ついて挿し木後の経時変化を示した。挿し木後約1カ月間は両区において生長量に差はみられないが，その後，苗高及び苗径とも非浄化区の方が劣り，浄化区と比較して著しい生長抑制がみられた。挿し木後114日目の苗高は浄化区で216cm，非浄化区で143cmとなり，苗径はそれぞれ17.3mm，11.7mmであった。

次に，ポプラの生長量をD^2H（苗径^2×苗高）としてその経時変化を見ると図Ⅲ－2のようになった。即ち，挿し木後49日目で両区に差が生じ，114日目には浄化区737cm^3，非浄化区で202cm^{3}となり，非浄化区の生長量は浄化区の27.4％にとどまった。（写真Ⅲ－1）

(b) 生長率（RGR），純同化率（NAR），葉面積比（LAR）[71]

ポプラの生長量D^2Hは掘り取り調査による乾物重と相対生長の関係にあり高い相関が得られた。そこで，経時的に測定したD^2Hから乾物重を推定して，RGRを求め，さらに個体ごとの葉面積からNAR，LARを計算して図Ⅲ－3に示した。生育期間中の非浄化区のRGRとNARは浄化区よりも小さい値であり，一方，LARは非浄化区の方が大きい値を示した。

(c) 各器官の乾物重と分配率

挿し木後，57，86，118日目のポプラの各器官の乾物重は表Ⅲ－3のようであり，各期とも浄化区と比較すると非浄化区において著しく乾物重の減少を示し，生育が進むにつれてその差を拡大した。挿し木後118日目では個体当りの全乾物重は浄化区で211.69gに対し非浄化区では82.73gとなり，特に根，茎，葉柄の生長抑制割合が大きかった。（写真Ⅲ－2）

これらの分配率を図Ⅲ－4に示すと，挿し木後57，86，118日目では浄化区に比べて非浄化区の新梢の分配率が減少し，葉の割合は86，118日目でやや増加する傾向がみられた。

(d) 全葉数，1日当りの展開葉数，葉面積

図Ⅲ－5より生育期間中に展開した全葉数の経時変化を見ると，挿し木後36日目ごろまでは浄化区と非浄化区でほとんど差はないがその後徐々に非浄化区のほうが少なくなり，挿し木後114日目では浄化区で65.2枚に達したのに対して非浄化区では51.2枚となり浄化区の79％の葉数であった。一方，1日当りに展開した葉数は挿し木後36日目では両区で0.5～0.6枚でほぼ等しかったが，それ以降103日目まで差を生じ非浄化区の方で少なかった。

葉面積について個体中最大面積を持つ葉を比較すると，挿し木後114日目では浄化区332.2cm^2，非浄化区222.2cm^{2}となり，非浄化区は浄化区の67％にとどまった。（写真Ⅲ－3）

(2) 非浄化空気室内における可視被害と異常落葉

非浄化区におけるポプラは挿し木後1カ月目位からOxが10pphm前後発生すると3，4日後に成熟葉の表面に白色小斑点を生じ，その後Oxが発生するごとに被害面積の拡大と被害葉数の増加を示した。可視被害の生じた葉は挿し木後2カ月目位から徐々に下位葉から落葉し，114日目までに20.4枚の落葉数となった。これらの落葉数と可視被害の被害指数L.D.I.＝T.D.／（L×5）×100（T.D.は可視被害を受けた葉の面積を全葉位ごとに被害度1～5の段階に分けて調査した合計値，Lは全葉数）の経時変化を図Ⅲ－6に示し，その期間に発生したOx 7pphm以上の日ドース（濃度（pphm）×時間（hr））を積算して比較してみると，被害指数と落葉数の変化がOxドースの推移と類似していた。

一方，浄化区のポプラではこの様な可視被害は全くみられず，春期に展開した葉がわずかに落葉しただけで挿し木後114日目までに5.0枚の落葉数であった。

(3) 各年ごとの生長抑制割合，落葉率及び被害指数とOx発生濃度の経年変化

(a) 浄化区に対する非浄化区の生長量抑制割合

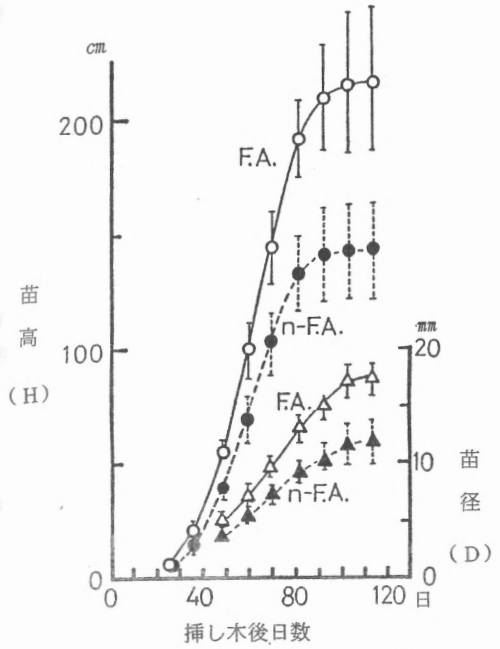
挿し木後展開した新葉が6，7枚に達した時点を貯蔵物質依存の生長期から独立栄養生長期へ転換（挿し木後20～25日目）したもの[72),73)]として，その時点から3カ月後の生長量をD^2Hを用いて各年ごとに浄化区と非浄化区を比較すると表Ⅲ－4(a)のようになった。即ち，浄化区の生長量D^2Hを100％とした場合，1974年と1975年の非浄化区の生長量D^2Hはそれぞれ28.2％，27.4％となり著しい生長抑制がみられ，1977年は39.4％，1976年と1978年は，それぞれ48.0％，51.2％となった。

(b) 落葉率

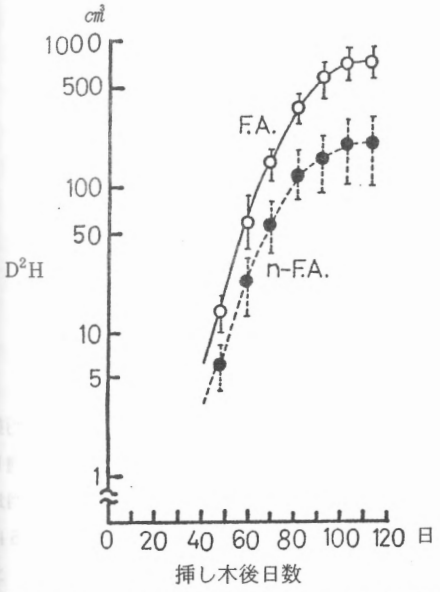
浄化区と非浄化区の全葉数は表Ⅲ－4の(b)に，落葉数は(c)に示し，これらより両区の落葉率を求めて(d)に示した。非浄化区の落葉率を見ると1974年が58.5％と最高値を示し，次に1978年，1975年，1977年と続き1976年が14.1％と低い値であった。

(c) 可視被害の被害指数

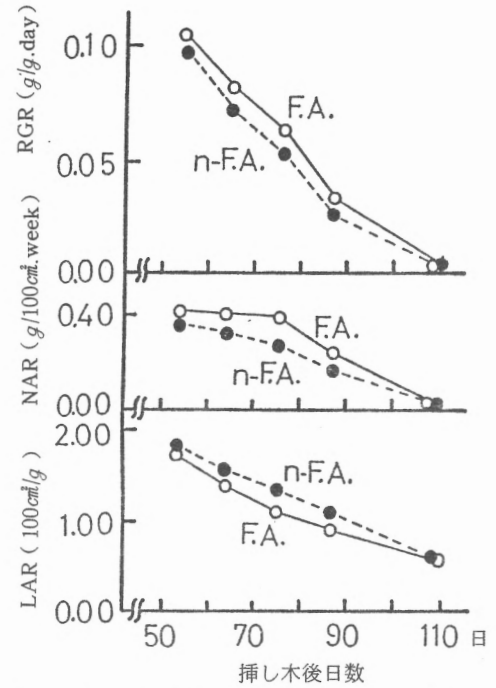
非浄化区でポプラの生育期間に生じた可視被害の被害指数L.D.I.＝T.D.／（L×5）×100を求めて表Ⅲ－4(e)に示した。1975年から1978年の4年間の調査（1974年は調査せず）では，1975年の被害指数が一番高く，1977年，1976年と続き，1978年が最も低かった。



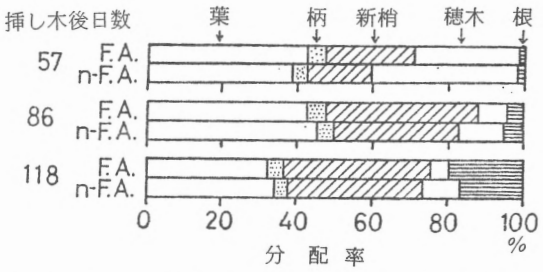
図Ⅲ－1　1975年に浄化区（F.A.）と非浄化区（n-F.A.）で育成したポプラ挿し木苗の苗高と苗径の経日変化



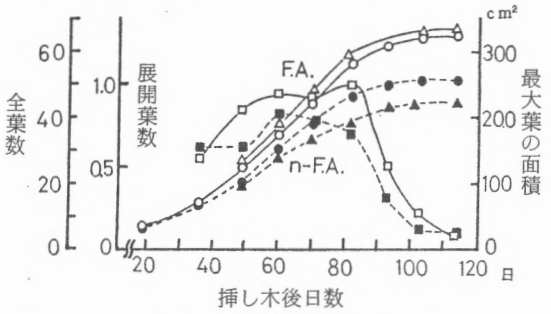
図Ⅲ－2　1975年に浄化区（F.A.）と非浄化区（n-F.A.）で育成したポプラ挿し木苗のD^2Hの経日変化



図Ⅲ－3　1975年に浄化区（F.A.）と非浄化区（n-F.A.）で育成したポプラ挿し木苗の生長率（RGR），純同化率（NAR），葉面積比（LAR）の経日変化



図Ⅲ－4　1975年に浄化区（F.A.）と非浄化区（n-F.A.）で育成したポプラ挿し木苗の各器官における乾物重の分配率



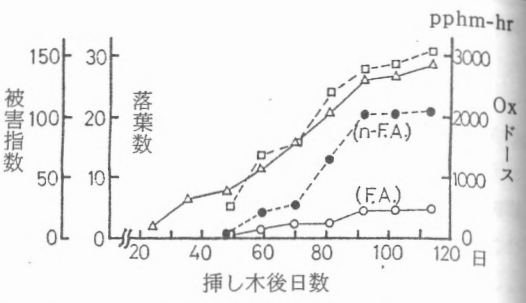
図Ⅲ－5　1975年に浄化区（F.A.）と非浄化区（n-F.A.）で育成したポプラ挿し木苗の全葉数，1日当りの展開葉数，最大葉の面積の経日変化

F.A.　n-F.A.

○　●：全葉数

□　■：1日当りの展開葉数

△　▲：最大葉の面積



図Ⅲ－6　1975年の非浄化空気中のOx7pphm以上ドースとポプラの可視被害指数および落葉数の経日変化

F.A.　n-F.A.

○　●：落葉数

△：Oxドース（7pphm以上）

□：被害指数

表Ⅲ－3　1975年に浄化区（F.A.）と非浄化区（n-F.A.）で育成したポプラ挿し木苗の各器官の乾物重

挿し木後日数	区	葉	柄	新梢	穂木	根	合計
57	F.A.	6.693	0.749	3.626	3.967	0.242	15.278
	n-F.A.	3.970	0.421	1.776*	3.723	0.180	10.070
	n-F.A./F.A.×100%	59	56	49	94	74	66
86	F.A.	40.26	5.22	38.94	6.83	4.93	96.01
	n-F.A.	20.18*	2.15*	15.36*	4.86	2.51	45.06*
	n-F.A./F.A.×100%	50.1	41.2	39.4	71.2	50.9	46.9
118	F.A.	67.73	9.24	82.36	10.37	41.99	211.69
	n-F.A.	28.21**	3.66**	29.45	7.73*	14.29**	82.73
	n-F.A./F.A.×100%	42	33	36	75	34	39

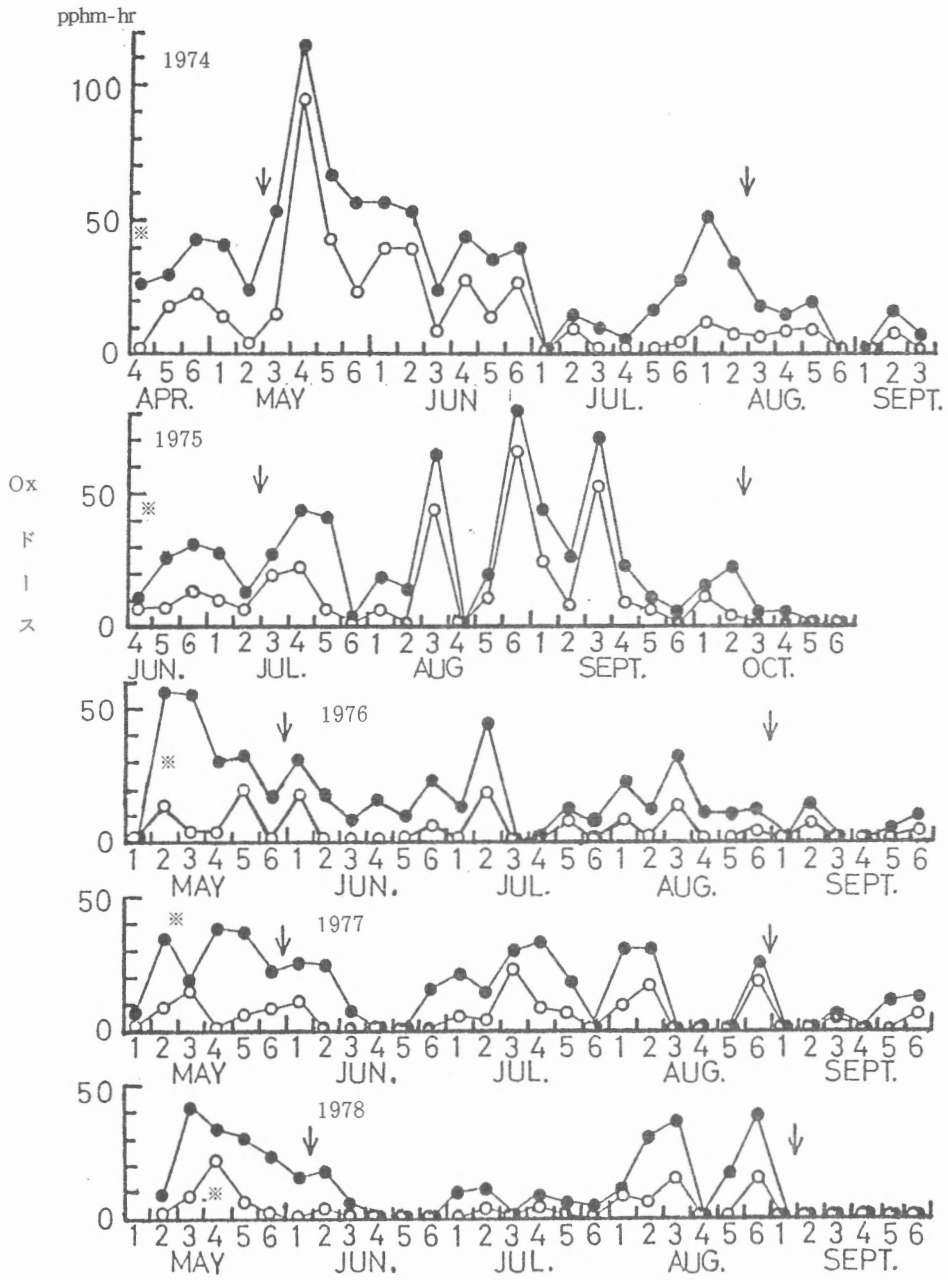
（**：P＝.01　*：P＝.05）　（単位：g.d.w.）

(d)　ポプラの生育期間におけるOx発生状況

1974年から1978年のOx発生状況は，ポプラの挿し木を行った時点（図Ⅲ－7の※印）から生長が停止するまでの期間について5日間ごとの7および10pphm以上ドースの日平均値で図Ⅲ－7に示した。次に，ポプラの独立栄養生長の開始時点から3カ月間（図Ⅲ－7の↓から↓の期間）におけるOx7および10pphm以上ドース（6時から19時まで）の日平均値と日最高値の平均値を表Ⅲ－5に示した。これらの期間のOx発生濃度の高い年は1974年と1975年であり，1976年，1977年，1978年は比較的低い値であった。

〈考　察〉

本実験に用いた施設の特徴は当地で発生した大気汚染物質に植物体が常時暴露される機構とフィルターを通した空気で暴露される機構からなっている。そこで，当地における大気汚染の特徴を見ると図Ⅲ－7と表Ⅲ－6に示すようにOx濃度が高く，二酸化イオウ（SO_2），二酸化窒素（NO_2），一酸化窒素（NO）濃度は比較的低い値であった。Oxの環境値はポプラのオゾン単体暴露実験によって証明されたように可視被害を生じるに十分な濃度の発生をしばしば記録した。一方，SO_2，NO_2，NOについては一般に植物葉に可視被害を与える濃度はかな



図Ⅲ－7　1974年から1978年におけるポプラ生育期間中の非浄化空気中の Ox 7 および10pphm 以上ドースの 5 日間ごとの平均値

●：7 pphm以上ドース　　○：10pphm以上ドース

※：挿し木日　　※～↓：貯蔵物質依存期間

↓～↓：独立栄養生長開始から 3 カ月間

表Ⅲ－4　1974年から1978年において浄化区（F.A.）と非浄化区（n-F.A.）で育成したポプラ挿し木苗の生長量（D^2H），全葉数，落葉数，落葉率および被害指数

	区	年				
		1974	1975	1976	1977	1978
(a) D^2H（cm^3）	F.A.	760.5	737.0	1,185.4	697.0	1,040.4
	n-F.A.	214.6**	202.2**	569.5**	274.3**	532.7**
	n-F.A./F.A.×100%	28.2	27.4	48.0	39.4	51.2
(b) 全葉数	F.A.	79	65	71	66	75
	n-F.A.	65**	51**	64**	55**	69**
(c) 落葉数	F.A.	7	5	1	2	6
	n-F.A.	38**	21**	9**	18**	31**
(d) 落葉率	F.A.	8.9	7.7	1.4	3.0	8.0
((c)/(b)×100%)	n-F.A.	58.5	41.2	14.1	32.7	44.9
(e) 被害指数	n-F.A.	−	74.3	49.1	62.2	40.6

（**：P＝.01）

り高く，[74),75)] 松島ら[76)] はポプラにSO_2 0.3 ppmを処理して可視被害の発生を報告している。したがって，当地でのSO_2，NO_2，NOの環境値ではポプラに可視被害は生じないものと考えられる。

次に，植物の生長量に及ぼす大気汚染物質の影響についてみると，谷山[74)] は作物生産に関わるSO_2の環境基準として0.03 ppmという数値をあげている。NOxについてはNO_2がトマトの乾物重の低下をきたす濃度は0.15～0.26 ppm，10～20日間処理[77)] により，アルファルファとオート麦の光合成低下はNO_2，NOそれぞれ0.6 ppm以上と報告[75)] されている。当地のSO_2，NO_2，NOの環境値をみるとかなり低濃度であり，これらの汚染物質がポプラの生長に与える影響は非常に微々たるものと思われる。

更に，本施設のフィルター効果（第Ⅰ章，表Ⅰ－1）を見るとオゾンとPANの除去率は大きいが，SO_2，NO_2，NOについては小さいことから推定しても，ポプラの生長にはOxが主要な影響を及ぼす汚染物質であろう。また，一般にPANは未成熟葉に可視被害を与えるが，ポプラではこのような症状はみられず，非浄化区の未成熟葉の光合成能力及びクロロフィル含有率にも影響はみられなかったことから，Ox中のオゾンにより生長抑制が起こるものとみなされる。

(1) Oxによる生長抑制

ポプラの初期の生長を浄化区と非浄化区とで比較してみると，挿し木後20～25日目くらいまではOxが発生したにもかかわらず5年間の調査においては差はみられなかった。これはポプラ穂木内の貯蔵物質を消費して新梢が生長した期間[72),73)] と考えられ，外界の影響を受けにくいものとみなされる。その後の独立栄養生長に対するOxの影響をみるために，1975年と1978年のOx発生量を比較してみると，貯蔵物質依存期間（図Ⅲ－7の※～左の↓の間）はほぼ同一であるが，独立栄養生長期に移る頃から1975年のOx発生量が多く，1978年は少なかった。そこでポプラの生長量を見ると，1975年は挿し木後約1カ月目から浄化区と非浄化区とで差が生じている（図Ⅲ－1，2）が，1978年ではOx発生量の低い期間に相当する挿し木後2カ月目くらいまでD^2Hが両区でほとんど等しかった（図Ⅲ－8）。即ち，ポプラの生長量は独立栄養生長期に移る頃からOxが発生した場合にその影響を強く受け，その後のOx発生の繰り返しによって1975年にみられたような生長量の大きな抑制となって現れたものと考えられる。

Jensenら[78)] は，ポプラの挿し木苗に0.15 ppm，1日8時間，1週5日間，6週間のオゾン処理を行ったところ，葉の75%が可視被害を受けて，苗高と乾物重は無処理区と比較しておよそ50%という生長抑制がみられたと報告している。これらの実験から示されるようにポプラの生長はオゾンで著しく影響を受けるものと見なされる。

ポプラの生長率（RGR）（図Ⅲ－3）は，生育末期を除いて非浄化区の方が浄化区よりも常に小さい値を示している。これは全生育期間中に累積的に生長量の大きな

表Ⅲ－5　1974年から1978年においてポプラ挿し木苗の生育期間中に生じたOxの7および10pphm以上ドース（6時から19時まで）の日平均値と日最高値の平均値

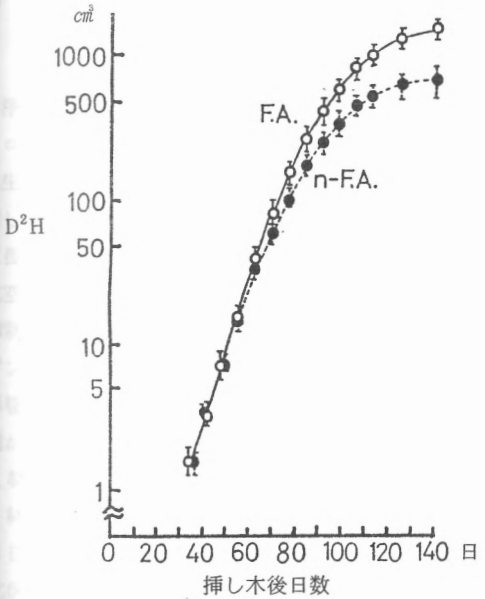
Ox	年	1974	1975	1976	1977	1978
	期間	11. May.～10. Aug.	11. Jul.～10. Oct.	1. Jun.～31. Aug.	1. Jun.～31. Aug.	6. Jun.～5. Sept.
ドースの日平均値	7pphm以上	38. 60	29. 61	16. 10	15. 54	11. 14
	10pphm以上	20. 20	16. 73	4. 36	5. 81	3. 26
日最高値の平均値		8. 833	8. 167	6. 461	6. 782	5. 451

（単位：pphm－hr）

表Ⅲ－6　1975年におけるSO_2，NO_2，NOの一時間平均値と日最高値の月平均値およびSO_2 2 pphm以上，NO_2とNO 5 pphm以上の時間数

月	SO_2			NO_2			NO		
	A (pphm)	B (pphm)	C	A (pphm)	B (pphm)	D	A (pphm)	B (pphm)	D
Jul.	0. 84	1.39	5	2. 2	3. 9	20	0. 38	1. 5	0
Aug.	0. 71	1.17	12	2. 0	3. 5	9	0. 54	2. 9	4
Sept.	0. 91	1.61	15	2. 7	5. 8	51	0. 41	1. 9	0
Oct.	0. 79	1.36	3	2. 8	5. 2	47	1. 35	4. 5	20

（A：1時間平均値　B：日最高値　C：2 pphm以上の時間数　D：5 pphm以上の時間数）



図Ⅲ－8　浄化区（F.A.）と非浄化区（n-F.A.）における1978年のポプラ挿し木苗のD^2Hの経日変化

差を生じる原因となり，非浄化区の乾物重の著しい低下（表Ⅲ－3）をもたらしたことを裏付けている。一方，非浄化区の純同化率（NAR）は浄化区よりも小さく，葉面積当りの生産量の低下がみられ，Ox被害による光合成速度の阻害が推定される。更に個体当りの葉面積の合計値が浄化区に比べて非浄化区で低いことから，個体当りの生産量も低くなり生長量の大きな抑制となったものと思われる。

非浄化区の葉面積比（LAR）は浄化区より大きく，個体の単位重さ当りの葉面積が大きいことを表している。このことは，非浄化区では異常落葉が起こるにもかかわらず，図Ⅲ－4の挿し木後86，118日目に示したように非浄化区の乾物重の葉への分配率がやや大きく，逆に新梢への分配率が小さいこと，および表Ⅲ－3に示したように非浄化区の葉の乾物重が新梢，柄，根と比べて阻害割合が比較的小さいことなどと関連があると思われる。

(2)　Oxによる可視被害と落葉現象

前述したように，非浄化区でみられたポプラの成熟葉の表面の白色小斑点はOx中のオゾンによって生じたものと見なされる。その後繰り返しのOx発生により葉の

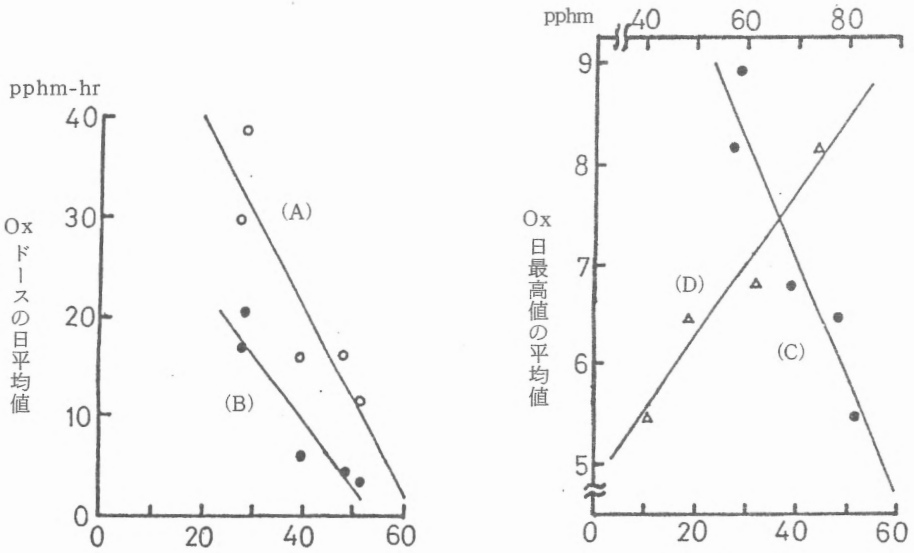
被害面積が拡大したのち，下位葉から生育最盛期に落葉した。一般にエチレンは落葉を引き起こすことが知られている。当地で大気中のエチレン濃度は測定していないので環境値はわからないが，エチレンの指標植物であるゴマを非浄化区に植栽したところ落蕾現象[79]は認められなかったことから，大気中のエチレンがポプラの落葉を直接引き起こしたものとは考えられない。一方，オゾン処理をした植物の葉で内生エチレンが増加し落葉するという報告[80]がある。本実験のポプラにおいてもOx暴露により内生エチレンが生じて落葉したものと思われる。

(3)　5年間におけるポプラの生長抑制，被害指数，落葉率とOx発生程度の関係

Ox発生量はその年の気象条件などによって大きく変動するため，ポプラの生長などがOxにより抑制される程度も年によって異なるものと推察される。そこで，1974年から1978年に得られたデータを用いて，各年ごとの浄化区の新梢の生長量（D^2H）を基準とした非浄化区の生長量（D^2H）の割合と，非浄化区で生じた可視被害の被害指数および落葉率が，それぞれの年の生育期間に発生したOx濃度とどの様な関係にあるかを検討してみた。表Ⅲ－7および図Ⅲ－9に示すように，新梢の生長抑制

表Ⅲ－7　1974年から1978年においてポプラ挿し木苗の生育期間中に生じたOx汚染量と成長量の割合（D^2H％），被害指数および落葉率との一次相関関係式

Ox		D^2H%(n-F.A./F.A.×100)	被害指数	落葉率
Oxドースの日平均値（6時－19時）	7pphm	Y＝－0.9469X＋58.9755 r＝－0.9041（P＝.05）	Y＝0.4806X－9.0804 r＝0.8903	Y＝0.4498X＋4.9886 r＝0.6299
	10pphm	Y＝－0.6710X＋36.1336 r＝－0.9420（P＝.02）	Y＝0.3734X－13.5957 r＝0.8891	Y＝0.3283X－2.4887 r＝0.6760
日最高値の平均値		Y＝－0.1186X＋11.7452 r＝－0.9587（P＝.02）	Y＝0.0733X＋2.5701 r＝0.9680（P＝.05）	Y＝0.0432X＋5.4859 r＝0.5132



(A)：7pphm以上　　(C)：D^2H％

(B)：10pphm以上　　(D)：被害指数

図Ⅲ－9　1974年から1978年においてポプラ挿し木苗の生育期間中に生じたOx汚染量と生長量の抑制割合（D^2H％）および可視被害指数との関係

はOxドース（６～19時の間に生じた７および10 pphm以上）の日平均値及び日最高値の平均値との間に高い負の相関関係が得られた。また，可視被害の被害指数との関係では日最高値の平均値との間に正の相関関係がみられた。一方，落葉率との間には相関は得られなかったが，これはOx発生濃度の低い1978年において高い落葉率を示したためである。異常落葉現象を起こす原因としてOx被害葉で生じる内生エチレンが主に考えられているが，植物の生理面および日照などの気象条件その他の要因によって変動するのであろう。

なお，Ox以外の汚染物質についてポプラの生育期間中に発生したSO_2ドース（１，２pphm以上），NO_2およびNOドース（２，５pphm以上）の日平均値と新梢の生長抑制との関係を見たところ，相関関係はなかった。

以上のことから，ポプラの挿し木苗の生育期間中に発生したOxは長期間にわたって生長量を低下させると共に，その発生濃度の高低によって生長の抑制程度を左右し，その年のOx汚染状況がポプラの挿し木苗の生長量に反映することが明かとなった。

以上，都市郊外における樹木は樹種，樹齢による程度の差はあろうが，生育期間中に生じたOxにより生長量が抑制され，長い年月には累積されて，かなり大きな社会的経済的損失を伴うものと推察された。

2) オキシダントがポプラ挿し木苗の各葉齢のクロロフィル含有率，光合成・暗呼吸速度および炭水化物・窒素含有率に及ぼす影響

浄化空気室と非浄化空気室内でポプラを育成し，葉中クロロフィル含有率，光合成・暗呼吸速度を各葉齢ごとに生育をおって測定し，大気中に発生するOxがポプラ挿し木苗の葉の機能に及ぼす影響をみた。そして，Oxに長期間繰り返し暴露されたポプラ葉の光合成量と非浄化空気室においてみられたポプラの乾物生長量の著しい抑制とを比較検討した。さらに，ポプラ葉内の糖，デンプン，全窒素及びタンパク態窒素含有率に及ぼすOxの影響をみて，全窒素含有率と光合成速度抑制との関連を明かにした。

〈材料および方法〉

材料はポプラ（品種Ｉ45/51）のさし穂を1976年５月８日に浄化空気室内（浄化区）と非浄化空気室内（非浄化区）に挿し木を行い，第Ⅲ章１）で述べた方法と同じように育成した。ポプラが成長するにしたがい開葉する葉に２週間ごとにモールをつけ，その開葉月日から葉齢の区別を行った。さらに各葉位の葉面積の測定を行い，また８月11日に開葉した葉については経日の葉面積の拡大を測定した。

(1) 葉のクロロフィル含有率，光合成速度及び暗呼吸速度

1976年６月８日，７月６日，８月10日，９月７日に浄化区と非浄化区のポプラを葉齢別にサンプリングして測定を行った。クロロフィルａ，ｂ含有率は小川ら[56]の方法を用い９５％メタノール抽出を行い分析した。光合成速度は切葉を用いファンを内蔵したアクリル製チャンバー（底面15×15cmおよび20×20cmの箱を葉の大小により用いる）内にいれ，照度45 klux，温度28℃の条件とし，活性炭で浄化した空気を５および8 l/minで通気して，通気入口と出口のCO_2濃度を日立堀場ASSA-２型で測定を行った。また，９月７日には照度別の光合成速度を測定し光－光合成曲線を求めた。暗呼吸速度は温度28℃下で２および３ l/minの通気量で測定した。また一部分は温度別の呼吸量を求めた。以上の測定はすべて３個体ずつ用いて行い，結果はそれらの平均値で示した。

(2) 葉内の糖，デンプン，全窒素，タンパク態窒素含有率

浄化区と非浄化区のポプラ葉を葉齢ごとに８月12日にサンプリングし，直ちに80℃で約２時間加熱乾燥後40℃にて乾燥した。次にボールミルで粉末にした後，炭水化物[58]については80％エタノールで抽出し蒸留後，水抽出液を除タンパクし，還元糖を，また加水分解後全糖をそれぞれソモジーネルソン法で比色定量した。残渣は4.5N過塩素酸溶液で抽出し，デンプンをアンスロン法で比色定量した。

一方，全窒素についてはケルダール法を用いて，タンパク態窒素はバルンスタイン法[81]で定量した。

〈結　果〉

(1) 非浄化空気のオキシダント濃度

ポプラ挿し木苗を調査した期間に発生した非浄化空気室内の大気中Ox濃度は図Ⅲ－10に示すような日最高値を記録した。1976年５月26日から９月７日までの104日間に発生したOxのうち日最高値が15 pphm以上を記録した日数は１日，10 pphm以上は13日，７pphm以上は51日であった。

(2) 浄化区と非浄化区における葉齢別クロロフィル含有率，光合成速度，暗呼吸速度の経時変化

表Ⅲ－８には，６月８日，７月６日，８月10日，９月７日に測定した各葉齢（開葉月日は５月26日，６月９日，６月23日，７月７日，７月21日，８月４日，８月18日）

表Ⅲ－8　1976年に浄化区（F.A.）と非浄化区（n-F.A.）で育成したポプラ挿し木苗の葉齢ごとのクロロフィル含有率，光合成速度および暗呼吸速度

測定月日		8 Jun.	6 Jul.	10 Aug.	7 Sept.
開葉月日		クロロフィル含有率（μg／cm²）			
26 May.	F.A.	29.3 (100)	41.4 (100)	—	—
	n-F.A.	30.2 (103)	26.5 (64)		
9 Jun.	F.A.	a)22.0 (100)	36.1 (100)	52.5 (100)	62.9 (100)
	n-F.A.	24.0 (109)	30.8 (85)	30.6 (58)	25.1 (40)
23 Jun.	F.A.	—	23.8 (100)	56.9 (100)	63.7 (100)
	n-F.A.		24.2 (102)	35.8 (63)	34.6 (54)
7 Jul.	F.A.	—	—	55.3 (100)	63.3 (100)
	n-F.A.			48.9 (88)	43.1 (68)
21 Jul.	F.A.	—	—	47.5 (100)	59.3 (100)
	n-F.A.			47.1 (99)	46.2 (78)
4 Aug.	F.A.	—	—	b)41.2 (100)	58.3 (100)
	n-F.A.			41.7 (101)	54.2 (93)
18 Aug.	F.A.	—	—	—	56.9 (100)
	n-F.A.				52.8 (93)
開葉月日		光合成速度（mg CO^2／dm^2・hr）			
9 Jun.	F.A.	—	28.43(100)	19.89(100)	—
	n-F.A.		18.75(66)	8.74(44)	
23 Jun.	F.A.	—	24.02(100)	21.71(100)	19.04(100)
	n-F.A.		24.40(102)	10.12(47)	11.02(58)
7 Jul.	F.A.	—	—	17.46(100)	19.31(100)
	n-F.A.			13.94(80)	11.24(58)
21 Jul.	F.A.	—	—	22.63(100)	19.72(100)
	n-F.A.			26.14(116)	12.28(62)
4 Aug.	F.A.	—	—	b)23.75(100)	22.90(100)
	n-F.A.			26.43(111)	21.51(94)
18 Aug.	F.A.	—	—	—	28.10(100)
	n-F.A.				27.44(98)
開葉月日		暗呼吸速度（mg CO^2／dm^2・hr）			
9 Jun.	F.A.	—	1.831(100)	2.668(100)	—
	n-F.A.		2.837(155)	4.212(158)	
23 Jun.	F.A.	—	2.188(100)	1.869(100)	2.13 (100)
	n-F.A.		2.392(109)	2.867(153)	3.31 (155)
7 Jul.	F.A.	—	—	1.677(100)	2.56 (100)
	n-F.A.			2.879(172)	3.17 (124)
21 Jul.	F.A.	—	—	1.686(100)	1.01 (100)
	n-F.A.			2.681(159)	2.56 (253)
4 Aug.	F.A.	—	—	b)3.180(100)	1.58 (100)
	n-F.A.			2.501(79)	3.22 (204)
18 Aug.	F.A.	—	—	—	2.27 (100)
	n-F.A.				1.90 (84)

a)　6月2日に開葉　　b)　7月28日に開葉

のクロロフィル含有率，光合成速度，暗呼吸速度の経時変化を示した。また，図Ⅲ－11には８月10日のそれぞれの測定値と葉位ごとの葉面積および非浄化区で生じた可視被害の被害程度を５段階に分けて図示した。

はじめにクロロフィル含有率についてみると，挿し木後１カ月目の６月８日に測定した葉は浄化区と非浄化区とでほとんど同じ値を示した。しかし，７月６日の測定では５月26日に開葉した葉のクロロフィル含有率が浄化区で増加しているのに対し，非浄化区では浄化区の64%に減少した。また，６月23日に開葉した葉は７月６日では両区で同じクロロフィル含有率を示したが，その後浄化区では次第に増加するのに対し，非浄化区では８月10日にやや増加したが９月７日にはほとんど変化しないため浄化区と比較するとそれぞれ63%，54%に減少した。即ち，非浄化区の葉のクロロフィル含有率は開葉後20日目頃まで浄化区とほとんど同じ値であったが，開葉後，１カ月目頃になると低下し白色小斑点の可視被害が出現した。

表Ⅲ－８中段および図Ⅲ－11に示したように光合成速度は開葉後20日目頃まで浄化区と非浄化区でほとんど等しいかあるいは非浄化区の方がやや速かった。しかし，開葉後１カ月目以降になると非浄化区では浄化区よりも低い光合成速度を示した。そして開葉後の日数がたつにつれて，すなわち上位葉から下位葉になるに従って両区の光合成速度の差が拡大した。

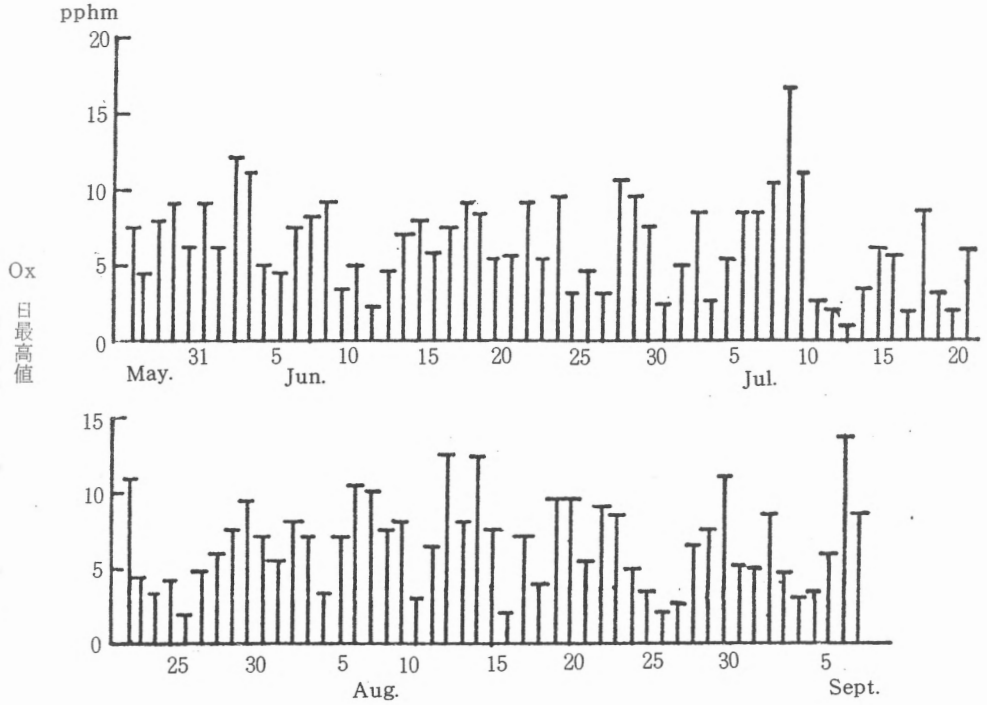
表Ⅲ－８下段に示すように浄化区と非浄化区の暗呼吸速度は展開中の若い葉齢の葉ではほとんど等しいかあるいは非浄化区の方が低い値を示したが，それ以降の葉齢では可視被害の有無にかかわらず非浄化区の方が常に高い値を示した。

(3)　各葉齢における光－光合成曲線

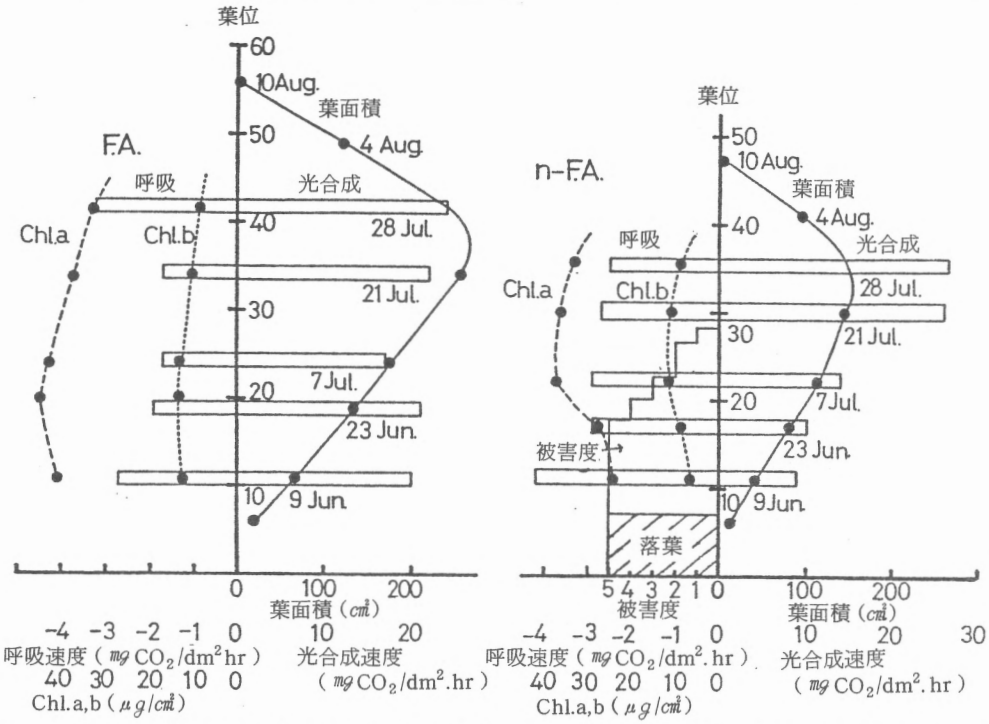
９月７日に測定した浄化区と非浄化区の葉齢ごとの光－光合成曲線は図Ⅲ－12に示した。８月18日に開葉した葉は照度に関係なく両区で同一な曲線を示し，８月４日開葉の葉は約10klux以上において浄化区の方が非浄化区よりもやや高い値であり，約５klux以下ではほとんど同じ値を示した。７月21日と６月23日開葉の葉の光飽和点は非浄化区が10klux付近であり，浄化区の30klux付近と大きな違いを示したが，５klux以下の低照度では両区でほとんど同じ値を示した。浄化区と非浄化区の各葉齢の光補償点は１klux付近の値であった。

(4)　葉面積拡大の経日変化

８月11日に開葉した葉についてその後の葉面積の拡大の様子を見ると図Ⅲ－13のようになった。すなわち開葉

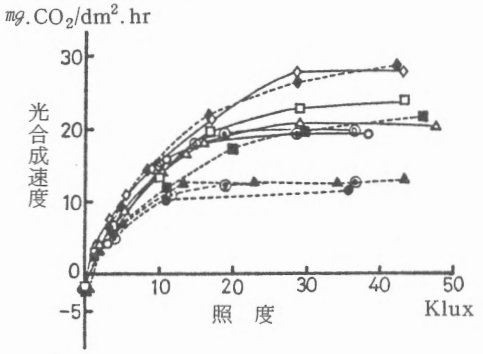


図Ⅲ－10　1976年５月26日から９月７日までのOx日最高値



図Ⅲ－11　浄化区（F.A.）と非浄化区（n-F.A.）で育成したポプラ挿し木苗の各葉齢について8月10日に測定したクロロフィルa，b含有率，光合成速度，暗呼吸速度，葉面積および被害度

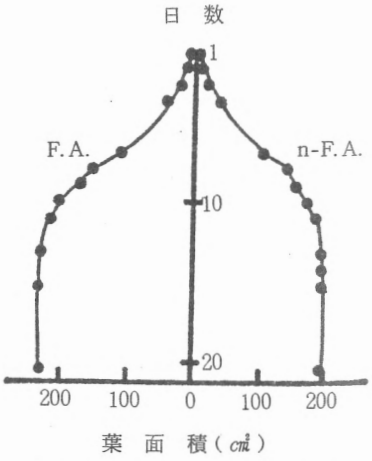
（図中の月日は各葉が開葉した日を示す）



図Ⅲ－12　浄化区（F.A.）と非浄化区（n-F.A.）で育成したポプラ挿し木苗の各葉齢について9月7日に測定した光－光合成曲線

開　葉　月　日

	23 Jun.	7 Jul.	21 Jul.	4 Aug.	18 Aug.
F.A.：	○	◎	△	□	◇
n-F.A.：	●	⊙	▲	■	◆

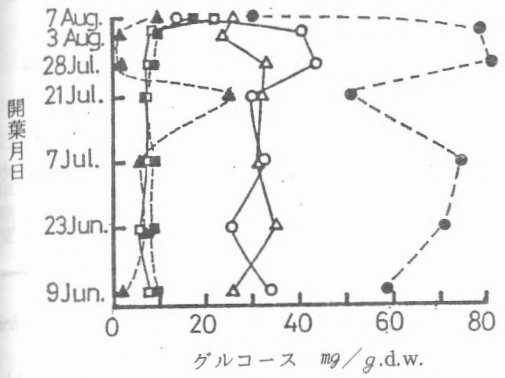


図Ⅲ－13　8月11日に開葉したポプラ葉の浄化区（F.A.）と非浄化区（n-F.A.）の葉面積拡大の経日変化

後10日目ごろまで葉面積は急速に拡大したのち緩慢になり約15日目以降では一定な値を示した。この様な傾向は浄化区と非浄化区において葉面積の大きさは異なるが同様であった。

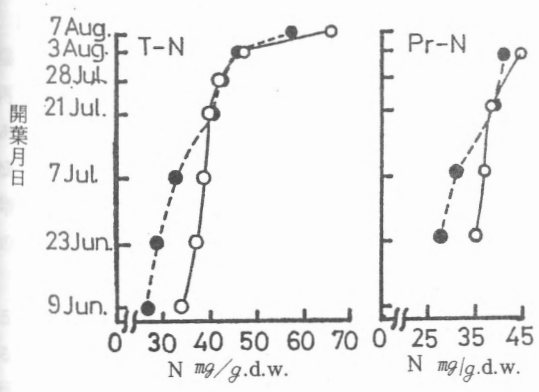
(5) 葉齢別の糖，デンプン，全窒素及びタンパク態窒素含有率

図Ⅲ－14に浄化区と非浄化区におけるポプラの葉齢ごとの還元糖，非還元糖，デンプン含有率について示した。



図Ⅲ－14 浄化区（F.A.）と非浄化区（n-F.A.）で育成したポプラ挿し木苗の各葉齢について８月12日に測定した還元糖非還元糖およびデンプン含有率

F.A. n-F.A.
—○— ---●--- ：還元糖
—△— ---▲--- ：非還元糖
—□— ---■--- ：デンプン



図Ⅲ－15 浄化区（○）と非浄化区（●）で育成したポプラ挿し木苗の各葉齢について８月12日に測定した全窒素およびタンパク態窒素含有率

非浄化区の還元糖含有率は全葉位において浄化区よりも約２倍高い値であった。一方，非還元糖含有率は浄化区で30mg／g.d.w.前後の値を示したのに対し，非浄化区では開葉後20日目の葉を除いて10mg／g.d.w.以下の低い値となった。なお，デンプン含有率は両区でほとんど差はみられなかった。

全窒素及びタンパク態窒素含有率は図Ⅲ－15に示した。開葉後20日目頃までの葉では浄化区と非浄化区でほとんど同じ値であったが，それ以降の葉齢では浄化区に比べて非浄化区の方が低い値を示した。

〈考　察〉

(1) 葉齢別クロロフィル含有率と光合成速度に対するOxの影響

一般に，展開中の若い葉はオゾンに対して非感受性であり，可視被害は生じない[82]が，本実験のポプラも開葉して15日目くらいまで葉面積の拡大がみられ，20日目頃までの葉齢の葉は非浄化区でOxに暴露されてもクロロフィル含有率および光合成速度は浄化区の値とほぼ等しく，また可視被害も生じなかった。開葉後１カ月目頃になると非浄化区のクロロフィル含有率が低下し，可視被害の白色小斑点も明らかになってきた。すなわち，ポプラでは開葉20日目頃までの若い葉のクロロフィルや光合成作用はOxによって影響されないものと思われる。そこで，開葉後20日目以降の成熟葉についてOxが葉中クロロフィルに及ぼす影響を見ると図Ⅲ－16のようになった。９月７日に測定した各葉齢のクロロフィル含有率の浄化区に対する非浄化区の割合（n-F.A.／F.A.×100％）は開葉後20日目から９月６日までの間に各々の葉が暴露されたOxドース（各期間における６時から18時までの１時間平均値の合計値）と高い負の相関関係にあった。この様にポプラの葉は成熟すると比較的低濃度のOxであっても（図Ⅲ－10）長期間繰り返し暴露されると次第にクロロフィルが破壊され，暴露日数が多くなる下位葉ほど著しく低下し，ついには落葉に至るものと思われる。落葉時期はクロロフィル含有率が浄化区の半分以下になった開葉後３カ月目頃であった。

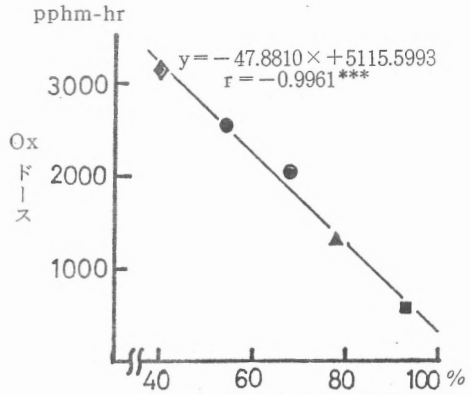
次に８月10日に測定した浄化区と非浄化区における各葉齢のクロロフィル含有率と光合成速度との関係を見ると図Ⅲ－17に示すように開葉20日目までの若い葉齢の葉を除いた成熟葉について相関関係が得られた。さらに葉面積当りの光合成速度の値を乾物重当りの値へ換算し，葉乾物重当りの全窒素含有率との関係をみると，全葉齢を通じて高い相関関係を示した（図Ⅲ－18）。図Ⅲ－15

にみるように全窒素含有率はその大部分がタンパク態窒素であり，Oxが光合成等の酵素作用[83]に影響を与えたものと考えられる。

以上，ポプラの成熟葉は本実験期間中に発生した比較的低濃度のOxでも繰り返し暴露されるとクロロフィルやタンパク態窒素の減少を生じ著しい光合成速度の低下を起こすものと思われる。

(2) 浄化区と非浄化区における1日の純光合成量の比較

9月7日に測定した光ー光合成曲線（図Ⅲ－12）と葉位ごとの平均葉面積をもとにして両区のポプラ個体当りの1日の純光合成量を推定してみた。図Ⅲ－19に示したような水平照度の1日の変化（太い実線）を例にとってみると，各葉齢の1日の光合成速度の変化は図Ⅲ－19の細い実線と破線のようになる。これらの値に各葉面積を乗じて合計し，夜間の18時から4時までの呼吸量（23℃として計算）を差し引いた値は浄化区が30,311.5mg CO_2／日・個体であり，非浄化区は14,840.7mg CO_2／日・個体となり浄化区の49.0％であった。図Ⅲ－12の光合成曲線からわかるように純光合成量の両区の差は高照度下で大きく，約10 klux以下の低照度下で小さくなる傾向である。従って曇天下では両区の差はこの数値よりも小さくなるであろう。一方，本実験を行った5月から9月においては高照度下で大気中にOxが発生する頻度は多い。

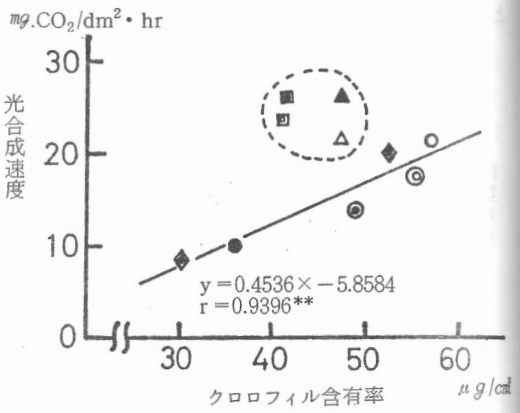


図Ⅲ－16　9月7日に測定した各葉齢のクロロフィル含有率の抑制割合と開葉後20日目から各葉が暴露されたOxドースとの関係

開葉月日：9 Jun.　23 Jun.　7 Jul.　21 Jul.　4 Aug.

◈　●　⊙　▲　■

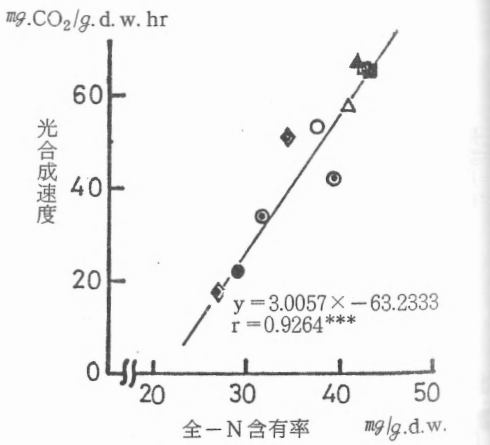
可視被害のある成熟葉はすでに光合成は低下しているが，それに再びOxが作用することにより光合成速度が減少することが推察される。したがって，非浄化区のポプラの純光合成量は大気中にOxが発生している時はさらに低下し浄化区との割合は49％以下になることが考えられる。



図Ⅲ－17　8月10日に測定した浄化区（F.A.）と非浄化区（n-F.A.）の各葉齢の光合成速度とクロロフィル含有率との関係

開葉月日

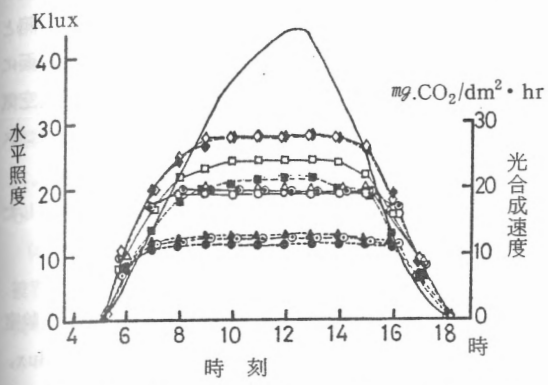
	9 Jun.	23 Jun.	7 Jul.	21 Jul.	28 Jul.
F.A.：	◈	○	◎	△	▣
n-F.A.：	◈	●	⊙	▲	■



図Ⅲ－18　浄化区と非浄化区における各葉齢の光合成速度と全窒素含有率との関係
（図中の記号は図Ⅲ－17を参照）

なお，1976年８月12日に採取したポプラの乾物生産量の浄化区に対する非浄化区の割合は52.3%であり，９月９日では60.9%であった。

１日の純光合成量は天候による日照の変化及び大気汚染状況などにより左右されることと非同化器官の呼吸量を考慮しなければならないことなどがあるが，第Ⅲ章，２，１）で述べたような大気中Oxによるポプラの乾物生長量の著しい抑制現象について葉の機能面からも説明しうるものと思われる。



図Ⅲ－19　水平照度の１日の変化と浄化区と非浄化区における各葉齢の１日の光合成速度の変化

――――：水平照度

（図中の記号は図Ⅲ－12を参照）

(3) 葉齢別の暗呼吸速度と糖，デンプン含有率に対するOxの影響

図Ⅲ－11に示すように浄化区の呼吸量は展開中の若い葉で高い値であり，成熟すると低くなり老化にともない再び高くなるというDickmannら[43]の報告と同じ傾向であった。一方，非浄化区においてはクロロフィルや光合成に影響の出ない可視被害発生前の成熟葉から呼吸量が増大し，可視被害が発現した葉では浄化区より５割増しの高い値を示した。

Barnes[84]はマツ実生苗を用いて0.15ppmのオゾンを５週間処理して可視被害発生前に呼吸量の増加を見ている。また，Duggerら[85]はレモン実生苗にオゾン処理を行ったところ１週間後のまだ可視被害の出現しない頃から呼吸量が増加しはじめ７週間後も高い値が続き，葉中の還元糖の増加により呼吸が促進したと説明している。

本実験の８月12日に採取したポプラ葉内の糖を浄化区についてみると，展開中の若い葉で還元糖含有率が高く，開葉後20日目以降の成熟葉でほぼ一定の低い値を示している。Tingら[82]はワタの葉がオゾンに感受性を示す時期は葉内の還元糖含有率の低下したときであることを報告しているが，本実験でポプラ葉に可視被害が発生した時期は開葉後20日を過ぎてからであり，還元糖が低下した時期と一致している。

一方，非浄化区でOxに暴露されて生育したポプラ葉の還元糖含有率は全葉位で浄化区の約２倍高い値を示し，非還元糖は逆に低下したように，可視被害のない若い葉齢においても炭水化物代謝の異常を生じた。ポプラと同じ様な現象はナシ[86]の長果枝葉についてもみられ，可視被害のない若い葉でもすでに生理的な変化が生じていると思われる。

Suttonら[87]によると，ピントビーンの８日目の若い葉はオゾン処理により可視被害を生じないが，〔^{14}C〕-2-deoxy-D-glucoseの吸収実験の結果，細胞レベルではオゾン障害が起きていること，さらにこの様な若い葉の細胞レベルの障害は５日間くらいで回復し，またグルコースを葉へ供給することなどの処理によって著しく回復が早くなることを報告しているが，本実験で示された葉内の還元糖の増加が若齢の葉でこの様な働きをしていることも考えられる。

以上，大気中に発生したOxによる影響は可視被害の発想にかかわらずポプラの全葉位において炭水化物代謝に異常が起こること，さらに被害葉だけでなく成熟直後の可視被害のない葉でも呼吸量が増加すること，また下位葉になるほどOxに繰り返し暴露されクロロフィル含有率が次第に低下し，それに伴い光合成速度が減少することなどにみられたようにOxはポプラの生理的機能に変化を与え，その結果として生長量を著しく抑制したものと考えられる。

3) オゾン処理がポプラ葉の光合成，光呼吸および暗呼吸速度に及ぼす影響

第Ⅲ章，２，2)において，浄化空気室（FAC）と非浄化空気室（n-FAC）で育成したポプラの光合成速度を測定し，n-FAC内の成熟した下位葉は大気中に発生したOxにより光合成が著しく阻害されることが明らかになった。

谷山ら[88]は，トウモロコシ，水稲，落花生を用いてオゾンによる光合成阻害について報告しているが，0.1および0.2ppmの濃度で２時間処理した場合，光合成の阻害は明かでなく，0.5ppmの高濃度処理により明らかな阻害を見ている。また，茶樹[89]については２時間以上経過

してから阻害が現れるとしている。

一方，Millerら[69]はポンデローサパインの実生苗に0.15，0.30，0.45 ppmのオゾンを30日間処理して，光合成速度が10，70，85%阻害されたことから，長期間にわたりオゾンを処理すると光合成に影響を与えることを報告している。

一般に光化学スモッグ汚染地域の植物は野外において大気中に発生するOxにいろいろな濃度で長期間にわたり繰り返し暴露されている。そこで，各種濃度のオゾンがポプラ葉の光合成速度に及ぼす影響と，連続して長期間オゾン処理した場合オゾンが光合成，光呼吸および暗呼吸速度に及ぼす影響について実験を行った。さらに，オゾンに連続処理された葉が再びオゾンに処理される時，光合成速度がどの様に変化するかについて実験を行い，n-FACでOxに繰り返し暴露されたポプラが示した著しい光合成速度の低下について検討を行った。

〈材料および方法〉

(1)　材　料

材料はポプラ（品種I 45/51）を用い，5月上旬に1／5000 aのワグネルポットに穂木を挿し木してn-FAC内にて育成した。土壌は黒ぼく土とピートモスを7対3の割合に混合し，石灰でpHを6.5に矯正した。施肥はポット当りN 0.5 g，P_2O_5 0.44 g，K_2O 0.44 gを基肥とし，その後3回液肥（N 10%，P_2O_5 10%，K_2O 10%）の100倍液を200 mlずつ追肥した。

葉齢の区別は生育するにしたがって開葉する葉に1週間ごとにモールをつけて行った。

(2)　光合成・呼吸速度の測定方法

光合成・呼吸速度の測定は図Ⅲ－20に示すような装置を用いて行った。活性炭フィルター(A)で浄化した屋外の空気をポンプ(B)で引き除湿後(C)分配器(D)に導き，光合成測定は流量計(J)を通して5 l／minの空気を同化箱(K)へ送りその同化箱内の空気の一部分を赤外線CO_2分析計(N)（日立堀場ASSA 2型）へ導きCO_2濃度を測定し，分配器から直接赤外線CO_2分析計へ送った空気のCO_2濃度との差から計算した。オゾンを処理しながら光合成速度を測定する方法は分配器(D)から空気をオゾン発生器(E)へ通し，別に分配器から引いた空気と混合器(F)内で希釈し同化箱内へ空気を送った。その同化箱内の空気の一部分はオゾン分析計(M)（ケミルミネッセンス法，GLX-11形，D.K.K.社製）と赤外線CO_2分析計(N)へそれぞれ導きオゾン濃度とCO_2濃度を測定した。

呼吸速度は浄化除湿した空気をソーダライム(G)と10%KOH溶液(H)に通し無炭酸ガスの空気にしたのち，分配器(D')から同化箱(K)へ3 l／minの空気を送り，同化箱内の空気の一部分を赤外線CO_2分析計で測定した。

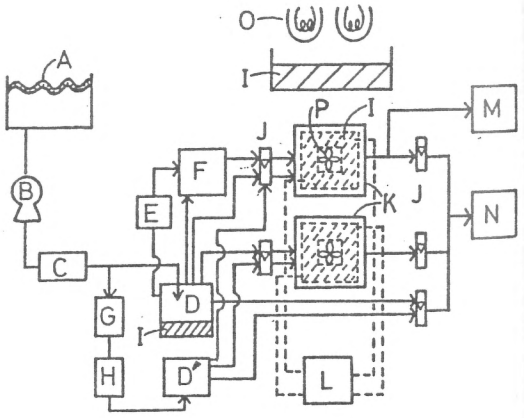
光合成・呼吸速度は2個の同化箱で対照区と処理区の葉を同時に測定し，また，オゾン処理中の光合成速度を測定するときは1個の同化箱にオゾンを通し，他の1個には対照として普通の空気を通して比較しながら同時に測定した。

同化箱は底面20×20 cm，厚さ6 cmの箱を透明なアクリル板で作成し，箱内の中央部にファンを設置しそのファンのまわりには冷却水を通す箱を内蔵した。外側の箱と内側の箱（冷却用）の間には上面に2 cmと側面と下面に1 cmのすき間があり，中央のファンを回転させると空気が循環するようになっている。箱内の温度は銅－コンスタンタン熱電対で測定した。

光源はハロゲンランプを用いて同化箱の上に設置した水槽を通して照明した。

(3)　濃度別オゾン処理実験

FAC内で育成したポプラ挿し木苗はポットごと実験室に持ち込み，着生葉1枚を同化箱内へ入れて，35 klux，28℃条件下で前照射を行い光合成速度が安定してからオゾン処理を開始し，5時間測定した。開葉後35日目頃の



図Ⅲ－20　光合成，呼吸速度測定およびオゾン処理装置の概略図

A：活性炭フィルター　B：ポンプ　C：シリカゲル
D，D'：分配器　E：オゾナイザー　F：混合器
G：ソーダライム　H：10% KOH溶液　I：水槽
J：流量計　K：同化箱　L：クールニクス
M：オゾン分析計　N：赤外線ガス分析計
O：ハロゲンランプ　P：ファン

下位葉に処理した各オゾン濃度は0.10，0.15，0.20，0.25 ppmであり，開葉後20日目頃の上位葉には0.10，0.20 ppmの処理を行った（濃度誤差：±0.01 ppm）。処理後，下位葉については数日間の光合成速度を測定した。以上の実験は各濃度の処理区につき3ポットずつ用いて測定し，その平均値で示した。

(4) 連続オゾン処理実験

FAC内に設置したオゾン発生装置[90]を用いて，5ポットずつのポプラに0.10 ppmオゾンで1日5時間（10時から15時まで），週5日間処理を1および2週間自然光下（2～37 klux）で行った。各処理後，下位葉（開葉後30～40日目）の光合成・光呼吸・暗呼吸速度を測定し，また2週間処理区の上位葉（開葉後20日目）と下位葉（開葉後40日目）は照度別の光合成および呼吸速度を測定した。

(5) 連続オゾン処理葉に対するオゾン再処理実験

(4)の連続オゾン処理実験の1週間処理区について可視被害の生じた下位葉を用いて実験を行った。被害程度の異なる被害度3と被害度5の下位葉にそれぞれ0.10 ppmのオゾンを3時間処理してその期間の光合成速度の変化を測定した。

(6) FACとn-FACのポプラ葉に対するオゾン処理実験

FAC内でポットにて育成したポプラの一部分をn-FACへ移動し，約20日間Oxに暴露させた。両室のポプラの上位葉と下位葉を用いて，それぞれに0.15 ppmのオゾンを3時間処理しながら光合成速度を40 klux，28℃下で測定した。その後30分間暗黒下におき，再び照射して光合成速度の回復を見た。さらに同じ葉の光合成速度を1日後に測定した。

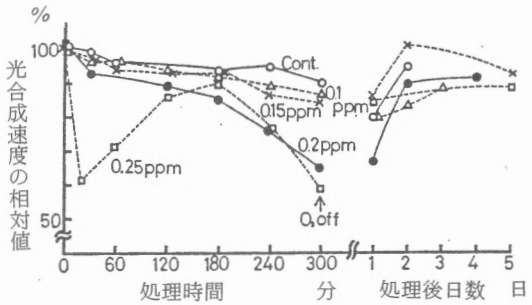
〈結果および考察〉

(1) 濃度別オゾン処理による光合成速度の変化

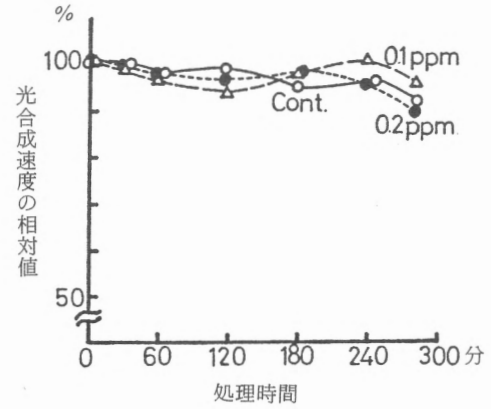
図Ⅲ－21はポプラの開葉後約35日目の下位葉に各濃度のオゾンを5時間処理してその期間における光合成速度の変化と処理後の値を示した。0.10 ppmおよび0.15 ppmオゾン処理区は処理開始後3時間まで対照区と光合成速度はほとんど変わらないが，その後若干低下し5時間後に0.10 ppm処理区では3％，0.15 ppm処理区で7％の阻害率を示した。0.20 ppm処理区は処理開始後から徐々に低下し3時間後に10％，5時間後に28％の阻害率となった。0.25 ppm処理区は処理開始後30分まで急激に低下し，その後3時間目まで徐々に回復したのち再び低下して5時間後には34％の阻害率を示した。一方，オゾン処理後1日目の光合成速度は0.20 ppm処理区以外の葉では対照区と同じレベルに回復し，0.20 ppm処理区も2日目以降には回復する傾向を示した。

図Ⅲ－22には開葉後約20日目の上位葉にオゾンを処理した時の光合成速度の変化を示した。0.10 ppmおよび0.20 ppmのオゾンを上位葉に処理した場合，5時間の処理期間中には対照区との差はみられなかった。

第Ⅲ章，2，2)で述べたようにn-FACで育成したポプラはOxに暴露されても開葉後20日目位までの若い葉は光合成速度の低下はみられないが，約30日目以降の下位葉では低下する。本実験のオゾン処理によっても同様に光合成に対するオゾンの影響は若い上位葉にはみられず，下位葉では0.20 ppm以上の処理によって明らかな低下が示された。しかし，各濃度処理区の光合成速度は処理後1～3日目に回復し，5時間の処理実験では処理後にまで影響を及ぼさなかった。



図Ⅲ－21 オゾン各濃度による処理期間中および処理後のポプラ下位葉の光合成速度の変化



図Ⅲ－22 オゾン各濃度による処理期間中および処理後のポプラ上位葉の光合成速度の変化

(2) 連続オゾン処理による光合成・光呼吸・暗呼吸速度への影響

0.10ppmのオゾンを1日5時間，週5日間処理を1および2週間行ったポプラは，処理開始後4日目頃から下位葉（開葉後約25日目以降55日目位の葉齢）の表面に白色小斑点を生じた。可視被害の程度を葉位ごとに5段階に分けて個体当りの被害指数を求めると1週間処理区では51.6となり，2週間処理区では66.6であった。

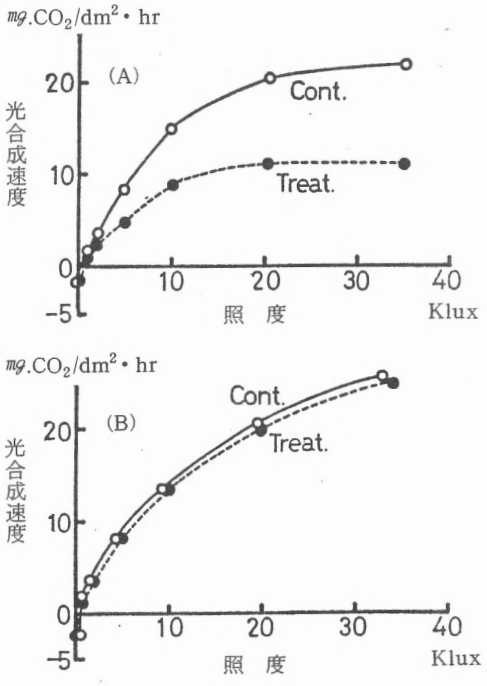
表Ⅲ－9には各処理区の下位葉（開葉後30～40日目）の光合成・光呼吸・暗呼吸速度の値を示した。光合成速度は1週間処理区で33%，2週間処理区で59%の阻害率であり，光呼吸速度はそれぞれ19%，40%の阻害率を示し，オゾンは光呼吸よりも光合成へより大きさ影響を与えた。一方，暗呼吸速度は1週間処理区で15%の増加をみたが，2週間処理区では対照区と同じ値であった。

濃度別オゾン処理実験でみられたように0.10ppmのオゾンで5時間処理したときの光合成速度は対照区とほとんど変わらず，また処理後1日目においても対照区と同じ値であり，短時間の処理では影響されなかった。しかし，同じ0.10ppmの濃度で連続して数日間処理すると光合成速度が著しく抑制されたことは，大気中に発生した比較的低濃度のOxでも繰り返し暴露されることによりポプラ葉のクロロフィル含有率と光合成速度が次第に低下することを裏付けるものと思われる。

表Ⅲ－9　オゾン1および2週間処理（0.1ppm，5時間／日，5日間／週）によるポプラ下位葉の光合成，光呼吸，暗呼吸速度への影響

処理期間	1週間			2週間		
項目	対照区	処理区	%	対照区	処理区	%
光合成速度	21.37	14.30	67	20.42	10.19	41
光呼吸速度	3.34	2.71	81	3.90	2.36	60
暗呼吸速度	1.39	1.60	115	1.85	1.85	100

（単位：mg CO_2／dm^2・hr）

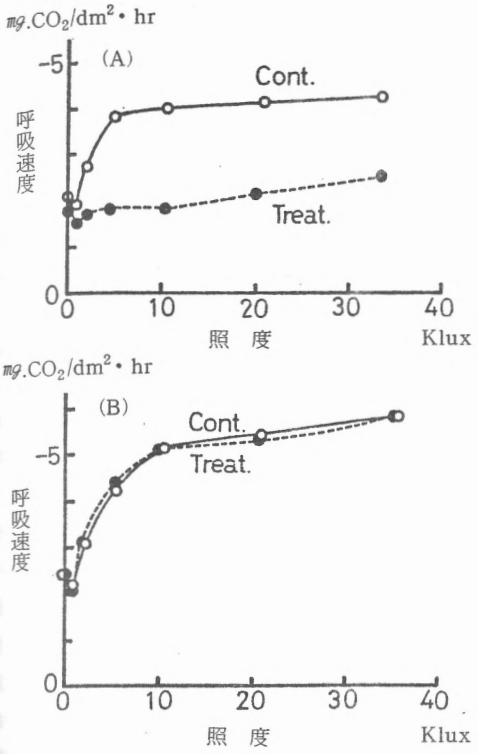


図Ⅲ－23　オゾン2週間処理区（0.1ppm，5時間／日，5日間／週）の下位葉（A）と上位葉（B）の光－光合成曲線

図Ⅲ－23には，2週間処理区の下位葉と上位葉の光－光合成曲線を示した。下位葉の光合成の光飽和点は対照区が30klux以上であるのに対し，処理区では約20kluxであったが，光補償点はほぼ同じ値であった。一方，上位葉は対照区と処理区でほとんど同じであり，これらの結果はn-FAC内でOxに暴露されたポプラの上位葉と同じ傾向であった。

図Ⅲ－24の下位葉及び上位葉の照度別呼吸速度を見ると，光補償点付近で最低値を示し，それ以上の照度および暗黒下で高くなった。また，対照区の下位葉では約5kluxで飽和に達したが，処理区では35klux付近まで徐々に増加した。一方，上位葉では対照区と処理区で同じ傾向を示し，飽和点は35klux以上であった。

古川ら[91]は，0.9ppm，120分間のオゾン処理によりポプラの光呼吸が低下したことを報告している。本実験では上位の若い葉の光呼吸速度は下位葉よりも高い値を示し，またオゾンに影響されないが，下位葉では0.10ppm連続処理により阻害されることがわかった。

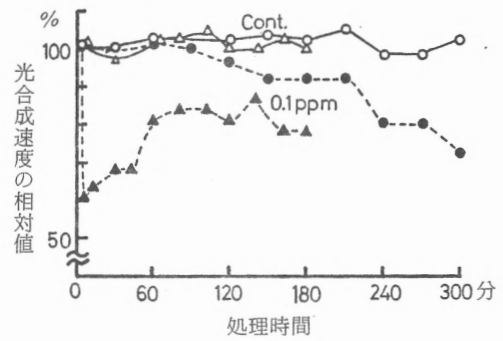


図Ⅲ－24　オゾン２週間処理区（0.1ppm，5時間／日，５日間／週）の下位葉（A）と上位葉（B）の照度別呼吸速度

(4)　連続オゾン処理葉のオゾン再処理による光合成速度の変化

0.10ppmオゾンを５日間処理した後，被害度３および５の可視被害を生じた葉に再び0.10ppmのオゾンを処理したときの光合成速度は図Ⅲ－25のようになった。すなわち，対照区として同程度の被害を受けた葉を用いてその光合成速度と比較すると処理開始後３時間目には10%の阻害率を示し，５時間後には30%の阻害となった。濃度別処理実験で用いた健全葉は0.10ppmオゾンの５時間処理で３%の阻害率であったが，軽く被害を受けている葉はオゾンによる光合成の阻害割合が大きく，低濃度でも繰り返しの処理によって大きな影響を受けるようになることがわかった。

被害度５の激しい被害を受けている葉に対して0.10ppmのオゾンを処理したときの光合成速度の変化は，処理開始後直ちに40%の阻害率を示した後，回復して３時間後に22%の阻害率となった。これは0.25ppmのオゾンを健全葉に処理したときと同じ傾向であり，被害の激しい葉は低濃度オゾンでも高濃度を処理したときと同じ様な影響を受けることが明かとなった。



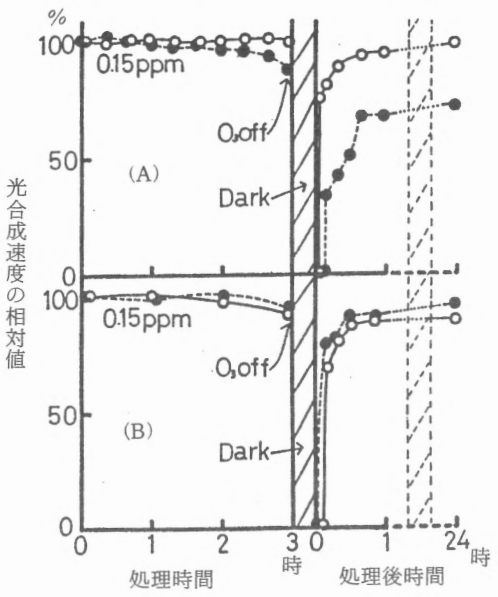
図Ⅲ－25　オゾン処理葉（被害度３（○，●）および５（△，▲））に0.1ppmオゾンを再処理した時の光合成速度の変化

(5)　FACとn-FACで育成したポプラの光合成速度に対するオゾン処理の影響

図Ⅲ－26はFACとn-FAC内の下位葉と上位葉にそれぞれ0.15ppmのオゾンを処理したときの光合成速度の変化を示した。FACで育成したポプラの下位葉は３時間オゾン処理を行っても全く阻害されなかったが，n-FACでOxにより被害を受けている下位葉（被害度２）は処理後３時間目には11%の阻害率を示した。また，３時間処理後30分間暗黒下において再び照射するとFACのポプラは約30分間で94%まで回復し，１日後には完全に回復したが，n-FACのポプラは50分後に68%，１日後に72%の回復程度であり処理直後よりもさらに低下した。一方，上位葉は両室でほとんど同じ傾向を示し，オゾン処理による影響はみられなかった。

以上のことから，比較的低濃度のオゾンに初めて処理されるポプラの下位葉はオゾンに対して抵抗性があり光合成速度に対して影響はほとんどないようである。しかし，オゾンあるいはOxにより被害を受けている下位葉は同じ濃度処理でも光合成速度に対する阻害は大きく，また，処理後はさらに低下することから連続処理により繰り返し暴露されることは光合成作用を累積的に低下させるのではないかと考えられる。実際に植物は野外で常にOxに暴露されていることを考えると，たとえ低濃度でも長期間になると大きな影響となって現れることがわかった。

Jensen ら[78]は，0.15ppmのオゾンをポプラ挿し木苗に



図Ⅲ－26　浄化区（○）と非浄化区（●）で育成したポプラ挿し木苗の下位葉(A)と上位葉(B)に対する0.15ppmオゾン処理期間中および処理後の光合成速度の変化

6週間処理したところ50%の生長抑制を見ているが，1 ppmの高濃度を8時間処理した場合，その後の生長はオゾンの影響を受けなかったと報告している。したがって，前述したポプラ挿し木苗の乾物生長の著しい抑制は大気中に発生したOxにより繰り返し暴露され，光合成速度が累積的に低下した結果もたらされたものと推察される。

摘　要

光化学オキシダントが樹木の生長に及ぼす影響を浄化空気室法を用いて調べるとともにOxおよびオゾンによる光合成，呼吸，葉内成分などへの生理的影響について検討を行った。

1. 数種樹木を浄化空気室と非浄化空気室にて育成し生長量を比較してみると，落葉樹のポプラとコナラはOxにより大きな生長抑制を受け，クワおよび常緑樹のシラカシ実生苗では中程度であり，シイ実生苗ではわずかな影響を受けた。

2. 浄化空気室（浄化区）と非浄化空気室(非浄化区)内にてポプラを育成しOxによる生長量への影響をみた。ポプラは1974年から1978年の各春期に挿し木して，その後約4カ月間にわたり新梢の苗高，苗径，全葉数，葉面積，乾物重などを比較検討した。

(1) 1975年の挿し木後114日目のポプラ挿し木苗の苗高，苗径は浄化区でそれぞれ216cm，17.3mm，非浄化区では143cm，11.7mmであり，Oxによる著しい生長抑制がみられた。

(2) 生育期間中の非浄化区の生長率（RGR），純同化率（NAR）は浄化区よりも低い値であり，葉面積比（LAR）は浄化区よりも非浄化区で高い値を示した。

(3) 1975年のポプラ挿し木苗の個体当りの乾物重は挿し木後118日目で浄化区211.69gに対し非浄化区では82.73gとなり，Oxによって著しい生長抑制が生じた。

各器官の乾物重の分配率は，非浄化区の新梢への割合が小さく，葉への割合がやや増大した。

(4) 1975年の全展開葉数は挿し木後114日目で浄化区65.2枚に対し非浄化区51.2枚であった。一方，個体中の最大葉の面積を比較すると，浄化区332.2cm²，非浄化区222.2cm²であり，Ox暴露により葉数，葉面積も低下した。

(5) Oxの発生により非浄化区のポプラは成熟葉の表面に白色小斑点を生じ，その後下位葉から異常落葉をおこした。1975年では挿し木後114日目までに落葉した葉数は非浄化区で20.4枚，浄化区で5.0枚であった。

(6) 1974年から1978年の各年においてみられた浄化区に対する非浄化区のポプラ挿し木苗の成長量（D^2H）の割合は，それぞれの年の生育期間に発生したOxドース（7および10pphm以上）の日平均値および日最高値の平均値と高い負の相関関係にあった。また，非浄化区で生じた可視被害の被害指数はOx日最高値の平均値との間に正の相関関係が認められ，年によって異なるOx発生量がポプラの生長量および可視被害の程度に反映した。

3. ポプラ挿し木苗が大気中に発生するOxに繰り返し暴露されるとき，Oxが葉の機能に及ぼす影響を明らかにするため浄化空気室と非浄化空気室内でポプラを育成し各葉齢ごとに比較した。

(1) ポプラ挿し木苗の調査期間，104日間における非浄化空気室内の大気中Ox濃度は日最高値で15pphm以上を記録した日数は1日，10pphm以上は13日，7pphm以上は51日であった。

(2) 浄化区と非浄化区のクロロフィル含有率と光合成速度は開葉後20日目までの若い葉齢ではほとんど同じ値を示したがそれ以降の葉齢では非浄化区の方が次第に低い値となった。浄化区に対する非浄化区の各葉齢におけるクロロフィル含有率の割合（n-F.A./F.A.×100%）

は各葉が開葉後20日目以降から暴露されたOxドース（6時から18時までの1時間平均値の合計値）と高い負の相関関係にあった。また，開葉後20日を過ぎた各葉のクロロフィル含有率と光合成速度との間に正の相関関係が得られた。

(3) 光合成の光飽和点は浄化区の葉と非浄化区の可視被害のない葉で20～30 kluxであるのに対し，可視被害のある葉では10 klux付近であった。光－光合成曲線と各葉位の葉面積から個体当りの1日の純光合成量を推定してみると非浄化区は浄化区の49.0%であった。

(4) 非浄化区のポプラ葉の暗呼吸速度は可視被害が発生する前の中位葉および可視被害のみられた下位葉において浄化区よりも高い値を示した。

(5) 非浄化区におけるポプラ葉の還元糖含有率は全葉位で浄化区よりも約2倍高い値を示した。一方，非還元糖は浄化区で30 mg／g. d. w. 以下の低い値であった。

(6) 両区の全窒素とタンパク態窒素含有率は開葉後20日目頃までほぼ同じ値であったが，それ以降の葉齢で非浄化区の方が低い値を示した。全窒素含有率と光合成速度との間には正の相関関係が認められた。

4. 濃度別オゾン処理および長期間オゾン処理がポプラ挿し木苗の光合成・光呼吸・暗呼吸速度に及ぼす影響について検討を行った。

(1) ポプラの下位葉に0.10，0.15，0.20，0.25 ppmのオゾンを5時間処理すると，光合成速度はそれぞれ3，7，28，34%の阻害率を示した。処理後2，3日以内に光合成速度は対照区と同じレベルに回復した。一方，上位葉の光合成速度は0.10および0.20 ppmオゾンを5時間処理しても影響を受けなかった。

(2) 0.10 ppmのオゾンで1日5時間，週5日間処理を1および2週間行うと，下位葉の光合成速度はそれぞれ33%，59%の阻害率を，また光呼吸速度は19%，40%の阻害率を示したが，暗呼吸速度は1週間処理区で15%の増加をみた。一方，上位葉の光合成・呼吸速度はオゾンの影響がみられなかった。

(3) 0.10 ppmのオゾンを1日に5時間ずつ5日間処理して，被害度3および5の可視被害を生じた葉に再び0.10 ppmのオゾンを3時間処理した時の光合成速度はそれぞれ10%，22%の阻害率を示し，健全葉への処理よりも大きな影響を受けた。

(4) 浄化空気室と非浄化空気室で育成したポプラの下位葉に0.15 ppmのオゾンを3時間処理した時の光合成速度を見ると，浄化空気室のポプラでは影響はみられないが，非浄化空気室のポプラは11%の阻害を受けた。処理後1日目の光合成速度は浄化空気室のポプラでは処理前と同じ値であったが，非浄化空気室のポプラは処理直後よりさらに低下し28%の阻害率を示した。すなわち，ポプラは比較的低濃度のオゾンでも繰り返して暴露されることにより累積的に光合成阻害が生じた。

第Ⅳ章　光化学オキシダントによるホウレンソウの被害の特徴および品種抵抗性の解明と被害軽減に関する試験

緒　言

都市近郊農業の主要生産を占めるホウレンソウは春期から秋期にかけて発生するOxに遭遇すると葉上に可視被害が生じ大きな経済的損失を受けている。最近，夏まきホウレンソウの栽培が導入されるようになり，Oxによる被害発生の機会が増えてきた。

ここではホウレンソウのOx被害の特徴を明らかにすると共に，被害を軽減・回避するため，まず抵抗性品種の検索を行った。

Ox被害に関する品種間差はタバコ[92]，*Phaseolus vulgaris*[93]，タマネギ[94]，ホウレンソウ[95,96]，スイートコーン[97]など多くの種において報告されている。Ox抵抗性の品種間差異とその要因に関する研究はタバコ，*Phaseolus vulgaris*を中心に用いてなされ，気孔密度[98,99]，気孔拡散抵抗[100]，葉内アスコルビン酸[101,102]，SH基含有量[103]などとの関連について記述されている。

ホウレンソウのオゾン感受性に関する品種間差はManning[95]らにより報告されているが，その要因について研究はほとんどなされていない。そこで，ホウレンソウ品種の形態的，生理的特徴について調査を行い抵抗性の要因を検討した。また，最近，オゾン被害の作用機作について葉緑体中に生じる活性酸素が原因になるという説が出され，それらは活性酸素防御系酵素および活性酸素防御物質によりある程度の毒性を妨ぐことができると報告している[104,105]。この様な観点からホウレンソウの感受性品種と抵抗性品種について葉内の活性酸素防御系酵素活性と活性酸素防御物質のオゾン処理による変動を比較検討し，抵抗性の要因について解析を試みた。

一方，栽培技術的にOx被害を軽減する方法は薬剤散布[12,106]などがあるが，価格および安全性の面から問題があ

り，特に生鮮野菜に関する有効な方法はいまだ見いだされていない。そこで，もっとも安全で安価な施肥による方法について実験を試みた。まず，ポット試験にて窒素，リン酸，加里，石灰の各施用量と被害程度との関係を明らかにした後，圃場にて窒素及び加里の増肥あるいは追肥を行い，被害の軽減について検討し，さらに，農家の畑にてOx被害の軽減・回避対策に関する現地実証試験を行った。

1．オキシダントによるホウレンソウの被害の特徴

大気中に生じたOxがホウレンソウに与える被害は畑の作付状況によりいろいろな様相が観察された。Oxの発生日より可視被害症状に違いがみられ，また，作付された品種により被害の程度が大きく異なり，同一品種でも播種した日により被害の発現程度に違いがみられた。そこで，ホウレンソウの可視被害症状，品種によるOx感受性の差異，生育期によるOx感受性の差について，それらの特徴を明らかにした。

1）可視被害症状の特徴

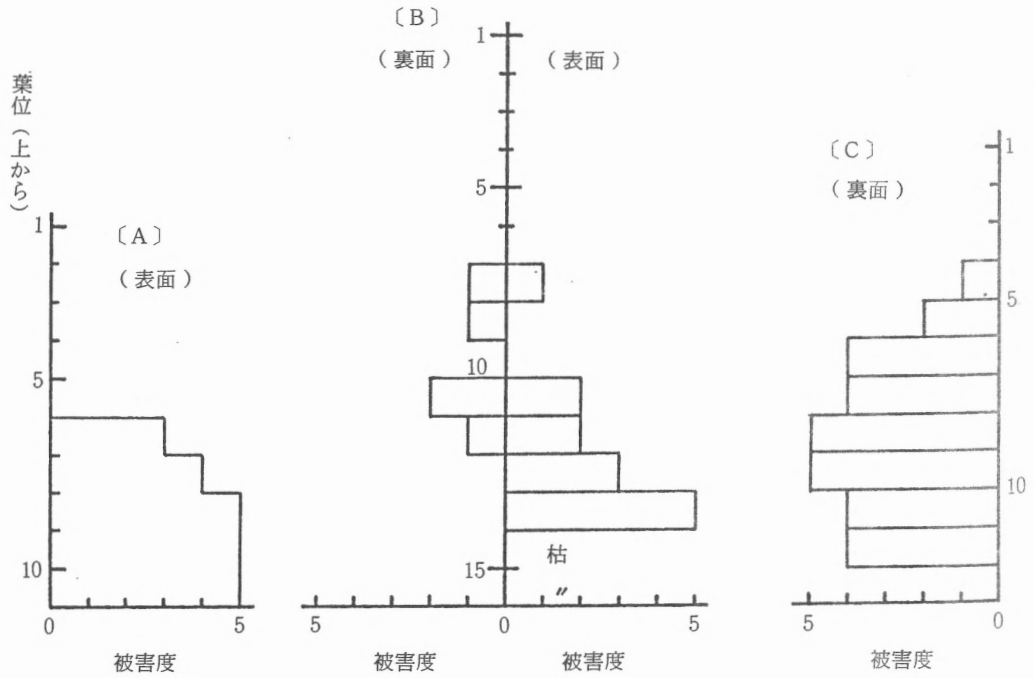
〈方　法〉

圃場に植栽されているホウレンソウについてOxが発生した数日後に葉の表面と裏面の被害を葉位ごとに調査した。被害度は0～5の6段階とした。

〈結果および考察〉

ホウレンソウのOxによる可視被害は図Ⅳ－1〔A，B，C〕に示すように3つの現れ方をした。すなわち，中位葉から下位葉の表面を中心に白色斑が生じるオゾン型被害〔A〕と中位葉を中心にして上位葉から下位葉までの裏面に銀白色斑を生じるPAN型被害〔C〕とそれらが同一株に同時に生じる型〔B〕である。オゾン型被害の生じる葉位はPAN型被害の生じる葉位よりもやや下位であった。

大気中に生じるOx中のオゾンとPANの割合はほぼ一定であるがその日の汚染状況により比較的オゾン濃度の高いとき，あるいはPAN濃度の高いときもあり，これらの発生パターンの違いにより3つの型となって現れたものと考えられる。



図Ⅳ－1　ホウレンソウのOxによる可視被害の葉位別被害度

〔A〕　オゾン型：1977年10月19日調査（10月14日Ox）

〔B〕　オゾン型とPAN型：1977年10月26日調査（10月25日Ox）

〔C〕　PAN型：1977年11月9日調査（10月31日Ox）

品種：〔A〕〔B〕はミンスターランド〔C〕は豊葉

2) 品種による感受性の差異

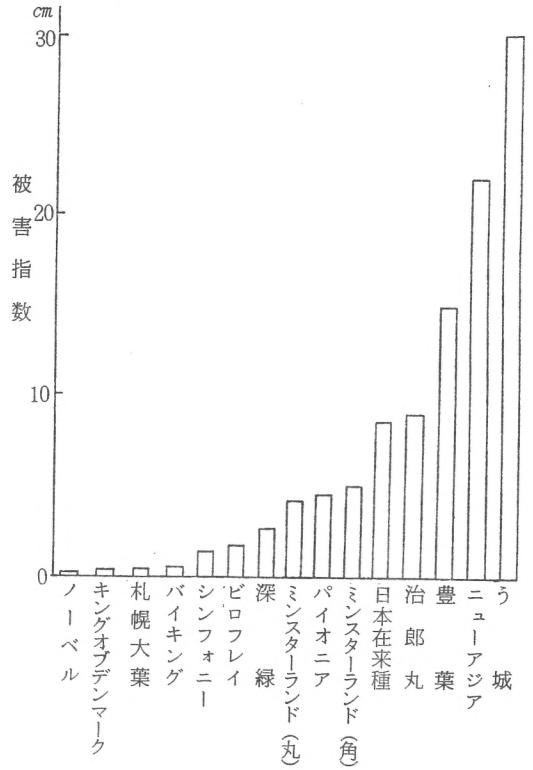
〈材料および方法〉

15品種（日本在来，う城，F_1深緑，治郎丸，札幌大葉，豊葉，ニューアジア，バイキング，ビロフレイ，ノーベル，キングオブデンマーク，ミンスターランド（丸種），ミンスターランド（角種），パイオニア，シンフォニー）を用いて，1978年3月24日に圃場に播種し栽培した。元肥は化成肥料（14，14，14）80kg／10a，熔成燐肥60kg／10a，苦土石灰50kg／10a，石灰270kg／10aを施した。5月12，13，14，16，17日に光化学スモッグが発生し，そのときのOx濃度の日最高値はそれぞれ12，8，10，14，12pphmであった。5月20日に草丈，茎丈，葉数，被害度（0～5段階）の調査を行い，被害指数（被害度合計／（葉数×5）×100）を求めた。

〈結果および考察〉

15品種の被害指数は図Ⅳ－2に示したように，う城＞ニューアジア＞豊葉＞治郎丸≒日本在来＞ミンスターランド（角種）≧パイオニア≧ミンスターランド（丸種）＞F_1深緑＞ビロフレイ＞シンフォニー＞バイキング≒札幌大葉≒キングオブデンマーク≧ノーベルの順であり，激しい被害を呈した品種からわずかな被害の品種まで差がみられた。一般にホウレンソウの品種系統は抽台が早く角種子で葉は長三角形で欠刻のある東洋系品種と晩抽性で丸種子，葉は楕円形の西洋系品種および雑種系品種に分けられている[107]。東洋系品種であるう城は特にOx感受性が高く，日本在来も高かった。ビロフレイ，バイキング，札幌大葉，キングオブデンマーク，ノーベルは西洋系品種でありOxに抵抗性を示した。う城と札幌大葉の交配種であるニューアジアは感受性の高いう城の性質を強く受け感受性が高く，日本在来とキングオブデンマークの交配種のF_1深緑は両親の中間の値であった。一方，日本在来×ミンスターランドからの分系育種である豊葉は両親よりも高い感受性を表した。

図Ⅳ－3には15品種の草丈と茎丈を示した。生長，抽台の早い品種はう城，ニューアジア，豊葉，治郎丸，日本在来であり，Ox感受性の高い品種と一致した。抽台が中程度の品種はミンスターランド（角種，丸種），パイオニア，F_1深緑，札幌大葉であり，ミンスターランドとパイオニアは中程度の感受性を示したが，比較的生育の速いF_1深緑はやや抵抗性であり，札幌大葉は抵抗性が強かった。抽台の全くみられなかったビロフレイ，シンフォニー，バイキンブ，キングオブデンマーク，ノーベルは抵抗性の強い品種であった。



図Ⅳ－2　ホウレンソウの品種別によるOxの被害指数
（1978年5月20日調査，5月12～17日Ox）

3) 生育ステージによる感受性の差異

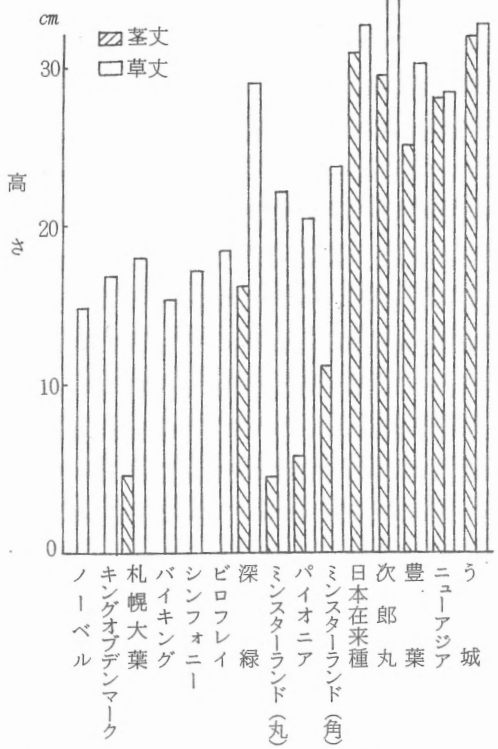
(1) 夏まきホウレンソウの播種日別によるOx被害の程度

〈方　法〉

八王子市中野のホウレンソウ畑で，播種日が7月30日，8月6日，8月11日，8月16日のホウレンソウ（品種パレード）についてOxによる被害の調査を8月30日に行った。同時に草丈，茎丈，生重，葉数を調査した。Ox発生日は8月25，26日でありオゾン濃度の日最高値はそれぞれ13，14pphm（立川での測定値）であった。

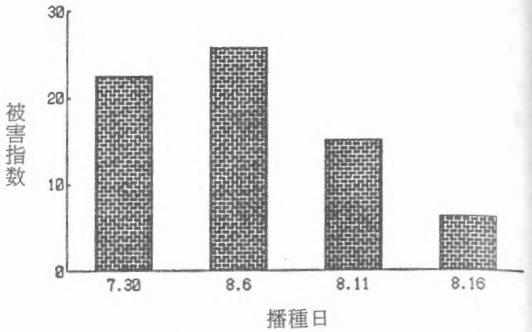
〈結　果〉

播種日別のOxによる被害指数は図Ⅳ－4に，生長量は図Ⅳ－5に示した。被害指数は8月6日に播種したホウレンソウが一番高い値であり，次に高いのは7月30日の播種であり，8月11日播種，8月16日播種は順次低下した。生育ステージを見ると本葉が4枚で播種後2週間（8月16日播種）くらいの時期は被害も少ないが，本葉が10枚前後になると被害が大きくなった。夏どりホウレ



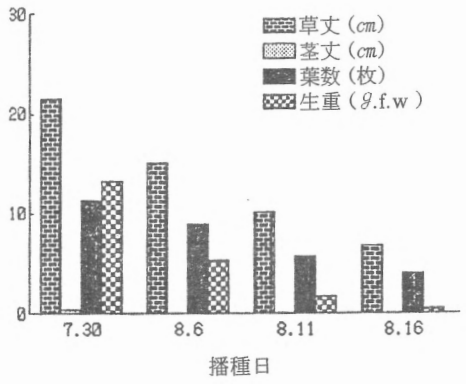
図Ⅳ－3　ホウレンソウの品種別による草丈と茎丈

（1978年5月20日調査）



図Ⅳ－4　播種日別ホウレンソウ（品種パレード）のOxによる被害指数

（8月30日調査，8月25，26日Ox）



図Ⅳ－5　播種日別ホウレンソウ（品種パレード）の生育

（8月30日調査）

ンソウは生長が早く播種後30日ごろに収穫期をむかえるが，この時期にOxに遭遇すると大きな被害となって現れ損害も大きかった。

(2)　生育ステージ別試験区の感受性

野外に於てOxに暴露されたホウレンソウは播種日の違いにより被害の発現程度が異なることがわかった。ここでは播種日別による生育ステージの異なる試験区，低温処理及びケミカルバーナリゼーションを行って人為的に生育相を早めた試験区を設定し，それぞれのホウレンソウにオゾン処理を行い，オゾン感受性と生育ステージの関係を明らかにした。

〈材料および方法〉

(a)　播種日別試験区：品種はミンスターランド（角種）を用い，4月10日，17日，24日，5月1日の4回角型ポリポットに播種し，その後間引きして5株を生育させた。

(b)　低温処理試験区：品種はF_1深緑とキングオブデンマークを用い，催芽後2℃の冷蔵庫に14日間暗黒冷蔵[108]し，4月24日に播種した。

(c)　ケミカルバーナリゼーション試験区：上記と同様の低温処理を行ったF_1深緑とキングオブデンマークは4月24日に播種し，その後5月6日と13日に40ppm ジベレリン溶液[109]を1株当り4mℓ散布した。

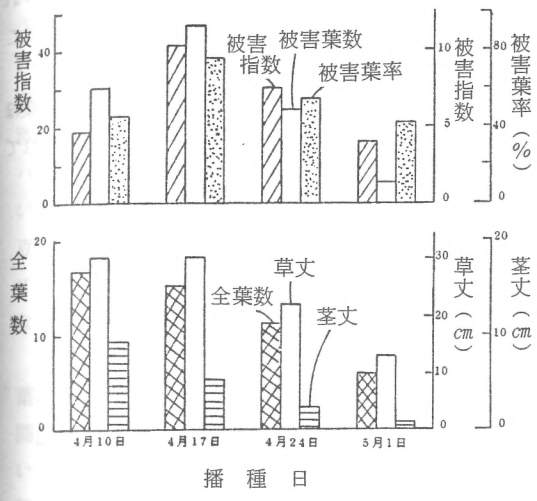
以上の試験区は全て容積2.4lの角型ポリポットを用い，培養土は黒ボク土と腐葉を7対3の割合に混合し，施肥量はN，P_2O_5，K_2O，CaO，MgOとしてそれぞれポット当り0.75g，1.125g，0.75g，2.98g，0.75gとした。播種後は浄化空気室内にて育成した。

オゾン処理方法はF_1深緑とミンスターランド（角種）が0.15ppmで3時間，キングオブデンマークが0.25ppmで3時間の処理を播種後約1カ月目に行った。オゾン処理後3日目に全葉数，被害葉数，葉位ごとの被害度（0～5段階）および草丈，茎丈を調査した。

〈結果および考察〉

(a) 播種日別のオゾン感受性

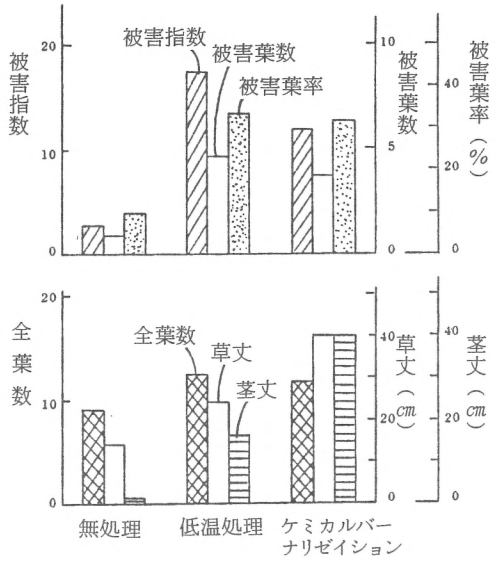
図Ⅳ－6の上段には播種日別の被害指数，被害葉数，被害葉率を，下段には全葉数，草丈，茎丈を示した。5月24日にオゾン処理した結果では4月17日に播種したホウレンソウの被害指数が一番高く，次に4月24日であり，4月10日，5月1日の順となった。生育が進むにしたがってオゾン感受性は高くなるが，抽台も進み開花結実をするようになると感受性は低下した。すなわち，4月播種したホウレンソウは収穫期に相当する播種後5週間目頃に一番高い感受性を示した。



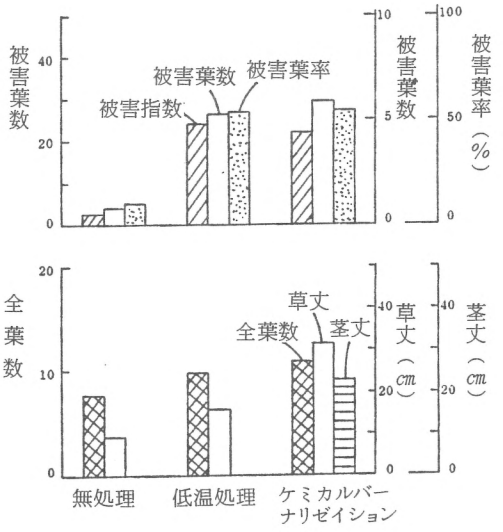
図Ⅳ－6　播種日別によるミンスターランド（角種）の生育とオゾン処理（0.15 ppm × 3時間）による被害量

(b) 低温処理及びケミカルバーナリゼーションによるオゾン感受性

図Ⅳ－7にF_1深緑，図Ⅳ－8にキンブオブデンマークの被害量（上段）と生長量（下段）について示した。低温処理及びケミカルバーナリゼーションは花芽分化，抽台，開花を促進すること[108,109]が知られている。本実験においても無処理と比較して全葉数，草丈，茎丈の生長が両処理で促進され，とくにケミカルバーナリゼーションは花茎の伸長が著しかった。F_1深緑の被害量は低温処理とケミカルバーナリゼーションを行った区の方が無処理区より高い値となりオゾン感受性が高くなった。低温処理区よりも抽台の早いケミカルバーナリゼーションは被害指数が低温処理区より低い値であり，老化が進むと感受性は低下する傾向がみられた。



図Ⅳ－7　低温処理，ケミカルバーナリゼイションによるF_1深緑の生育とオゾン処理（0.15ppm × 3時間）による被害量



図Ⅳ－8　低温処理，ケミカルバーナリゼイションによるキングオブデンマークの生育とオゾン処理（0.25ppm × 3時間）による被害量

晩抽性であるキングオブデンマークは低温処理により抽台しなかったが生長は促進されオゾン感受性が高まった。一方ケミカルバーナリゼーション区では著しい抽台がみられオゾン感受性も高くなった。1，2)の15品種の比較試験では，生長が早く抽台の早い品種ほど高い感受性を示したが，これらの実験からオゾン感受性は抽台の有無とは関係なく，葉齢の進行程度と関係があるものと推察された。

4) 生育ステージによる葉内成分含有率

ホウレンソウのオゾン感受性は生育ステージの違いにより異なった。そこで葉内の還元性物質であるSH基，活性酸素を解毒する酵素のスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）[110]およびグアヤコールパーオキシダーゼ（G. per.）活性について播種日別に測定し，オゾンに対する抵抗性を検討した。

〈材料および方法〉

品種はF_1深緑を用い1，3)，(2)と同じ方法でポットに4月1日，8日，15日，22日，29日に播種し，浄化空気室内にて育成した。5月中旬中位葉を用いて葉内のタンパク，SH基，クロロフィル含有率，SOD，G. per.活性を測定した。

SH基の定量はEllmann法[111,112]を用い，生葉を0.15%アスコルビン酸溶液で磨砕し，遠心分離したのち，上澄液とDTNB試薬を反応させ412nmの吸光度にて測定した。

酵素粗抽出液は4℃下で生葉を50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.8）で磨砕し，遠心分離後，上澄液を20mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）で透析を3回繰り返したのち，再遠心分離し調整した。

SOD活性[113]はキサンチン酸化酵素によるチトクロムCの還元速度の阻害の程度を550nmの吸光度の増加から測定した。反応液は1mℓ中に50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.8），0.1mM EDTA，0.1mMキサンチン，10μMチトクロムC，酵素粗抽出液を含んでおり，反応はキサンチン酸化酵素を加えて開始し，30～60秒後の値を測定した。単位はこの条件下でチトクロムCの還元を50%阻害する量を1単位とした。

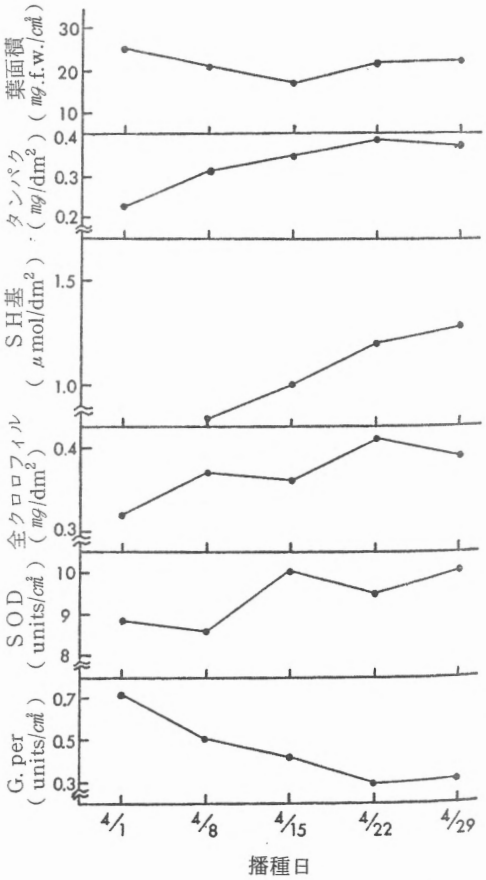
G. per.活性[114]は，反応液1mℓ中に100mMリン酸カリウム緩衝液（pH6.0）0.1mM EDTA，1mMグアヤコール，0.005% H_2O_2，酵素粗抽出液を含み，H_2O_2の添加により反応を開始し，470nmで吸光度を測定した。1単位は1分間当り1.0までの吸光度を増加する酵素量とした。

タンパクの定量は，Lowry法[115]によった。

〈結果および考察〉

図Ⅳ－9に示すように，葉内のタンパク，SH基およびクロロフィル含有率，SOD活性は後から播種した若い生育ステージの方ほど高い値がみられた。G. per.活性は逆に生育が進み老化するほど，高い活性を示した。Tomlinsonら[103]は，オゾン処理によりタバコ葉内SH基が減少することとオゾンに抵抗性のある若い葉はSH基の含有量がオゾンに感受性のある古い葉よりも高いと報告しており，本実験のホウレンソウも若い生育ステージの方ほど高い結果が得られた。オゾンの毒性反応のごく初期はSH化合物であること[116]が示唆されており，グルタチオンをタバコに葉面散布するとオゾンの被害が軽減される[101]ことからもSH基はオゾン抵抗性と関係していることが考えられる。

インゲンマメ[117]やポプラ葉[118]のSODは上位の若い葉ほど高い活性を持ち，被害も受けにくいことが報告されて



図Ⅳ－9　播種日別によるF_1深緑の葉内各成分量と酵素活性

いる。ホウレンソウも若い生育ステージの方が高いSOD活性を示したことは活性酸素障害の保護機能の高い葉齢ではオゾンによる被害を受けにくく，この保護機能が葉の老化とともに低下した葉ではオゾンに対する抵抗性が弱くなることが推察された。

2．品種系統によるオキシダント抵抗性の解明

Ox抵抗性の品種間差異とそれらの要因に関して次のような報告がある。

Dean[98]はタバコの気孔密度は感受性と関連があるとしているが，Huclら[99]は，*Phaseolus vulgaris*の12品種の気孔密度と被害程度との間には関連が認められないとしている。また，オゾンにより気孔閉鎖がタマネギやタバコの抵抗性品種で起こるとする報告[94,100]や気孔閉鎖とは関係がない[99]とするものもある。体内成分については還元性物質のアスコルビン酸含有量がタバコの抵抗性品種の方で高いという報告[101]がある一方で，Menser[102]はタバコの抵抗性とアスコルビン酸含有量は関係ないとしている。酵素活性の品種間差はパーオキシダーゼ活性が大豆の感受性品種でオゾン処理により増大すると報告されている[119]。このように抵抗性の要因についてはいろいろ異なった報告が多い。

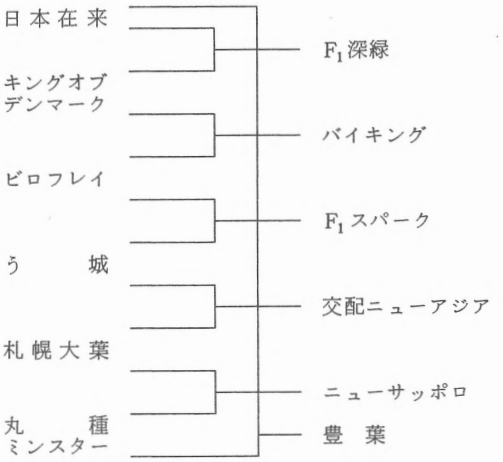
ここでは，ホウレンソウの抵抗性品種の検索を行い，葉の形態，体内成分，酵素活性などの要因と抵抗性との関係を調べ，正逆交雑種からみた抵抗性の遺伝様式について解析を行った。さらに，感受性品種と抵抗性品種を用い，気孔密度，オゾン処理による気孔拡散抵抗の差異，高濃度，低濃度オゾン処理による活性酸素防御系酵素活性と活性酸素防御物質の変動について明らかにし，オゾン被害の作用機作と抵抗性について解明を試みた。

1) 12品種の主成分分析による抵抗性要因

1，2)で述べたようにホウレンソウは品種によりOxに対する感受性，抵抗性が大きく異なった。そこで系統の明らかな12品種（協和種苗KKより提供）を栽培し，生長量，葉の形態，葉内成分，酵素活性を測定し，Ox抵抗性の要因について検討した。なお，葉内成分として，ここではタンパク，クロロフィル，アスコルビン酸をとりあげたが，アスコルビン酸はグルタチオンと同様に植物体内において可逆的な酸化還元系を形成する。三宅[101]はタバコの感受性系統のBel W_3－Sと抵抗性系統のBel W_3－Rの総アスコルビン酸と還元型アスコルビン酸含有量を比較し，Bel W_3－Rの方が高いことを認めている。一方，アスコルビン酸を葉面に散布することにより被害の軽減を見ている[101,102,120]。そこで，酸化型および還元型のアスコルビン酸含有率と品種による抵抗性との関連を他の要因とともに検討した。

〈材料および方法〉

品種は以下のような系統の12種類を選び用いた。



4月中旬に圃場と非浄化空気室内に播種し，5月中旬，圃場で生じたOxによる被害，草丈，茎丈，葉数，葉の形態（刻み，厚さ，葉形）を品種ごとに調査した。非浄化空気室内のホウレンソウは最大葉より一つ下の葉位の葉をOxによる可視被害のない時期に採取し，タンパク，クロロフィル，総，酸化型，還元型アスコルビン酸含有率，SODおよびG. per.活性について分析測定を行った。

アスコルビン酸の定量[121]は，生葉を5％メタリン酸で磨砕し，遠心分離して得られた上澄液を2，4－ジニトロフェニールヒドラジンとインキュベートし，デヒドロアスコルビン酸を発色させて520 nmの吸光度で測定し，また，同じ上澄液にインドフェノールを加えてアスコルビン酸をすべてデヒドロアスコルビン酸に酸化し，全デヒドロアスコルビン酸含有量を求め，両者の差から還元型アスコルビン酸含有量を算出し，それぞれ酸化型，総，還元型アスコルビン酸として表した。

〈結果および考察〉

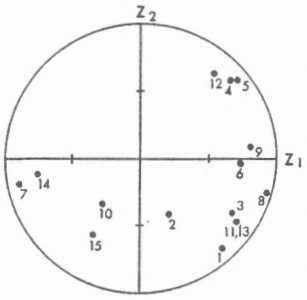
12品種について調査測定した15項目は，1. 草丈，2. 茎丈，3. 全葉数，4. 被害株率（オゾン型），5. 被害指数（オゾン型），6. 葉の刻み（少～多：1～3），7. 葉の厚さ（薄～厚：1～3），8. 葉形（丸形～三角形：1～3），9. タンパク含有率（mg／g. f. w.），10. クロロフィル含有率（μg／mgタンパク），11. 総アスコルビン酸含有率（mg／100g. f. w.），12. 酸化型アスコルビン酸含有率（mg／100g. f. w.），13. 還元型アス

コルビン酸含有率（mg／100g. f. w.），14. SOD活性（units／mgタンパク），15. G. per. 活性（units／mgタンパク）であり，表Ⅳ－1にそれぞれの数値を示し，各項目の相関関係を求めて表Ⅳ－2に相関行列を示した。12品種の被害株率と被害指数は葉の厚さと負の相関を，また，被害指数はタンパク含有率と正の関係およびSOD活性と負の相関があった。酸化型アスコルビン酸含有率は被害株率，被害指数と正の相関があり，葉の刻みと正の，厚さとは負の相関を示した。葉形は草丈，全葉数，葉の刻み，タンパク含有率，総，還元型アスコルビン酸含有率と正の相関があり，葉の厚さ，SOD活性とは負の関係であった。すなわち，葉の刻みが多く，厚さの薄い品種はOx被害を受けやすく，酸化型アスコルビン酸が多かった。一方，葉形が丸形で刻みが少なく厚い葉を持った品種はタンパクが少なく，SOD活性が高くオゾンに対して抵抗性をもっていた。

次に，12品種の生長，被害量，葉の形態，体内成分量，酵素活性の各因子間の相互関係を見るために，主成分分析[122]を行い15個の特性値の固有ベクトルと因子負荷量，寄与率を算出して表Ⅳ－3に示した。第1主成分では正の方向で草丈，全葉数，被害株率，被害指数，葉の刻み，葉形，タンパク，総，還元型アスコルビン酸が選ばれ，負の方向では葉の厚さとSODであり，その寄与率は44.6％であった。第2主成分は正の方向で被害株率，被害指数，酸化型アスコルビン酸が選ばれ，負の方向では草丈，茎丈，全葉数，総，還元型アスコルビン酸，G. per. であり，その寄与率は19.0％であった。第3主成分は正の方向で葉の刻み，クロロフィル，酸化型アスコルビン酸，SODであり，負の方向で茎丈，タンパクとなり，寄与率は11.7％となった。一方，各特性値に対する3主成分の寄与率を見ると，草丈と葉形が約90％であり，被害指数，葉の厚さ，タンパク，総，酸化型，還元型アスコルビン酸が約80％であったが，G. per. は38％と低く3主成分では説明されなかった。

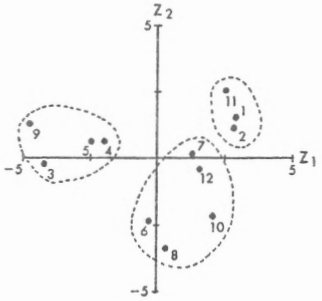
第1，第2主成分上における各特性値が持つ「重み」を図Ⅳ－10に示した。草丈，葉形，葉の厚み，被害株率，被害指数は円周に近い位置に分布していたが，茎丈，クロロフィル，G. per. は第1，2主成分では説明されなかった。次に12品種のスコアを図Ⅳ－11に示すと，被害量が多く酸化型アスコルビン酸の多い東洋系品種の日本在来，う城と豊葉は第1象限でまとまりを作り，葉が厚くSOD活性の高いキングオブデンマーク，ビロフレイ，札幌大葉，バイキングは第2，第3象限で西洋系品種のまとまりになった。交配種のF_1深緑，ニューサッポロ，交配ニューアジア，F_1スパークと丸種ミンスターは第1，第3，第4象限に分布し，交配種は両親の中間的な性質を示した。

なお，被害株率と被害指数を除いて13項目について主成分分析を行ったところ，12品種のスコアは上記と同様の3つのまとまりとなった。



1. 草　丈
2. 茎　丈
3. 全葉数
4. 被害株率(%)
5. 被害指数
6. 刻　み（1～3）
7. 厚　さ（1～3）
8. 葉　形（1～3）
9. タンパクmg／g.f.w.
10. Chl. μg／mgタンパク
11. 総　Asc.
12. 酸　化　Asc.
13. 還　元　Asc.
14. SOD. u／mgタンパク
15. G. per. u／mgタンパク

図Ⅳ－10　第1，第2主成分の各特性値への重み（因子負荷量）



No.　品種名
1. 日本在来
2. う　城
3. キングオブデンマーク
4. ビロフレイ
5. 札幌大葉
6. 丸種ミンスター
7. F_1深緑
8. F_1スパーク
9. バイキング
10. 交配ニューアジア
11. 豊　葉
12. ニューサッポロ

図Ⅳ－11　12品種のスコア（第1，第2主成分について）

2）正逆交雑による抵抗性の特徴

Oxに対する抵抗性の遺伝について，Taylor[123]はタバコの感受性品種Bel W_3と抵抗性系統を交配し，F_1は両親の中間の感受性を表し，F_2は抵抗性が40％，感受性10％，中間が50％に分離したことから2つ以上の遺伝子により制御されていると推察している。山本[124]はタバコの感受性品種のBel W_3と抵抗性を示すConnecticut 7-DおよびF_1，F_2ならびに戻し交雑世代を用いて，圃場栽培では遺伝子の相加的効果が有意であり，鉢栽培では抵抗性の側に優性効果を認めている。一方，スイートコーンでは，5種の自殖種と3種のF_1を用いてオゾン感受性に対する部分優性の遺伝形質が示唆されている[97]。

表Ⅵ－1　12品種について調査測定した15項目の値

項目 / 品種名	1 草丈 (cm)	2 茎丈 (cm)	3 全葉数	4 被害株率 (%)	5 被害指数	6 刻み (1～3)	7 厚さ (1～3)	8 葉形 (1～3)	9 タンパク (mg/g.f.w.)	10 Chl. (μg/mg タンパク)	11 総Asc.	12 酸化Asc.	13 還元Asc.	14 SOD	15 G.per.
											(mg/100g.f.w)			(units/mgタンパク)	
1. 日本在来	16.6	0	10.2	85.5	6.50	3	1	3	16.4	40.4	84.5	5.4	79.1	18.5	1.99
2. う城	15.5	0.2	8.3	75.0	8.35	2	1	3	17.3	42.9	103.1	3.8	99.3	17.4	1.45
3. キングオブデンマーク	14.5	0	7.5	35.0	2.05	1	3	1	12.7	48.8	73.4	3.1	70.4	27.6	2.50
4. ビロフレイ	15.0	0	8.0	45.0	4.13	1	3	2	14.8	46.2	79.0	3.9	75.1	23.8	1.97
5. 札幌大葉	15.2	1.1	8.8	35.0	1.45	1	3	2	14.9	35.6	65.9	2.7	63.2	23.7	1.45
6. 丸種ミンスター	15.9	0	10.9	20.0	0.85	3	2	3	13.2	51.7	94.8	3.4	91.4	25.3	2.05
7. F_1 深緑	17.6	0	9.9	80.0	4.44	3	1	3	14.8	39.8	78.1	3.5	74.5	22.0	2.58
8. F_1 スパーク	21.7	1.1	9.7	25.0	0.86	2	2	3	16.2	47.0	86.4	2.9	83.5	20.4	2.84
9. バイキング	12.8	0	7.6	35.0	1.75	1	3	1	12.7	45.0	51.8	3.0	48.8	22.7	2.41
10. 交配ニューアジア	19.1	3.3	10.8	65.0	4.31	2	2	3	15.4	40.2	94.6	3.0	91.6	17.6	2.40
11. 豊葉	15.6	0.8	9.6	85.0	7.67	3	1	3	17.0	44.5	75.2	6.2	69.1	20.0	1.67
12. ニューサッポロ	18.9	0	10.1	50.0	3.75	2	2	3	18.7	44.4	80.4	3.1	77.2	15.9	1.77

表Ⅳ－2　15項目の相関行列（項目No.は表Ⅳ－1と同じ）

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1.00														
2	0.45	1.00													
3	0.65*	0.38	1.00												
4	0.04	0.07	0.21	1.00											
5	−0.06	−0.01	0.04	0.90***	1.00										
6	0.37	−0.03	0.77**	0.53	0.41	1.00									
7	−0.35	0.01	−0.54	−0.77**	−0.72**	−0.87**	1.00								
8	0.68*	0.25	0.82**	0.46	0.43	0.80**	−0.80**	1.00							
9	0.53	0.11	0.36	0.52	0.60*	0.36	−0.59*	0.70*	1.00						
10	−0.06	−0.36	−0.09	−0.50	−0.30	0.01	0.19	−0.15	−0.31	1.00					
11	0.48	0.24	0.52	0.23	0.36	0.48	−0.54	0.72**	0.41	0.14	1.00				
12	−0.13	−0.17	0.16	0.70*	0.74**	0.58*	−0.62*	0.35	0.37	−0.03	0.11	1.00			
13	0.50	0.26	0.51	0.17	0.31	0.44	−0.50	0.70*	0.38	0.15	0.99***	0.03	1.00		
14	−0.51	−0.31	−0.43	−0.57	−0.58*	−0.36	0.60*	−0.66*	−0.86***	0.39	−0.40	−0.25	−0.38	1.00	
15	0.36	0.13	0.05	−0.27	−0.48	−0.01	0.15	−0.17	−0.44	0.31	−0.11	−0.34	−0.09	0.25	1.00

*** P＝.001
** P＝.01
* P＝.05

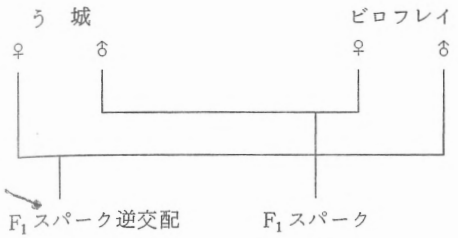
表Ⅳ－3　各特性値の固有ベクトル，因子負荷量および寄与率

	固有ベクトル			因子負荷量			3つの主成分の寄与率(%)
	第1	第2	第3	第1	第2	第3	
1. 草丈	0.239	−0.405	−0.162	0.619	−0.684	−0.215	89.7
2. 茎丈	0.086	−0.241	−0.491	0.224	−0.408	−0.652	64.1
3. 全葉数	0.257	−0.241	0.016	0.665	−0.407	0.022	60.8
4. 被害株率（%）	0.253	0.348	−0.074	0.655	0.588	−0.099	78.4
5. 被害指数	0.273	0.345	0.022	0.708	0.584	0.030	84.3
6. 刻み（1～3）	0.289	−0.016	0.302	0.748	−0.027	0.401	72.0
7. 厚さ（1～3）	−0.343	−0.109	−0.176	−0.889	−0.185	−0.233	87.9
8. 葉形（1～3）	0.361	−0.145	0.040	0.935	−0.245	0.054	93.7
9. タンパク mg／g.f.w.	0.311	0.053	−0.286	0.805	0.090	−0.380	80.0
10. Chl. μg／mgタンパク	−0.104	−0.197	0.539	−0.270	−0.334	0.715	69.5
11. 総Asc.	0.277	−0.269	0.198	0.717	−0.455	0.262	79.0
12. 酸化Asc.	0.209	0.375	0.249	0.542	0.634	0.380	80.5
13. 還元Asc.	0.277	−0.269	0.198	0.717	−0.455	0.262	79.0
14. SOD u／mgタンパク	−0.289	−0.063	0.290	−0.750	−0.107	0.385	72.1
15. G.per.u／mgタンパク	−0.092	−0.336	0.051	−0.240	−0.568	0.068	38.3
固有値 λK	6.6996	2.8564	1.7586				（平均）
寄与率（%）	44.6	19.0	11.7				75.3

ここでは，ホウレンソウ感受性品種であるう城と抵抗性品種のビロフレイおよびそれらの正逆交雑による2品種を用いてOx被害量，葉の形態，葉内成分量を調査分析し，抵抗性の遺伝的特徴について検討を行った。

〈材料および方法〉

う城とビロフレイおよびそれらを正逆交雑した品種であるF_1スパークとF_1スパーク逆交配（協和種苗KKより提供）は以下のような系図である。



これら4品種は圃場に播種し，Ox発生により生じた被害を調査した（写真Ⅳ－1）。オゾン型被害は1984年5月30日のOx（O_3日最高値9pphm）により生じ，6月1日に調査した。PAN型被害は1983年5月14日のOx(Ox日最高値10pphm）により生じ18日に調査した。

生長量は生量，草丈，茎丈を測定し，葉の形態については最大葉の大きさ，第3，4葉位の葉の厚さ（㎜），第5葉位以上の葉について葉形（丸形～三角形：1～3），葉の先端（丸～尖：1～3），葉の切れ込み（浅～深：1～3），葉の刻み（個数），葉の縮み（少～多：1～3）を調査した。

葉内成分分析用のホウレンソウは上記と同じ4品種を容量2.4ℓの角型ポリポットに播種し，浄化空気下の人工気象室（昼間22～23℃，夜間12～13℃，湿度70%，天然光）で育成した。培養土は黒ボク土，ピートモス，砂を3：1：1の割合に混合し，ポット当り化成肥料（8，8，8）を7g，苦土石灰を2.55g施用した。播種後約40日目にオゾン感受性葉位の葉について，タンパク，クロロフィル，アスコルビン酸，SH基含有率[111,112]を求めた。アスコルビン酸の分析方法は生葉約1gを1.5%メタリン酸で磨砕（ヒスコトロン，日音医理科器械製作所KK製）し，ミラクロスでろ過したのち，遠心分離を行い，上澄液を用い，食品分析酵素法[125]のF－キット（ベーリンガー・マンハイム山之内KK製）にて測定した。

〈結果および考察〉

図Ⅳ－12に示すようにオゾン型被害とPAN型被害の被害指数は，う城＞F_1スパーク逆交配＞F_1スパーク＞ビロフレイの順となり，オゾン型よりもPAN型被害の方が品種間の差は大きかった。交雑種の抵抗性はそれぞれの母親の影響を強く受けており，細胞質遺伝をすることが推定された。4品種の生長量と葉の形態は表Ⅳ－4に示した。両親の生重，草丈，茎丈の値は，う城の方がビロフレイよりも大きく，2つの交雑種は生重，茎丈，最大葉の大きさが両親よりも大きい値を示した。葉の形態ではビロフレイの方がう城よりも葉が厚く，葉の縮みも多かった。う城は葉が三角形で葉の先端が尖り，切れ込みが深く，葉の刻みが多いという特性を持った。交雑種は葉形，葉の先端，葉の縮みが両親の中間の値を示したが，切れ込みの深さと葉の刻みの個数はう城の形質を強く表し，葉の厚さはそれぞれの母親の値に近かった。

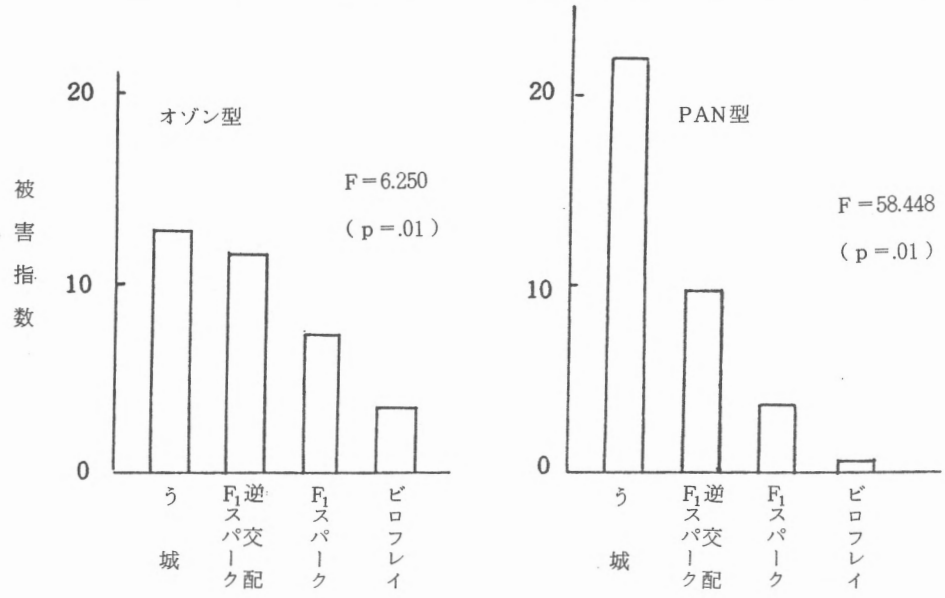
葉内成分については図Ⅳ－13に示した。両親の葉内のタンパク，クロロフィル，SH基，アスコルビン酸はう城の方がビロフレイよりも多く含有していた。交雑種は中間の値であったが，クロロフィルとSH基含有率はそれぞれの母親の性質を強く受けていた。

一般に細胞質遺伝は正逆交雑により明確な差を示し，常に母親に似るのを特徴としている。近年，葉緑体固有のタンパク，および葉緑体やミトコンドリアのDNAそのものが細胞質遺伝をすることが実証されてきた[126]。そして，受精に際して葉緑体が母親からだけ伝わる植物と花粉親からも伝わる植物があるが，後者の植物でも雄性配偶子からの葉緑体の伝達は雌性配偶子に比べ少ないといわれている。

オゾンがホウレンソウ葉の細胞微細構造に及ぼす影響は最初に葉緑体のチラコイドが膨潤すること[127]また，オゾン処理によりホウレンソウ葉の光合成色素が分解すること[104]が報告されている。一方，葉緑体内にはアスコルビン酸やグルタチオンが存在しており[128]，葉内のアスコルビン酸がオゾンによる色素分解の開始前に大きく減少する[104]ことなどから，オゾンによる被害の引金が葉緑体にあることが推察される。

正逆交雑種のF_1スパークとF_1スパーク逆交配の被害程度から抵抗性は母親の影響が強く，クロロフィル，SH基の含有量も母親の影響を受けており，オゾンによる被害が葉緑体に作用する可能性があることなどから推察するとオゾンに対するホウレンソウの抵抗性は細胞質遺伝をする葉緑体と関連した因子ではないかと考えられる。

しかし，アスコルビン酸とSH基含有量は抵抗性を持つビロフレイで少なく，感受性のう城で多いという結果であった。Tomlinsonら[103]は，オゾンに抵抗性のタバコ



図Ⅳ－12　4品種のオゾンおよびPAN型被害の被害指数
（オゾン型被害：1984年6月1日調査）
（PAN型被害：1983年5月18日調査）

表Ⅳ－4　4品種の生長量と葉の形態

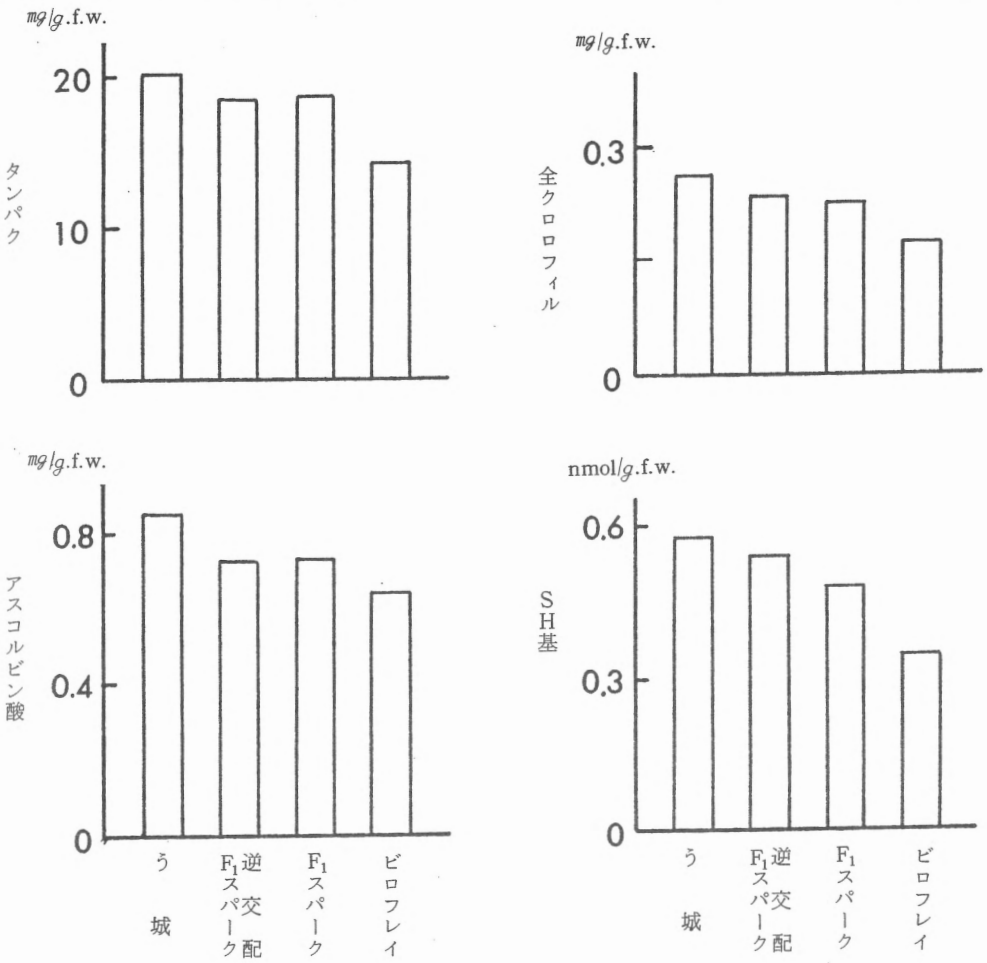
品種名	生重 (g.f.w)	草丈 (cm)	茎丈 (cm)	最大葉の大きさ (タテ×ヨコ)	葉の厚さ第3，4位葉 (mm)	葉形 丸～三角 (1～3)	葉の先端 丸～尖 (1～3)	切れ込み 浅～深 (1～3)	葉の刻み (個数)	葉の縮み 少～多 (1～3)
う城	11.1	21.5	0.8	9.4×4.2	0.46	2.8	2.7	2.4	4.0	0
F_1スパーク逆交配	14.5	22.9	1.9	11.5×5.9	0.49	2.2	2.3	2.7	4.7	1.0
F_1スパーク	14.1	20.4	0.9	11.3×5.5	0.57	2.3	2.4	2.6	4.0	0.9
ビロフレイ	10.4	14.7	0.4	8.8×5.9	0.54	1.8	1.3	1.2	1.8	2.4
F値	2.554	37.25	1.420	8.04×2.97	1.675	11.11	12.91	22.59	14.30	278.9
L. D. S.	N.S.	1%	N.S.	1%×N.S.	N.S.	1%	1%	1%	1%	1%

品種のSH化合物が感受性品種よりも低い含有量であることを報告し，本実験も同様であり，抵抗性が葉内の還元性物質の単なる含有量だけで説明されないことがわかった。

3)　感受性品種と抵抗性品種の気孔密度とオゾン処理による気孔拡散抵抗の変化

気孔は葉内にオゾンなどの大気汚染質が進入する主要な部分であり，気孔密度および気孔開度と感受性との関係についての報告[46, 98, 99]がある。また，Oxは気孔を閉じさせる作用がある[129, 130]ことが知られている。河内[100]は，タバコを用いオゾンに耐性の強い品種Hicksは感受性のBel－W_3に比べて気孔拡散抵抗が明らかに大きく，オゾン処理にともない気孔閉鎖を起こすため，Bel－W_3に比べて50～60%前後のオゾン吸収量であったことを報告している。

ここでは，ホウレンソウの感受性品種と抵抗性品種の



図Ⅳ－13　4品種の葉内タンパク，クロロフィル，SH基，アスコルビン酸含有率

気孔密度を調査し，また，オゾン処理が気孔拡散抵抗に及ぼす影響について測定を行い，抵抗性の要因を検討した。

〈材料および方法〉

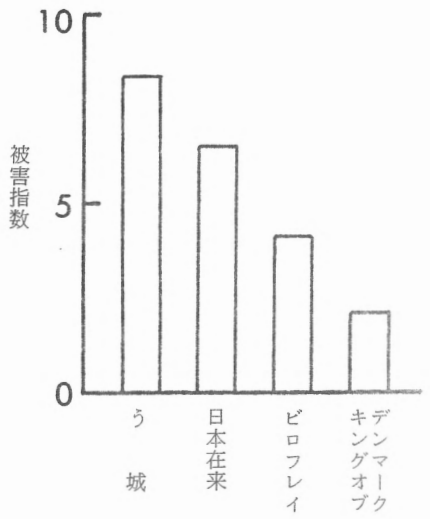
(1) 気孔密度：う城，日本在来，ビロフレイ，キングオブデンマークの4品種を4月下旬圃場に播種し，約1カ月後に第1～4葉位（下位より）の葉表面と裏面の気孔密度を測定した。[131] 方法は歯科用型取り合成樹脂を葉の表面に手早く塗り付け固化してから葉から引き剥し，その樹脂に無色のマニキュア液を塗り付け，固化したマニキュアフィルムをはぎ取って顕微鏡下で観察し，気孔数を数えた。その後，発生したOxによる4品種の被害を調査した。

(2) 気孔拡散抵抗：感受性品種としてう城と日本在来，抵抗性品種としてビロフレイとキングオブデンマークを用い，角形ポリポットに播種し，浄化空気室にて育成した。培養土は2，2)の材料および方法と同様である。う城とビロフレイ，日本在来とキングオブデンマークをそれぞれ対比する実験区を作り，播種後30～40日目の各5個体の感受性葉位について，光合成・蒸散速度，気孔拡散抵抗を測定した。光合成測定装置は第Ⅲ章，2，3)で述べたとおりであり，蒸散速度は同化箱入り口と出口の温湿度を0.3φ銅－コンスタンタン熱電対を用いて測定し，$gH_2O \cdot dm^{-2} \cdot hr^{-1}$ として表した。[132] 葉温は0.1φ銅－コンスタンタン熱電対を葉裏面に接着し測定し，同化箱内気温は0.3φの熱電対で測定した。拡散抵抗はGaastra[133] の方法により，蒸散速度，葉内蒸発面の水蒸気濃度（葉温における飽和水蒸気圧から計算），同化箱内空気の水蒸気濃度を用いて計算した。

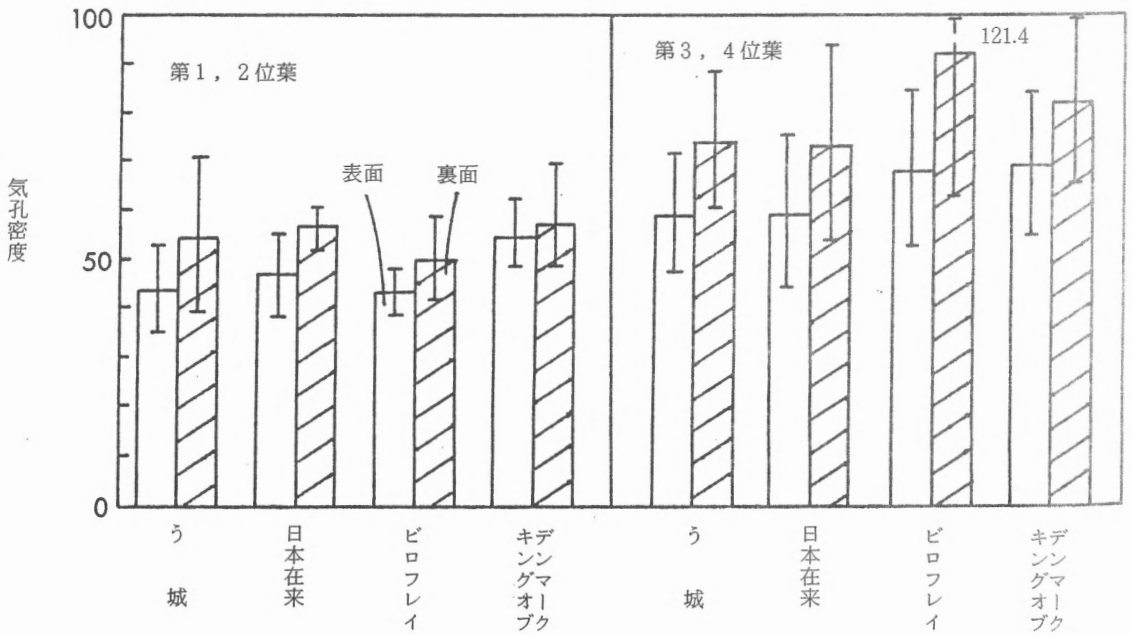
〈結果および考察〉

(1)　気孔密度：図Ⅳ－14に圃場における4品種のオゾン型被害指数を示し，図Ⅳ－15には4品種の気孔密度を示した。被害の程度はう城が最も大きく，次に日本在来，ビロフレイと続き，キングオブデンマークが一番抵抗性であった。気孔密度についてみると第1，2葉位は4品種でほとんど差がなく，第3，4葉位は感受性のう城と日本在来よりも抵抗性のビロフレイとキングオブデンマークの方がやや多い結果となり，気孔密度については抵抗性との関連が認められなかった。

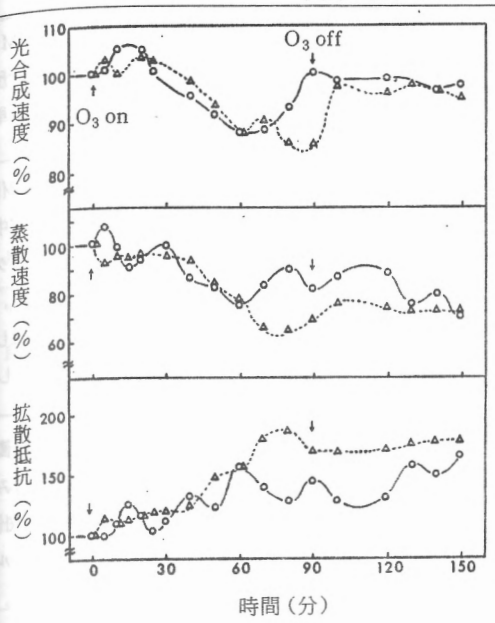
(2)　気孔拡散抵抗：図Ⅳ－16にオゾン処理がう城とビロフレイの光合成・蒸散速度，拡散抵抗へ及ぼす影響を示した。処理後60分までう城とビロフレイは同じ様に光合成・蒸散速度が減少し拡散抵抗が増大したが，60分以降においてはう城とビロフレイに差が生じ，拡散抵抗を見るとビロフレイはう城よりも高い値になった。図Ⅳ－17に日本在来とキングオブデンマークのオゾン処理による影響を見ると，光合成・蒸散速度は減少し，拡散抵抗は増大したが処理開始50分後からキングオブデンマークの拡散抵抗が日本在来より高い値を示した。このように抵抗性の2品種は処理の途中から感受性品種よりも気孔が閉鎖する傾向が認められ，抵抗性の一因になっているものと考えられる。しかし，タバコ[100]でみられたほどの拡散抵抗の品種間差はなく，抵抗性は葉内の生理的要因に負うところが多いものと思われる。



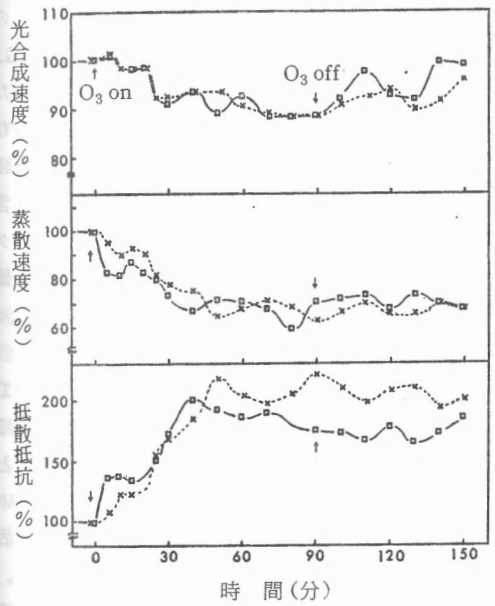
図Ⅳ－14　う城，日本在来，ビロフレイ，キングオブデンマークのオゾン型被害指数（1982年5月14日調査）



図Ⅳ－15　う城，日本在来，ビロフレイ，キングオブデンマークの気孔密度



図Ⅳ－16　オゾン処理（0.15ppm×1.5時間）によるう城とビロフレイの光合成速度，蒸散速度，拡散抵抗の経時変化
○：う城　△：ビロフレイ



図Ⅳ－17　オゾン処理（0.15ppm×1.5時間）による日本在来とキングオブデンマークの光合成速度，蒸散速度，拡散抵抗の経時変化
□：日本在来　×：キングオブデンマーク

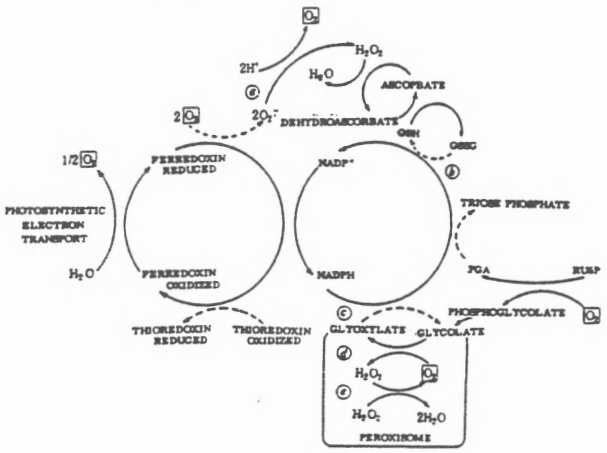
4)　感受性品種と抵抗性品種における葉内の活性酸素防御系酵素活性と活性酸素防御物質の変動

Asadaら[134]は葉緑体を光照射するとスーパーオキシド（O_2^-）が生成し，これはさらに他の活性酸素，$^1O_2$，H_2O_2およびOH・の発生をもたらす[110]が，これらの活性酸素は普通の状態ではscavenger，quencherにより消去され毒性がでないように保たれていると述べている。

ホウレンソウの葉緑体に生じたO_2^-は亜硫酸を連鎖反応的に酸化し，大量の活性酸素を生成することがAsadaら[135]により示された。また，SO_2を処理したホウレンソウは光と酸素の存在下で光合成色素が分解するが，クロロフィルaの分解はアスコルビン酸とSODの添加により阻害されることから，クロロフィルaはO_2^-によって分解することが証明された[136]。さらに，田中ら[137]はホウレンソウ葉にSO_2処理をすると大量のH_2O_2が蓄積することを報告している。

一方，榊ら[104]によると，オゾンも光合成色素の分解および不飽和脂質の過酸化を起こすことを示し，アスコルビン酸，O_2^-のscavengerのTironを与えてクロロフィルaと全カロチノイドの分解が阻害されること，分解には光と酸素が必要であることなどから，オゾンの毒性もO_2^-が関与していることを示唆した。

Fosterら[138]は下図に示すような葉緑体における活性酸素の代謝系を記している。



a：superoxide dismutase
b：glutathione reductase
c：glyoxylate reductase
d：glycolate oxidase
e：catalase

Nakanoら[139]はホウレンソウの葉緑体中の過酸化水素を分解する物質はL－アスコルビン酸であり，L－アスコルビン酸はデヒドロアスコルビン酸から光化学系Ⅰ→フェレドキシン→NADP→グルタチオンの系により再生産されることを証明した。

以上の活性酸素防御系酵素活性とオゾンに対する抵抗性に関する研究はこれまでほとんどなされていない。そこで，SOD，アスコルビン酸パーオキシダーゼ（Asc.per.），デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ（DHA red.），グルタチオンレダクターゼ（GSSG red.），およびカタラーゼ（Cat.）とグアヤコールパーオキシターゼ（G.per.）活性を測定しホウレンソウの感受性品種と抵抗性品種について潜在的な活性を比較した。さらに，オゾンの高濃度および低濃度オゾン処理を行い，活性酸素防御系酵素活性と活性酸素防御物質であるアスコルビン酸とグルタチオン含有量の変動を測定し，オゾン抵抗性の要因を解明した。

(1)　感受性品種と抵抗性品種の酵素活性の比較

〈材料および方法〉

(a)　材料：感受性品種としてう城，日本在来，抵抗性品種としてビロフレイ，キングオブデンマークを用い，う城とビロフレイを比較する実験区と日本在来とキングオブデンマークを比較する実験区を設けた。4品種の育成方法は2，2)の材料および方法で述べたとおりである。

(b)　酵素活性の測定方法：播種後約40日目に中位葉と下位葉の間に位置するオゾン感受性葉位を採取し，葉面積（Planimex25，日本レギュレーターKK製）と生重を測定した後，50mMリン酸カリ緩衝液（pH7.0）で磨砕（ヒスコトロン）し，ミラクロスでろ過後，10,000×g30分間遠心分離し，上澄み液を2つに分け，一方はAsc.per.とDHA red.活性の測定用とした。残りは20mMリン酸カリ緩衝液（pH7.8）で透析を行った後，SOD，GSSG red.，Cat.，G.per.活性の測定用にした。なお，以上の操作はすべて4℃にて行った。

Asc.per.とDHA red.活性はNakanoら[139]の方法に準じて，アスコルビン酸による290nmの吸光度の減少と増加を測定した（日立ダブルビーム分光光度計200-20型）。Asc.per.活性の測定の反応液は1㎖中に50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0），0.5mMアスコルビン酸，0.1mM H_2O_2，0.1mM EDTAおよび酵素粗抽出液を含んでいる。反応の開始はH_2O_2の添加により，その後の10～30秒後の吸光度の減少を測定した。DHA red.の反応液は1㎖中に50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0），5mM GSH，2mMデヒドロアスコルビン酸，0.1mM EDTAおよび酵素粗抽出液を含み，GSHの添加により反応を開始し，10～30秒後の吸光度の増加を測定した。単位はμmol／minとした。

GSSG red.活性はグルタチオンによるNADPHの酸化を340nmの吸光度の減少から測定した[138]。反応液は1㎖中に0.15mM NADPH，3mM $MgCl_2$，0.5mM酸化型グルタチオン，50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5），酵素粗抽出液とし，NADPHの添加により反応を開始し，15～30秒後の吸光度を測定し，単位はμmol／minとした。

Cat.活性は反応後1㎖中に50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.8），5mM H_2O_2および酵素粗抽出液を含み，H_2O_2の添加により反応を開始し，15～45秒間のO_2放出を生化学用DO測定器（オキシグラフ8型，セントラル科学KK製）で測定し，単位はμmol／minで表した。

SODとG.per.活性の測定方法は1，4)で述べた通りである。以上の酵素活性の測定はすべて25℃下で行った。

〈結果および考察〉

表Ⅳ－5にう城とビロフレイの葉面積重，タンパク含有率，各酵素活性を示した。葉面積重は2品種間で差はなかったが，タンパク含有率はう城よりもビロフレイの方が低かった。酵素活性はビロフレイのSODとGSSG red.がう城よりも低く，G.per.はビロフレイが高かった。Asc.per.とCat.は2品種間で有意差は認められなかった。

日本在来とキングオブデンマークの比較は表Ⅳ－6に示した。キングオブデンマークの葉面積重とタンパク含有率は日本在来より高い値であった。酵素活性はキングオブデンマークのSODとGSSG red.が日本在来より低く，G.per.はキングオブデンマークが高かった。Asc.per.とCat.は2品種間で有意差はみられなかった。

以上2つの実験区の感受性品種と抵抗性品種について酵素活性の特徴は同じ結果が得られた。すなわち，SODとGSSG red.活性は抵抗性品種の方が低く，Asc.per.とAsc.per.とCat.活性は差がなく，G.per.活性だけが高いという結果であり，葉緑体中の活性酸素防御系の酵素活性は予想に反し抵抗性品種の方で低いことが示された。G.per.活性は罹病性との関係で詳細に研究され，菌の接種により抵抗性品種は罹病性品種に比べて急激な活性の増大を認めているが[140]，オゾン処理ではオゾン感受性品種の方がG.per.活性は高くなるという報告があり[119]，被害の発現とともに活性が増大すること[25]を加味すると，細胞傷害が生じた結果，活性が高くなるものと考えられ，オ

表Ⅳ－5　う城とビロフレイの葉面積重，タンパク含有率，酵素活性の比較

品種名	葉面積重 (mg.f.w./cm²)	タンパク (mg/cm²)	SOD (units/cm²)	Asc. per.	GSSG. red. (μmol/cm²/min)	Cat.	G. per. (units/cm²)
う城	23.7 (100)	0.459 (100)	13.7 (100)	0.483 (100)	0.0197 (100)	10.61 (100)	0.158 (100)
ビロフレイ	25.4 (107)	0.326 (71)	10.9 (79)	0.523 (108)	0.0063 (32)	10.04 (95)	0.208 (132)
t 値	2.134	8.951	2.377	−1.105	5.701	1.386	2.634
自由度	10	10	10	10	10	10	10
L.D.S.	N.S.	0.1%	5%	N.S.	0.1%	N.S.	5%

表Ⅳ－6　日本在来とキングオブデンマークの葉面積重，タンパク含有率，酵素活性の比較

品種名	葉面積重 (mg.f.w./cm²)	タンパク (mg/cm²)	SOD (units/cm²)	Asc. per.	GSSG. red. (μmol/cm²/min)	Cat.	G. per. (units/cm²)
日本在来	26.5 (100)	0.471 (100)	19.1 (100)	0.648 (100)	0.0209 (100)	13.0 (100)	0.197 (100)
キングオブデンマーク	35.1 (132)	0.527 (112)	15.9 (83)	0.649 (100)	0.0080 (38)	13.7 (105)	0.249 (126)
t 値	−6.875	−2.820	2.203	−0.039	2.975	−1.439	−3.181
自由度	10	10	10	10	10	10	10
L.D.S.	0.1%	2%	10%	N.S.	2%	N.S.	1%

ゾンに対する抵抗性とは関係ないものと見なされる。

(2) 高濃度オゾン処理による酵素活性の経時変化

〈材料および方法〉

材料は2，4)，(1)と同様に4品種を育成して用いた。オゾン処理方法はオゾン発生装置で発生させたオゾンを希釈し，人工気象室内へ導き0.15ppmの濃度を3時間処理した。オゾン処理開始時，30分，1，2，3時間後および処理終了後30分，1，2時間，1，3あるいは4日後に感受性葉位の葉を5ポットより半葉ずつ対照区とともに採取し，酵素活性の変化を測定した。測定方法は2，4)，(1)と同様である。

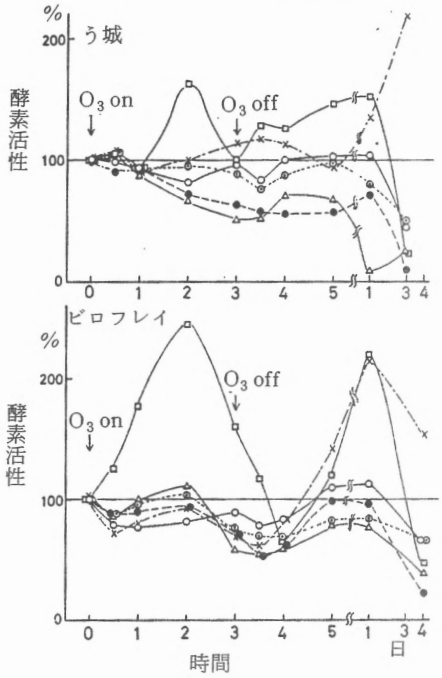
〈結果および考察〉

図Ⅳ－18にう城（上図）とビロフレイ（下図）のオゾン処理による酵素活性の経時変化を対照区に対する割合（%）として示した。ビロフレイのGSSG red.活性はオゾン処理開始とともに増大し，2時間後に最大となり以降低下したが，う城は処理後1時間まで変化がなく2時間後にビロフレイより遅れて増大し3時間後には低下した。処理終了後2品種ともGSSG red.活性は再び増大し，脱水症状がみられた1日後に最大となった後，白色斑の被害を生じた3ないし4日後にはG. per.以外の他の酵素とともに低い値となった。ビロフレイのAsc. per.とDHA red.活性は処理後2時間までほとんど変化がなく3時間後に低下したが，う城ではビロフレイよりも早く1時間後から低下し始めた。

G. per.活性は処理期間中ビロフレイでやや低下したが，処理後被害の発現とともに2品種とも増大し，傷害酵素の特徴を表した。う城のSODとCat.活性は処理中の変化があまり見られなかった。

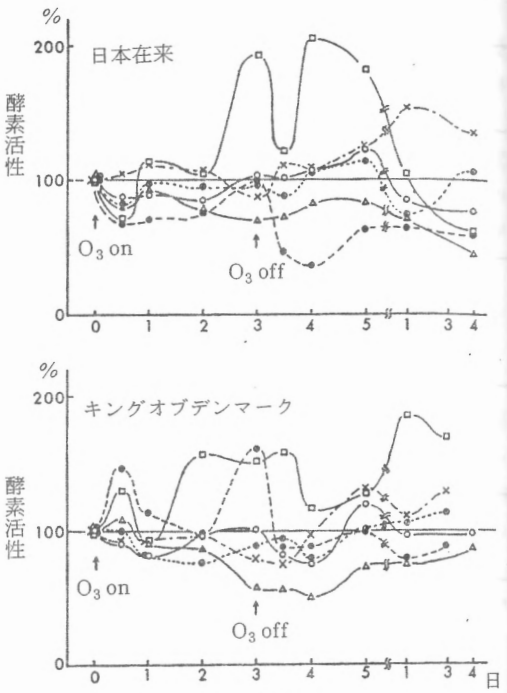
図Ⅳ－19には日本在来とキングオブデンマークの酵素活性の経時変化を示した。キングオブデンマークは処理開始とともにGSSG red.とDHA red.活性が上昇し，GSSG red.は2時間目以降も高い値を維持していたが，日本在来は処理後30分には低下しその後2時間目まで対照区とほぼ同じ値を示し，3時間後にキングオブデンマークよりも遅れて増大した。

本実験のオゾン処理による可視被害指数はう城が48.2，ビロフレイが33.1，日本在来が41.7，キングオブデンマ



図Ⅳ－18　高濃度オゾン処理（0.15ppm×3時間）によるう城とビロフレイの酵素活性の経時変化

○—○ SOD　□---□ GSSG red.
△—△ Asc. per.　⊙---⊙ Cat.
●—● DHA red.　×---× G. per.



図Ⅳ－19　高濃度オゾン処理（0.15ppm×3時間）による日本在来とキングオブデンマークの酵素活性の経時変化

○—○ SOD　□---□ GSSG red.
△—△ Asc. per.　⊙---⊙ Cat.
●—● DHA red.　×---× G. per.

ークが14.3であった。抵抗性の一番強いキングオブデンマークの処理3日目のGSSG red.活性は高い値であり，他の酵素も対照区とほとんど変わらない値を示した。

Fosterら[138]はワタを75%O_2の高酸素条件下で1～3日間処理すると，GSSG red.活性が2～3倍に増大し，SODおよびパーオキシゾームのグリコレイトオキシダーゼとCat.活性は変化しなかったことを報告している。そして，21%O_2下でも十分に高い活性を持っているとみなされるSODと増大したGSSG red.活性が，O_2の還元性中間生成物の酸素毒性を防御する系であると推定している。

本実験においても同様に4品種のGSSG red.活性がオゾン処理により増大する現象がみられたがSODとCat.活性は大きな変化を示さなかった。SO_2およびオゾン処理により葉緑体内で生じるとされているO_2^-，H_2O_2の解毒にGSSG red.活性の増大が関係していることが考えられる。さらに，抵抗性品種のビロフレイとキングオブデンマークがオゾン処理開始直後からこの酵素の活性が高まるのに対し，感受性品種のう城と日本在来が1～2時間遅れて高くなることやAsc. per.とDHA red.活性が抵抗性品種より感受性品種の方で早く低下をすることにみられたような活性酸素防御機能の反応の違いが抵抗性と関連することが推察された。

(3)　低濃度オゾン長時間処理による酵素活性とアスコルビン酸およびグルタチオン含有量への影響

大気中のオゾンのバックグランド値は0～0.05ppmと言われている[141]。野外に植栽されている植物は光化学スモッグが発生しないときでもこの程度のオゾン濃度により常に暴露されている。

Runecklesら[142]は，ブッシュビーン（*Phaseolus vulgaris* L，品種Pure goldwax）に0.02ppmの低濃度オゾンを7日間前処理した後，0.15ppmのオゾンを6時間

処理したところ，前処理をしない対照区よりも被害程度が50%以上低下したことを報告している。その後，ChanwayとRuneckles[134]は低濃度オゾン前処理によるSOD活性の変動と被害低下との関係は認められないが，0.1ppm以上のオゾン処理により被害の生じたブッシュビーンの初生葉でSOD活性が増大することをみている。

田中ら[118]は比較的低濃度の0.1ppmのSO_2を20日間ポプラに処理しSOD活性が増大することを明らかにし，その後2ppmSO_2を処理したところ，クロロフィル含量の低下割合が抑えられたことからSOD活性は抵抗性と関連があると予測している。一方，Grillら[111]はSO_2汚染地帯のトウヒなどの樹木の葉中SH化合物が高い含有率を示し，人工的に長期間SO_2処理した場合でも増加することを記述している。また，アスコルビン酸については，Barness[144]が5種の松実生苗にオゾン0.05ppmを5～22週間処理した結果，有意な増加を認めている。これら活性酸素防御に関する物質が低濃度長期間の処理により増大することは抵抗性獲得と関連するものと思われる。

そこで，ホウレンソウの感受性品種と抵抗性品種が低濃度オゾンに長時間暴露される場合，葉内の活性酸素防御系酵素活性とアスコルビン酸およびグルタチオン含有量がどのような影響を受けるか実験を行い検討した。

〈材料および方法〉

材料は2，4)，(1)と同様な方法で育成した。2台の人工気象室を用い，1台をオゾン処理用とし，播種後30日目から0.025ppmのオゾンを1日5時間，10日間連続処理した。対照用として他の1台の人工気象室を用いた。この室内の浄化空気中のオゾン濃度は野外大気に影響されたが0～0.005ppmの範囲内であった。

酵素活性はオゾン処理を10日間行った後に3ポットから感受性葉位の葉を1枚づつ採取し測定した。方法は2，4)，(1)で記したとおりである。

アスコルビン酸とグルタチオン含有量は処理開始時，処理5日目および10日目に測定した。測定方法は，感受性葉位について生葉を1.5%メタリン酸で磨砕し，遠心分離を行った後上澄み液を用い，アスコルビン酸は食品分析酵素法[125]のF－キットにて測定した。グルタチオンはグルタチオンレダクターゼによる酵素法[128]を用い，反応液1mℓ中に3mM DTNB 100μℓ，5mM NADPH 35μℓ，グルタチオンレダクターゼ（100単位／mℓ）10μℓ，100mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5），酵素粗抽出液を含み，反応は酵素の添加により開始し，15～45秒後の412nmの吸光度を測定した。グルタチオン標準液について同様の測定を行い，総グルタチオン濃度を求めた。

〈結果および考察〉

(a) 活性酸素防御系酵素への影響

表Ⅳ－7に低濃度オゾン長時間処理によるう城とビロフレイの酵素活性の変化を示した。う城のSOD活性は処理により低下したが，ビロフレイでは増加がみられ，Asc. per.活性はう城で低下し，ビロフレイでは変化しなかった。ビロフレイのGSSG red.活性は5割の増大を示した。

カタラーゼ活性はビロフレイで増大がみられ，G. per.活性はう城で増大した。

表Ⅳ－8は日本在来とキングオブデンマークについて示した。日本在来はG. per.活性が増大したが，SOD，Asc. per.，GSSG red.，Cat.活性は低下した。キングオブデンマークはCat.活性が増大し，GSSG red.とG. per.活性にやや増大がみられたが，SOD活性には変化がなか

表Ⅳ－7　低濃度オゾン長時間処理（0.025ppm×5時間×10日間）がう城とビロフレイの酵素活性へ及ぼす影響

品種名	区	タンパク (mg/cm²)	SOD (units/cm²)	Asc. per. (μmol/cm²/min)	GSSG. red. (μmol/cm²/min)	Cat. (μmol/cm²/min)	G. per. (units/cm²)
う城	対照区	0.436	20.48	0.488	0.0304	10.64	0.243
	低オゾン区	0.374	18.67	0.398	0.0329	10.27	0.321
	(%)	(87.0)	(91.2)	(81.4)	(108.2)	(96.5)	(132.1)
ビロフレイ	対照区	0.353	16.69	0.467	0.0254	8.32	0.236
	低オゾン区	0.348	19.81	0.466	0.0386	11.27	0.226
	(%)	(98.6)	(118.7)	(99.8)	(151.8)	(135.5)	(94.1)

表Ⅳ－8　低濃度オゾン長時間処理（0.025ppm×5時間×10日間）が日本在来とキングオブデンマークの酵素活性へ及ぼす影響

品種名	区	タンパク (mg/cm²)	SOD (units/cm²)	Asc. per. (μmol/cm²/min)	GSSG. red. (μmol/cm²/min)	Cat. (μmol/cm²/min)	G. per. (units/cm²)
日本在来	対照区	0.479	23.45	0.485	0.0393	12.66	0.299
	低オゾン区	0.409	20.93	0.189	0.0339	10.19	0.337
	(%)	(85.4)	(89.3)	(39.0)	(86.2)	(80.5)	(112.7)
キングオブデンマーク	対照区	0.482	23.59	0.609	0.0375	10.64	0.287
	低オゾン区	0.469	24.32	0.461	0.0410	13.90	0.320
	(%)	(97.3)	(103.1)	(75.8)	(109.2)	(130.6)	(111.5)

った。Asc.per.活性は低下したが，日本在来と比べると低下割合は少なかった。

なお，4品種ともこのオゾン処理により可視被害は全くみられなかった。4品種の生長量（草丈，葉数）は対照区と低オゾン区で差は生ぜず，統計的にも有意差はみられなかった。

感受性品種のう城と日本在来はG.per.以外の活性酸素防御系の酸素活性はほとんど低下し，タンパク含有率も減少がみられた。一方，抵抗性品種のビロフレイとキングオブデンマークはAsc.per.以外の酵素活性に増加の傾向がみられ，タンパク含有率も変化しないことがわかった。

バックグランドのような低濃度オゾンを処理したときにみられる抵抗性品種の活性酸素防御系酵素の活性増大現象は一般に野外で栽培しているホウレンソウについてもおこることが予想される。

2，1)で述べた12品種の主成分分析の結果では，非浄化空気室で育成したホウレンソウのSOD活性と圃場で生じた被害指数とが負の相関関係にあり，抵抗性品種の方がSOD活性が高い傾向を示していた。一方，2，4)，(1)では浄化空気下で育成したホウレンソウのSOD活性は感受性品種よりも抵抗性品種の方が低い値を示し，相反する結果であった。しかし，本実験で低濃度オゾン処理により感受性品種のSOD活性などが低下し，抵抗性品種の方で増加の傾向を示したことから，この矛盾が解決された。

(b)　アスコルビン酸，総グルタチオン含有率への影響

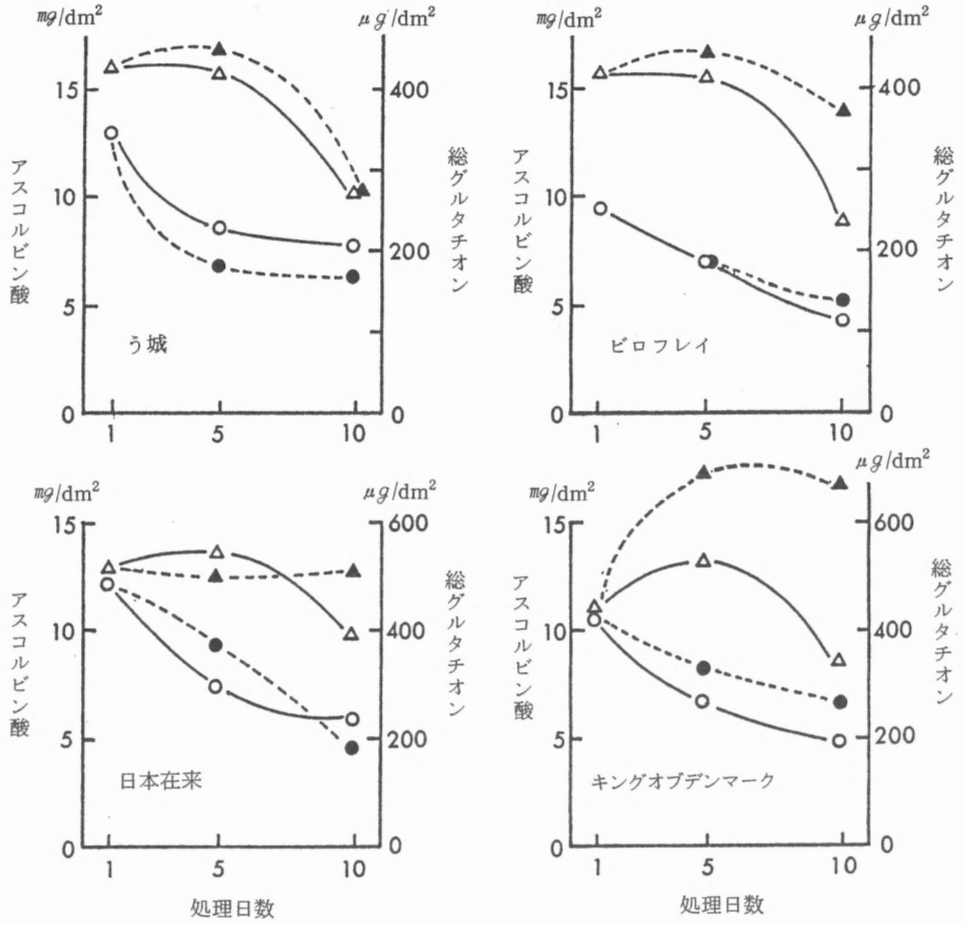
図Ⅳ－20にう城，ビロフレイ，日本在来，キングオブデンマークのアスコルビン酸と総グルタチオン含有率を示した。対照区は播種後30日目から40日目にかけて感受性葉位のアスコルビン酸含有率は減少し，処理区も減少したが，キングオブデンマークの低下は緩やかであった。

対照区の総グルタチオン含有率は播種後35日目から40日目にかけて減少し，低オゾン区については，う城が対照区と同じ様に減少したが，ビロフレイは対照区と比べてわずかな減少であった。日本在来の低オゾン区はほとんど変化せず，キングオブデンマークは処理により含有率が増加した。

図Ⅳ－21には4品種のアスコルビン酸と総グルタチオン含有率の対照区に対する低オゾン区の相対値の経時変化を示した。処理10日目にう城と日本在来のアスコルビン酸の相対値は対照区よりも減少したがビロフレイとキングオブデンマークは増加した。総グルタチオンはキングオブデンマークが処理により著しい増加を示し，ビロフレイも同様の傾向であった。日本在来は10日目にやや増加がみられ，う城は変化しなかった。

播種後30日から40日にかけて感受性葉位が急激に活性酸素防御物質を減少する期間において，抵抗性品種は低濃度のオゾン処理により減少速度が緩やかになり，特に総グルタチオンでは逆に増加がみられることは，バックグランドのような低濃度のオゾンにより葉内にそれらの物質を維持ないしは増大させる働きが生じオゾンの毒性に対する防御機能を獲得するものと考えられる。

以上，感受性品種と抵抗性品種の特徴について述べてきたが，オゾンに対する抵抗性は両品種の気孔密度や気孔拡散抵抗の差よりも，葉内の酵素活性，特にGSSG red.がオゾン処理により直ちに増大することや低濃度オゾン処理によりGSSG red.，Cat.活性などが高くなり，総グルタチオン含有量も増加した状態となることなどが総合的に影響し，ホウレンソウの西洋系品種においてオ



図Ⅳ－20　低濃度オゾン長時間処理（0.025ppm×5時間×10日間）によるう城，ビロフレイ，日本在来，キングオブデンマークのアスコルビン酸と総グルタチオン含有率の経時変化

	アスコルビン酸	総グルタチオン
対照区	——○——	——△——
低オゾン区	·····●·····	·····▲·····

ゾン抵抗性を現したものと推察された。

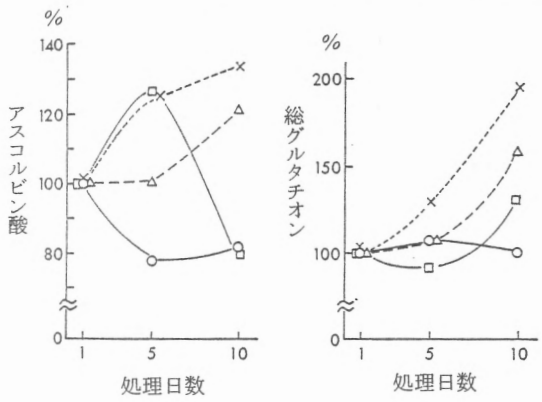
3．施肥方法によるオキシダント被害軽減に関する試験

Ox被害は抵抗性品種を用いることにより軽減・回避できることがわかったが，これらは西洋系品種であるため草丈，葉数，株重に関する生産上および味覚の点に問題があり一般の畑に普及されていない。現在使用されているホウレンソウはほとんどがF_1品種であり中程度の被害を生じ，栽培技術的に被害を軽減する必要がある。

ここでは施肥方法についてポット試験，圃場試験，現地実証試験を行い，被害軽減に関する検討を行った。

1）施肥量によるポット試験

窒素，リン酸，加里，石灰の各施用量の多少とオゾン処理によるホウレンソウの被害程度との関係を明らかにするためポットにて試験を行った。一方，施肥量が葉内の活性酸素防御物質および活性酸素防御系酵素活性に及ぼす影響と，被害軽減との関係を解明した例はこれまでにない。そこで，窒素，加里各施用量がこれらの物質に与える影響を明らかにしオゾン毒性の防御機能を獲得する施肥方法について検討を行い，被害軽減のための基礎



図Ⅳ－21　低濃度オゾン長時間処理（0.025ppm×5時間×10日間）によるう城，ビロフレイ，日本在来，キングオブデンマークのアスコルビン酸と総グルタチオン含有率の相対値の経時変化
○：う城　　△：ビロフレイ
□：日本在来　　×：キングオブデンマーク

資料とした。

(1)　窒素，リン酸，加里，石灰各施用量とオゾン被害量

〈材料および方法〉

培養土は5㎜のふるい目を通した黒ボク土とピートモスと砂を3：1：1の割合に混合し，pH6.4になるように石灰を施し，2.4ℓの角型ポリポットにいれた。施肥成分量はポット当りN（NH_4NO_3）0.5g，P_2O_5（$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$）0.75g，K_2O（K_2SO_4）0.5g，MgO（$MgSO_4 \cdot 7H_2O$）0.5g，CaO（$CaCO_3$）2.75gを標準量とした。窒素施用量試験区はNとしてポット当り0g，標準の0.5g，2倍の1.0g，4倍の2.0gとしそれぞれN0区，N1区，N2区，N4区と表した。リン酸施用量試験区はP_2O_5としてポット当り0g，0.75g，1.5g，3.0gとしそれぞれP0区，P1区，P2区，P4区と表し，加里施用量試験区はK_2Oとしてポット当り0g，0.5g，1.0g，2.0gとし，K0区，K1区，K2区，K4区と表し，石灰施用量試験区はCaOとしてポット当り0g，2.75g，5.5g，11.0gとし，Ca0区，Ca1区，Ca2区，Ca4区と表した。

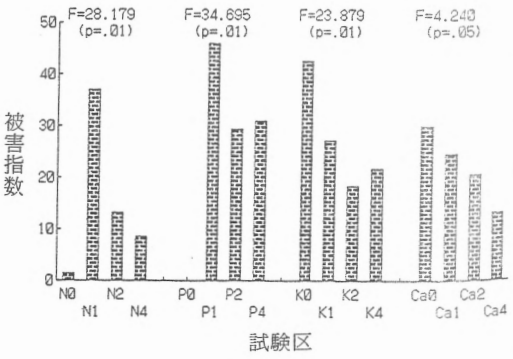
材料は品種F_1深緑をポットに播種し，間引き後4株とし，浄化空気下の人工気象室（昼間22～23℃，夜12～13℃，湿度70%，天然光）で育成した。

オゾン処理条件は，窒素および石灰施用量試験区が0.11ppm，4時間，リン酸施用量試験区が0.12ppm，4時間，加里施用量試験区が0.11ppm，5時間であり，処理後3日目に被害程度を0～5段階に分けて葉位ごとに調査し，被害指数を求めた。

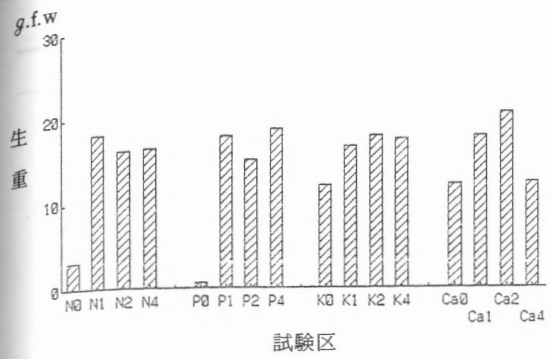
〈結果および考察〉

図Ⅳ－22に窒素，リン酸，加里，石灰各施用量試験区の被害指数を示し，図Ⅳ－23には各区のホウレンソウ株当り生重を示した。窒素施用量試験区は標準施肥のN1区の被害指数がもっとも高い値を示し，N2区，N4区，N0区と順に低下した（写真Ⅳ－2）。N0区は正常な生育をせず，他の3区はほぼ同様な生育状態であった。リン酸施用量試験区はP0区でほとんど生育がみられず被害も生じなかった。P2区とP4区はP1区よりも被害は少なかった。加里施用量試験区はK1区よりもK0区の被害が大きく，K2区とK4区は小さかった（写真Ⅳ－3）。生育量はK0区がやや低い値であったが他の3区はほぼ同じ値を示した。石灰施用量試験区はCa0区，Ca1区，Ca2区，Ca4区の順に被害が小さくなった。生育量はCa0区がCa1区より小さく，Ca2区はやや大きくなり，Ca4区は生育抑制がみられた。

窒素施用量に関して，Keckら[53]はピントビーンを用いて多施用するにしたがいオゾンによる被害が小さくなることを報告し，Leoneら[52]はタバコについて最適量が最もオゾン被害が増大し，少肥と多肥で被害が減少したと述べている。一方，Brewerら[50]はホウレンソウの窒素施用量を増加させるとOx被害が大きくなるとしているが，本実験では標準量の2倍，4倍施用すると被害が軽減されることがわかった。リン酸施用量についてはLeoneら[145]はトマトについて，Craker[55]はアオウキクサについて多施用がオゾン感受性を高めると報告している



図Ⅳ－22　窒素，リン酸，加里，石灰各施用量試験区におけるオゾン処理による被害指数



図Ⅳ－23　窒素，リン酸，加里，石灰各施用量試験区における株当り生重

が，本実験では逆に被害が小さくなり，第Ⅱ章で述べたアサガオの施肥実験と同様であった。加里施用量は，Dunning ら[61]がピントビーンとダイズについて水耕液中の加里は低濃度の方が高濃度よりもオゾン被害が大きいことを示し，浅川ら[60]は加里を欠如した場合，ネギとトマトの被害が激しくなるとしており，ここで得られたホウレンソウの結果も同じ傾向であった。Heagle[146]は4品種のダイズについてN－P－K（6-25-15）を液肥で施用し，3段階の濃度を比較すると高濃度になるほどオゾンによる被害が低下したことを報告している。

石灰施用に関しては，真弓ら[147]がホウレンソウについて各形態の窒素質肥料区を設け，炭酸カルシウム無施用と併用の区を比較し，炭酸カルシウム併用によりOxの被害軽減効果を認めている。本実験は施用量を多くするほど，被害の軽減が認められたが，4倍のCa4区では過剰施用により生育抑制がみられた。

以上，ホウレンソウは正常な生育をしなかった窒素とリン酸の無施用区を除くと，三要素とも施肥量を多くするとオゾン被害が軽減されることが分かった。

(2)　窒素，加里各施用量による葉内の活性酸素防御物質及び活性酸素防御系酵素活性への影響

〈材料および方法〉

材料は(1)の窒素及び加里施用量試験区と同様である。活性酸素防御物質のアスコルビン酸とグルタチオンの測定方法は2，4)，(3)で述べた通りである。酵素活性の測定はSODとG. per.が1，4)に，Asc. per.，GSSG red.およびCat.は2，4)，(1)に記載した方法で行った。

〈結果および考察〉

(a)　活性酸素防御物質への影響

図Ⅳ－24に窒素および加里施用量試験区の葉内のアスコルビン酸と総グルタチオン含有率を示した。窒素施用量試験区のアスコルビン酸は標準のN1区に比べてN4区で5割増の含有率を示したが，総グルタチオンはN2区，N4区の方がN1区より低い含有率であった。N0区はアスコルビン酸が特に高い値であり，総グルタチオンは低かった。加里施用量試験区のアスコルビン酸はほとんど同じ様な値を示し，総グルタチオンはK4区が一番高く，次がK1区であり，K0区とK2区は低かった。

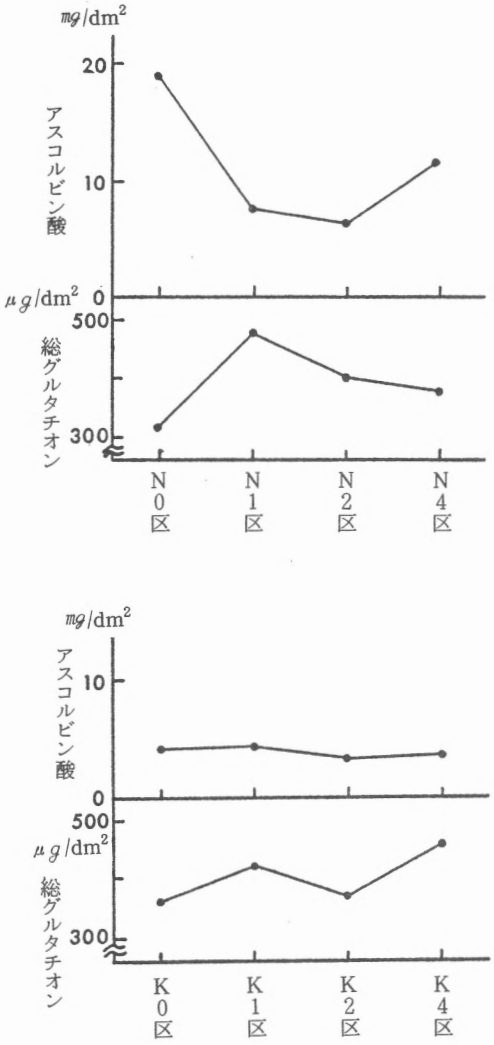
施肥条件とアスコルビン酸含有量の関係について，菅原[148]はホウレンソウを用いて三要素の試験を行い，窒素倍量区が最もアスコルビン酸含有量を増加し，加里倍量区がこれに次ぎ，リン酸倍量区はもっとも関係が少ないとした。また，ホウレンソウおよびチシャに尿素の葉面散布を行いアスコルビン酸含有量の増加を見ている。篠原ら[149]もシュンギクとレタスが尿素の葉面散布により著しくアスコルビン酸含有量が増加することを報告しているように葉内の窒素濃度を高めるとアスコルビン酸は増加する傾向がうかがえた。一方，1／4濃度の培養液で栽培したレタスは生産が抑制され，アスコルビン酸が特異的に高い値を示すことを見ている。[149]本実験においても正常な生育をしなかったN0区は同様に高い含有量であった。

N0区を除いてオゾン被害の軽減とこれら物質の関係を見ると，窒素を4倍施用した区のアスコルビン酸と加里を4倍施用した区の総グルタチオン含有率は標準施用区より高くなったが，2倍施用区では逆にやや低下がみられ，明らかな関係は見いだせなかった。

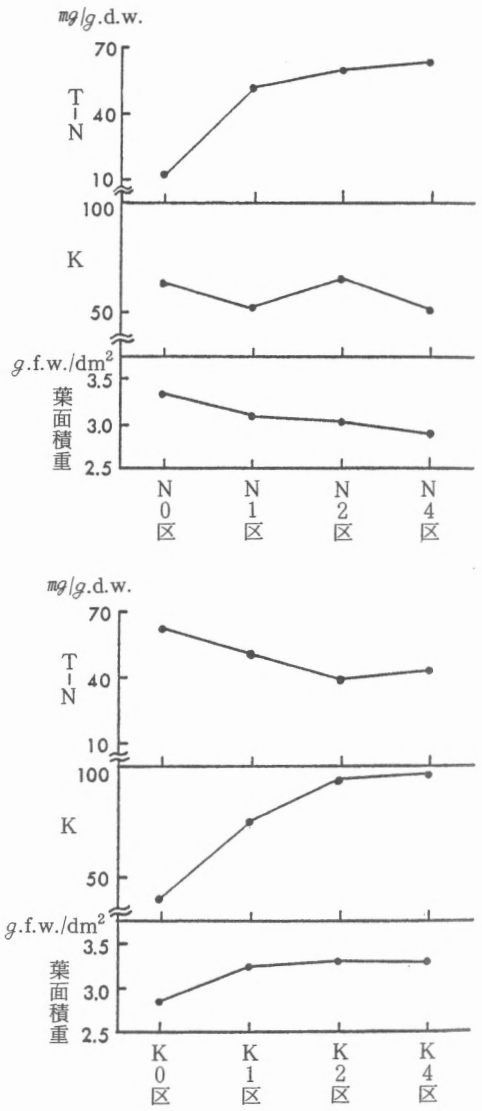
なお，図Ⅳ－25に2つの施用量試験区の葉内T－N，K含有率と葉面積重を示した。T－N含有率は窒素多用により増加し，加里多用により減少の傾向がみられた。K含有率は加里多用により増加したが2倍と4倍施用はほぼ同じ値であった。葉面積重は窒素を多施用すると低下の傾向であり，加里施用量では欠乏すると低くなるが，他の3区は同じ値であった。

(b)　活性酸素防御系酵素活性への影響

窒素施用量試験区の酵素活性は表Ⅳ－9と図Ⅳ－26に示した。N1区と比較してN2区とN4区のGSSG red.活性は114％，186％へと増大した。N2区とN4区のCat.活性はN1区100％に対し133，132％と増大の傾向にあった。SODとG. per.活性は多施用により低下傾向を示し，Asc per.活性はN4区でN1区より減少した。N0区はタンパク含有率が低く，酵素活性はすべてN1区より低かった。なお，この値は面積当りの酵素活性で



図Ⅳ－24　窒素および加里施用量試験区における葉内のアスコルビン酸と総グルタチオン含有率



図Ⅳ－25　窒素および加里施用量試験区における葉内のT－N，K含有率と葉面積重

あるがタンパク当りの酵素活性として表した場合でもN1，2，4区は同様な傾向であった。

加里施用量試験区は表Ⅳ－10と図Ⅳ－27に示した。SODとAsc. per.活性はK多施用により増大しK4区はK1区の値に対しそれぞれ144%，128%となった。GSSG red.活性はK1区に対しK2区が150%，K4区が135%と増大し，Cat.活性はK2区が126%，K4区が120%と増えた。一方，G. per.活性はK1区に対しK2区とK4区は減少する傾向を示した。K0区はGSSG red.とG. per.活性がK1区より低く，他は同じあるいはやや高い値であった。

De Kokら[150]は培養液中のNaCl濃度を高めホウレンソウをストレス条件下においた場合，グルタチオンとGSSG red.活性に変化は認められないと報告している。本実験の窒素，加里多施用によるこれら物質の増大は単なる塩類濃度の増加による現象ではないものと思われる。

以上のように，加里を多施用するとG. per.以外の酵素活性が高まる傾向が見いだされ，また，窒素を多施用す

表Ⅳ－9　窒素施用量試験区における葉内の活性酸素防御系酵素活性

（　）内は%

酵　素　名	N0区	N1区	N2区	N4区
SOD (units／cm^2)	11.9 (52.7)	22.6 (100)	19.4 (85.8)	18.1 (80.1)
Asc. per. (μmol／cm^2／min)	0.568 (73.0)	0.778 (100)	0.825 (105.9)	0.723 (92.9)
GSSG red. (μmol／cm^2／min)	3.0 (20.4)	14.7 (100)	21.1 (144)	27.3 (186)
Cat. (μmol／cm^2／min)	4.6 (26.3)	17.5 (100)	23.3 (133)	23.1 (132)
G. per. (units／cm^2)	0.150 (48.9)	0.307 (100)	0.227 (73.9)	0.231 (75.2)
タンパク (mg／dm^2)	23.1 (47.9)	48.2 (100)	55.1 (114)	49.7 (103)

表Ⅳ－10　加里施用量試験区における葉内の活性酸素防御系酵素活性

（　）内は%

酵　素　名	K0区	K1区	K2区	K4区
SOD (units／cm^2)	14.7 (112)	13.1 (100)	15.3 (117)	18.9 (144)
Asc. per. (μmol／cm^2／min)	0.473 (110)	0.430 (100)	0.498 (116)	0.550 (128)
GSSG red. (μmol／cm^2／min)	27.5 (89)	30.9 (100)	46.2 (150)	41.6 (135)
Cat. (μmol／cm^2／min)	11.8 (101)	11.7 (100)	14.7 (126)	14.0 (120)
G. per. (units／cm^2)	0.104 (61)	0.170 (100)	0.166 (98)	0.133 (78)
タンパク (mg／dm^2)	47.1 (102)	46.0 (100)	47.0 (102)	53.2 (116)

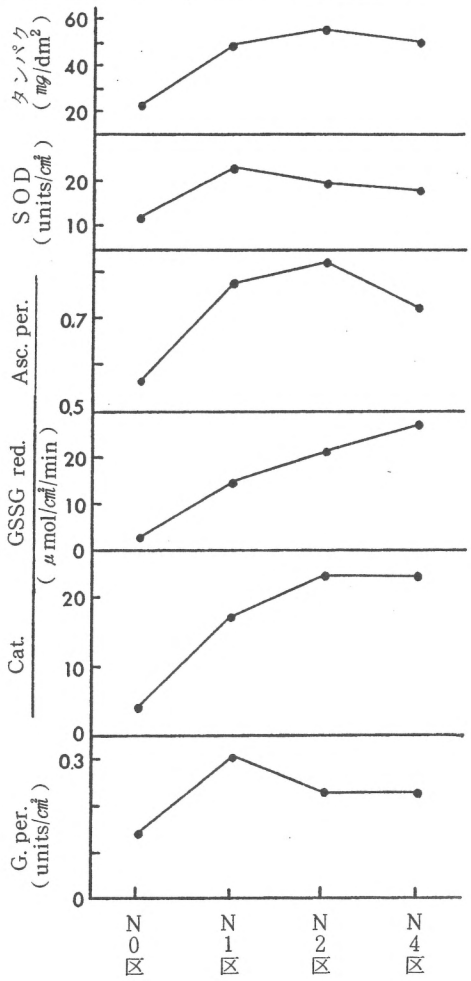
るとGSSG red.とCat.活性が高くなることは，2，4)，(2)と(3)で述べた低濃度オゾン長期間処理により抵抗性品種のGSSG red.とCat.活性が増大した現象と高濃度オゾン処理によりGSSG red.活性の著しい促進がみられたこととの関連が想定され，オゾン被害に対する軽減効果がこれら酵素活性の高揚によりもたらされたものと推察された。

2) 加里施用量および窒素，加里追肥による圃場試験

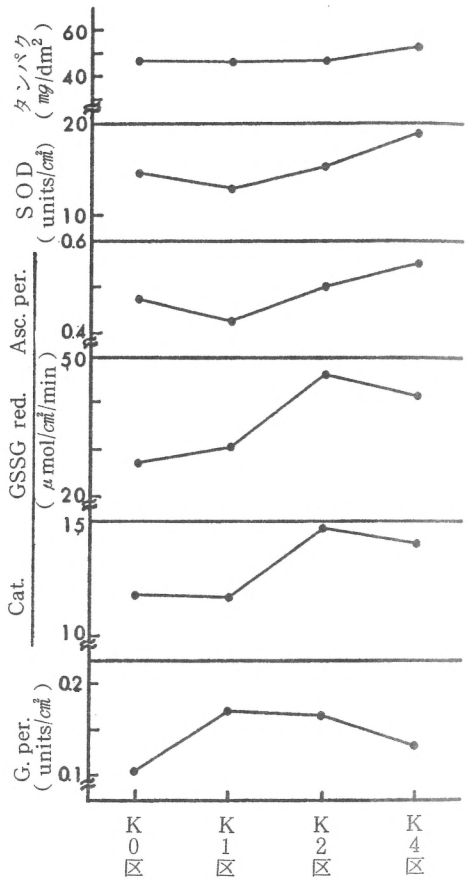
ポット試験の結果，各肥料成分を多施用するとオゾン被害が軽減できることが明かとなったので，これらの関係を圃場にて試験した。しかし，窒素の多施用は病害虫発生の要因になることやリン酸は火山灰土壌への吸着が多いこと，石灰はホウレンソウの場合多施用が慣行であり，過剰による生育阻害が出ることなどが想定されるので，元肥の施用量に関する圃場試験は加里についてのみ行った。一方，元肥の多施用は土壌中へ過剰の塩分を投入することになるので，少量を最も効果的な時期に追肥する方法を検討した。ホウレンソウは本葉が5，6枚の時期から急速に生長をはじめ株重が増加し，Oxに対する感受性も高くなることを1，3)で述べた。そこで生長を開始する直前に窒素あるいは加里，窒素と加里の両方の3種類の追肥を行い，野外で発生するOxによる被害の軽減について検討を行った。

〈材料および方法〉

(1)　加里施用量試験：元肥としてN，P_2O_5，K_2O（化成肥料8号）を各々16kg／10a施用した区を標準区とし，他は同量としK_2O（硫酸加里を加える）を32kg／10a施した区を2倍区，64kg／10a施した区を4倍区とし，2連制で行った。なお，炭酸石灰は247kg／10a施



図Ⅳ－26　窒素施用量試験区における葉内の活性酸素防御系酵素活性



図Ⅳ－27　加里施用量試験区における葉内の活性酸素防御系酵素活性

用した。品種はう城，日本在来，F_1深緑，タイタン，ビロフレイを用い，1985年5月2日に播種し，6月3，4，5日に発生したOx（O_3最高値は各々9，8，7pphm）による被害を6月6日に調査し，被害指数を求めた（写真Ⅳ－4）。

(2)　追肥試験：元肥としてN，P_2O_5，K_2Oを各々16kg／10a施した圃場にう城とF_1深緑を5月2日に播種し，収獲の約1週間前の5月28日に①N（硝安）8kg／10a ②K_2O（硫加）8kg／10a　③NとK_2O各々8kg／10aの3種類の追肥を2連制にて行った。Oxは6月6，7日（O_3最高値，各々7，10pphm）にも発生し，6月10日に被害の調査を行った。

〈結果および考察〉

(1)　加里施用量試験

図Ⅳ－28に5品種の加里施用量試験区の被害指数を示した。標準区の被害指数はう城が一番高く，次に日本在来，F_1深緑，タイタン，ビロフレイの順になり，Ox抵抗性に品種間差がみられた。K_2O2倍区では5品種とも標準区より被害が少なく，タイタンを除いてK_2O4倍区では2倍区よりもさらに減少した。すなわち，う城の4倍区の被害軽減率は66%，F_1深緑では57%，日本在来で39%，タイタンは39%，ビロフレイは55%となった。次に，被害指数を株ごとに0，1～5未満，5～10未満，10～20未満，20以上にわけて株数の割合を図Ⅳ－29に示した。タイタンを除く4品種の被害指数0の株割合は標準区，2倍区，4倍区の順に多くなり，被害指数の大きい株割合は逆に低下した。加里多施用は被害のない株数と軽い株数を増加させることがわかった。なお，生長量は3区間において差はみられなかった。