学センター第9回研究発表会講演要旨集. pp. 1-4.
- Yamaguchi, M., Watanabe, M., Matsuo, N., Naba, J., Funada, R., Fukami, M., Matsumura, H., Kohno, Y., Izuta, T. (2007 a) Effects of nitrogen supply

- on the sensitivity to O₃ of growth and photosynthesis of Japanese beech (*Fagus crenata*) seedlings. Water Air Soil Pollut:Focus 7 : 131-136.
- Yamaguchi, M., Watanabe, M., Iwasaki, M., Tabe, C., Matsumura, H., Kohno, Y., Izuta, Y. (2007 b) Growth and photosynthetic responses of *Fagus crenata* seedlings to O₃ under different nitrogen loads. Trees. 21:707-718.
- Yonekura, T., Yoshidome, M., Watanabe, M., Honda, Y., Ogiwara, I., Izuta, T. (2004) Carry-over effects of ozone and water stress on leaf phenological characteristics and bud frost hardness of *Fagus crenata* seedlings. Trees. 18 : 581-588.