

酸性霧を主体とする複合ストレスに対する
モミ苗木の生理応答

名古屋大学大学院生命農学研究科

生物圏資源学専攻

森林環境資源学研究分野

吉 田 耕 治

2004 年度

名古屋大学図書



11504263

目 次

第 1 章	序論	1
1.1	酸性霧が樹木生理に及ぼす影響	1
1.1.1	酸性霧の発生メカニズムとその特性	1
1.1.2	酸性霧の樹木生理に及ぼす影響	3
1.1.2.1	個体レベルでの影響	4
1.1.2.2	葉面ワックスへの影響	4
1.1.2.3	樹木の養分状態への影響	5
1.1.2.4	クロロフィル, 光合成機能への影響	6
1.1.2.5	酸性霧ストレスに対する初期応答	8
1.1.3	酸性霧と他のストレスとの複合影響	8
1.2	丹沢山地大山地区におけるモミの枯損	10
1.3	本研究の目的	12
第 2 章	酸性霧を主体とする複合ストレスがモミ苗木のガス交換速度に及ぼす影響	13
2.1	緒言	13
2.2	材料と方法	14
2.2.1	植物材料と生育条件	14
2.2.2	酸性霧暴露	14
2.2.3	付加ストレス処理	15
2.2.3.1	乾燥処理	15
2.2.3.2	低温ストレス	16
2.2.3.3	細根切断ストレス	16

2.2.3.4	オゾン暴露	17
2.2.3.5	土壌酸性化及び窒素負荷	17
2.2.3.6	根圏アルミニウムストレス	17
2.2.4	ガス交換速度及びクロロフィル濃度の測定	18
2.2.5	土壌 pH 測定	19
2.2.6	統計解析	19
2.3	結果と考察	19
2.3.1	ガス交換速度の通年変化	19
2.3.2	気象要因による付加ストレスの影響（乾燥，低温，細根切断ストレス）	20
2.3.3	大気汚染要因による付加ストレスの影響 （オゾン暴露，土壌酸性化，窒素負荷根圏アルミニウムストレス）	22
2.4	まとめ	25
第 3 章	酸性霧と土壌酸性化・窒素負荷・根圏アルミニウムの複合ストレスが モミ苗木の養分状態に及ぼす影響	27
3.1	緒言	27
3.2	材料と方法	28
3.2.1	植物材料，生育条件，ストレス処理方法	28
3.2.2	土壌の養分状態	29
3.2.3	苗木の成長量，養分状態の測定	29
3.2.4	統計処理	29
3.3	結果	30
3.3.1	土壌酸性化・窒素負荷実験	30

3.3.2	根圏 AI ストレス実験	30
3.4	考察	31
3.4.1	土壌酸性化・窒素負荷実験	31
3.4.2	根圏 AI ストレス実験	33
3.5	まとめ	36
第 4 章	酸性霧と乾燥・オゾン暴露の複合ストレスがモミ苗木の活性酸素消去系 酵素活性に及ぼす影響	38
4.1	緒言	38
4.2	材料と方法	39
4.2.1	植物材料, 生育条件, ストレス処理方法	39
4.2.2	活性酸素消去系酵素活性の測定	39
4.2.3	統計処理	40
4.3	結果と考察	40
4.4	まとめ	43
第 5 章	長期酸性霧暴露が気孔開閉メカニズムに及ぼす影響	44
5.1	緒言	44
5.2	材料と方法	45
5.2.1	植物材料, 生育条件, 酸性霧暴露方法	45
5.2.2	ガス交換速度 (気孔コンダクタンス, 暗呼吸速度) の測定	45
5.2.3	走査型電子顕微鏡による葉面観察	45
5.2.4	養分状態の測定	46
5.2.5	アブシジン酸含量の分析	46

5.2.6 統計処理	47
5.3 結果	47
5.3.1 ガス交換速度	47
5.3.2 葉面状態	48
5.3.3 葉内 ABA, Ca, K 濃度	49
5.4 考察	49
5.5 まとめ	53
 第 6 章 総合考察	 54
6.1 酸性霧暴露がモミ苗木に及ぼす影響	54
6.2 大山地区におけるモミの枯損	59
6.3 結論	62
 摘要	 64
 謝辞	 68
 引用文献	 70
 図	 84
 表	 109

第 1 章 序論

1.1 酸性霧が樹木生理に及ぼす影響

1.1.1 酸性霧の発生メカニズムとその特性

大気汚染物質が樹木に及ぼす影響については、森林衰退の一因としての観点から、これまで数多くの調査研究がなされてきた。一口に大気汚染物質と言っても形態、構成する物質はさまざまである。ガスや粒子状物質による乾性沈着、雨による湿性沈着、オカルト沈着と呼ばれる霧や露など、汚染物質の降下の形態や、それらを構成する成分によって樹木に対する影響の程度やメカニズムは異なっている。酸性霧(さんせいぎり)は、降雨に比べて粒径が小さく、大気中の滞留時間が長いという特徴を持ち、酸性雨よりも地上部への直接影響が大きいと考えられる。また、特に日本では山岳地形が多いことから、霧そのものの発生する機会は非常に多く、山岳域の森林への影響が懸念されている。そこで 1.1 章では酸性霧の特性と現状について述べた後、酸性霧の樹木への影響について生理機能を中心にこれまで報告されている研究の成果を概説する。

まず本研究における霧の定義づけを行なうことにする。雲は高山において霧と認識されるため、霧水 (fog water) と雲水 (cloud water) を明確に分離できない。また、英語では霧の濃さによって fog, mist と区別されるが、いずれもここでは同一に扱うこととする。霧はその発生メカニズムから大きく分けて滑昇霧と放射霧に分類される。滑昇霧は、大気が山の斜面を上昇する時に断熱膨張によって冷却され、水分が凝結して発生する。放射霧は、地表面の放射冷却によって大気が冷却されて発生する。霧の半径は 10 μm , 霧水量は $0.02 - 0.2 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-3}$ (Seinfeld, 1986) 程度とされ、液滴径が小さい分大気中での滞留時間が長く、また単位体積あたりの表面積が大きい。加えて大気汚染物質の発生量が多い地表面付近で発生することから、汚染物質を吸収しやすく、雨よりも大気汚染物質濃度が高くなる (井川, 1992; 村野, 1993)。

霧は主に硝酸、硫酸、塩化水素の存在によって酸性化する。硝酸、硫酸はそれぞれ

化石燃料の燃焼などで生じた窒素酸化物 (NO_x), 硫黄酸化物 (SO_x) を由来とし, これらを一次汚染物質と呼ぶ。窒素酸化物は, 過酸化水素やオゾンなどの酸化性物質と大気中で反応して硝酸を生じ(気相反応), これが霧水に溶解する。硫黄酸化物は気相反応のほか, 酸化性物質と霧水中で反応して硫酸を生じる(液相反応)。酸化性物質は主に光化学反応によって生成され, 霧の酸性化に大きく寄与している (原, 1997)。このような過程で生成した硝酸, 硫酸を二次汚染物質と呼ぶ。塩化水素の生成要因としては, 霧水中での硫酸, 硝酸と海塩との反応 (角脇, 1980) や塩素化合物の焼却 (谷川, 1990) で発生したものが霧に取り込まれることが考えられる。

日本における SO_x の排出量は, 石油の脱硫や排煙脱硫といった改善策により大幅に減少した。しかし, NO_x の排出量は, 石油の脱硫のような予防策が取れないことや, 最も大きな排出源である大型貨物自動車の改善が進まないことから, 横ばいの状態となっている。また, 農業や畜産が主な起源と考えられるアンモニアガスは, 霧水の酸性化を抑制する効果大きい (井川, 1992)。その一方で, アンモニウムイオンとして地表面への窒素沈着量が増加し, 土壌中でのアンモニウムイオンの硝化が起こった場合は, それにより生じた水素イオンが土壌の酸性化を引き起こす (村野, 1993; 伊豆田, 2001)。さらに, 硝酸イオンやアンモニウムイオンの沈着量の増加による地表面の窒素飽和も懸念されている (伊豆田, 2001)。

これまでに, 日本国内では各地で酸性霧が観測されている (図 1-1)。神奈川県西部, 丹沢山地の大山では, 局地的な塩化水素ガスの汚染由来と考えられる塩酸を主成分とする pH 1.95 の霧が1994年に観測された (森ら, 1997)。これはやや特殊なケースであるが, この大山では pH 3 を下回る酸性霧が頻繁に観測され, 主に硝酸がその酸性度の上昇に大きく寄与している (井川ら, 1991; Igawa et al., 1998)。酸性霧の発生は大山のような大都市圏に隣接する地域だけとは限らず, 関東地方を例に挙げれば, 周辺山岳部の赤城山 (池田ら, 1995) でも酸性霧が観測されている。関東平野で発生した二次汚染物質は長距離輸送され, 中部山岳地域にまで至ることもある (Kurita et al., 1990)。このように長

距離輸送された汚染物質が、近傍に汚染源のない内陸地域における霧の酸性化に寄与していると考えられている(栗田, 1989)。また、一般に SO_x は NO_x よりも寿命が長く、そのままの形で遠方まで輸送される。夏期の山岳地域では SO_x 濃度に比べて過酸化物質濃度が高く、十分な酸化性物質が存在する状態になることから、山岳地域での硫酸の生成が促進されることが、中部山岳地域の乗鞍岳における観測で指摘されている(Watanabe et al., 1995; Watanabe et al., 2001)。

霧の酸性化の原因となる大気汚染物質には無機化合物だけでなく、有機化合物も含まれている。有機化合物も無機化合物同様、長距離輸送されことや、光化学反応を受けて様々な二次汚染物質を生じることが知られている(Satsumabayashi et al., 1989; Satsumabayashi et al., 1990)。このような有機化合物の中で、ギ酸、酢酸、シュウ酸といった有機酸は含有量が比較的多く、霧の酸性化に寄与している(松本, 1988; 佐久川ら, 1995; Watanabe et al., 1999)。また、反応性が高く植物影響が大きいと考えられるアルデヒド類も霧水中から見出されている(片桐ら, 1994; Hosono et al., 1994)。

酸性霧が観測されている地域ではしばしば樹木の衰退現象が見られ、その関連性が示唆されている(村野, 1994)。それらの原因を解明するため、あるいは今後起こり得る衰退を防止するためには、さまざまなストレスに対する感受性の樹種間差異を考慮しつつ、酸性霧をはじめとする個々のストレスが樹木に及ぼす影響のメカニズムを明らかにする必要がある。

1.1.2 酸性霧の樹木生理に及ぼす単独影響

これまで、針葉樹を中心に様々な樹種に対する酸性霧の単独影響について報告されている。以下、作用点や実験系ごとに樹種間の感受性の差異、暴露した酸性霧の成分組成を比較しながら述べる。

1.1.2.1 個体レベルでの影響

個体レベルでの酸性霧の影響は、可視障害の有無や成長量、乾物重量などによる比較によって評価されている (Kim, 1989; Futai and Harashima, 1990; Heller et al., 1995; Leith et al., 1995; Sheppard et al., 1995; Kim and Um, 1996; Igawa et al., 1997; Matsumura, 2001 など)。Leith et al. (1995) は、red spruce (*Picea rubens* Sarg.) の一年生苗木に対して水素イオン、アンモニウムイオン、硫酸イオン、硝酸イオンの組成比を変えた6種類の霧を地上部と土壌表面に暴露した。1.6 mol/m³ 硫酸 (pH 2.5) では4回目の暴露で、1.6 mol/m³ 硫酸+1.6 mol/m³ 硝酸アンモニウム (pH 2.5) では24回目の暴露で可視障害が発生したことから、アンモニウムイオンまたは硝酸イオンには硫酸の影響を抑制する作用があることが示唆された。このことから、酸性度の上昇は可視障害の誘導要因であるが、酸性霧の構成成分によってその影響が異なることが考えられる。Heller et al. (1995) は、硫酸、硝酸のそれぞれ pH 2.85 の霧を2年生の red spruce に暴露し、暴露後に霧水が葉面で乾く場合と脱イオン水で洗浄される場合を比較検討した。その結果、酸性霧の暴露は頂芽の伸長量には影響しなかった。一方、脱イオン水で洗浄される場合は可視障害が発生しなかったのに対し、葉面上で霧水が乾く場合は可視障害が発生し、針葉の乾重が減少した。このことは、酸性霧の組成だけでなく、暴露後の挙動も植物に影響を及ぼす大きな要因であることを示している。

1.1.2.2 葉面ワックスへの影響

酸性霧に限らず大気汚染物質が葉面に沈着すると、クチクラワックスの中でも最外層に存在するエピクチクラワックスの流亡・変質が起こる (佐瀬・高松, 2000)。クチクラワックスは葉面を保護する役割を持っているが、これが破壊されると、病虫害や微生物に対する抵抗力の低下、クチクラ蒸散の促進、栄養塩類の流出、紫外線に対する防御力の低下が起こる。これらの影響は樹木衰退につながることを指摘されている (Turunen and Huttunen, 1990)。Igawa et al. (1997) は、モミ (*Abies firma* Sieb. et Zucc.) 苗木に硝酸、塩化ナトリ

ウム、硫酸アンモニウムで調製した pH 3 の人工酸性霧の暴露を行い、その影響として、針葉の枯損や樹高の低下だけでなく、気孔及びクチクラからの蒸散速度が上昇することを観察した。Mengel et al. (1989) は、pH 3 の酸性霧の暴露でドイツウヒ (*Picea abies* (L.) Karst) のエピクチクラワックスの分解が生じることを明らかにした。エピクチクラワックスの劣化の指標として濡れ性 (wettability) の評価がある。この評価法は、葉面に水滴を滴下し、水滴と葉面の接触角を測定するものであり、ワックスの結晶構造が変質するにつれて葉面の親水性が増し、接触角が低下、すなわち濡れ性が上昇することになる (佐瀬・高松, 2000)。Percy et al. (1992) は、red spruce に対して酸性霧の暴露を行い、その結果、酸性霧暴露によって葉面の濡れ性が増大したと報告している。人工酸性雨の暴露実験においても、モミ (伊豆田ら, 1993), ウラジロモミ (*Abies homolepis* Sieb. et Zucc.; 松村ら, 1995) で暗条件下における蒸散速度の促進が観察され、その要因の一つとして、エピクチクラワックスの分解の可能性が指摘されている。

1.1.2.3 樹木の養分状態への影響

大気からの硝酸イオンやアンモニウムイオンの降下は、森林生態系への窒素負荷要因のひとつであり (大河内ら, 1993), これらの負荷量の増加は樹木の養分バランスの崩れを引き起こすなど、窒素の過剰害が生じることが指摘されている (伊豆田, 2001)。しかし、酸性霧に含まれる窒素の負荷の影響について検討した報告はわずかである。中川 (2002) は、霧水中の窒素濃度を 3 meq/l, 24 meq/l に設定し、それぞれ pH を 2.0 - 6.5 に変化させた酸性霧を 3 年生のスギ (*Cryptomeria japonica*) 苗木に暴露した。その結果、窒素濃度 3 meq/l ではいずれの霧水の pH でも可視障害がみられなかったのに対し、窒素濃度 24 meq/l では pH 3.0 - 4.5 の範囲で茎頂先端部の可視障害が観察され、葉内の硝酸イオン、アンモニウムイオン濃度の上昇や、これらのイオンに含まれる窒素分と葉内の Mg, Ca 濃度との比 (N/Mg, N/Ca) の著しい上昇が見られた。

酸性霧の負荷が長期にわたった場合、土壌が酸性化し、土壌溶液中へのアルミニウム

の溶出を招く。酸性霧やアルミニウムは植物の生理機能や養分状態を制限する重要な要因であるが (Schaberg et al., 2000; 伊豆田ら, 2001), これらの複合ストレスが樹木に及ぼす影響について検討した研究は少ない。Schaberg et al. (2000) は, red spruce の苗木を用いて, 地上部への pH 3 の酸性霧暴露と, 土壌へのカルシウム, アルミニウム処理を行う複合ストレス実験を行った。処理後の苗木の養分状態を解析したところ, pH 5 では, Al 濃度 0 μM に比べて 200 μM で葉中の Ca, Mg, P, Zn 濃度が低下するのに対し, pH 3 ではそれらの濃度低下が緩和された。また, 酸性霧の単独処理では葉からの Al, Ca, Fe, Mg, Mn, P, Zn の溶脱の促進が観察された。さらに, 膜結合性 Ca 濃度, 低温耐性, 膜の安定性の低下がみられたが, これらは溶脱による Ca の損失の結果によると示唆している。Schaberg et al. (2000) はまた, 酸性霧暴露による red spruce 葉内の Fe, K 濃度の上昇を観察し, これは土壌への霧水の滴下によって, 土壌中のこれらの元素の利用性が向上した結果であるとしている。酸性の霧水による土壌溶液中への溶解度の上昇に伴う Fe, Mn の葉中濃度の上昇が酸性霧のみを暴露した Jeffrey pine (*Pinus jeffreyi*) においても観察されている (Westman and Temple, 1989)。

一方, 切り枝を用いた酸性霧暴露実験として Igawa et al. (2002b) は, モミの切り枝に硝酸, 塩酸, 硫酸で調製した人工酸性霧を暴露させたところ, ホウ素と酸性糖が溶脱することを明らかにし, 酸性霧によるホウ素の欠乏がモミの衰退要因として重要であることを指摘している。

1.1.2.4 クロロフィル, 光合成機能への影響

酸性霧が樹木の葉内成分に及ぼす影響に関する報告は比較的限られているが, その多くはクロロフィル濃度についてのものである (Westman and Temple, 1989; Kim, 1989; Eamus and Fowler, 1990; Kim and Um, 1996)。Kim and Um (1996) は, *Ligustrum obtusifolium*, *Cercis chinensis*, *Hibiscus syriacus*, *Sophora japonica* の広葉樹 4 種に対して pH 2.5, 3.5, 4.5, 6.5 の霧を暴露し, クロロフィル濃度の変化を観察した。その結果, 6月

上旬の測定では *H. syriacus* のクロロフィル濃度が pH 2.5 区で最高となり、8 月下旬の測定では *L. obtusifolium* のクロロフィル濃度が pH 2.5 区で最高となり、他の樹種では pH 6.5 区で最高となった。これらの結果から、酸性霧暴露によるクロロフィル濃度の変化は樹種によって異なる挙動を示すことが示された。Westman and Temple (1989) は、Jeffrey pine 及び giant sequoia (*Sequoiadendron gigantea*) への pH 2.0, 2.7, 3.4, 4.1 の酸性霧の暴露を行なったところ、giant sequoia では変化がなかったのに対し、Jeffrey pine ではクロロフィル b 濃度が低下し、カロチノイド濃度が上昇することを明らかにした。Eamus and Fowler (1990) は、2 年生の red spruce に対して硫酸アンモニウムと硝酸で調製した pH 2.5 と 5.0 の霧を暴露し、クロロフィル濃度、葉面積あたりの光合成速度、気孔コンダクタンスを測定した。その結果、クロロフィル濃度、飽和光下における光合成速度、二酸化炭素飽和下における光合成速度、量子収率はいずれも pH 5.0 よりも pH 2.5 の霧暴露で上昇が観察され、酸性霧はクロロフィル量の増加させることで集光能力が増加し、red spruce の光合成機能を変化させたと指摘している。しかし、単位クロロフィル量あたりでは飽和光下における光合成速度、二酸化炭素飽和下における光合成速度は低下することも報告している。一方、Taylor et al. (1986) は、1 年生の red spruce に、実際に観測された霧水の組成に基づいて調製した pH 3.6 の酸性霧を暴露したが、光合成速度への影響はなかったと報告している。

酸性雨の暴露が蒸散速度や気孔開度に及ぼす影響について言及したいくつかの研究では、蒸散速度の上昇が観察されている。その理由として、前述したエピクチクラワックスの流亡・変質のほかに、気孔閉鎖機能の障害が推察されている (Adams et al., 1984; 伊豆田ら, 1993; 渡辺ら, 1999)。草本植物 *Artemisia tilesii* Ledeb. に対して酸性雨を暴露させた Adams et al. (1984) の報告によれば、酸性雨で障害を受けた表皮細胞に囲まれているか、あるいは接している気孔が開いたままになったことが観察されている。このような現象は酸性霧の暴露でも起きる可能性がある。

1.1.2.5 酸性霧ストレスに対する初期応答

植物が大気汚染物質によるストレスを受けたときの初期応答作用として、エチレンの放出 (Mehlhorn and Wellburn, 1987; Meyer et al, 1987) や、活性酸素消去系酵素活性の上昇 (Tanaka and Sugahara, 1980; Jung et al., 1994) が起こることが知られている。これらをもとに酸性霧でも同様の研究が行われている (Takenaka et al., 1996; Ogawa et al., 1998; Tezuka et al., 1998)。Takenaka et al. (1996) はそれぞれ一年生のヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.), スギに対して硫酸の希釈倍率を変えた pH 2, pH 4 の酸性霧を 180 ml 暴露し、暴露後のエチレン放出量を測定したところ、ヒノキ、スギともに pH 2 の酸性霧暴露でエチレン放出量が増加し、pH 4 では変化しないことを明らかにした。Ogawa et al. (1998) は、1.0 または 0.1 meq L⁻¹ の硫酸 (pH 3.0, 4.0), ギ酸 (pH 3.4, 4.2), 酢酸 (pH 3.9, 4.5) の酸性霧をヒノキの切り枝に処理し、活性酸素消去系酵素活性の応答を比較検討した。その結果、いずれの酸処理においてもスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の活性が高まり、特に硫酸よりもギ酸、酢酸の方が SOD, アスコルビン酸パーオキシターゼ (APX) の活性が上昇したと報告している。すなわち、酸性霧が葉面に直接付着した際の初期応答に活性酸素が関わっていることが明らかとなった。また、Tezuka et al. (1998) も同様に、オオシラビソ (*Abies mariesii* Mast.) の切り枝に 1.0 meq L⁻¹ の硫酸、塩酸、ギ酸、酢酸の酸性霧をそれぞれ暴露させ、SOD 活性はギ酸 > 酢酸 = 塩酸 > 硫酸、APX 活性はギ酸 = 酢酸 > 塩酸 = 硫酸となり、ギ酸、酢酸の方が硫酸よりも SOD, APX 活性が上昇することを明らかにした。これらの結果から、同濃度の無機酸と有機酸で比較した場合、有機酸の方が pH が高いにもかかわらずその植物に対する影響が大きいことが示唆されている。

1.1.3 酸性霧と他のストレスとの複合影響

酸性霧と、他のストレスとの複合影響については以下のような研究が報告されている。

酸性霧は窒素負荷要因の一つであるが、夏期や秋期に特にカリウムが制限された状

態で窒素が負荷されると、針葉樹の耐凍性の低下を招く (Puempel et al., 1975; Nihlgard, 1985)。この観点から、酸性霧が針葉樹の耐凍性に及ぼす影響が調べられている (Fowler et al., 1989; Eamus and Murray, 1993; Sheppard et al., 1993a; Sheppard et al., 1993b; Sheppard et al., 1998)。Sheppard et al. (1998) は、酸性霧を硫酸イオン、アンモニウムイオン、硝酸イオンの組み合わせ、土壌酸性化の有無、暴露頻度、pH などを変えてドイツウヒに暴露し、電解質溶出を指標としてこれらの影響を調べた。それによれば、硫酸イオンを含む場合か、あるいは土壌酸性化がなく、低 pH の酸性霧を高頻度で暴露した場合で耐凍性の有意な低下が観察された。

酸性降下物によって葉面ワックスの流亡や変質を起こした樹木は、乾燥に対する感受性が増大することが考えられる。酸性霧と乾燥の複合ストレス実験として、Esch and Mengel (1998) の報告がある。彼らは5年生のドイツウヒに対して硫酸と硝酸を 2:1 で混合した pH 3 と pH 5 の霧を、土壌が酸性化されないよう暴露時にプラスチックシートで覆いながら 10 週間暴露し、その後春季に土壌を -2°C に保つ方法で根からの水分吸収を6週間抑制した。その結果、凍結による乾燥ストレスは霧の pH に関係なく気孔のほぼ完全な閉鎖を引き起こし、蒸散速度、純光合成速度を低下させた。一方、酸性霧と乾燥の複合ストレスにより膨圧が低下したことから、酸性霧が乾燥ストレスを強めることが明らかになった。この原因として、酸性霧の暴露でエピクチクラワックスの崩壊がみられたことから、クチクラ蒸散の増加が示唆された。

他の気象要因との複合ストレス実験としては、風の影響を検討した Hoad et al. (1998) の報告がある。3年生の birch (*Betula pubescens* Ehrh.) に対し、3段階の風(直接風、間接風、無風)と3段階の pH の霧 (pH 3, 5, 7) を組み合わせた処理を行なったところ、無風では葉の可視障害やクチクラの損傷がわずかで、霧の pH による差は見られなかったのに対し、葉の可視障害は間接風と pH 3 酸性霧の組み合わせで、クチクラコンダクタンス、クチクラの損傷は直接風と pH 3 酸性霧の組み合わせで最大となることが観察された。

一方、酸性霧とオゾンや酸性雨など他の大気汚染物質の複合ストレスによる影響につ

いての報告もされている (Kim, 1989; Westman and Temple, 1989; Barnes et al., 1990a; Barnes et al., 1990b; McLaughlin et al., 1993; Matsumura, 2001)。Matsumura (2001) は木本 14 種の苗木に対する pH 3 の人工酸性霧とオゾンを含む外気の複合暴露を行い、乾物成長量に及ぼす影響を検討した。1993 年から 1995 年まで暴露を行った結果、酸性霧の単独暴露はアカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.), クロマツ (*Pinus thunbergii* Parl), カラマツ (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.), モミ, シラビソ (*Abies veitchii* Lind.), ヒノキ, スギ, ドロノキ (*Populus maximowiczii* Henry), シラカンバ (*Betula platyphylla* Sukatchev var. *japonica*), ブナ (*Fagus crenata* Blume), ケヤキ (*Zelkova serrata* Makino) の乾物成長量を増加させ、ドイツトウヒ, ウラジロモミ, ミズナラ (*Quercus mongolica* Fisch, var. *grosseserrata*) には影響しなかった。一方、オゾンと酸性霧の複合影響によってシラビソ, ブナの乾物成長量の低下が促進された。

1.2 丹沢山地大山地区におけるモミの枯損

丹沢山地は神奈川県北西部に位置する山塊であり、最も高い蛭ヶ岳 (標高 1672 m) を中心に面積は 4 万 ha を有する。その山地の東端に位置するのが大山 (おおやま, 標高 1252 m) であり、東京の南西 50 km に位置し、首都圏に最も近い山の一つであることから、関東平野や相模湾からもその姿を認めることができる。大山は別名雨降山 (あめふりやま) と呼ばれ、その中腹には大山阿夫利 (あふり) 神社下社、山頂には上社が置かれ、1200 年以上にわたって信仰の山として親しまれている。

大山はまた、モミ (*Abies firma* Sieb. et Zucc.) の原生林でも有名である。モミは大山の南東斜面の標高がおよそ 400-1000 m の範囲に約 100 ha にわたって生育し、上層木の樹高は 16-26 m、胸高直径は 50-90 cm、樹齢が 200-250 年前後と老齢化している (鈴木, 1992)。1960 年代、急速なモミの枯損がこの大山で発生した。神奈川県 (1994) が行なった航空写真を用いた枯損状況の調査によれば、1954 年の時点では高齢化したモミの自然な枯死のみが見られたのに対し、1964 年には新たな枯損木が 1954 年のおよそ 3 倍に

達した。1969 年をピークとして枯損木の発生は減少し、1980 年代以降は急速枯損から慢性衰弱的な枯死が見られるようになっている。鈴木 (1992) は、モミの年輪幅と各種気象要因の変動傾向とを比較検討したものの、気象要因だけではモミの急速な枯損を説明するのは困難であるとしている。1960 年代には、大山のモミだけでなく、関東圏周辺でスギ枯れも観察されている (茨城県林業試験場, 1969; 山家, 1978)。横堀 (1981) はアカマツの着葉量の変化と二酸化硫黄 (SO_2) の経年変化とがよく対応していると報告している。この大山の南東斜面は東京、横浜、川崎といった特に人口が集中し、重工業が集積する京浜工業地帯に面している。神奈川県内から排出された SO_x 量は 1965 年に最大となり、その量は 39 万 7 千 t に及ぶと推計されている (神奈川県, 1994)。また、京浜工業地帯で発生した大気汚染物質は相模湾に移流した後、光化学反応を起こしながら海風により神奈川県の西部へ輸送されることが示されている (相原ら, 1982)。以上のことから、1960 年代に発生したこのモミの枯損は、その当時頻繁に観測されていた高濃度の SO_x によるものと考えられている (Sakata and Suzuki, 2000)。しかしながら、 SO_x による大気汚染は、硫黄分の高い石炭・石油から低硫黄の石油に転換されたことや、脱硫装置の設置により改善されたものの、緩慢なモミの衰退は依然として観察されている。大山では酸性度の高い霧が頻繁に観測され (井川ら, 1991)、大山阿夫利神社における pH 3 を下回る酸性霧の年間発生時間は約 120 時間に及ぶ (Igawa et al., 1998, 2001)。さらに、1994 年には pH 1.95 の霧が観測されている (森ら, 1997)。従って、現在見られるモミの緩慢な衰退に酸性霧が関与している可能性が示唆されている (井川, 1992)。大山地区ではまた、 NO_x 、 SO_2 濃度は都市部よりも低濃度であるが、 O_3 濃度は都市部と同程度であり (Nakatani et al., 2004)、酸性霧やオゾンとモミの樹勢の低下との関連が疑われている (井川, 1992)。さらに大山地区では、大気汚染物質による土壌の酸性化や窒素飽和が進行していることが報告されている (Okochi and Igawa, 2001)。

この大山でのモミ衰退に関して、酸性降下物がモミに及ぼす影響についての報告がされている (伊豆田ら, 1993; Igawa et al., 1997; Igawa et al., 2002a; Igawa et al., 2002b)。

伊豆田ら (1993) は硫酸と硝酸で調製した酸性雨を 30 日間モミ苗木に暴露し、酸性雨の pH が 2.0 の場合は葉面に可視障害が発生し、pH が 3.0 かそれ以上の場合は乾物成長量が低下すると報告している。Igawa et al. (1997) は、モミに硝酸、塩化ナトリウム、硫酸アンモニウムで組成した pH 3 の酸性霧を 30 ヶ月暴露し、針葉の現存量の低下、苗木の成長量の低下をもたらすことを報告している。しかし、現在までに大山でのモミの衰退のメカニズムは明らかにされていない。これは、酸性降下物による影響だけでなく、他の環境要因も関連していると考えられるからである。苗木を用いたポット実験においても、大気汚染物質と環境要因の複合ストレスに対するモミの生理応答については、これまでに検討されていない。

1.3 本研究の目的

モミの衰退のメカニズムを明らかにするためには、衰退地におけるモミの生理状態を把握するだけでなく、コントロールされた実験条件下でのモミのさまざまなストレスに対する応答を生理・生化学的に検討することも重要である。特に長期の大気汚染物質によるストレス下での、他のストレスに対する生理応答を検討することは意義深い。本研究では、大山におけるモミの衰退メカニズムを明らかにすることを最終目的として、長期酸性霧暴露を主体とするさまざまな複合ストレスがモミ苗木の生理活性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

本研究の特色としては、①暴露する霧の組成は、この実験の背景となっている丹沢山地の大山地区で観測された霧の組成を参考にし、無機酸だけでなく、有機酸（ギ酸、酢酸）を添加したこと、②酸性霧の暴露に、自然条件下で起こり得る化学的、物理的ストレスを付加したこと、③酸性霧暴露は穏和な条件に設定し、約 5 年と長期にわたって行なったことが挙げられる。

第2章 酸性霧を主体とする複合ストレスがモミ苗木のガス交換速度に及ぼす影響

2.1 緒言

蒸散や光合成などのガス交換は植物が生育する上で基本となるものであり、その活性の変化はエネルギー生産、物質生産、代謝など、植物生理のあらゆる方面に影響を及ぼすと考えられる。従って、ガス交換速度の測定は、ストレス下に置かれた植物の生理活性の変化を把握する上で非常に有用である。一方、第1章で述べたように、丹沢山地の大山ではモミの緩慢な衰退が見られ、酸性度の高い霧と他の環境要因との関わりがその原因として考えられる。そこで本実験ではモミ苗木に対する長期酸性霧暴露を主体とするさまざまな複合ストレス実験を行い、ガス交換速度(蒸散速度、気孔コンダクタンス、純光合成速度)を中心にその影響を明らかにすることを目的とした。

本実験では、モミ苗木に長期間酸性霧 (pH 3) を暴露し、その上で7種の付加ストレス(乾燥、低温、細根切断、オゾン暴露、土壤酸性化、土壤窒素負荷、根圏アルミニウム処理)を与えた。乾燥ストレスは厳冬期、盛夏期の少雨傾向を、低温ストレスは植物の耐凍性が失われる春先の冷え込み(いわゆる寒の戻り)を、細根切断ストレスは、台風などの強風で樹木が揺り動かさせられる状態を想定したものである。一方、オゾン暴露、土壤酸性化、土壤窒素負荷、根圏アルミニウム処理はいずれも大気汚染物質による影響を考慮したものである。大山では 60 ppb を越える高い濃度のオゾンが頻繁に観測されているほか(神奈川県, 1994)、酸性降下物による土壤の酸性化や、特に窒素酸化物による森林への窒素の負荷が指摘されている(Okochi and Igawa, 2001)。また、一般に土壤への酸性降下物の負荷が進むと、土壤鉱物中のアルミニウムが土壤溶液中へ溶出することが指摘されている(Izuta, 1998)。これらの処理を行った後、ガス交換速度をすべての付加ストレス実験で測定し、加えて一部の処理ではクロロフィル濃度も測定した。

本実験で暴露した霧水は、1998年に筆者らが大山で測定したものを参考にし、有機酸を添加した。有機酸は山岳地帯の霧水で頻繁に観測され(Watanabe et al., 1999)、植物の代謝物質

でもあることから、植物の生理機能に影響を及ぼすことが考えられる。Ogawa et al. (1998) 及び Tezuka et al. (1998) によれば、有機酸は無機酸に比べてより強いストレス応答を引き起こす。本研究は有機酸を含んだ長期の酸性霧暴露がモミに及ぼす影響を明かにするという点が特徴的である。

2.2 材料と方法

2.2.1 植物材料と生育条件

3年生のモミ苗木 (*Abies firma* Sieb. et Zucc.) 200 個体を、1/2000 アールワグネルポット (藤本科学工業, 容積 13L) に赤玉土と腐葉土を 1:2 の割合で混合した土壌を用いて植栽した。植栽は 1999 年 4 月中旬に行った。苗木は名古屋大学構内のビニールハウス内で生育させ、自動灌水装置を用いて夏場には 450 ml, 冬場には 50 ml の井水を投与した。ビニールハウス内の温湿度は 15 分おきに自動的に測定、記録した。1999 年 5 月から 2000 年 8 月までの平均温度、湿度はそれぞれ 18.6°C, 73.8%であった。

2.2.2 酸性霧暴露

用意したモミ苗木 200 個体のうち、100 個体に対しては 1999 年 7 月 14 日より pH 3 の酸性霧を暴露した。残る 100 個体に対しては何も処理を行なわなかった。酸性霧の組成は、筆者が大山で観測した霧水の組成(未発表データ)を参考にして、以下のように調製した (μM); Cl^- (300), NO_3^- (600), SO_4^{2-} (275), Ca^{2+} (25), K^+ (50), Mg^{2+} (25), Na^+ (100), NH_4^+ (200), acetic acid (25) and formic acid (25)。酸性霧の暴露は、木枠とビニールシートからなるチャンバー (60 × 60 × 90 cm high) に苗木を 4 個体入れ、超音波式加湿器 (UV-G45S, 日立製作所) を用いて一週間に 2 回、10 分間ずつ行なった (図 2-1)。山岳域で発生する滑昇霧は午後に発生しやすいことから、午後 2 時から 5 時の間に暴露を行った。暴露した霧水の量はチャンバーあたり 60 ml とした。暴露の際には、土壌に滴下した霧水による土壌酸性化を防ぐため、土壌表面をポリエチレン製ビニールシートで覆った。この実験では、酸性霧暴露処理を F 処理区または F 区、コントロール区を C

処理区または C 区と表記する。

2.2.3 付加ストレス処理

本実験で行なった付加ストレスそれぞれの処理期間を図 2-2 に示す。

2.2.3.1 乾燥処理

乾燥処理は 1999 年 11 月から 2000 年 1 月, 2000 年 8 月, 2000 年 12 月から 2001 年 3 月の合計 3 期間にわたって行なった。以後これらをそれぞれ 99 冬処理, 00 夏処理, 00 冬処理と表記する。

99 冬処理では, 1999 年 11 月 4 日から 2000 年 1 月 19 日まで苗木への灌水を停止した。酸性霧の有無, 乾燥処理の有無の組合わせで 4 処理区 (各 8 個体) を設け, 以下酸性霧と乾燥の複合ストレスを FD1 区, 乾燥ストレスのみを D1 区, 酸性霧暴露のみを F 区, コントロールを C 区とそれぞれ表記する。00 夏処理では, 99 冬処理で乾燥ストレスを与えた FD1 区, D1 区の各 8 個体に再度処理を行なったほか, F 区, C 区からそれぞれ 8 個体を選び, 新規に処理を行なった。この実験では, 2 回目の乾燥ストレスとなる酸性霧暴露個体群を FD2, 2 回目の乾燥ストレスとなるコントロール個体群を D2, 新規に乾燥処理を行なう酸性霧暴露個体群を FD'1, 新規に乾燥処理を行なうコントロール個体群を D'1, 酸性霧暴露のみを F 区, コントロールを C 区とそれぞれ表記する。この処理では 2000 年 8 月 1 日から 2000 年 8 月 31 日まで苗木への灌水を停止した。00 冬処理では, 99 冬処理, 00 夏処理で乾燥ストレスを与えた 4 つの個体群に再度処理を行なった。この実験では, 3 回目の乾燥ストレスとなる酸性霧暴露個体群を FD3, 3 回目の乾燥ストレスとなるコントロール個体群を D3, 2 回目の乾燥ストレスとなる酸性霧暴露個体群を FD'2, 2 回目の乾燥ストレスとなるコントロール個体群を D'2, 酸性霧暴露のみを F 区, コントロールを C 区とそれぞれ表記する。この処理では 2000 年 12 月 27 日から 2001 年 3 月 14 日まで苗木への灌水を停止した。いずれの処理においても, 酸性霧暴露は乾燥処理終了後まで継続して行った。処理期間中, ガス交換速度は 2-3 日おきに測定した。乾燥処理終了は, 乾燥処理群の蒸散速度

が乾燥処理を行なわない処理群の 50%以下となった時点とした。

2.2.3.2 低温ストレス

酸性霧暴露開始 8 ヶ月後となる 2000 年 3 月, F 区, C 区のそれぞれ 8 個体を名古屋大学農学部附属演習林 (愛知県稲武町, 標高約 1000 m) に移動させた。これらの苗木は移動後に酸性霧暴露は行なわず, 1 ヶ月間馴化させた。4 月 10 日に F 区, C 区のそれぞれ 4 個体に対し, 大型冷凍庫 (RS-60C, 日立製作所) を用いて低温ストレス処理を行なった。温度低下を緩慢にさせるため, あらかじめ冷凍庫にスタイロフォーム[®](ダウ化工)の内張りを施した。また, ワグネルポットの外側に断熱材を巻き, 土壌の凍結を防いだ。凍害は光条件下でより深刻となるため (Powles, et al., 1983), 処理は暗黒下で行なった。この実験では, 室温 (12°C) から -5°C まで温度を低下させ, 温度低下速度は約 4.8°C/h であった。処理直後にガス交換速度を測定した。以後酸性霧と低温の複合ストレスを FL 区, 低温ストレスのみを L 区, 酸性霧暴露のみを F 区, コントロールを C 区とそれぞれ表記する。各処理区とも繰り返し数は 4 個体である。

2.2.3.3 細根切断ストレス

細根切断ストレスは台風などによって樹木が揺り動かさせられることによって生じる。そのため, 酸性霧暴露開始 15 ヶ月後となる 2000 年 10 月 19 日に処理を行なった。F 区, C 区から無作為にそれぞれ 8 個体を選び, 苗木を土から掘り出して水道水を使って根を丁寧に洗浄した。このうち, F 区の 4 個体と C 区の 4 個体については細根 (直径 1 mm 以下) を半量切断し, もともと生育していた土壌を使って再びポットに植栽した。残る F 区の 4 個体と C 区の 4 個体は, 細根を切断せずにもともと生育していた土壌を使って再びポットに植栽した。以後この実験の処理区を, それぞれ酸性霧と細根切断の複合ストレスを FR 区, 細根切断ストレスのみを R 区, 酸性霧暴露のみを F 区, コントロールを C 区と表記する。

2.2.3.4 オゾン暴露

酸性霧暴露開始 13 ヶ月後となる 2000 年 8 月 10 日及び 22 日に、F 区の 8 個体と C 区の 8 個体に対してオゾン暴露した。オゾンの暴露は、木枠とビニールシートからなるチャンバー (112 × 70 × 70 cm high) に苗木を 8 個体入れ、オゾン発生装置 (日本動物薬品) を用いて 60 分間ずつ行なった。暴露したオゾン濃度は外気よりも 100-150 ppb 高い濃度であった。チャンバーにファンを設け、オゾン濃度が均一になるようにした。暴露は正午から午後 3 時の間に行った。酸性霧暴露は処理終了時まで継続して行なった。以後この実験の処理区を、酸性霧とオゾン暴露の複合ストレスを FO 区、オゾン暴露のみを O 区、酸性霧暴露のみを F 区、コントロールを C 区とそれぞれ表記する。各処理区とも 8 個体を用いた。

2.2.3.5 土壌酸性化及び窒素負荷

この実験における処理区は、酸性霧と土壌酸性化の複合ストレス (FS 区)、土壌酸性化のみ (S 区)、酸性霧と窒素負荷の複合ストレス (FN 区)、窒素負荷のみ (N 区)、酸性霧暴露のみ (F 区)、コントロール (C 区) を設定し、それぞれ 8 個体を用いた。FS 区及び S 区に対しては 0.5 mM の硫酸 (pH3.0) を、FN 区及び N 区に対しては 133 μ M の硝酸アンモニウム溶液をそれぞれ土壌に散布した。これらの溶液の散布は酸性霧暴露と同時に開始し (1999 年 7 月 14 日)、週に 2 回、通常の灌水に代わってそれと同量行なった。年間総負荷量は 6 kg H⁺/ha/year 及び 30 kg N/ha/year とした。ガス交換速度は処理中間の 2000 年 6 月 8 日 (土壌酸性化)、同 6 月 15 日 (窒素負荷)、処理終了後の 2000 年 12 月 21 日に測定した。処理後は同時にクロロフィル濃度測定用として当年葉のサンプリングも行なった。

2.2.3.6 根圏アルミニウムストレス

2001 年 7 月、F 区、C 区のそれぞれ 16 個体をポットから掘り起こした。これらの苗木の根を水道水で丁寧に洗浄し、砂 (東海 M3 号) を敷き詰めた 1/2000 アールワグネルポットに植え替えた。培養液として 1/5 Hoagland's No. 2 溶液を毎日 300 ml ずつ与えた。培養液の pH は 3.5 まで塩酸

を用いて段階的に下げた。酸性霧暴露開始から25ヶ月後となる同年8月14日、F区、C区の半数個体(各8個体)に与える培養液に、1.0 mMとなるよう Al^{3+} を添加した。他の各8個体には低pHの培養液を与え、どちらの培養液もpHは3.5に調整した。なお、大山での土壤溶液中のAl濃度の報告がないため、日本各地のスギ・ヒノキ林で測定した土壤溶液中のAl濃度が0.002から3.16 mMであること(加藤ら, 1995)から、その中間的な値を取って暴露濃度を1.0 mMに設定した。培養液は自動灌水装置を用いて毎日300 ml与えられ、余剰分はポット下部の排水口から流出した。処理は360日間とし、処理終了後まで酸性霧暴露を継続して行った。処理終了後に当年葉のガス交換速度を測定したほか、当年葉を採取してクロロフィル濃度を測定した。以下この実験の処理区を、酸性霧と根圏アルミニウムの複合ストレスをFA区、根圏アルミニウムストレスのみをA区、酸性霧暴露のみをF区、コントロールをC区とそれぞれ表記する。各処理区とも8個体を用いた。

2.2.4 ガス交換速度及びクロロフィル濃度の測定

ガス交換速度は、その測定時の当年葉のもので評価した。測定には携帯用光合成蒸散測定装置 CIRAS-1 (PP Systems 社) に、パーキンソンリーフキュベット PLC (C/P) (PP Systems 社) を接続して用いた。供給する空気中の二酸化炭素濃度を380 ppm、湿度を70%、供給量を400または450 ml/minに設定した。リーフキュベット内の光量子密度は、モミの光飽和点を前もって検討し、700 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ とした。ガス交換速度の測定はおおむね午前9時から正午の間に行った。測定に際しては葉面が乾燥していることを確認した。CIRAS-1を用いた測定では、あらかじめ仮の葉面積値を入力し、仮のガス交換速度を算出した。処理終了後にガス交換測定部位の針葉をサンプリングし、画像解析ソフト LIA32 (Yamamoto, 2000) を用いて葉面積を求め、その値からガス交換速度の真値を算出した。クロロフィル濃度の測定には、可視的障害のない当年葉を用い、採取した針葉は後すぐに液体窒素で凍結した。サンプルは測定まで-80°Cで保管した。測定には Barnes et al. (1992) の方法を用いた。

2.2.5 土壌 pH の測定

土壌酸性化、窒素負荷の処理後、処理した土壌の pH (H_2O) を測定した。採取した土壌を均一化し、実験室内で風乾した。10 g の風乾土壌に 25 ml の蒸留水を加え、30 分間振とうした。得られた溶液の pH をガラス電極法による pH メーター (WM-22EP, 東亜電波) を用いて測定した。

2.2.6 統計処理

この実験では、得られたガス交換速度、クロロフィル濃度、土壌 pH の値に対し、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) と Fisher の最少有意差法 (Fisher's LSD test) を組み合わせて統計処理を行なった。有意水準は 5% とした。すべてのデータは 4 または 8 個体の繰返しによる平均値とその標準偏差で表示する。

2.3 結果と考察

2.3.1 ガス交換速度の通年変化

長期にわたる酸性霧の暴露は、すべての期間において葉面に可視障害を発生させなかった。図 2-3 に F 区、C 区の 1999 年 11 月から 2001 年 3 月までの気孔コンダクタンスの季節変化を示す。冬期には F 区の気孔コンダクタンスは C 区よりも低くなる傾向にあり、1999 年 12 月 19 日、2000 年 1 月 4 日には C 区に比べて有意に低下した。それに対して夏期には、F 区の気孔コンダクタンスは C 区よりも高くなる傾向にあり、2000 年 8 月 16 日には C 区に比べて有意に上昇した。2000 年 11 月以降は前年の冬のような傾向は見られなかった。

いくつかの研究では酸性降下物が樹木のガス交換速度、特に蒸散速度や気孔コンダクタンスに及ぼす影響について報告している。それらの研究では、気孔閉鎖機能の崩壊 (Adams et al., 1984; 伊豆田ら, 1993) やエピクチクラワックスの流亡 (Mengel et al., 1989; 松村ら, 1995) をそのメカニズムとして提案している。これらのメカニズムでは、酸性降下物の影響は不可逆的ではなくである。しかしながら、本実験でモミ苗木に長期にわたる酸性霧を暴露させた結果、処理を

行なわない個体に比べて冬期には過剰な気孔の閉鎖、夏期には過剰な気孔の開放と、季節変化に対して過剰に反応することが明らかとなった。このことは、長期の酸性霧暴露が不可逆的な気孔開閉機能の崩壊を引き起こすのではなく、温度などの環境要因の季節変化に対して、気孔の感受性が高まったことを意味している。長期の酸性霧暴露は、環境変化のセンサーとなる部位や気孔へのそのシグナル伝達経路を何らかの形で攪乱しているのかもしれない。酸性霧暴露による蒸散速度や純光合成速度の変化が気孔コンダクタンスの変化と類似していることから、おそらくこれらは気孔開度に律速されていたのであろう。

これまでに、モミ苗木に対する酸性霧の影響を検討した研究例はあるが (Igawa et al., 1997; Igawa et al., 2002a; 2002b), 気孔開閉機能に対する可逆的な影響を報告した例はない。これらの報告と本研究との違いは、酸性霧の暴露量、暴露期間、あるいは酸性霧の組成の違いから生じたものと思われる。特に本研究では酸性霧の組成は大山で観測されたものを参考にし、また、ギ酸、酢酸を添加するという違いがある。酸性霧による気孔開閉機能の攪乱がどの成分によるものであるのか、さらなる検討が必要である。

2.3.2 気象要因による付加ストレスの影響（乾燥、低温、細根切断ストレス）

表 2-1 に気象要因による付加ストレスを与えた際のモミ苗木のガス交換速度を示す。乾燥ストレスの 99 冬処理において、処理後の D1 区の気孔コンダクタンスは、乾燥ストレスによって C 区よりも有意に低下した。それとは対照的に、FD1 区と C 区の間には処理後の気孔コンダクタンスに有意な差は見られなかった。処理後の蒸散速度、純光合成速度は気孔コンダクタンスと同様の傾向がみられた。

乾燥ストレスの 00 夏処理では、乾燥ストレスによって処理後のガス交換速度の低下が再び観察されたが、F 区と FD2 または FD'1 区との差は有意であった。乾燥ストレスの経験が 2 回目 (D2 と FD2 区) であるか 1 回目 (D'1 と FD'1 区) であるかは、処理後のガス交換速度に影響しなかった。酸性霧暴露の有無による違いもなかった。

乾燥ストレスの 00 冬処理では、乾燥ストレスの経験が 3 回目 (D3 と FD3 区) または 2 回目

(D'2 と FD'2 区) となる。C 区と比べた処理後の気孔コンダクタンスに、D3, D'2, FD3 区では有意差が認められたが、FD'2 区との間には認められなかった。さらに、FD3 区の純光合成速度は FD'2 区よりも有意に低下した。乾燥処理の影響は FD'2 区よりも FD3 区に対してより明瞭に現れた。このことは、乾燥ストレスの繰り返しは長期酸性霧暴露の影響を緩和することを示唆している。

乾燥ストレスによって気孔が閉鎖することはよく知られている。冬期と夏期いずれも、酸性霧暴露がない場合、乾燥ストレスによってモミ苗木の気孔コンダクタンスは低下した。しかしながら、酸性霧暴露がある場合、乾燥ストレスに対する気孔コンダクタンスの応答は異なっていた。夏期の酸性霧がある場合の応答と酸性霧がない場合の応答は同じであったに対し、冬期になるとその傾向は不明瞭になった。既に乾燥ストレスを経験していた 00 冬処理における FD3 個体でこの影響は消失していた。この一連の乾燥ストレス処理の結果から、長期の酸性霧暴露を受けたモミ苗木が特に冬の乾燥ストレスを受けると、土壤水分状態に合わせた気孔の閉鎖ができなくなることが示唆された。しかしながら、乾燥ストレスを繰り返すことで、通常の気孔開閉機能を回復するのかもしれない。

低温傷害に対する感受性は秋期と春期、すなわち低温耐性が確立される前後に高まり (Weiser, 1970), 大気汚染物質はその感受性をさらに高める (Chappelka and Freer-Smith, 1995)。本研究では、低温ストレス実験を細胞や組織の低温耐性が解除される 4 月に行ない、可視傷害は観察されなかったが F 区に比べて FL 区で有意な純光合成速度の低下が認められた (表 2-1)。気孔コンダクタンスや蒸散速度には有意差が認められなかった。Cape et al. (1991) は、硫酸イオン、アンモニウムイオンからなる霧を吸収することによって、ドイツウヒの秋期における凍害耐性が攪乱されると報告している。また Earnus and Murray (1993) は硫酸イオンを含む酸性霧はドイツウヒに不可逆的な気孔の開放を引き起こし、真冬の凍害に対する感受性を増加させると述べている。これに対して本研究では、霧水中の硫酸イオンやアンモニウムイオンは硝酸イオンに比べて低濃度である。さらに、気孔コンダクタンスの過剰な季節変化が観察され、これは不可逆的な気孔の開放とは異なる現象である。そのメカニズムはまだ明らかではないが、本研究の

結果は、長期の酸性霧暴露が低温ストレスに対する光合成機能の感受性を直接的に上昇させることが示唆された。しかし、処理 13 日後の純光合成速度を含め、ガス交換速度はいずれも処理区間で有意差は認められなかった (表 2-2)。従って、酸性霧暴露を受けたモミ苗木の純光合成速度が、低温ストレスによって低下する現象は、一時的なものであることが示された。

細根切断ストレスにもかかわらず、すべての個体は細根切断以後 6 ヶ月間、可視傷害を生じることなく生育した。このストレス実験では、ガス交換速度測定部位の葉面積データがないため、処理後の値を処理前の値で除した相対値で処理区間の比較を行なった (表 2-3)。この処理で、R 区及び FR 区の相対ガス交換速度はコントロール (C 区) に比べて有意に低下した。一方、酸性霧暴露の有無による差は見られなかった。谷本ら (1996) は、奥日光山地のダケカンバ (*Betula ermanii*) の衰退要因について、1982 年に上陸した台風 10 号による強風が樹木を揺らし、細根を切断したことが高温、乾燥期の水分バランスの崩れを引き起こし、その結果として枯損につながったものと推測している。これは、細根切断ストレスが樹木衰退の要因となり得ることを意味している。本研究で得られた結果はまた、根のバイオマスの半減により苗木の活性低下が引き起こされるものの、細根切断ストレス下において、酸性霧による気孔開閉機能の攪乱の影響は生じないことが明らかとなった。

2.3.3 大気汚染要因による付加ストレスの影響 (オゾン暴露, 土壌酸性化, 窒素負荷, 根圏アルミニウムストレス)

オゾン暴露実験前、苗木の葉面に可視障害は見られなかった。1 回目のオゾン暴露を行った 4 日後、FO 区 8 個体中 6 個体の葉面に可視障害を認めた。当年葉、一年葉が部分的に黄化、脱色した (図 2-4a)。一方、2 回のオゾン暴露を行ったにも関わらず、O 区には可視障害が一切現れなかった (図 2-4b)。この現象は、長期にわたる酸性霧の暴露がオゾンに対する感受性を増加させることを意味している。表 2-1 に処理前、処理後における見た目に健全な針葉で測定したガス交換速度の結果を示す。コントロール (C 区) と比較して、O 区では処理後のガス交換速度の有意な低下が観察された。FO 区の処理後の気孔コンダクタンスと純光合成速度には、C と比

較して有意な差は認められなかった。しかし、FO 区の純光合成速度は F 区に比べて有意に低下した。これらの結果から、O 区の苗木は適切な気孔の開鎖によりオゾンの侵入を防ぎ、結果として可視障害を生じさせなかったものと考えられる。それに対し F 区の気孔コンダクタンスが C 区に比べて有意に高い値であることから、FO 区の苗木の気孔は高濃度のオゾンの侵入を許し、これが葉面の可視傷害につながったものと考えられる。それゆえ、O 区の純光合成速度の低下はオゾン防御のための気孔の開鎖によるものであり、一方、F 区と比較して FO 区の見た目に健全な針葉の純光合成速度の低下は気孔の応答ではなく、オゾンによる光合成機能の損傷によるものであることが示唆された。Sakaki et al. (1983) は抗酸化物質や活性酸素消去系酵素の活性はオゾン暴露によって低下し、その結果クロロフィル濃度が低下すると報告している。Tanaka et al. (1985) の報告によれば、オゾンから植物体内で生成される活性酸素種は、活性酸素消去系酵素により分解されるため、これはオゾンによる障害を緩和する機能を持つと考えられるが、一方で生成した活性酸素種はクロロフィルを分解するとしている。しかしながら本実験では、見た目に健全な針葉中のクロロフィル濃度は、処理前、処理後ともほぼ一定であった。これらの結果は、F 区に比べて FO 区で有意に光合成速度が低下したのは、クロロフィル濃度の低下によるものではなく、光合成機能の他の部分の損傷によるものであることが示唆された。

Matsumura (2001) は、モミをはじめとする 14 樹種の苗木を用いて、酸性霧とオゾンがそれらの成長に及ぼす影響を検討した。それによると、活性炭処理した大気に比べて通常大気で生育させた場合は根のバイオマスが減少し、酸性霧暴露下では地上部のバイオマスが増加するのに対し、モミ苗木の成長量に対する酸性霧とオゾンの相互作用はないとしている。また、彼の実験では可視障害は発生しなかった。本実験では酸性霧の暴露は通常大気中で行ない、酸性霧暴露のみでは可視障害が発生しなかった。これらの結果から、通常大気中のレベルのオゾンと酸性霧の暴露はモミ苗木に重篤な障害を生じさせないが、酸性霧暴露で高濃度のオゾンに対する感受性が増加することが明らかとなった。

土壌酸性化、窒素負荷、根圏アルミニウム処理において、葉面に可視障害は発生しなかった。C, S, N, F, FS, FN 各処理区の処理後の土壌 pH はそれぞれ 6.68 ± 0.02 , 6.58 ± 0.02 , 6.63 ± 0.03 ,

6.67 ± 0.02, 6.59 ± 0.03 and 6.66 ± 0.01 であった。土壌酸性化処理における H⁺ の負荷 (6 kg H⁺/ha/year) により, C 区に比べて S, FS 区で有意な pH の低下がみられたが, その差はわずかであった。土壌酸性化, 窒素負荷処理におけるガス交換速度の測定は, 処理開始 11 ヶ月後となる 2000 年 6 月と処理後 (17 ヶ月後, 2000 年 12 月) に行った。これらの結果を表 2-4 に示す。また, 根圏アルミニウム処理における処理前, 処理後のガス交換速度を表 2-1 に示す。S 区及び FS 区の 11 ヶ月後のガス交換速度は C 区に比べて有意に低下した。処理後のガス交換速度も気孔コンダクタンスを除いて同様の傾向を示した。窒素負荷処理においては, N 区のガス交換速度は 11 ヶ月後の気孔コンダクタンスを除き, 11 ヶ月後, 処理後とも C 区に比べて有意に低下した。酸性霧と窒素負荷の複合ストレスでは, 11 ヶ月後の気孔コンダクタンスが N 区に比べて有意に上昇した。C 区と比較した FN 区の処理後のガス交換速度は有意に低下した。根圏アルミニウム処理においては, ガス交換速度に有意な差は認められなかった。処理後の FN 区のカロロフィル濃度は C 区に比べて有意な上昇を示した (図 2-5)。しかし, 土壌酸性化, 根圏アルミニウム処理ではカロロフィル濃度に有意差は見られなかった。

土壌酸性化は酸性降下物だけでなく土壌に負荷されたアンモニウムイオンの硝化によっても生じる (van Breemen et al., 1982; Rollwagen and Zasoski, 1988)。土壌がより酸性側に傾くと, 土壌水中にアルミニウムイオンが溶出することが知られている。アルミニウムイオンは植物にとって有毒な金属であり, 土壌水中の μM レベルのアルミニウムは多くの植物に対して過剰障害を引き起こす (Ma et al., 2001)。本実験では, 土壌酸性化や窒素負荷による土壌 pH (H₂O) の低下はわずかであり, 処理後の pH はアルミニウムイオンが溶出するには高すぎる値であった。それゆえ, S, N 区で見られたガス交換速度の低下はアルミニウムイオンによるものではないことは明らかである。本研究の結果は, モミ苗木は根圏への 1 mM のアルミニウム処理に対して耐性があるものと考えられた。

17 ヶ月後の FS 区, FN 区のガス交換速度の傾向が異なるため, ガス交換速度を低下させるメカニズムは土壌酸性化と窒素付加で異なっていることが示唆された。Izuta et al. (2001) は, 酸性化した土壌で生育させた *Fagus crenata* の苗木で炭酸固定効率が低下することを観察し, その

理由としてリブローズ1,5-ビスリン酸 (RuBP) カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ活性または量、あるいは RuBP の再生速度が低下したことをその原因として挙げている。それに対し、本研究の土壤酸性化処理では、モミ苗木の気孔コンダクタンスが低下した。既に述べたように、土壤酸性化によるガス交換速度の低下は土壤水中に溶出したアルミニウムイオンによるものではなく、他の要因によるものである。また、ガス交換速度に及ぼす酸性霧と土壤酸性化の相互効果も見られなかった。根圏の酸性化が気孔に及ぼす影響は、長期の酸性霧暴露による気孔開閉機構の攪乱よりもずっと大きいと考えられる。

Nakaji et al. (2001) は、300 mg N/l の窒素を負荷した森林土壤で生育させたスギ苗木で、純光合成速度、クロロフィル濃度の低下がみられたと報告している。N 区の苗木でガス交換速度の低下が見られた本実験の結果は、モミ苗木が窒素負荷に対して感受性が高いことを示唆している。処理開始 11 ヶ月後(夏期)の FN 区の気孔コンダクタンスが N 区に比べて有意に高くなったことについて、長期酸性霧暴露による過剰な気孔開放が、窒素負荷によるガス交換速度の低下を打ち消したものと考えられる。しかし、処理後(冬期)には N 区と FN 区間の気孔コンダクタンスの差は消失し、その結果として FN 区においても C 区に比べて有意にガス交換速度が低下したのであろう。養分状態の不均衡は、窒素負荷による影響の一つである (Boxman and Roelofs, 1988; Aber et al., 1989; Nakaji et al., 2001)。Nakaji et al. (2001) は、窒素負荷をしたスギ苗木のガス交換速度の低下の一部は、Mg 欠乏といった養分不均衡が原因かもしれないと述べている。窒素負荷を行なったモミ苗木のガス交換速度の低下の要因として、養分状態の変化も考えられるが、それについては第 3 章で述べる。

2.4 まとめ

pH 3 の酸性霧を暴露したモミ苗木では、冬期には気孔コンダクタンスの低下傾向が、夏期には上昇傾向が認められた。酸性霧暴露は、気孔の環境要因に対する感受性を高めたものと推察された。さらに、酸性霧を暴露したモミ苗木に乾燥ストレスを付加すると、気孔コンダクタンスが十分に低下しないことが明らかとなった。また、オゾン暴露を付加すると、葉面に可視傷害が

観察されたことから、酸性霧の暴露は気孔の開閉メカニズムを攪乱することが考えられた。

一方で酸性霧を暴露したモミ苗木に低温ストレスを付加すると、純光合成速度が低下することが示された。この現象は乾燥ストレスやオゾン暴露の場合と異なり、光合成機能の低温ストレスに対する感受性を、酸性霧暴露が直接上昇させていることを示唆した。

土壌への酸や窒素の付加は、モミ苗木のガス交換速度を低下させる要因であったが、根圏への1 mM のアルミニウムストレスは影響を与えなかった。したがってモミは1 mM 程度のアルミニウムイオンに対しては耐性があることが示唆された。

第3章 酸性霧と土壤酸性化・窒素負荷・根圏アルミニウムの 複合ストレスがモミ苗木の養分状態に及ぼす影響

3.1 緒言

第1章で述べたとおり、酸性霧は生態系に対してさまざまな形で影響を及ぼす(吉田・竹中, 2004)。植物体に付着した酸性霧は植物に直接作用するが、土壤に落下したものは土壤に水素イオンや窒素を負荷することで、土壤の化学性を変化させ、結果として植物に対して間接的に作用する。酸性降水による土壤酸性化の第一段階では、植物にとって必須の金属元素の土壤からの溶脱が起こり、その次の段階で土壤溶液中にアルミニウムやマンガンが溶出する(Izuta, 1998)。アンモニウムイオンとして土壤に負荷された窒素もまた、硝化によって土壤を酸性化させる(van Breemen et al, 1982; Rollwagen and Zasoski, 1988)。さらに、Boxman and Roelofs (1988)は、硝酸イオンだけの施肥では、Scots pine 中で必須元素の集積が見られるのに対し、硝酸イオンと高濃度のアンモニウムイオンの施肥は、必須元素量を低下させると報告している。このように、土壤酸性化や窒素負荷によって生じた植物の養分状態の変化に関する研究はこれまでに数多くなされているが、これらと酸性霧などの地上部への直接影響を組み合わせた複合ストレスについて検討した報告はほとんどない。このような複合ストレスは植物の活性や養分状態を制限する重要な要因である(Schaberg et al., 2000; Izuta et al., 2001)。

モミの衰退が観察されている神奈川県の大山(1252 m)の南東斜面(都市側)に位置する大山地区では、硝酸が霧水の酸性化の要因となっている(Hosono et al., 1994)。このことから、この酸性霧が大山地区における土壤への窒素の負荷や酸性化招いていることが示唆されている(Okochi and Igawa, 2001)。また、大山地区では土壤中の水溶性Al濃度が、大山の山地側(北西斜面)に位置する札掛地区に比べて高いことが報告されている(高見ら, 2002)。これらのことから、大山地区に生育するモミは、複合的なストレスを受けていると考えられる。前章の実験で、筆者らは土壤酸性化・窒素負荷を受けたモミ苗木の純光合成速度の低下を観察した。一方、第2章で示したように、長期酸性霧暴露の有無にかかわらず、根圏へのAl処理はモミ苗木のクロロ

フィル濃度, ガス交換速度を変化させなかった (Yoshida et al., 2004)。

植物の養分状態は生理状態に大きく影響する。例えば, いくつかの主要元素でも特にリン (P) やマグネシウム (Mg) は光合成機能に重要な役割を演じており, 銅 (Cu), 鉄 (Fe), マンガン (Mn), 亜鉛 (Zn) といった微量元素は酵素を含めたタンパク質の中心金属として不可欠である (Marschner, 1997)。従って, 土壌酸性化・窒素負荷を受けたモミ苗木の養分状態を把握することは, 純光合成速度の低下を招いた要因を明らかにするという意味で重要である。また, 根圏 Al ストレスを受けたモミ苗木については, ガス交換速度が低下する以前に生じる, 根圏 Al ストレスに特有の植物体内の養分状態の変化を把握するという意味で重要である。

そこで本実験では, 酸性霧と土壌酸性化・窒素負荷・根圏 Al の複合ストレスがモミ苗木の養分状態に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。第2章で示した土壌酸性化・窒素負荷実験および根圏 Al ストレス実験の処理後に, それぞれの針葉と細根の元素濃度を測定し, 酸性霧と土壌酸性化・窒素負荷・根圏 Al の複合ストレス下における養分状態の変化を検討した。

3.2 材料と方法

3.2.1 植物材料, 生育条件, ストレス処理方法

本実験では, 第2章で述べた土壌酸性化, 窒素負荷, 根圏 Al ストレスの各処理を行なったモミ (*Abies firma* Sieb. et Zucc.) 苗木を分析に供試した。詳細については, 植物材料と生育条件は本論文 2.2.1 章, 酸性霧暴露方法は 2.2.2 章, 土壌酸性化及び窒素負荷は 2.2.7 章, 根圏 Al ストレスは 2.2.8 章で述べた通りである。個体数はそれぞれ 8 個体とした。なお, 酸性霧暴露の際には土壌表面をポリエチレン製ビニールシートで覆い, 酸性霧による土壌酸性化を防いだ。酸性霧による葉面への総窒素負荷量は 17.5 mg N/seedling/year であった。

この実験では 8 処理区を設けた。以下それぞれを下記のように称呼する: C 区, コントロール (無処理区); F 区, 酸性霧単独ストレス (長期酸性暴露のみ); S 区, 土壌酸性化単独ストレス (酸負荷のみ); FS 区, 酸性霧と土壌酸性化の複合ストレス; N 区, 窒素負荷単独ストレス (窒素負荷のみ); FN 区, 酸性霧と窒素負荷の複合ストレス, A 区, 根圏 Al 単独ストレス (Al 処理のみ); FA

区、酸性霧と根圏 Al の複合ストレス。それぞれの処理に対して 8 個体供試した。

3.2.2 土壌の養分状態

土壌酸性化・窒素負荷の処理終了時にそれぞれのポットから土壌を採取した。土壌は均一化し、実験室内で風乾させた。風乾土壌 5 g に 25 ml の超純水を加え、1 時間振とうした。得られた溶液は 3,000 rpm で 30 分間遠心分離 (KS-5000, 久保田商事) した。上澄みを 0.45 μm メンブレンフィルター (C045A025A, 東洋濾紙) でろ過し、元素濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICAP, Jarrel Ash, USA) で測定した。この測定により, Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Zn 濃度を決定した。

3.2.3 苗木の成長量, 養分状態の測定

土壌酸性化・窒素負荷を処理した個体に対しては、伸長成長率を求めた。苗木の伸長成長は、処理前と処理後に地上部高を測定し、成長分を処理前の地上部高で除することで求めた。

処理後に当年葉、一年葉及び細根を採取した。細根サンプルは苗木を掘り起こし、水道水で地下部を丁寧に洗浄して得た。針葉、細根とも蒸留水で表面の塵埃を除去し、素早く液体窒素で凍結し、分析まで -80°C で保存した。

凍結サンプルは解凍のうえ、乾燥器で 80°C 、48 時間乾燥させ、乾重を求めた。土壌酸性化・窒素負荷を処理した個体に対しては、サンプル中の N 濃度を C/N コーダー (MT-700, ヤナコ) を用いて分析した。すべての処理個体について、他の元素濃度を評価するため、乾燥させたサンプルをマイクロウェーブサンプルプロセッサ ETHOS-1600 (Milestone Srl, Italy) で湿式灰化した。分解したサンプルは超純水で 25 ml にメスアップし、元素濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICAP, Jarrel Ash, USA) で測定した。

3.2.4 統計処理

この実験において、長期酸性霧暴露と土壌酸性化、窒素負荷、根圏 Al ストレスがモミ苗木の

養分状態に及ぼす影響を二元配置分散分析 (2-way ANOVA) で評価した。データは平均値で示し、繰返し数は 4-8 個体とした。

3.3 結果

土壌酸性化・窒素負荷実験と、根圏 Al ストレス実験では、前者が土耕で酸性霧と同時に負荷をしているのに対し、後者は砂耕で末期のみ負荷をしており、処理の方法が異なることから、それぞれ分けて結果をまとめた。

3.3.1 土壌酸性化・窒素負荷実験

図 3-1 にモミ苗木の成長率を示す。すべての処理において有意差は認められなかった。

土壌の水溶性元素濃度を表 3-1 に示す。土壌酸性化・窒素負荷によって K 濃度が低下した。酸性霧暴露や複合ストレスによる元素濃度の有意な変化は認められなかった。

細根中の元素濃度を表 3-2 に示す。細根では、酸性霧暴露・土壌酸性化・窒素負荷のいずれも元素濃度に影響を与えなかった。

処理後の当年葉の元素濃度を表 3-3 に示す。酸性霧暴露による Mg, Al, Fe 濃度の有意な低下が見られた。窒素負荷は Al 濃度, N/P 比を上昇させた。さらに、酸性霧と土壌酸性化、酸性霧と窒素負荷の複合ストレスによる相互作用が B 濃度において認められた。

表 3-4 に一年葉の元素濃度の変化を示す。酸性霧暴露は、Mg, Al, Cu, Fe, Zn 濃度を低下させた。土壌酸性化によって Al と Cu 濃度が有意に上昇した。酸性霧と土壌酸性化の複合ストレスによる相互作用が Al, Cu に認められたが、いずれも相殺作用であった。

3.3.2 根圏 Al ストレス実験

根圏 Al ストレス実験では、成長量に関して定量的なデータは得られていないが、外観上処理による影響はみられなかった。

細根中の元素濃度を表 3-5 に示す。細根では、根圏 Al 処理によって Al と Cu 濃度が上昇し、

Ca, Mg, B, Mn, Zn 濃度が低下した。酸性霧暴露・酸性霧と根圏 Al の複合ストレスによる元素濃度の有意な変化は認められなかった。

当年葉において、根圏 Al 処理による K と Al 濃度の有意な上昇, Ca, Mg, P, Zn 濃度の有意な低下が見られた (表 3-6)。酸性霧暴露は Fe と Zn 濃度を低下させた。さらに、酸性霧と根圏 Al の複合ストレスによる相互作用が Fe 濃度において認められた。

表 3-7 に酸性霧暴露・根圏 Al 処理による一年葉中の元素濃度の変化を示す。酸性霧暴露は, Al, Cu, Zn 濃度を低下させた。根圏 Al 処理によって P と Cu 濃度が減少したのに対し, Ca, Al, B, Mn 濃度は有意に上昇した。酸性霧と根圏 Al の複合ストレスによる相互作用が認められた元素のうち, K, Al 濃度は相乗作用, P 濃度は相殺作用であった。

3.4 考察

3.4.1 土壌酸性化・窒素負荷実験

苗木の成長率に有意差が認められなかったことは、今回設定した窒素や酸の負荷量ではミ苗木の地上部の成長量に影響する程のレベルではないことを示している。

処理後の土壌 pH (H_2O) は、既に第 2 章 (Yoshida et al., 2004) で述べた通りであるが、表 3-1 に再掲する。本実験に先立ち、酸の負荷量と土壌 pH の関係を求めた予備実験から、この実験で設定した酸負荷量 ($6\text{ kg H}^+/\text{ha}/\text{year}$, 17ヶ月間) では土壌 pH が 5.8 まで低下すると見積もられていたにもかかわらず、結果として目立った pH の低下は生じなかった。このことは、例えば硝酸イオンの吸収とともに根からプロトンを吸収して根圏の pH を調整する機能 (Watanabe et al., 1998) を通して、苗木の存在が土壌の緩衝能力を高めていることを示唆している。降下したアンモニウムイオンの硝化も土壌を酸性化させる要因であり (van Breemen et al., 1982; Rollwagen and Zasoski 1988), 1 モルのアンモニウムイオンから、硝化によって 2 モルのプロトンが生じる。本実験では、仮にすべての負荷したアンモニウムイオンが硝化されたとしても、生成するプロトンは $2.1\text{ kg H}^+/\text{ha}/\text{year}$ に過ぎない。よって、アンモニウムイオンの硝化による土壌 pH の変化はなかったと考えるのが妥当であろう。

土壌の酸性化は、K, Ca, Mgといったアルカリ金属の土壌からの溶脱を促進させ、さらに酸性化が進むと土壌溶液中への Al, Mn の溶出を招く (Izuta, 1998)。He et al. (1999) は、土壌へのアンモニア態窒素の負荷が土壌酸性化を引き起こし、それに伴って土壌中の K 濃度が低下すると報告している。本研究の結果から、土壌 pH の大きな低下に至らずとも、これらの処理によって土壌中の K 濃度の低下が引き起こされることが示された。土壌の水溶性 K 濃度の低下は土壌からの溶脱によるものであろうが、細根・針葉中の K 濃度は処理によって変化しなかった。従って、この程度の土壌中からの K の溶脱では、すぐにはモミ苗木の K 欠乏を生じないことが示された。

いくつかの報告では土壌の酸性化は針葉中の養分状態のバランスの崩れを引き起こすことが示され、たとえば Fe, Mg 濃度の上昇 (Westman and Temple, 1989)、Scots pine における Al 濃度の上昇と Ca, Mg 濃度の低下 (Tarabula, 2000) などである。しかしながら本実験では、当年葉において有意な元素濃度の変化は認められなかった。酸の負荷は一年葉において Al, Cu 濃度の上昇を招いたが、Ca, Mg, Fe 濃度には影響を及ぼさなかった。一年葉の高濃度の Al, Cu は、土壌の部分的な根圏の酸性化によってこれらの金属の利用性が向上したからなのかもしれない。これらの結果から、針葉中の Al, Cu 濃度は、Ca, Mg, Fe に比べて土壌の酸の負荷に対してより感受性が高いことが示された。一方、しかし、酸性霧と酸負荷の相互作用により Al, Cu 濃度は、酸負荷単独の場合よりも低下しているため、酸性霧暴露による針葉中の Al, Cu 濃度の低下は、酸負荷下においてより顕著であることが明らかとなった。

窒素負荷もまた、樹木の養分状態を変化させることが知られている。本実験で、窒素負荷下において当年葉中の Al 濃度が上昇することが明らかとなった。さらに、いくつかの報告は、窒素負荷によって葉内の P 濃度が低下することを指摘している (Mohren et al., 1986; Cumming and Brown, 1994)。Mohren et al. (1986) は、アンモニウムイオンの硝化によって土壌の pH が低下し、その結果として P の植物への利用性が低下すると述べている。本実験では、窒素負荷によって当年葉中の P 濃度、N 濃度が有意ではないものの、それぞれ低下、上昇する傾向が見られた。それに対して当年葉の N/P 比は窒素負荷によって有意に変化した。このことは、顕著な pH の変化がなくとも、窒素負荷によって N と P のバランスの崩れが生じることが示された。他の元素

に関して言えば、酸負荷と同様に窒素負荷もその影響は軽微であった。さらに、酸性霧と窒素負荷、または酸負荷の複合作用は、当年葉における酸性霧による B 濃度の低下傾向を抑制した。

モミ苗木に対する酸性霧の暴露は、当年葉の Mg, Al, Fe 濃度、一年葉の Mg, Al, Cu, Fe, Zn 濃度を低下させた。このことは、針葉中の Mg, Al, Fe 濃度は酸性霧の影響を早くから受けやすいのに対し、Cu, Zn 濃度は葉の老化に伴って影響を受けることを示している。酸性霧暴露によるこれらの元素濃度の低下は、細根中では影響を受けていないことから、葉からの溶脱によるものと推察される。Nakatani et al. (2004) は、衰退のみられる大山地区(大山南東斜面)のモミの旧葉で、衰退の程度が大山よりも軽微な札掛地区(大山北西斜面)のモミに比べて Mg 濃度が低下することを観察し、この地区での土壌酸性化による Mg の吸収阻害が起きていたのかもしれないと述べている。しかし、本研究では針葉中の Mg 濃度の低下は、酸負荷よりもむしろ酸性霧の暴露で生じることが示された。Igawa et al. (2002b) は、硝酸、塩酸、硫酸からなる pH 3 の酸性霧を 90 分間モミ苗木に暴露することで、針葉から B が溶脱することを観察し、モミの衰退の一因として B の溶脱を挙げている。本研究では成長量の低下、針葉中の B 濃度の低下は認められなかった。しかしながら、F 区の当年葉の B 濃度は C 区に比べて低下する傾向が見られた。以上の結果から、酸性霧による B 濃度の低下は、酸負荷、窒素負荷で不明瞭になることが明らかとなった。

3.4.2 根圏 Al ストレス実験

第 2 章において、酸性霧の有無に関係なく、根圏への Al ストレスは当年葉の蒸散速度を変化させないことを述べた (Yoshida et al., 2004)。このことから、養分状態の変化は蒸散速度によるものではないことは明らかである。さらに、これらの処理がクロロフィル濃度や純光合成速度に及ぼす影響は認められず、可視障害も発生しなかった。これらの結果から、モミは 1 mM の Al イオンに対して耐性ある植物であると考えられる。Tomioka and Takenaka (2001) は、さまざまな濃度の Al イオンを含む培養液でヒノキ、コナラ苗木を生育させたところ、ヒノキでは根の乾重に Al 濃度による差は見られず、コナラではむしろ増加する傾向を示したことを報告している。また、一般に森林でもとりわけ針葉樹林の土壌 pH は低く、日本における森林土壌の pH (H₂O) はスギ林で

3.57-6.32, ヒノキ林で 3.85-4.18 であると報告されている (加藤, 1995)。これらの樹木と同様, モミも低 pH の土壤に適応し, Al に対して耐性を持っていると考えられる。

Truman et al. (1986) によれば, Al 耐性植物は Al 処理によって K 濃度が高まるが, Al 感受性植物では K 濃度が低下する。本研究では細根の K 濃度は根圏 Al 処理による影響を受けず, 当年葉では濃度が上昇した。さらに, 当年葉において酸性霧暴露と根圏 Al 処理の相乗効果が観察された。これらの結果もまた, モミは 1 mM Al ストレスに対して耐性植物なのかもしれないことが示唆され, 根圏 Al 処理はモミ苗木のガス交換速度を変化させないことから推察された同様の仮説 (Yoshida et al., 2004) を支持した。

本研究では, 当年葉で Ca, Mg, P 濃度の根圏 Al 処理による有意な低下が認められたのに対し, Ca, Mg 濃度は細根中で低下した。根圏 Al 処理による Ca, Mg 濃度の有意な低下は細根中での Al と Mg との競合による吸収阻害や (Wagatsuma and Ezoe, 1985), 負に帯電した根の結合サイトへの影響 (Godbold et al., 1988), あるいは膜タンパク質の損傷 (Siegel and Haug, 1983) によるものと考えられる。Al 処理による細根ならびに一年葉中での P 濃度の変化は細根から針葉への P の転流が阻害されていたものと示唆された。この理由の一つとして, 細根の表面または内部でリン酸が Al と結合し, リン酸アルミニウムとしての沈着と考えられる (Foy et al., 1978; 三宅ら, 1991; Rengel, 1996)。一年葉の P 濃度で, 酸性霧と根圏 Al の複合効果が認められた。このことは, 複合ストレスは根よりも地上部の P 濃度により影響しやすいことを示している。本実験では細根, 当年葉, 一年葉で根圏 Al 処理による Al 濃度の上昇が見られたが, 細根の Al 濃度上昇は針葉のそれをはるかに上回った。この原因の一部は共沈であろうが, 細根中の Al と P 濃度には必ずしも相関が見られなかった。それゆえこれらの結果から, モミ苗木には Al の根から地上部への移行を阻止し, 根中に Al を保持する機構が備わっていると考えられる。さらに, 長期酸性霧暴露は一年葉中の Al 濃度を低下させた。同様の变化は当年葉, 一年葉中の Fe, Zn 濃度でもみられた。Schaberg et al. (2000) は, red spruce への pH 3.0 の酸性霧暴露による樹幹流中の Al, Fe, Zn 濃度上昇について, 酸性霧中の H^+ が陽イオンを交換し, 溶脱を引き起こしたことを理由に挙げている。本研究における, 酸性霧暴露によるこれらの陽イオン濃度の低下は溶脱の可

能性が示唆された。

亜鉛もまた、根圏 Al 処理により細根、当年葉中の濃度が低下した。これまでにいくつかの報告で、土壌酸性化条件下では土壌酸性化による利用性の向上のため、土壌 pH と植物中の亜鉛含量に負の相関があることが示されている (Öborn et al., 1995; He et al., 1999)。しかし本実験の結果は、養分溶液中の Zn は十分な利用性があるにも関わらず、細根中の Zn 濃度は低下した。この結果から、共存する Al イオンが Zn の吸収を阻害し、当年葉中での Zn 濃度低下を引き起こすことが推察された。

根圏への Al 処理下では、当年葉中の Mn, Cu, B 濃度は影響を受けなかった。しかし、Mn, B 濃度は細根中で低下したにも関わらず、一年葉中では上昇することを観察した。これとは逆に、Cu 濃度は細根で上昇し、一年葉中では低下した。Tomioka et al. (2002) は、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) やコナラ (*Quercus serrata*) で観察された Zn や Mn の Al 処理による吸収阻害は、Al との競合のほか、Al による地上部への転流の活性化を指摘している。本研究では根圏 Al 処理をした場合の当年葉、一年葉の Mn 濃度がほぼ同じであり、その濃度は根圏 Al 処理をしなかった一年葉中の濃度よりも高かった。したがって、通常の状態において Mn は針葉の老化に伴って針葉から他の部分へ転流をするが、根圏 Al 処理はこのプロセスを阻害し、その結果として一年葉中の Mn 濃度が高くなったものと示唆された。ホウ素の場合、おそらく根圏 Al 処理による細根から一年葉への転流の促進によって、モミ苗木の B の細根と一年葉の配分バランスの攪乱をもたらすことが示唆された。これとは反対に、細根から一年葉への Cu の転流が根圏 Al 処理によって阻害され、Cu の細根と一年葉の配分バランスが攪乱されたのかもしれない。

これまでに B は酸性霧 (Igawa et al., 2002b) や Al ストレス (Lenoble et al., 1996) に対して影響されやすい元素であると報告されている。Igawa et al. (2002b) は、モミの衰退が見られ、酸性度の強い霧が頻繁に観測されている地域に生育するモミの林内雨で高い B 濃度を観察したほか、モミ苗木の当年葉の切り枝に対しさまざまな濃度の硝酸、塩酸、硫酸で調製した人工酸性霧を暴露させたところ、Ca と B の溶脱を引き起こすことを観察し、これらの結果から Ca や B の欠乏が酸性霧による森林衰退の一因である可能性を示唆している。また、Lenoble et al. (1996) は、

酸性で Al 濃度の高い下層土壌へのアルファルファの根の伸長が B の添加によって改善されることから、Al ストレスは B 欠乏を引き起こすことを示唆している。このことから、本研究でみられた細根中の B 濃度の低下は、根圏 Al 処理による B の配分の変化の結果であると考えられる。加えて、酸性霧による B 濃度の変化は観察されなかった。Igawa et al. (2002b) の報告との不一致は、酸性霧の組成や暴露頻度の違いによるものであろう。

第 2 章において、根圏 Al 処理はモミ苗木のクロロフィル濃度、純光合成速度に影響しないことを明らかにした (Yoshida et al., 2004)。この実験から、光合成速度が低下する前に、根圏 Al ストレスによって養分状態が変化することが示された。一般に、多くの酵素は Cu, Fe, Zn, Mn などの金属の存在を必須とする。そのため、これらの元素濃度の変化はさまざまな酵素の活性や植物中の代謝を変化させることが予想される。Ogawa et al. (2000) は、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) 根圏に 12 週間にわたって Ca/Al 比の低い溶液を暴露すると、針葉中のスーパーオキシドディスムターゼ活性が上昇することを報告している。それゆえ、地上部への酸性霧暴露や根圏への Al 処理が酵素活性に及ぼす影響についての研究を行なうことが、モミ苗木のストレス応答を理解するうえで重要になるであろう。

3.5 まとめ

土壌への酸・窒素の負荷、根圏への Al 処理によるモミ苗木の養分状態の変化が認められた。土壌への酸の負荷は、針葉中の Al, Cu 濃度を上昇させ、これは酸による利用性の向上によるものと考えられた。土壌への窒素の負荷によって当年葉の N/P 比が上昇し、N と P のバランスの崩れを生じさせることが示された。さらに酸性霧の暴露は、葉からの溶脱と考えられる針葉中の Mg, Al, Fe 濃度の低下を引き起こした。しかし、これ以外の元素については、土壌への酸・窒素の負荷の影響は比較的生じにくいことが明らかとなった。

根圏への Al 処理では、針葉中の Al 濃度が上昇し、Al との結合によるものと考えられる針葉中の P 濃度の低下、Al による吸収阻害によるものと考えられる Ca, Mg 濃度の低下が観察された。また、根圏への Al 処理は一年葉中の Mn 濃度を当年葉と同レベルに保ち、葉の老化にとも

なう Mn の転流を阻害することが推察されたほか、さらに、B は細根で濃度が低下するのに対して一年葉で上昇し、Cu は細根で濃度が上昇するのに対して一年葉で低下することが観察され、植物体内における元素配分を攪乱する可能性が示された。

第4章 酸性霧と乾燥・オゾン暴露の複合ストレスがモミ苗木の 活性酸素消去系酵素活性に及ぼす影響

4.1 緒言

第2章, 第3章において, 酸性霧を主体とするさまざまなストレスが, モミ苗木のガス交換速度や養分状態に及ぼす影響について検討してきた。一方, 第1章でも述べたように, 植物のストレス状態を把握するため, エチレン放出量や活性酸素消去系酵素活性を指標とする研究も行なわれている (吉田・竹中, 2004)。一般にさまざまなストレス下において, スーパーオキシドアニオン, ヒドロキシルラジカル, 過酸化水素といった活性酸素種が大量に生成され, 同時にこれらの活性酸素種を消去する酵素群が活性化される。スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) はスーパーオキシドアニオンから過酸化水素を生成する反応を, アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX), カタラーゼ (CAT) は過酸化水素を水と酸素に分解する反応を触媒する。大気汚染物質によるストレスもまた, 活性酸素消去系酵素活性を変化させる要因であり, さまざまな研究がされている。これまでに短期オゾン暴露したハンノキ (Inaba et al., 1998), 酸性霧を暴露したヒノキ (Ogawa et al., 1998), 長期二酸化硫黄を暴露したポプラ (Tanaka and Sugahara, 1980), オゾン暴露したトウヒ (Jung et al., 1994) で SOD 活性の上昇が報告されている。活性酸素消去系酵素は, オゾンなど酸化性を持つ大気汚染物質が植物体内に侵入した時の分解, 除去過程としても重要である (Tanaka et al., 1985)。

しかしながら複合ストレス下での活性酸素消去系酵素活性の変化についての研究はほとんど行なわれていない。長期にわたる大気汚染物質の影響の一つに, 付加ストレスに対する感受性の上昇が指摘されている (Maier-Maercker and Koch, 1992)。本研究でも第2章でも述べたように, 長期にわたる酸性霧の暴露は, 乾燥ストレス下においてモミ苗木の気孔の開閉メカニズムを攪乱させ, オゾン暴露下で可視障害を生じさせることが明らかとなった (Yoshida et al., 2004)。これらの結果は, 長期酸性霧暴露が乾燥やオゾンのストレスに対して感受性を上昇させていることを示している。

そこで本実験では、長期にわたって酸性霧を暴露したモミ苗木の乾燥やオゾンのストレスに対する感受性の変化を、酵素活性を通して把握することを目的とした。第2章で示した pH 3 の酸性霧と乾燥ストレスおよびオゾン暴露の複合ストレス処理後に、活性酸素消去系酵素活性を測定し、ストレス状態を評価した。

4.2 材料と方法

4.2.1 植物材料, 生育条件, ストレス処理方法

本実験では、第2章で述べた酸性霧と乾燥の複合ストレスを与えたモミ (*Abies firma* Sieb. et Zucc.) 苗木のうち、99 冬処理のもの、酸性霧とオゾンの複合ストレスを与えたモミ苗木を分析に供試した。植物材料と生育条件、酸性霧暴露方法、乾燥処理方法、オゾン暴露方法についての詳細は、それぞれ本論文 2.2.1 章, 2.2.2 章, 2.2.3 章, 2.2.6 章で述べた通りである。この実験では 6 処理区を設けた。以下、コントロール(無処理区)を C 区, 酸性霧単独ストレス(長期酸性暴露のみ)を F 区, 乾燥の単独ストレス(乾燥ストレスのみ)を D1 区, 酸性霧と乾燥の複合ストレスを FD1 区, オゾンの単独ストレス(オゾン暴露のみ)を O 区, 酸性霧とオゾンの複合ストレスを FO 区とそれぞれ称呼する。F 区, FD 区, FO 区に対しては pH 3 の酸性霧を 1 週間に 2 回暴露した。C 区, D1 区, O 区に対しては霧の暴露を行なわなかった。暴露の際には、土壤に滴下した霧水による土壤酸性化を防ぐため、土壤表面をポリエチレン製ビニールシートで覆った。

4.2.2 活性酸素消去系酵素活性の測定

乾燥処理前後の時点で可視障害のない当年葉を採取し、直ちに液体窒素で凍結させた。試料は分析まで -80°C で保存した。あらかじめ 0.1 M 3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) – 水酸化カリウム溶液 (pH 7.5), 1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$), 1 mM ジチオトレイトール (DTT), 1 mM アスコルビン酸からなる抽出用溶液を調製した。乳鉢中で液体窒素で凍結しながら針葉を粉碎し、針葉 1 g あたり 3.0 ml の抽出用溶液, 0.1 g のポリビニルポリピロリドン (PVPP) を加え、ホモジナイズした。ホモジネートを 20,000 g で 5 分間遠心分離し

(MX-150, トミー精工), 上清を 4°C で 4 時間透析した。得られた酵素液の SOD, CAT, APX 活性は, それぞれ Asada et al. (1973), Beers and Sizer (1952), Tezuka et al. (1997) の方法で測定した。酵素活性はタンパク質濃度あたりで評価するため, ウシ血清アルブミンを標準物質として酵素液中のタンパク質濃度を Lowry et al. (1951) の方法で決定した。酵素活性は分光光度計 (U-3210, 日立製作所) を用い, 25°C で測定した。測定は近似の値が最低 3 つ得られるまで行なった。

4.2.3 統計処理

この実験において, モミ苗木に及ぼす影響を一元配置分散分析 (ANOVA) で評価した。有意水準 5% における有意差を Fisher の最少有意差法により求めた。データは, 処理後の絶対値を処理前の絶対値で除した相対値を求め, その平均値と標準誤差 (standard error, SE) で示した。繰返し数は 4 個体(乾燥ストレス)または 8 個体(オゾン暴露)とした。

4.3 結果と考察

図 4-1, 4-2 にそれぞれ乾燥処理, オゾン暴露後の活性酸素消去系酵素活性の相対値を示す。第 2 章の結果から, モミ苗木に対する酸性霧の暴露は気孔の開閉メカニズムを攪乱し, 気孔の働きのストレス応答でより重要となる乾燥ストレスやオゾン暴露において, それらへの感受性が高まることが明らかとなった。しかし本実験の結果から, 活性酸素消去系酵素の活性の変化は酸性霧による感受性の増大を反映するのではなく, 乾燥ストレス, オゾン暴露に対してそれぞれ異なる応答を示すことが示された。

植物の葉に吸収された光エネルギーは最終的に CO_2 を還元する。過剰な光エネルギーは葉中の酸素を還元し, その結果としてスーパーオキシドや過酸化水素といった活性酸素種を生成する。乾燥ストレス下においては気孔の閉鎖によって CO_2 の供給不足となり, 活性酸素種の生成が盛んとなるため, 活性酸素消去系酵素活性が上昇すると考えられる。しかし, 本実験で乾燥処理後の活性酸素消去系酵素活性を測定したところ, SOD と APX 活性は酸性霧暴露, 乾燥処理のいずれにも影響を受けず, 処理区間で有意な差は認められなかった (図 4-1a, 1b)。一方

CAT 活性は、C 区、F 区では 0.15 前後の値となり、季節変化による活性の低下が見られたのに対し、乾燥処理を行なった D1 区、FD1 区では値が 1.2 前後と、処理前の活性を維持した (図 4-1c)。結果として CAT 活性は、C 区、F 区と比較して乾燥処理による有意な上昇となった。

Schwanz and Poll (2001) は maritime pine や pendunculate oak を用いた実験で、SOD、APX 活性が乾燥処理で低下することを見出し、両樹種はオキシダティブストレスの増加に対応する酵素の活性化機能を持っていないのかもしれないと述べている。彼らはまた両樹種とも CAT が活性化されることを明らかにし、乾燥ストレスによって生じるオキシダティブストレスに、部分的に対処しているのであろうと考察している。Kozaki and Takeba (1996) は、CO₂ フラックスが制限された条件下では、光呼吸回路は光防御機能として作用すると述べている。この回路では、葉緑体内で行なわれる CO₂ 固定においてその受容体となるリブローズ-1,5-ビスリン酸 (RuBP) が、酸素と反応して 2-ホスホグリコール酸となる。さらにリン酸が加水分解されてグリコール酸が生成するが、これは葉緑体からペルオキシソームへ輸送される。ここでグリコール酸オキシダーゼによって酸素と反応し、グリオキシル酸と過酸化水素をを生成する。CAT はペルオキシソームに局在する酵素であり、この経路で生じた過酸化水素は CAT によって分解される。一方、高等植物において葉緑体中に CAT は存在せず、代わって APX がその役割を演じている (尼子・浅田, 1992)。ここでは、おもに光合成の光化学系 I で過剰となった電子と酸素から生じたスーパーオキシドラジカル (O₂^{·-}) が SOD で過酸化水素と酸素に不均化され、その過酸化水素を APX が水と酸素に分解する。したがって、本実験で観察された活性酸素消去系酵素の挙動から、乾燥ストレス下のモミ苗木ではスーパーオキシドラジカルを生じるオキシダティブストレスは発生しないものの、気孔閉鎖による CO₂ フラックスの制限で光呼吸経路が活性化され、その過程で大量の過酸化水素が生じたものと考えられる。一般に気孔が閉鎖すれば光過剰となり、オキシダティブストレスが発生するが、本実験でそれが見られなかったのは、冬期で光強度が大きくなかったためと考えられる。また、D1 区、FD1 区で CAT 活性に差が見られなかったことから、乾燥ストレスに伴う光呼吸経路の活性化に、酸性霧は影響しないことが明らかとなった。

図 4-2 に、オゾン暴露処理前の SOD 活性を示す。コントロール区、酸性霧暴露区との間に有

意差は認められなかった。オゾン暴露処理後の C 区, O 区, FO 区の SOD 活性を図 4-3a に示す。オゾン暴露を行った O 区, FO 区の SOD 活性は C 区に比べて有意に低下した。CAT 活性は C 区に比べて FO 区で有意に活性が上昇した。また, APX 活性は O 区の活性が C 区に比べて上昇する傾向が見られた (図 4-3b, 3c)。

植物中に侵入したオゾンは抗酸化物質との反応や、活性酸素消去系酵素の機能により分解されることが知られている。オゾンが侵入すると、活性酸素消去系酵素の一つである SOD が、オゾンから生成した活性酸素種を解毒するために活性化する。Inaba et al. (1998) によれば、240 ppb のオゾンを暴露したハンノキ中の SOD 活性は暴露から数時間後に上昇する。しかしながら、本研究ではモミ苗木に高濃度のオゾンを 2 回暴露し、2 度目の暴露後に採取した針葉の活性酸素消去系酵素活性を測定したところ、SOD 活性は霧の有無にかかわらず低下した (図 4-2)。オゾン暴露によって SOD 活性が低下したメカニズムについては、SOD そのものまたはその生合成系がオゾンにより損傷を受けたものと考えられる。Tanaka et al. (1985) は、オゾン濃度が低い場合は活性酸素消去系酵素活性が上昇するのに対し、高濃度では低下すると述べている。本実験でのオゾン濃度はモミの SOD 活性を低下させるほどの高いレベルであったと考えられる。

高見ら (2002) は、モミの衰退が観察され、大気汚染の影響を受けやすい大山の南東斜面 (大山地区) と、比較的受けにくい北西斜面 (札掛地区) において、これらの地域に植栽したモミの苗木と、モミの成木 (樹高約 25 m) の針葉中の活性酸素消去系酵素 (SOD, CAT, APX) 活性を測定し、比較検討した。その結果、成木の APX 活性を除き、植栽苗木、成木とも大山地区の酵素活性が札掛地区に比べて低下していることを明らかにした。これについて、大山地区のモミは樹木の持つ防御機構の許容範囲を越えた過剰なストレスが負荷されており、その結果酵素そのものまたはその生合成系が阻害されている可能性があるという結論付けている。大山では酸性霧とともに高濃度のオゾンも頻繁に観測されており (神奈川県, 1994)、本実験のオゾン暴露による結果から、高濃度のオゾン暴露は SOD の活性化または生合成系が阻害される、モミにとって過剰なストレスであることが示唆された。

4.4 まとめ

酸性霧暴露の有無にかかわらず、乾燥ストレスを受けたモミ苗木針葉中の SOD, APX 活性に変化はなく、気孔閉鎖に伴うオキシダティブストレスは生じていないことが推察された。これに対して CAT 活性は上昇したことから、CO₂ フラックスが制限された条件で光呼吸経路が活性化し、大量の過酸化水素が生成したものと考えられる。

オゾンの暴露は SOD 活性を低下させ、SOD そのもの、あるいはその生合成系がオゾンによって損傷を受けたものと考えられた。大気濃度 +100~150 ppb という高濃度のオゾンは、モミにとって過剰なストレスであると推察された。しかしながら、オゾンによる SOD 活性の低下も酸性霧の影響はなく、活性酸素消去系酵素活性の変化は、乾燥ストレス、オゾン暴露それぞれに対して異なる応答を示すことが明らかとなった。

第5章 長期酸性霧暴露が気孔開閉メカニズムに及ぼす影響

5.1 緒言

第2章でも述べたとおり、本研究で行ったモミ苗木に対する酸性霧の長期単独暴露によって、季節変化に対して気孔コンダクタンスの値が過剰に変化すること、酸性霧暴露と乾燥の複合ストレスでは気孔コンダクタンスが十分に低下しないこと、酸性霧暴露とオゾンの複合暴露では葉面に可視障害が発生することがそれぞれ観察された (Yoshida et al., 2004)。これらの結果は、酸性霧が気孔開閉メカニズムに影響を及ぼしていることを示唆している。一方、気孔コンダクタンスは蒸散速度と葉面の温度から計算された値であり、気孔の開度を直接測定したものではない。したがって気孔コンダクタンスが正しく気孔の変化を反映しているとみなすためには、蒸散速度に影響する他の因子についても長期酸性霧暴露の影響を検討しておかなければならない。

酸性霧が植物の蒸散速度に及ぼしうるさまざまな影響のひとつとして、葉の表面を覆うクチクラワックスへの影響が指摘されている (佐瀬・高松, 2000)。樹木葉面に付着した霧水は、霧水量が多くない限り滴下せず、霧水に含まれる汚染物質は葉面に残ることになる。このことから、酸性霧はクチクラワックスを変質、流亡させることが考えられる。これにより紫外線、病虫害、微生物への抵抗力が低下と同時に、クチクラ蒸散の促進が起こる。クチクラ蒸散の促進については、暗呼吸速度を測定することで判定することができる。

一方、長期酸性霧暴露が気孔の開閉メカニズムそのものに影響するとすれば、その作用点を明らかにする必要がある。気孔閉鎖におもに関わる植物ホルモンはアブシジン酸 (abscisic acid, 以下 ABA という) であるが、これが孔辺細胞の受容体に結合し、Ca など数段階の物質を介したシグナルカスケードを経てKチャンネルなどが開放され、その結果として孔辺細胞の浸透圧が低下することで気孔が閉鎖する。ここでABA濃度を測定し、その濃度に酸性霧暴露で差があれば、酸性霧暴露はABAの生成または輸送部位に影響を及ぼしていると判定され、差がなければそれより下流側のシグナル伝達経路に影響を及ぼしていると判断できる。

そこで本実験では、第一に、長期酸性霧暴露は蒸散特性を左右する因子に対して影響を及

ばすものではないことを明らかにするために、モミ苗木に長期間酸性霧 (pH 3) を暴露し、明条件下での気孔コンダクタンス、暗条件下での蒸散速度を測定し、加えて走査型電子顕微鏡による針葉の葉面観察も行ない、検討を行った。第二に、長期酸性霧暴露が気孔の開閉メカニズムに及ぼす影響をより詳細に明らかにすることを目的として、長期間酸性霧 (pH 3) を暴露したモミ苗木の ABA 葉内濃度、Ca, K の葉内濃度を測定した。

5.2 材料と方法

5.2.1 植物材料, 生育条件, 酸性霧暴露方法

本実験では、第2章で述べた酸性霧を暴露したモミ (*Abies firma* Sieb. et Zucc.) 苗木 (F 区), 酸性霧を暴露していないモミ苗木 (C 区) の針葉を各種分析に供試した。植物材料と生育条件, 酸性霧暴露方法についての詳細は本論文 2.2.1 章, 2.2.2 章で述べた通りである。

5.2.2 ガス交換速度(気孔コンダクタンス, 暗呼吸速度)の測定

ガス交換速度は、その測定時の当年葉のもので評価した。測定は酸性霧暴露開始 43 ヶ月後の 2003 年 2 月 (針葉は 2002 年 6 月に展開), 52 ヶ月後の 2003 年 11 月, 56 ヶ月後の 2004 年 3 月 (いずれも針葉は 2003 年 6 月に展開) に行った。測定には携帯用光合成蒸散測定装置 CIRAS-1 (PP Systems 社) に、パーキンソンリーフキュベット PLC(C/P) (PP Systems 社) を接続して用いた。供給する空気中の二酸化炭素濃度を 360 ppm, 湿度を 70%, 供給量を 400 ml/min に設定した。リーフキュベット内の光量子密度は 700 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ とした。気孔コンダクタンスの測定は朝 8 時ころから正午前までの間に行った。暗呼吸速度の測定は同日の日没後に実施した。測定に際しては葉面が乾燥していることを確認した。

5.2.3 走査型電子顕微鏡による葉面観察

葉面状態の観察には、気孔コンダクタンスに有意差の見られた(後述)2003 年 11 月のサンプルの量が充分でなかったため、酸性霧暴露開始 56 ヶ月後の 2004 年 3 月に採取した針葉を供

試した。C 区, F 区それぞれの外観上の健全な当年葉 (2003 年 6 月展開), 一年葉, 二年葉を採取し, そのまま風乾により二晩かけて乾燥させた。葉面観察用のサンプルはそのままイオンコーター (IB-3, Eiko) により金を蒸着させた。気孔数計測用・気孔面積算出用のサンプルは乾燥後クロロホルムに 10–20 秒間浸漬することでクチクラワックスを除去し, 葉面積を測定 (Yamamoto, 2000) した上で同様に金を蒸着させた。葉面状態の観察, 気孔数の計測, 気孔面積の算出には走査型電子顕微鏡 (SEM, S-4000K, 日立製作所) を用いた。気孔数の計測では一定面積内の気孔数を計測し, あらかじめ測定しておいた葉面積から針葉あたりの気孔密度を算出した。気孔面積の算出では, 各個体の気孔を撮影し, その最大長, 最大幅を計測した上で気孔を楕円に近似して面積を求めた。

5.2.4 養分状態の測定

外観上健全な当年葉を酸性霧暴露開始 39 ヶ月後にあたる 2002 年 10 月に採取し, 素早く液体窒素で凍結させ, -80°C で保存した。分析前にサンプルを解凍し, 80°C で 48 時間乾燥した。針葉の乾重あたりの Ca, K 濃度を求めるため, 針葉の乾重を測定し, その上でサンプルをマイクロウェーブサンプルプロセッサ ETHOS-1600 (Milestone Srl, Italy) で湿式灰化した。分解したサンプルは超純水で 25 ml にメスアップし, Ca, K 元素濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICAP, Jarrel Ash, USA) で測定した。

5.2.5 アブシジン酸含量の分析

図 5-1 に ABA の抽出・精製方法を示す。これは ABA 類の一般的な溶媒分配法 (平井, 1994) を参考に, 筆者が改良した方法である。酸性霧暴露開始 17 ヶ月後にあたる 2000 年 12 月, 39 ヶ月後にあたる 2002 年 10 月にそれぞれ外観上健全な当年葉を採取し, 素早く液体窒素で凍結させ, -80°C で保存した。凍結保存しておいた針葉 1 g を量り取り, 乳鉢中で液体窒素で凍結しながら粉碎し, ポリビニルポリピロリドン (PVPP) 0.1 g, 氷冷した 80%アセトン 50 ml, ABA の酸化防止のため (Milborrow and Mallaby, 1975) 2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルフェノール (BHT) を順に

加えた。溶液を冷暗所で 10 分間放置し、ろ紙 (5C, 東洋濾紙) でろ過した。ろ液中のアセトンを残去し、ヘキサンで分配分液を行ない、水層を回収した。水層に 1N HCl を 3-4 滴加え、酢酸エチルで分配分液を行ない、有機層を回収した。続いて 2% NaHCO₃ 溶液で分配分液を行ない、水層を回収した。この水層を 1N HCl で pH 3 に調整し、酢酸エチルで分配分液を行ない、有機層を回収した。有機層を飽和 NaCl 水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを残去し、得られた固形物をアセトン 1 ml に溶解した。

ABA の分析には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた。プレカラムに Shin-Pack GRD-ODS (島津製作所) を用い、分離カラムには逆相カラム STR ODS-II, 4.6×15 (信和化工) を 2 本接続して用いた。カラムをカラムオープン (CTO-10A, 島津製作所) にセットし、温度を 40°C に設定した。溶離液は 0.2% リン酸:メタノール= 65:35 の定濃度溶液とし、送液ユニット LC-10AT (島津製作所) により流速は 1.0 ml/min とした。検出には UV-VIS 検出器 (SPD-10A, 島津製作所) を用い、検出波長は UV 254 nm とした。

5.2.6 統計処理

この実験では、得られたガス交換速度、気孔密度、元素濃度、ABA 濃度の値に対し、Fisher's LSD-test を行なった。有意水準は 5% とした。すべてのデータは 7 個体の繰返しによる平均値とその標準誤差で表示する。

5.3 結果

5.3.1 ガス交換速度

図 5-2 に酸性霧暴露開始 43 ヶ月後にあたる 2003 年 2 月の光飽和下での気孔コンダクタンス、暗黒下での蒸散速度を示す。いずれも処理区間で有意差は認められなかった。

図 5-3 に酸性霧暴露開始 52 ヶ月後にあたる 2003 年 11 月の光飽和下での気孔コンダクタンス、暗黒下での蒸散速度を示す。気孔コンダクタンスは C 区に比べて F 区で有意な上昇が認められた。その一方で、暗黒下での蒸散速度は処理区間で有意差はみられなかった。

図5-4に酸性霧暴露開始56ヶ月後にあたる2004年3月の光飽和下での気孔コンダクタンス, 蒸散速度を示す。気孔コンダクタンス, 蒸散速度ともに処理区間で有意差はみられなかった。

5.3.2 葉面状態

図5-5に2004年3月時点での当年葉(2003年6月展開)の表側の電子顕微鏡写真を示す。モミの表側は緩やかな波を打ったような比較的平滑な構造であった。表面には砂塵と思われる粒子状の物質や, 同定はできないが繊維状の物質が多く見られ, それらの傾向にC区, F区で大きな違いはなかった。

図5-6に2004年3月時点での当年葉の裏側, 中央にある葉脈の両側に存在する気孔帯の写真を示す。モミの気孔帯はこの写真のように厚いクチクラワックスに覆われ, 気孔を見ることはできなかった。ワックスの表面にはいくつもの亀裂が認められ, この亀裂を介してガス交換が行なわれているものと考えられる。亀裂の形成など, ワックスの構造にC区, F区で大きな違いはなかった。

図5-7に当年葉の気孔帯の拡大写真を示す。白い枝状のものはクチクラワックスの結晶構造である。C区, F区とも結晶構造は同様に発達しており, 処理による大きな違いはみられなかった。

図5-8に2004年3月時点での一年葉の気孔帯を示す。当年葉と異なり, 表面上に粒子状の物質が多く見られた。部分的にクチクラワックスの結晶構造が見られるものの, 経年に伴うワックスの塊状化が両処理区とも見られた。

図5-9に2004年3月時点での二年葉の気孔帯を示す。一年葉と同様, 表面上に粒子状の物質が多く見られ, クチクラワックスの結晶構造は部分的であった。経年に伴うワックスの塊状化がより進行していることが認められ, その傾向はC区, F区とも同様であった。

図5-10に2004年3月時点での当年葉の, クチクラワックスを除去した気孔帯を示す。気孔帯には気孔がほぼ規則正しく配列していた。気孔数と葉面積から求めた針葉全体の平均気孔密度はC区: 69 ± 4 個, F区: 65 ± 5 個であった。両処理区間に有意差は認められなかった。

図 5-11 に 2004 年 3 月時点での当年葉の気孔を示す。気孔の最大長, 最大幅から, 気孔を楕円に近似して求めた気孔面積の平均値は C 区: 331.8 ± 12.0 , F 区: $336.5 \pm 24.9 \mu\text{m}^2$ であり, 両処理区間に有意差は認められなかった。

5.3.3 葉内 ABA, Ca, K 濃度

図 5-12 に, 酸性霧暴露開始 17 ヶ月後にあたる 2000 年 12 月, 39 ヶ月後にあたる 2002 年 10 月の, モミの当年葉(生重) 1 g あたりのアブシジン酸量を示す。葉内 ABA 濃度は, いずれも両処理区間で有意な差は認められなかった。

図 5-13 に, 酸性霧暴露開始 39 ヶ月後にあたる 2002 年 10 月の, モミの当年葉(生重) 1 g あたりの Ca, K 濃度をしめす。当年葉内の Ca, K 濃度もまた, C 区, F 区の両処理区間で有意な差は認められなかった。

5.4 考察

これまでに酸性降下物がクチクラワックスに及ぼす影響について, さまざまな報告がされている。伊豆田ら (1993) はモミに人工酸性雨を暴露し, 暗条件下における蒸散速度の促進を観察している。松村ら (1995) もまた, ウラジロモミ (*Abies homolepis* Sieb. et Zucc.) に対する酸性霧暴露実験で同様の結果を得ている。しかし本実験の結果から, 2003 年の 2 月, 11 月の測定でいずれも, 酸性霧暴露区の暗黒下での蒸散速度はコントロールと差はなかった。測定した当年葉は展開してからそれぞれ 8 ヶ月, 5 ヶ月が経過し, その間酸性霧の暴露を受けているが, これらの結果は, 酸性霧暴露によってクチクラ蒸散に差が生じないことを意味しており, つまり, 本研究における pH 3 の酸性霧の週 2 回の暴露ではクチクラワックスの流亡・変質を引き起こさなかったものと考えられる。さらに 2003 年 11 月の測定時では, 光飽和下での酸性霧暴露区の気孔コンダクタンスはコントロール区に比べて有意に上昇した。第 2 章で述べたように, 酸性霧の暴露はモミ苗木の気孔コンダクタンスに対して, コントロール区に比べて冬期では過剰な低下を, 夏期には過剰な上昇を引き起こす (Yoshida et al., 2004)。これにより, 酸性霧暴露が気孔の開閉メカニ

ズムに影響を及ぼし、クチクラ蒸散に影響しないことが再確認された。なお、11 月であっても気孔コンダクタンスの有意な上昇が見られたことについては、この測定日のハウス内の最低気温 3.3°C まで低下したものの、測定を行なった午前中までにハウス内の気温が 17.0°C まで上昇し、温度差が大きかったためと思われる。

これまでに、酸性降下物などの汚染物質がワックスの構造に影響を与えることが報告されている。Crossley and Fowler (1986) は、主に二酸化硫黄による大気汚染地域と非汚染地域に生育する Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) のクチクラワックスを電子顕微鏡により観察し、その経年劣化、すなわちワックスのチューブ状の結晶構造が短小化、肥大化、非結晶化が汚染地域で早まることを明らかにした。Percy and Baker (1990) は、Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) に 4 種類の酸性度 (pH = 5.6, 4.2, 3.4, 2.6) の霧を暴露したところ、ワックスの量は酸性度の影響を受けなかったのに対し、ワックスの構造は pH 3.4 以下で非結晶化するなど、大きく変化したと述べている。Esch and Mengel (1998) は、pH 3 及び pH 5 (コントロール) の霧をドイツウヒ苗木に一週間に 3 回、10 週間にわたって暴露し、ワックスの構造が pH 5 では変化しなかったのに対し、pH 3 ではワックスの構造の連続性が消失することを明らかにした。Mengel et al. (1989) は、pH 5 (コントロール) の霧ではドイツウヒ苗木のワックスの結晶構造が保たれるのに対し、pH 3 の霧では細線状のワックスが溶解すると報告している。さらに Percy et al. (1992) は、葉面に水滴を滴下し、水滴と葉面の接触角をクチクラワックス劣化の程度の指標とする濡れ性 (wettability) の評価を用いて red spruce (*Picea rubens*) に対する酸性霧の影響を検討した。その結果、酸性霧の暴露を受けた red spruce では濡れ性の増大が確認された。その一方で Günthardt-Goerg and Keller (1987) は、ドイツウヒに長期にわたって 50 または 150 ppb のオゾンを暴露したものの、ワックスの結晶構造の消失、平滑化はコントロール区と同様であり、オゾンの影響を受けなかったとしている。Kerfourn and Garrec (1991) は、衰退地域に生育するドイツウヒ、オゾンと酸性霧の複合暴露を行ったドイツウヒ、ivy (*Hedera herix*) でワックスのアルカンの組成が変化することを見出したが、これは汚染物質による受動的な変化ではなく、生合成系が変化することによることを明らかにした。また、Barker and Ashenden (1992) は、ヒイラギに酸性霧を暴露したところ、ク

クチクラの透水性と Mg, Ca の溶脱量の増加を観察したものの、エピクチクラワックスの濡れ性や葉面積あたりのワックス量は酸性霧の影響を受けないことを明らかにした。このように酸性霧をはじめとする汚染物質の暴露はワックスの表面状態や結晶構造を変化させる要因となりうるが、すべてにおいて劣化を生じさせるものではない。本研究においても、当年葉、一年葉、二年葉ともに葉面状態に処理区間で大きな差がなく、モミ苗木に対する酸性霧暴露はワックスの劣化の促進要因とはならないことが明らかとなった。これは、本研究での酸性霧の暴露が一週間に2回ずつ、それぞれ 10 分間と非常に穏和な条件下で行なわれていたためと思われる。なお、これらの電子顕微鏡観察によって葉面上に多くの砂塵と思われる粒子状物質が認められた。葉面に沈着した粒子状物質は気孔に侵入して気孔の閉鎖を物理的に阻害したり、ガス交換を制限したりすることが知られているが (Crossley and Fowler, 1986)、モミの針葉の気孔帯はワックスで厚く覆われており、そのワックスの構造は酸性霧暴露で影響を受けなかったことから、本実験では粒子状物質の気孔侵入は生じ得ない。さらに、本実験では酸性霧暴露区と、酸性霧を暴露しないコントロール区を設けて比較検討したため、霧の暴露を受けることに適応し、針葉の単位面積あたりの気孔数や、気孔の大きさが変化している可能性が考えられたが、気孔密度、気孔面積ともに酸性霧暴露区、コントロール区で差がなかったことから、それらが蒸散特性に影響を与えたわけではないと考えられた。

酸性霧暴露区、コントロール区で、ワックスの結晶構造などの葉面状態に大きな違いはなく、また、気孔の密度や気孔の大きさにも差が生じないという電子顕微鏡観察の結果は、酸性霧暴露によるクチクラ蒸散の変化は生じないという先の結果と一致した。そしてこれらの結果は、酸性霧暴露はモミ苗木の気孔開閉メカニズムそのものに影響を及ぼすという第 2 章の推察を支持した。したがって、酸性霧暴露によって気孔の不可逆的な機能不全が生じる、つまり気孔が開いたままになってしまうということではなく、また、クチクラワックスも酸性霧による影響を受けているとは考えられなかった。すなわち、第 2 章で推察したように、酸性霧暴露は気孔開閉メカニズムを直接的に攪乱することが示唆された。

5.2.1 で述べたように、気孔の開閉を制御するメカニズムは複雑であり、いくつかの段階を経て

おこなわれる。本実験の結果から、酸性霧暴露開始 17 ヶ月後、39 ヶ月後の、モミの当年葉(生重) 1 g あたりのアブシジン酸量は、17 ヶ月後、39 ヶ月後ともいずれも両処理区間でその濃度に有意な差は認められなかった。このことは、長期酸性霧暴露は、ABA 合成部位やその輸送経路に影響を及ぼさないことを示唆している。これまでに、大気汚染地域に生育する *arolla pine* (*Pinus cembra*) の葉内 ABA 濃度の日変化の振幅が大きくなること (Yang et al., 1993) や、オゾン暴露したドイツウヒ (Bianco and Dalstein, 1999) で葉内 ABA 濃度が上昇することが報告されているが、酸性霧での報告例はない。また、Ca イオンは ABA が結合した孔辺細胞中でシグナル伝達の役割を持つ物質であり、K イオンはシグナル伝達を受けてイオンチャンネルが開かれ、気孔閉鎖時は孔辺細胞から放出される。しかし、酸性霧暴露開始 39 ヶ月後のモミの当年葉内の Ca、K 濃度もまた、C 区、F 区の両処理区間で有意な差は認められなかった。このことから酸性霧の暴露によって葉内 Ca、K 濃度が変化し、その結果としてシグナル伝達が攪乱されているわけではないことが示された。

したがって、以上の結果を総括すると、ABA よりも下流側、孔辺細胞の ABA 受容体からシグナルカスケード、イオンチャンネルまでの部位に酸性霧は作用し、その動きを攪乱させることを示唆している。これまでに、大気汚染物質が気孔の開閉メカニズムに及ぼす影響についての報告例はいくつか存在する。Atkinson et al. (1991) は、ハルオオムギ (*Hordeum vulgare* L. cv. Klaxon) に二酸化硫黄 (SO₂)、二酸化窒素 (NO₂) の混合ガスを暴露させ、分離した葉に ABA を処理したところ、非汚染大気を暴露させた葉に比べて気孔の反応が低下することを明らかにした。この結果は、大気汚染物質が ABA など調節物質に対する孔辺細胞の応答能力を低下させていることを示唆している (McAinsh et al., 2002)。また、Fink (1991) は、ドイツウヒ (*Picea Abies*) のシュウ酸 Ca の分布を検討し、コントロール区では結晶は針葉の表皮部分に局在するのに対し、オゾン暴露区では孔辺細胞の液胞にも分布し、このことからオゾン暴露は孔辺細胞に Ca²⁺ を流入させ、Ca²⁺ によるシグナル伝達を攪乱させるのではないかと推察している。これらの研究から、大気汚染物質は ABA よりも下流側の孔辺細胞の ABA 受容体やその先のシグナルカスケードの機能を攪乱することが考えられる。しかし、本研究の結果は、不可逆的な気孔

開閉機能の不全ではなく、これらの機能が温度などの環境因子に対して過剰に応答していることを意味している。そもそも孔辺細胞におけるシグナル伝達にはまだ不明な点が多い。シグナルカスケードの中で環境変化に応答する部位があるのかどうか、そしてそれが酸性霧の影響をどのように受けるのか、より詳細な検討が必要である。

5.5 まとめ

酸性霧の暴露を行なったモミ苗木の暗黒下での蒸散速度は、暴露を行わなかったモミ苗木のそれと差がなく、これまで多く報告されているような酸性降下物によるクチクラ蒸散の促進は、この暴露条件では生じないことが明らかとなった。モミ針葉の電子顕微鏡観察の結果、当年葉、一年葉、二年葉とも葉面状態に、霧の有無による大きな違いは認められなかった。pH 3、一週間に二回の酸性霧暴露は、クチクラワックスの劣化や流亡といった結晶構造の変化が引き起こすには充分でないことが示された。この結果は酸性霧はクチクラ蒸散に影響しないという結果と一致したほか、酸性霧は気孔開閉メカニズムそのものに影響を及ぼすというこれまでの仮説を支持した。

モミ針葉内の ABA 濃度は、酸性霧の暴露の有無でその差はなく、孔辺細胞における ABA の結合部位、あるいはその先の気孔閉鎖のシグナル伝達経路に酸性霧が影響を及ぼすことが推察された。また、気孔閉鎖のシグナル伝達に関わる Ca, K の葉内濃度も酸性霧暴露で変化しないことが示され、葉内 Ca, K 濃度変化の結果としてシグナル伝達が攪乱されているわけではないことが明らかとなった。

第6章 総合考察

6.1 酸性霧暴露がモミ苗木に及ぼす影響

本研究で得られた結果を表 6-1 に示す。これに、これまでに提案されている酸性霧が樹木に及ぼす影響を重ね合わせると、図 6-1 のように示すことができる。

酸性霧は、土壤に落下した霧水が土壤を酸性化させることによる樹木への間接影響を生じさせる可能性もあるが、酸性霧は植物の葉に付着しやすく滴下しにくいいため、植物体地上部への直接影響の割合がほとんどであると考えられる。しかしながら、これまで行われてきた酸性霧の影響に関する実験的研究では、この直接・間接影響の両者を分離しない、つまり暴露した霧水の地上部への滴下を許す実験系であるか、積極的に両者の複合ストレスとして検討した研究例がほとんどである。一方、切り枝実験などで間接影響を含まない研究例が見られるほか、Esch and Mengel (1998) の報告のように、酸性霧が土壤に落下するのを防止した研究例もある。このような直接・間接影響を分離した研究は、酸性霧が樹木に及ぼす影響を明確にする上で重要である。本研究では、酸性霧暴露において土壤表面にビニールシートを敷き、酸性霧による土壤の酸性化を防いだ。これにより、特に土壤酸性化、窒素負荷、根圏 Al の複合ストレス実験において、処理による測定項目の変化が地上部への酸性霧によるものか、あるいは地下部へのこれらの処理によるものかを明確にすることができた。

これまで行われてきた実験的研究では、酸性霧が樹木生理に及ぼす影響について、霧水の酸性度や主要な無機酸の構成成分を中心に議論されており、有機酸や酸化性物質について調べた報告は極めて少ない。しかし、自然条件下で観測される酸性霧には主要な無機イオンだけでなく、有機化合物や酸化性物質も含まれている。有機酸や酸化性物質は主要イオンに比べれば少量であるが、それらの植物への影響は無視できない。本実験では、酸性霧中で観測されることの多いギ酸と酢酸を添加した。これらを含まない酸性霧との比較検討を行っていないためその影響について言及することはできないが、酸性霧暴露による気孔開閉メカニズムの攪乱という、これまでの報告例にない結果が得られた原因の一つとして、有機酸の存在があるのかもし

れない。

図6-1で示したように、酸性霧は樹木に対してさまざまな影響を及ぼすことは明らかであるが、葉面の可視障害が生じることはあっても、苗木レベルで枯死を招くほどの影響があるとは言えない。また、自然条件下では強酸性の霧が常時発生しているわけではなく、酸性霧だけで森林衰退を説明するのは困難である。自然条件下で生育する樹木は、高温、低温、乾燥、強風、病虫害やあるいは他の大気汚染物質など、酸性霧だけでなく様々なストレスにさらされている。例えば、モミの枯損が発生した丹沢大山では、酸性霧をはじめとする大気汚染物質とともに、ハラアカマイマイやナラタケ病といった病虫害の関与の可能性が指摘されている（神奈川県，1994）。以上のことから、地上部ストレスとしての酸性霧の負荷が、樹木にどのような影響を直接与えるのかを十分に検討した上で、酸性霧は他のストレスの感受性を高めるのかを明らかにすることは非常に重要である。

本研究では、ポットに植栽したモミ苗木に対して pH 3 の酸性霧を 1 週間に 2 回、10 分間ずつ暴露し、その上で自然環境下で発生しうるさまざまなストレスを負荷した。いずれの負荷実験においても、酸性霧暴露だけでは可視障害は発生しなかった。1999 年 7 月の酸性霧暴露開始から約 5 年が経過した 2004 年 6 月現在においても、酸性霧暴露区の苗木に、コントロール区の苗木同様可視障害は確認できない。このことは、酸性霧だけでは、モミにとって樹勢が低下するような顕著なストレスにはならないことを示している。しかし、第 2 章の結果（Yoshida et al., 2004）から、酸性霧を暴露したモミ苗木の気孔コンダクタンスは、コントロールに比べて冬期に低く、夏期に高くなる傾向が見られること、酸性霧を暴露したモミ苗木にオゾンを暴露すると可視障害が発生すること、酸性霧を暴露したモミ苗木の気孔コンダクタンスは、冬期の乾燥ストレス下で気孔の閉鎖が充分でなくなる傾向が観察された。これらのことから、酸性霧の暴露は、外観上の変化を生じさせなくとも、気孔の応答にかかわる因子に対して潜在的な攪乱要因として振舞うことが推察された。

第 1 章で述べたとおり、酸性霧が植物に対して直接的に及ぼす影響のひとつとして、葉面ワックス(クチクラワックス)の劣化・流亡に伴う過剰な蒸散が指摘されている。しかしながら、本実験

は長期の酸性霧暴露の有無によるクチクラワックスの外観の差に大きな違いが認められなかった(第5章)。この結果は、モミのクチクラワックスは酸性霧の影響を受けにくく、酸性霧によるクチクラワックスの劣化・流亡が樹勢の低下を引き起こすものではないと言える。また、本実験の長期にわたる酸性霧暴露に適応することにより、葉面の気孔の大きさや、分布の密度に変化が生じる可能性も考えられたが、測定の結果変化はなく、その可能性は否定された。これにより、長期の酸性霧暴露は、気孔の開閉メカニズムそのものに影響を及ぼすことが推察された。

そこで第5章ではさらに、気孔閉鎖をつかさどる植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) の定量を行なった。その結果、葉内のABA濃度に酸性霧の有無で有意差はなく、気孔開閉メカニズムでもABAの受容体か、その下流側のシグナルカスケードに酸性霧が影響していることが明らかとなった。図6-2に気孔閉鎖にいたるシグナル伝達概念図を示す。ABAは気孔閉鎖の一次シグナルであり、その二次メッセンジャーの一つとしてCaイオンが存在する。孔辺細胞中でCaイオン濃度が上昇すると、気孔閉鎖のシグナルが伝達され、アニオンやKイオンが孔辺細胞から放出され、気孔が閉鎖する。これまでに、硫酸化物、窒素酸化物、オゾンといった乾性大気汚染物質は、植物の気孔の応答を攪乱することが報告されており、その多くはCaイオン濃度について言及している (McAinsh et al., 2002)。Le Thiec et al. (1994) は Norway spruce でオゾン暴露による気孔コンダクタンスの低下と、X線解析による孔辺細胞のサイトソル中のCaイオン濃度の上昇を観察している。また、植物中に侵入したオゾンから生成する過酸化水素もまた、気孔開度に影響することが示されている。Price et al. (1994) は、タバコに過酸化水素を暴露すると、サイトソル中のCaイオン濃度が上昇し、それが暴露した過酸化水素の濃度に依存することを明らかにした。McAinsh et al. (1996) もまた、*Commelina communis* に対する過酸化水素の暴露によって孔辺細胞のサイトソル中のCaイオン濃度が上昇し、気孔の開放が抑制されることを報告している。以上のことから、オゾンは過酸化水素に変化することで孔辺細胞のサイトソル中のCaイオン濃度を上昇させ、その結果気孔を閉鎖させるものと考えられる。オゾンと同様に、二酸化硫黄と二酸化窒素の複合暴露も、気孔コンダクタンスの低下、サイトソル中のCa濃度の上昇が観察されている (Carlson, 1983; McAinsh et al., 2002)。これらの報告に対して、大気汚染物質は植

物の気孔開閉メカニズムの攪乱する要因であるという見方もあるが (McAinsh et al., 2002), いずれも気孔閉鎖につながる Ca イオン濃度の上昇を引き起こしていることから、植物の大気汚染物質に対する防御反応の一つと考えることもできる。気孔の開閉メカニズムは複雑で、まだ完全には明らかにされていない。これらの大気汚染物質が孔辺細胞のサイトソル中の Ca イオン濃度を上昇させる現象についても、その関連メカニズムは不明であり、大気汚染物質に対する直接的な応答なのか、副次的なものであるかも未解明である。また、大気汚染物質の種類によって、さらに同じ大気汚染物質であっても、短期暴露であるのか長期暴露であるのかで植物の気孔の応答が異なることは少なくない (McAinsh et al., 2002)。植物影響の観点から、これまで示されてきたような乾性汚染物質と、酸性霧のような湿性汚染物質との違いは大きい。本実験の結果から、このような単純な気孔の閉鎖とはメカニズムが異なっていることは明らかであろう。しかし、これらの報告で示された孔辺細胞のサイトソル中の Ca イオン濃度の変化が、本実験の酸性霧暴露でも起きていた可能性は否定できず、酸性霧による気孔開閉メカニズムへの影響を解明するためには、Ca イオンの局在についてさらに詳しく検討する必要があると考えられる。

ところで、第 4 章では、オゾン暴露と活性酸素消去系酵素活性との関連を検討した。上で述べたように、過酸化水素は気孔閉鎖を引き起こすことが実験的に示されてきたが (Price et al., 1994; McAinsh et al., 1996), 過酸化水素が気孔閉鎖のシグナル伝達に必要であることを示唆した報告がある。Pei et al. (2000) は、*Arabidopsis* 孔辺細胞のイオンチャンネルに対する過酸化水素の影響を検討し、その中で、ジフェニレンヨードニウムクロライドを用いて過酸化水素の生成を抑制すると、ABA を介した気孔閉鎖が阻害されることを明らかにした。一般に、植物体に侵入したオゾンは体内の水と反応し、過酸化水素が生成すると考えられている ($O_3 + 3H_2O \rightarrow 3H_2O_2$)。本研究では、酸性霧を暴露したモミ苗木に対して、オゾンを暴露すると可視障害が発生することが明らかとなった (図 2-2, Yoshida et al., 2004)。過酸化水素が気孔閉鎖作用を持つことを考慮すると、酸性霧の暴露によって引き起こされる気孔開閉メカニズムの攪乱は、気孔閉鎖のシグナルカスケードの ABA よりも下流側であるだけでなく、過酸化水素の下流側に酸性霧が影響することで生じているのかもしれない (Yoshida et al., 未発表データ)。酸性霧とオゾンを複合暴露し

た苗木では、2 回目のオゾン暴露の後でもカタラーゼ (CAT) 活性が有意に上昇していることから (図 4-3), この時まで葉内の過酸化水素濃度の上昇していたと考えられる。しかし、気孔コンダクタンスはオゾンの単独処理区に比べて有意に高く、過酸化水素濃度の上昇とは相関が見られなかった。このことは、過酸化水素の下流側に酸性霧が影響するという推察を支持するものであろう。Maggio et al. (2002) によれば、カタラーゼを欠損させたトランスジェニックのトマトでは、アスコルビン酸 (AsA) の添加が乾燥ストレスを緩和させることから、高いレベルの過酸化水素は AsA サイクルに影響を及ぼすことが示唆されている。酸性霧暴露が気孔閉鎖に及ぼす影響を明らかにするためには、酸性霧を暴露したモミ苗木における AsA サイクルについての検討が必要になるであろう。

第 3 章では養分状態に着目したが、酸性霧暴露と土壤酸性化、窒素負荷、根圏アルミニウム処理の各複合ストレスによる影響は軽微であり、それぞれの単独影響の方が顕著であった (Yoshida et al., in press; Yoshida et al., submitted)。この中で、気孔の開閉メカニズムに関与する Ca と K の葉内濃度が変化したのは根圏アルミニウム処理であった。酸性霧の有無にかかわらず根圏へのアルミニウムの処理は葉内の Ca 濃度をおよそ 1.80 から 1.32 mg/g DW に低下させ、K 濃度およそ 13.6 から 16.3 mg/g DW に上昇させた。しかし、この処理による気孔コンダクタンスの変化は認められなかった。モミ針葉の乾重比 (DW/FW) はほぼ 0.4 であることから (未発表データ)、生重に換算するとそれぞれ Ca: 18.8, 13.3 μM /g FW, K: 138, 166 μM /g FW と見積もられる。一方、Clayton et al. (1999) によれば、*Arabidopsis* のサイトソル中の Ca 濃度は通常で 0.05 μM 程度である。また faba bean 気孔中の K 濃度は開放時で 424×10^{-8} μM , 閉鎖時で 20×10^{-8} μM であるとされている (Marschner, 1997)。モミの気孔中の Ca, K 濃度を測定した報告例はないが、これらと同程度と仮定すると、葉内の Ca, K は気孔中のものよりもはるかに濃度が高く、これらの元素の細胞内の恒常性さえ保たれていれば、今回観察されたような濃度の変化は影響しないと考えられる。

本研究では、モミの養分状態について針葉単位、あるいは細根単位でしか測定していない。しかし、以上述べた点を考慮すると、今後は酸性霧暴露による孔辺細胞中のイオン濃度変化を

把握していく必要があると思われる。これらの濃度の変化を、気孔が開放する光照射下から気孔が閉鎖する暗黒下まで動的に測定することで、酸性霧が気孔開閉に及ぼす影響のメカニズムが解明されることが期待される。同様に、気孔閉鎖のシグナルカスケードに関与している可能性のある過酸化水素についての検討も、影響メカニズムの解明に資するものと考えられる。

6.2 大山地区におけるモミの枯損

本研究の背景には、神奈川県西部の大山におけるモミの衰退現象がある。本研究で得られた知見を基に、最後にこの衰退現象の原因の可能性について若干の推論を試みる。

これまでに、大山に生育するモミについていくつかの研究がなされてきた。菊川・相原(1995) は、都市域である神奈川県平塚市に植栽したモミ苗木および、山岳域の丹沢山地大山地区・札掛地区・犬越路地区に自生するモミ成木について電子顕微鏡による微細構造の観察を行った。その結果、植栽した苗木では粒子状物質が葉面に多く付着していたのに対し、自生の成木では繊維状の物質が多く付着し、その程度は犬越路地区より大山、札掛地区のほうが大きいことを明らかにした。しかし、クチクラワックスの構造や付着量などに苗木・成木間、地区間の大きな違いは見られなかったと報告している。このことは、大気が比較的清浄と考えられる札掛地区、犬越路地区に対し、都市域の平塚市や、酸性霧や高濃度オゾンの発生頻度の高い大山地区においても、それらによるクチクラワックスの劣化や流亡が起きているわけではないことを示している。そして、これらの結果は、酸性霧暴露ではモミ苗木のクチクラワックスの状態に変化が生じないという点で本研究の知見と一致した。よって、酸性霧による気孔開閉メカニズムの攪乱に焦点を当てて述べる。

そもそも気孔開閉のメカニズムに攪乱が生じると、第1章で述べたように他の環境ストレス、特に乾燥ストレスや乾性の大気汚染物質に対する感受性が高まる(吉田・竹中, 2004)ことが考えられ、事実、本研究ではそれらのストレス下において不適切な気孔の応答が観察された(第2章: Yoshida et al., 2004)。まず乾燥ストレスについて検討すると、大山は別名雨降り山と呼ばれているように降水量が多く、1982年から91年では年間降水量が1786 mm(1982年)から2570

mm (1991 年) と, おおむね 2000 mm 前後で推移している (神奈川県, 1994)。また, これを季節別に見ると, 1988 年から 91 年までの平均で冬季:230 mm, 春季: 488 mm, 夏季: 856 mm, 秋季: 719 mm であり (神奈川県, 1994), 春から夏にかけて霧が発生しやすいのに対し, 秋から冬は霧の発生がほとんどなく, 太平洋側の気候の特徴として冬期は乾燥する傾向がある。特に 1988 年の大山の冬季の降水量は 102 mm に留まっている。冬期の少雨傾向が強まれば乾燥ストレスの影響が大きくなると予想されるが, 大山のモミは一般に林冠を形成しているため, 土壌が乾燥するほどの状態になるとは考えにくい。従って, 酸性霧がモミの気孔開閉メカニズムを攪乱し, さらに冬期の乾燥傾向が加わることによってモミの樹勢が低下すると考えるのは困難である。

一方, 大気汚染物質に対する感受性について検討すると, モミの急速な枯損を引き起こした一因と考えられる硫黄酸化物 (SO_x) による大気汚染は, 脱硫装置の設置などの対策が進み, 急速に改善された。それに対して窒素酸化物 (NO_x) による大気汚染は, さまざまな対策が講じられているにもかかわらず横ばいで推移している。例えば二酸化窒素濃度 (NO_2) は, 1973 年時点で横浜市(神奈川県庁)が 43 ppb, 大山山麓の伊勢原市(市役所)が 25 ppb となっていたのに対し, 1990 年度の平均値は横浜市(戸塚区): 28 ppb, 伊勢原市(市役所): 27 ppb であり, 両地点の 1990 年度の平均 NO_x 濃度はそれぞれ 47, 56 ppb に及ぶ (神奈川県, 1994)。この NO_x は, 大気中で光化学反応によりさまざまな物質を生成することが知られており, 特に空気中の酸素, 窒素に加えて炭化水素が存在すると, 大量のオゾンが生成する (植田, 1990)。大山のモミ林に近い阿夫利神社下社における NO_x 濃度は 6 ppb (1991 年度平均) 程度に過ぎないのに対し, 同年のオゾンの年平均値は 30 ppb, 60 ppb 以上を観測した日数は 65 日 (延べ 319 時間), さらに 120 ppb 以上を観測した日数も 6 日 (延べ 18 時間) あり, 最高値は 180 ppb であった (神奈川県, 1994)。これは神奈川県内で最もオゾン濃度レベルの高い横浜市戸塚区の値とほぼ同程度である。以上のことから, 大山のモミは, 酸性霧だけでなく高いレベルのオゾンの暴露も受けていると考えられる。従って, 酸性霧によってモミの気孔開閉メカニズムが攪乱され, それが頻繁に発生する高濃度オゾンの侵入を許容し, オゾンによる組織の傷害が樹勢の低下を招くというプロセスが可能性の一つとして考えられる。

一方、これらの他に本研究では、酸性霧暴露とともに気象要因によるストレスとして低温、細根切断処理を、大気汚染起源のストレスとして土壌酸性化、窒素負荷、根圏アルミニウム処理を行なった。低温ストレスは、春先に生じる「寒の戻り」を想定したものである。神奈川県地方では一般に、3月はまだ寒気が入りやすく、一時的に冬型の気圧配置に戻るため冷え込む日もあり、5月上旬でもよく晴れた夜には山沿いの地方では晩霜の被害が生じることもある。特に標高の高い大山では春先の低温傾向は平野部に比べて多く発生していることが予想される。本研究では、酸性霧を暴露したモミ苗木に低温ストレスを与えると、その直後の純光合成速度が有意に低下することが明らかとなった。しかし、その低下は一時的なものであることから、大山におけるモミの樹勢の低下に対する低温ストレスの寄与度は低いと考えられる。

細根切断ストレスにおいて、根のバイオマス低下によるものと考えられるガス交換速度の低下が観察された。このストレスは台風などの強風の影響を想定したものであるが、神奈川県において被害をもたらした台風は数多い(神奈川県, 1994)。風速(最大瞬間風速)で見ると、1966年の台風第26号は41.4 m/sを、1979年の台風第20号は37.4 m/sを、1982年の台風第10号は40.8 m/sを記録している。一方大山のモミは、樹高が30 m近くに及び、林冠を形成していることから風の影響を受けやすいと考えられる。しかし同じ大山でも樹勢の低下が南東斜面の大山地区で顕著であり、北西斜面の札掛地区のモミは比較的健全である。強風による被害が大山地区で特に大きくなるとは考えにくく、さらに本研究で細根切断ストレスは酸性霧との複合影響がみられなかったため、細根の切断が大山地区のモミの衰退要因の一つとみなすのは無理があると考えられる。

一方、土壌酸性化・窒素負荷は大山地区において懸念されている問題である(Okochi and Igawa, 2001)。大河内ら(1993)によれば、大山地区では1989年に土壌表面から高い濃度の硝酸イオンが検出されたが、この時点ではまだ土壌の酸性化は認められなかった。しかし、1998年には、土壌表面の硝酸イオン濃度は1989年とほとんど変わっていなかったのに対し、土壌pHは5.74から5.14に低下していた(Okochi and Igawa, 2001)。また、1992年から1998年までの平均の渓流水中の硝酸イオン濃度は4.81 mg/lであり、大山地区の森林生態系で窒素飽和が起き

ていることが示唆されている (Okochi and Igawa, 2001)。一般に土壤酸性化や窒素負荷は植物の養分状態を変化させることが知られている。しかし、本研究におけるこれらのストレスによるモミ苗木の養分状態の変化は、大山地区の水素イオン・窒素の年間負荷量よりも高いレベルであるにも関わらず、比較的緩慢であった。一方で、ガス交換速度は、これらの負荷によって低下する傾向が認められた。従って、大山地区での水素イオン・窒素負荷は、モミの樹勢の低下に関与している可能性がある。

ところで、大山地区に生育するモミ成木の針葉中の Al 濃度は、札幌地区よりも高い傾向にあることが報告されている (Nakatani et al., 2004; Yoshida et al., 未発表データ)。水素イオンの負荷の副次的作用として、土壤溶液中にアルミニウムが溶出することが指摘されているが、これらの現象は大山地区での高い水素イオン負荷によるものかもしれない。しかし、モミ苗木に 1 mM の Al イオンを添加した培養液を与えた結果、針葉内の Al 濃度が際立って高くなったにも関わらず、ガス交換速度は低下しなかった。これはモミが Al に対して耐性を持つことを示唆するものであり、大山地区における樹勢の低下は、酸性降下物による土壤の Al の利用性の向上であるとは考えにくい。

6.3 結論

長期の酸性霧暴露がモミ苗木に及ぼす影響として、温度などの環境要因の季節変化に対する気孔開度の過剰な応答、乾燥ストレス下における不適切な気孔開度、オゾン暴露下での針葉面の可視障害の発生が示された。これらの結果は、酸性霧の暴露がモミ苗木の気孔開閉メカニズムを攪乱することを強く示唆した。針葉内のアブシジン酸濃度は酸性霧の影響を受けず、乾燥ストレス下では酸性霧の有無に関係なくカタラーゼ活性が顕著に上昇していることから、酸性霧の暴露は、モミ苗木の気孔閉鎖のシグナル伝達の、ABA 受容体より下流側で、さらに過酸化水素よりも下流側で影響を及ぼすことが推察された。

酸性霧の直接影響として指摘されているクチクラワックスの劣化・流亡は認められず、針葉内の養分状態の変化も顕著とはいえなかったことから、酸性霧はモミの気孔開閉メカニズムに特に

作用したと考えられた。一方で、酸性霧の間接影響と考えられる土壌酸性化、窒素付加はガス交換速度を低下させる要因であったが、養分状態の変化は緩慢であった。一方で針葉内の高い Al 濃度にも関わらずモミ苗木は光合成速度を維持し、ガス交換速度の変化に対する養分状態の寄与度は低いと考えられた。

摘 要

酸性霧は高濃度の汚染物質を含み、粒径が小さく、大気中の滞留時間が長い。そのため、植物の特に地上部に対する直接影響が大きいと考えられる。また、長距離輸送された汚染物質は山岳地域で霧の酸性化に寄与しており、都市域周辺だけでなくこのような地域の森林においても酸性霧の影響が懸念されている。これまでに苗木を用いた酸性霧の暴露実験が行なわれ、可視傷害の発生、乾物重量や光合成機能の低下、葉面ワックスの劣化、養分バランスの崩れ、凍害や風、オゾンなど他のストレスに対する感受性の増大などが引き起こされること、その程度は酸性霧の組成や pH、樹種によって異なることが明らかとなった。しかしながら、野外で発生する酸性霧には有機化合物が頻繁に観測されるにも関わらず、その影響が検討されていないなど、課題も多い。

神奈川県西部、丹沢山地の大山 (1252 m) では、1960年代にモミの急速な枯損が発生した。この枯損の原因として、当時深刻な汚染問題となっていた硫黄酸化物が原因物質ではないかと考えられている。しかし、硫黄酸化物による大気汚染が改善したにも関わらず、現在でも樹勢の低下などの緩慢な衰退が観察されている。この大山地区では、pH 3 を下回る霧が頻繁に発生していることから、それと樹勢の低下との関連が疑われている。しかし、樹勢の低下が酸性霧のみで説明できるとは考えにくく、自然条件下ではさまざまなストレスが樹木に負荷されていると考えられる。そこで本研究では、モミ苗木を用いたポット実験で長期にわたり酸性霧を暴露し、その上で、さまざまなストレスを負荷する複合ストレス実験を行うこととした。

まず、酸性霧がモミ苗木の光合成活性に及ぼす影響を検討するため、大山で観測された霧の組成を参考に、有機酸を含む酸性霧 (pH 3) をモミ苗木に継続的に暴露し、その上で乾燥、低温、細根切断、オゾン暴露、土壌酸性化、土壌窒素負荷、根圏アルミニウム処理といったさまざまなストレスを付加する複合ストレス実験を行った。酸性霧の暴露のみを行った場合では、夏期に気孔が過剰に開放し、冬期には過剰に閉鎖する傾向がみられた。一方、付加ストレスを与え

た場合、酸性霧の暴露を受けた個体は、乾燥ストレス下において気孔の開放傾向を示し、オゾン暴露下において可視障害が生じた。純光合成速度は酸性霧の直接的な影響を受けるというよりはむしろ、気孔開度に律速された。これらのことから、酸性霧の暴露は気孔開閉メカニズムに影響を及ぼし、それがストレス耐性に重要な役割を演じる場合において重大な損害を生じさせることが示唆された。モミのガス交換速度は、土壌の酸性化や土壌への窒素の負荷に対しては感受性であるのに対し、根圏へのアルミ処理には耐性を示した。このことは、土壌酸性化によるアルミの溶出ではなく、別の要因がガス交換速度を制限することを示している。また、土壌の酸性化では酸性霧暴露の影響はみられなかったものの、土壌への窒素負荷では、酸性霧はガス交換速度の低下を抑制した。従って、この2つのガス交換速度の低下は、それぞれ異なるメカニズムによることが示唆された。

次に、酸性霧暴露と土壌酸性化・窒素負荷・根圏アルミニウムストレスがモミ苗木の養分状態に及ぼす影響を検討した。土壌酸性化・窒素負荷実験では17ヶ月間 pH 3 の酸性霧を暴露し、同時にその土壌に酸または過剰な窒素を、年間の酸及び窒素の負荷量がそれぞれ 6 kg H⁺/ha/year, 30 kg N/ha/year となるよう負荷した。根圏 Al ストレス実験ではモミ苗木に約3年間酸性霧を暴露し、暴露期間の最後の1年間、根圏への Al 処理を行った。いずれの処理においても、処理後に根や葉における養分状態について分析を行なった。

酸・窒素負荷は土壌 K 濃度を低下させたが、これらのストレスはモミ苗木細根中の養分状態にはほとんど影響しなかった。酸性霧の暴露は当年葉の Mg, Al, Fe 濃度、一年葉の Mg, Al, Cu, Fe, Zn 濃度を低下させた。一方、酸性霧の有無にかかわらず、酸・窒素負荷が養分状態に及ぼす影響は比較的軽微であった。これらの結果から、モミ苗木針葉中の養分状態は、酸・窒素負荷よりもむしろ酸性霧暴露の影響を受けやすいことが明らかとなった。

一方、根圏 Al ストレス実験では、酸性霧暴露が主要元素に対してほとんど影響しなかったのに対し、当年葉、一年葉の Fe, Zn 濃度、一年葉の Al 濃度を低下させた。根圏 Al 処理は細根、針葉ともに多くの元素濃度を変化させた。また、酸性霧と根圏 Al の拮抗作用が一年葉の P 濃度

で観察された。これらの結果から、長期酸性霧暴露と根圏 AI の単独、複合処理によって、光合成機能の低下が引き起こされる前に、さまざまな養分バランスの崩れが生じることが明らかとなった。

さらに、長期にわたる酸性霧の暴露による乾燥やオゾンのストレスに対する感受性の上昇メカニズムを明らかにすることを目的として、植物のストレス状態を把握する手法の一つである活性酸素消去系酵素活性を測定した。スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT)、アスコルビン酸パーオキシダーゼ (APX) 活性を検討した結果、酵素活性は乾燥ストレス、オゾン暴露それぞれ異なる応答をすることが示された。SOD と APX 活性は酸性霧暴露、乾燥処理のいずれにも影響を受けず、乾燥処理によって CAT 活性が有意に上昇した。乾燥ストレスに伴う気孔の閉鎖で過酸化水素が生成し、その結果として CAT 活性が上昇したと考えられる。一方、オゾン暴露実験では、オゾン暴露によって SOD 活性が有意に低下した。オゾン暴露によって SOD 活性が低下したメカニズムについては、SOD そのものまたはその生合成系がオゾンにより損傷を受けたものと考えられた。

ガス交換速度の測定において、酸性霧はモミ苗木の気孔開閉メカニズムを攪乱することが推察された。そこで、その作用点をより明確にするため、まずモミ苗木の蒸散特性に影響を及ぼすクチクラワックスについて検討を行った。次に気孔開閉に関わる植物ホルモンであるアブシジン酸と、そのシグナル伝達物質の一つであるカルシウム、気孔開閉時に孔辺細胞の浸透圧を変化させる役割を持つカリウムについて、針葉レベルでの濃度を測定し、酸性霧による影響を検討した。

長期にわたり酸性霧を暴露したモミ苗木の暗黒下での蒸散速度、すなわちクチクラ蒸散は酸性霧の影響を受けなかった。また、走査型電子顕微鏡による葉面観察を行なったところ、クチクラワックスの結晶構造や経年劣化の進行に酸性霧の有無で違いは見られなかった。さらに、葉面あたりの気孔数、気孔面積を算出したところ、いずれも酸性霧暴露区、コントロール区で有意

な差は認められなかった。以上の結果から、モミ苗木に対する酸性霧暴露はそのクチクラワックスや気孔の形成に影響を及ぼすことはなく、気孔開閉メカニズムそのものに対して影響することが確認された。一方、葉内アブシジン酸濃度に酸性霧暴露区、コントロール区で有意差は認められなかった。このことは、酸性霧はアブシジン酸の生合成や輸送には影響せず、孔辺細胞上のその受容体から下流側のシグナル伝達経路に影響することが示唆された。さらに、葉内カルシウム、カリウム濃度にも処理区間で有意差が見られなかったことから、葉内のこれらの元素濃度が変化することでシグナル伝達経路を攪乱させるのではないことも示された。

以上の結果から、酸性霧がモミの気孔開閉機能を攪乱することについて、そのメカニズム的側面から検討を行った。気孔閉鎖を引き起こすアブシジン酸に対して、その2次シグナルとなるのが孔辺細胞中のCaイオンである。これまでに、オゾンや二酸化硫黄、二酸化窒素などの乾性大気汚染物質によって、このカルシウムイオン濃度が上昇し、気孔が閉鎖を招くことが示されてきた。また、細胞内に侵入したオゾンから生成する過酸化水素も、気孔閉鎖のシグナル伝達に何らかの関与をしていることがこれまでの報告で示唆されている。しかし、本実験の結果は季節変化に対する気孔の過剰な応答であり、オゾン暴露との複合処理ではむしろ気孔コンダクタンスが低下した。従って、従来の報告とはメカニズムが異なっていると考えられるが、酸性霧の影響を解明するためには酸性霧のCaイオンに対する影響、あるいは過酸化水素が酸性霧を暴露したモミ苗木の気孔閉鎖に及ぼす影響を今後検討する必要がある。

次に本研究で得られた結果から、大山地区におけるモミの樹勢低下のメカニズムについて推論を行なった。酸性霧の暴露は気孔の開閉メカニズムの攪乱を引き起こし、これが乾燥ストレスや他の大気汚染物質に対する感受性を増加させることが明らかとなった。まず乾燥ストレスについて検討すると、大山地区は冬場に少雨乾燥となるものの、年間降水量は2000 mm程度あり、樹勢が低下するほどの乾燥ストレスが生じるとは考えにくい。それに対して、大山地区では都市部とほぼ同レベルの高濃度のオゾンが頻繁に発生していることから、酸性霧によってモミのオゾンに対する防御反応が低下することが、樹勢の低下につながる一因として推察された。

謝 辞

私は本研究を、科学技術振興事業団（JST, 現・独立行政法人科学技術振興機構）戦略的基礎研究プロジェクトの技術員として、1999 年に名古屋大学大学院生命農学研究科に赴任して以来進めてまいりました。赴任当初は森林科学系に対する知識の乏しかった私が、ここに一つの区切りをつけることができたのも、この間一貫として惜しみのないご指導、ご助言を賜りました同研究科の竹中千里教授のおかげであり、先ずもって心より感謝申し上げます。また、同大学院人間情報学研究科(現・理学研究科)手塚修文教授(現・名誉教授)にも、JSTプロジェクトの一員として以上のご指導、ご助言を終始賜り深謝いたします。さらに、同大学院生命農学研究科の梅村武夫教授(現・名誉教授)、山本一清助教授、三宅 博教授、木村 眞教授にも懇切なるご指導を頂き、感謝いたします。

JST プロジェクトのメンバーであった、福岡県保健環境研究所の永淵 修氏(現・千葉科学大学)、東海大学海洋学部教授の西村弥亜教授、科学技術振興事業団研究員の小林 剛氏(現・北海道大学)、久米 篤氏(現・富山大学)、新垣雄光氏(現・琉球大学)、同技術員の平川剛氏(現・東和科学)、中谷暢丈氏(現・広島大学)、名古屋大学地球水循環研究センターの石坂 隆助教授、広島大学大学院生物圏科学研究科の佐久川弘教授からは、植物生理から大気環境にいたるまで、研究を進める上でのさまざまな手法や知識、考え方について広く学ことができ、ここに御礼申し上げます。

研究生生活、とりわけ大学院博士課程（後期）入学後は、社会人からの出戻りのためさまざまな重圧との闘いでもありました。そんな中、精神的な支えとしてもっとも大きな役割を果たしたのが趣味でした。日本における貨車研究の第一人者である貨車研究者協会会長の吉岡心平氏をはじめ、同会の古谷雅之氏、宮坂達也氏、筒井俊之氏、佐竹洋一氏、浦田 慎氏、長門克巳氏、高橋 聡氏、矢嶋 亨氏、福田孝行氏、植松 昌氏、西片 洋氏など、日本の貨車研究界を牽引する多くの方々と交流を持つことができ、それぞれからその趣の深さ、研究の喜びを教授して下さったことに感謝申し上げます。なお、浦田 慎氏には貨車研究だけでなく、金沢大学大学院理

学研究科在籍時より、植物における養分吸収の面でもご助言を頂いたことを付記しておきます。

趣味以外でも、この間多くの方に精神的に支えていただきました。特に名古屋西高等学校在学時以来の親友である藤原紀子氏、小島恵美氏、伊賀順子氏、吉田健宏氏、鬼頭伸治氏をはじめ、修士まで学んだ信州大学時代からの友人である森田実穂子氏、赤羽京子氏、薦田（太田）淳子氏、辻田（梅田）禎子氏、奥野 功氏、木村 薫氏、渋谷健治氏、杉浦 実氏には、さまざまな形で大変お世話になりましたことに感謝いたします。なお、私に JST 戦略的基礎研究プロジェクトの技術員を勧めてくださったのは、1998 年当時、同プロジェクト研究補助員であった辻田禎子氏でありました。私がこのように研究の道に進むことができたのも、あの時氏より一本の電話をいただいたからこそであることを決して忘れません。そして、私の我儘な JST への異動を許してくださった財団法人長野県下水道公社南信管理事務所(元)所長の栗田秀實氏、同伊那分室長の高橋氏に厚く御礼申し上げます。栗田元所長は大気汚染物質の長距離輸送に関する研究者でもあり、餞別として頂いた参考書、論文集が本研究をまとめるにあたり大変役に立ったことを申し添えておきます。

最後になりましたが、森林環境資源学研究室の歴代のメンバーの皆様、両親・妹に謝意を述べ、ここに筆を置くことといたします。

引用文献

- Aber, J.D., Nadelhoffer, K.J., Steudler, P. and Melillo, J.M. (1989) Nitrogen saturation in Northern forest ecosystems. *BioScience* **39**: 378-386.
- Adams, C.M., Dengler, N.G., and Hutchinson, T.C. (1984) Acid rain effects on foliar histology of *Artemisia tilesii*. *Can. J. Bot.* **62**: 463-474.
- 相原敬次・三村春夫・村松富美雄・篠崎光夫・長崎善一・関 清宣・氷見康二 (1982) 神奈川県西部地域(西湘地域)の光化学大気汚染発生機構に関する調査研究(1) 相模湾海風と局地汚染について. 神奈川県公害センター研究報告 **4**: 1-13.
- 尼子克己・浅田浩二 (1992) アスコルビン酸ペルオキシダーゼ, 5 生体における活性酸素消去系の測定法 (活性酸素測定マニュアル. 浅田浩二・中野 稔・柿沼カツ子編, 244 pp, 講談社, 東京). 218-222.
- Asada, K., Urano, M. and Takahashi, M. (1973) Subcellular location of superoxide dismutase in spinach leaves and preparation and properties of crystalline spinach superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **36**: 257-266.
- Atkinson, C.J., Wookey, P.A. and Mansfield, T.A. (1991) Atmospheric pollution and the sensitivity of stomata on barley leaves to abscisic acid and carbon dioxide. *New Phytol.* **117**: 535-541.
- Barker, M.G. and Ashenden, T.W. (1992) Effects of acid fog on cuticular permeability and cation leaching in holly (*Ilex aquifolium*). *Agric. Ecosystems Environ.* **42**: 291-306.
- Barnes, J.D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S. and Davison, A.W. (1992) A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls *a* and *b* in lichens and higher plants. *Environ. Exp. Bot.* **32**: 85-100.
- Barnes, J.D., Eamus, D., and Brown, K.A. (1990a) The influence of ozone and acid mist on the amount and wettability of the surface waxes in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *New Phytol.* **114**: 531-536.

- Barnes, J.D., Eamus, D., and Brown, K.A. (1990b) The influence of ozone, acid mist and soil nutrient status on Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) II. Photosynthesis, dark respiration and soluble carbohydrates of trees during late autumn. *New Phytol.* **115**: 149-156.
- Beers, R.F. Jr. and Sizer, I.W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**: 133-140.
- Bianco, J. and Dalstein, L. (1999) Absciscic acid in needles of *Pinus cembra* in relation to ozone exposure. *Tree Physiol.* **19**: 787-791.
- Boxman, A.W. and Roelofs, J.G.M. (1988) Some effects of nitrate versus ammonium nutrition on the nutrient fluxes in *Pinus sylvestris* seedlings. Effects of mycorrhizal infection. *Can. J. Bot.* **66**: 1091-1097.
- Cape, J.N., Leith, I.D., Fowler, D., Murray, M.B., Sheppard, L.J., Eamus, D. and Wilson, R.H.F. (1991) Sulphate and ammonium in mist impair the frost hardening of red spruce seedlings. *New Phytol.* **118**: 119-126.
- Carlson R.W (1983) Interaction between SO₂ and NO₂ and their effects on photosynthetic properties of soybean *Glycine max*. *Perviron. Pollut.* **32**: 11-38.
- Chappelka, A.H. and Freer-Smith, P.H. (1995) Predisposition of trees by air pollutants to low temperatures and moisture stress. *Environ Pollut.* **87**: 105-117.
- Clayton, H., Knight, M.R., Knight, H., McAinsh, M.R. and Hetherington, A.M. (1999) Dissection of the ozone-induced calcium signature. *Plant J.* **17**: 575-579.
- Crossley, A. and Fowler, D. (1986) The weathering of Scots pine epicuticular wax in polluted and clean air. *New Phytol.* **103**: 207-218.
- Cumming, J.R. and Brown, S.M. (1994) Effects of elevated nitrate and aluminum on the growth and nutrition of red spruce. *Tree Physiol.* **14**: 589-599.
- Eamus, D. and Fowler, D. (1990) Photosynthetic and stomatal conductance responses to acid mist of red spruce seedlings. *Plant Cell Environ.* **13**: 349-357.

- Eamus, D. and Murray, M.B. (1993) The impact of constituent ions of acid mist impair on assimilation and stomatal conductance of Norway spruce prior and post mid-winter freezing. *Environ. Pollut.* **79**, 135-142.
- Esch, A. and Mengel, K. (1998) Combined effects of acid mist and frost drought on the water status of young spruce trees (*Picea abies*). *Environ. Exp. Bot.* **39**: 57-65.
- Fink, S. (1991) Unusual patterns in the distribution of calcium oxalate in spruce needles and their possible relationship to the impact of pollutants. *New Phytol.* **119**: 41-51.
- Futai, K. and Harashima, S. (1990) Effect of simulated acid mist on pine wilt disease. *J. Jpn. For. Soc.* **72**: 520-523.
- Fowler, D., Cape, J.N., Deans J.D., Leith, I.D., Murray, M.B., Smith, R.I., Sheppard. L.J., and Unsworth, M.H. (1989) Effect of acid mist on the frost hardiness of red spruce seedlings. *New Phytol.* **113**: 520-523.
- Foy, C.D., Chaney, R.L. and White, M.C. (1978) The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 511-566.
- Godbold, D.L., Dictus, K. and Hüttermann, A. (1988) Influence of aluminium and nitrate on root growth and mineral nutrition of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings. *Can. J. For. Res.* **18**: 1167-1171.
- Günthardt-Goerg, M.S. and Keller, T. (1987) Some effects of long-term ozone fumigation on Norway spruce. II. Epicuticular wax and stomata. *Trees* **1**: 145-150.
- 原 宏 (1997) 21 世紀の酸性雨研究－酸性雨研究の現状と課題－. (身近な地球環境問題－酸性雨を考える－. 日本化学会・酸性雨問題研究会編, 220 pp, コロナ社, 東京). 13-18.
- He, Z.L., Alva, A.K., Calvert, D.V., Li, Y.C. and Banks, D.J. (1999) Effects of nitrogen fertilization of grapefruit trees on soil acidification and nutrient availability in a Riviera fine sand. *Plant Soil* **206**: 11-19.
- Heller, L.I., Shaw, A.J., and Jacobson, J.S. (1995) Exposure of red spruce seedlings to acid mist:

- importance of droplet composition just prior to drying periods. *New Phytol.* **129**: 55-61.
- 平井 伸博 (1994) アブシジン酸, 5-2 化学 (植物ホルモンのハンドブック 下. 高橋信孝・増田芳雄共編, 431 pp, 培風館, 東京). 7-21.
- Hoad, S.P., Marzoli, A., Grace, J., and Jeffree, C.E. (1998) Response of leaf surfaces and gas exchange to wind stress and acid mist in birch (*Betula pubescens*). *Trees* **13**: 1-12.
- Hosono, T., Igawa, M., and Okochi, H. (1994) Fogwater chemistry at a mountainside in Japan. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **67**: 368-374.
- 茨城県林業試験場 (1969) 偕楽園スギ枯損原因調査. 森林防疫 **18**: 79-85.
- 井川 学 (1992) 酸性霧とその環境影響. 森林立地 **34**: 36-39.
- 井川 学・補伽栄一・細野哲也・岩瀬光司・長島 律 (1991) 酸性霧の化学組成と洗浄効果. 日本化学会誌 **698**-704.
- Igawa, M., Kameda, H., Maruyama, F., Okochi, H., and Otsuka, I. (1997) Effects of simulated acid fog on needles of fir seedlings. *Environ. Exp. Bot.* **38**: 155-163.
- Igawa, M., Kase, T., Satake, K. and Okochi, H. (2002a) Severe leaching of calcium ions from fir needles caused by acid fog. *Environ. Pollut.* **119**: 375-382.
- Igawa, M., Matsumura, K., and Okochi, H. (2001) Fog-water chemistry in Mt. Oyama and its dominant factors. *Water Air Soil Pollut.* **130**: 607-612.
- Igawa, M., Okumura, K., Okochi, H., and Sakurai, N. (2002b) Acid fog removes calcium and boron from fir tree: one of the possible causes of forest decline. *J. For. Res.* **7**: 213-215.
- Igawa, M., Tsutsumi, Y., Mori, T., and Okochi, H. (1998) Fogwater chemistry at a mountainside forest and the estimation of the air pollutant deposition via fog droplets based on the atmospheric quality at the mountain base. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 1566-1572.
- 池田有光・安田龍介・東野晴行・渡辺竜馬・畠山史郎・村野健太郎 (1995) 赤城山で発生する酸性霧と大気汚染の解析—汚染大気の輸送を中心として—. 大気汚染学会誌 **30**: 113-125.
- 池田有光・安田龍介・東野晴行・山田哲也・畠山史郎・村野健太郎 (1996) 赤城山で発生する酸

- 性霧と大気汚染の解析(2)―天気条件と霧水汚濁の特性―. 大気環境学会誌 **31**: 292-302.
- Inaba, T., Ogawa, T., Takenaka, C. and Tezuka, T. (1998) Response of enzymes scavenging active oxygen in alder (*Alnus hirsuta*) leaves exposed to ozone. *Environ. Sci.* **6**: 29-35.
- Izuta, T. (1998) Ecophysiological responses of Japanese forest tree species to ozone, simulated acid rain and soil acidification. *J. Plant. Res.* **111**: 471-480.
- 伊豆田 猛 (2001) 森林生態系における窒素飽和とその樹木に対する影響. 大気環境学会誌 **36**: A1-A13.
- 伊豆田 猛・松村秀幸・河野吉久・清水英幸 (2001) 樹木に対する酸性降下物の影響に関する実験的研究. 大気環境学会誌 **36**: 137-155.
- 伊豆田 猛・大谷知子・横山政昭・堀江勝年・戸塚 績 (1993) モミ苗の成長に対する人工酸性雨の影響. 大気汚染学会誌 **28**: 29-37.
- Izuta, T., Yamaoka, T., Nakaji, T., Yonekura, T., Yokoyama, M., Matsumura, H., Ishida, S., Yazaki, K., Funada, R. and Koike, T. (2001) Growth, net photosynthetic rate, nutrient status and secondary xylem anatomical characteristics of *Fagus crenata* seedlings growth in brown forest soil acidified with H₂SO₄ solution. *Water Air Soil Pollut.* **130**: 1007-1012.
- Jung, K., Rolle, W., Schlee, D., Tintemann, H., Gnauk, T., and Schüürmann, G. (1994) Ozone effects on nitrogen incorporation and superoxide dismutase activity in spruce seedlings (*Picea abies* L.). *New Phytol.* **128**: 505-508.
- 角脇 怜 (1980) 名古屋市大気中における海塩粒子の挙動. 日本化学会誌 **141**: 141-146.
- 神奈川県 (1994) 酸性雨に係る調査研究報告書. 286 pp, 神奈川県.
- 片桐保行・渡辺真一・大河内 博・井川 学 (1994) 酸性霧に含まれるアルデヒドの濃度とその支配要因. 日本化学会誌 **1007**: 1007-1011.
- 加藤秀正・白井昌洋・松川 進 (1995) 酸性土壌の土壌溶液のアルミニウムの形態と濃度. 日本土壌肥料学会誌 **66**: 39-47.

- Kerfourn, C. and Garrec, J.P. (1991) Modifications in the alkane composition of cuticular waxes from spruce needles (*Picea abies*) and ivy leaves (*Hedera herix*) exposed to ozone fumigation and acid fog: comparison with needles from declining spruce trees. *Can. J. Bot.* **70**: 861-869.
- 菊川城司・相原敬次 (1995) 大山, 丹沢山地のモミの微細構造の観察. 神奈川県環境科学センター研究報告 **18**: 28-33
- Kim, G. (1989) A study on selection of sulfur dioxide resistant tree species: II. artificial acid rain and acid mist treatments. *J. Kor. For. Soc.* **78**: 209-217.
- Kim, G. and Um, T. (1996) Effects of artificial acid mist on leaf injury and surface wettability of several broad-leaved species. *J. Kor. For. Soc.* **85**: 577-585.
- Kozaki, A. and Takeba G. (1996) Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* **384**: 557-560.
- 栗田秀實 (1989) 沿岸地域から内陸地域への二次汚染物質の長距離輸送. 全国公害研究会誌 **14**: 108-116.
- Kurita, H., Ueda, H., and Mitsumoto, S. (1990) Combination of local wind systems under light gradient wind conditions and its contribution to the long-range transport of air pollutants. *J. Appl. Meteor.* **29**: 331-348.
- Leith, I.D., Sheppard, L.J., and Murray, M.B. (1995) Potential mechanisms of acid mist injury to red spruce. *Environ. Exp. Bot.* **35**: 125-137.
- LeNoble, M.E., Blevins, D.G. and Miles, R.J. (1996) Prevention of aluminium toxicity with supplemental boron. II. Stimulation of root growth in an acidic, high-aluminium subsoil. *Plant Cell Environ.* **19**: 1143-1148.
- Le Thiec, D., Rose, C., Garrec, J.P., Laffray, D., Louguet, P., Galaup, S. and Loosveldt, P. (1994) Altération of element contents in guard cells of Norway spruce (*Picea abies*) subjected to ozone fumigation and (or) water stress: X-ray microanalysis study. *Can. J. Bot.* **72**: 86-92.
- Lowly, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the

- Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Ma, J.F., Ryan, P.R. and Delhaize, E. (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* **6**: 273-278.
- Maggio, A., McCully, M.G., Kerdnaimongkol, K., Bressan, R.A., Hasegawa P.M. and Joly R.J. (2002) The ascorbic acid cycle mediates signal transduction leading to stress-induced stomatal closure. *Funct. Plant Biol.* **29**: 845-852.
- Maier-Maercker, U. and Koch, W. (1992) The effects of air pollution on the mechanism of stomatal control. *Trees* **7**: 12-25.
- Marschner, H. (1997) Function of mineral nutrients. In *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd Edition, p.313-404 Academic Press, London
- 松本光弘 (1988) 雨水中の有機酸-カルボン酸-のイオンクロマトグラフィーによる測定と濃度. *大気汚染学会誌* **23**: 64-72.
- Matsumura, H. (2001) Impacts of ambient ozone and/or acid mist on the growth of 14 tree species: an open-top chamber study conducted in Japan. *Water Air Soil Pollut.* **130**: 959-964.
- 松村秀幸・小林卓也・河野吉久・伊豆田 猛・戸塚 績 (1995) スギ, ウラジロモミおよびシラカンバ苗の乾物成長とガス交換速度に及ぼす人工酸性雨の影響. *大気環境学会誌* **30**: 180-190.
- McAinsh, M.R., Clayton, C., Mansfield, T.A. and Hetherington A.M. (1996) Changes in stomatal behaviour and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiol.* **111**: 1031-1042.
- McAinsh, M.R., Evans, N.H., Montgomery, L.T. and North, K.A. (2002) Calcium signalling in stomatal responses to pollutants. *New Phytol.* **153**: 441-447.
- McLaughlin, S.B., Tjoelker M.G., and Roy, W.K. (1993) Acid deposition alters red spruce physiology: laboratory studies support field observations. *Can. J. For. Res.* **23**: 380-386.
- Mehlhorn, H. and Wellburn, A.R. (1987) Stress ethylene formation determines plant sensitivity to

- ozone. *Nature* **327**: 417-418.
- Mengel, K., Hogrebe, A.M.R., and Esch, A. (1989) Effect of acidic fog on needle surface and water relations of *Picea abies*. *Physiol. Plant.* **75**: 201-207.
- Meyer, A., Muller, P., and Sembdner, G. (1987) Air pollution and plant hormones. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **182**: 1-21.
- Milborrow, B.V. and Mallaby, R. (1975) Occurrence of methyl (+)-abscisate as an artefact of extraction. *J. Exp. Bot.* **94**: 741-748.
- 三宅 博・亀井信一・伊豆田 猛・戸塚 績 (1991) 水耕栽培におけるスギ苗の生長に対するアルミニウムの影響. 人間と環境 **17**: 10-16.
- Mohren, G.M.J., Van den burg, J. and Burger, F.W. (1986) Phosphorus deficiency induced by nitrogen input in Douglas fir in the Netherlands. *Plant Soil* **95**: 191-200.
- 森 孝司・大河内 博・井川 学 (1997) 丹沢大山において観測された塩酸を主成分とする pH 1.95 の霧の発生. 大気環境学会誌 **32**: 157-161.
- 村野健太郎 (1993) 酸性雨と酸性霧. 123-154 pp, 裳華房, 東京.
- 村野健太郎 (1994) 酸性雨による影響の特徴と日本での実態. 環境技術 **23**: 10-16.
- 中川吉弘 (2002) 樹木衰退に対する酸性霧の影響—六甲山を中心にして—. 大気環境学会植物分科会講演会講演要旨集: 16-21.
- Nakaji, T., Fukami, M., Dokiya, Y. and Izuta, T. (2001) Effects of high nitrogen load on growth, photosynthesis and nutrient status of *Cryptomeria japonica* and *Pinus densiflora* seedlings. *Trees* **15**: 453-461.
- Nakatani, N., Kume, A., Kobayashi, T., Hirakawa, T. and Sakugawa, H. (2004) Needle morphology related to chemical contents in the needles of Japanese fir (*Abies firma*) trees subjected to acidic depositions at Mt. Oyama, eastern Japan. *Water Air Soil Pollut.* **152**: 97-110.
- Nihlgard, B. (1985) The ammonium hypothesis – an additional explanation to the forest dieback in Europe. *Ambio* **14**: 2-8.

- Öborn, I., Jansson, G. and Johnsson, L. (1995) A field study on the influence of soil pH on trace element levels in spring wheat (*Triticum aestivum*), potatoes (*Solanum tuberosum*) and carrots (*Daucus carota*). *Water Air Soil Pollut.* **85**: 835-840.
- Ogawa, T., Matsumoto, C., Takenaka, C. and Tezuka, T. (2000) Effect of Ca on Al-induced activation of antioxidant enzymes in the needles of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*). *J. For. Res.* **5**: 81-85.
- Ogawa, T., Takenaka, C., and Tezuka, T. (1998) Response of antioxidant enzymes to mist containing sulfuric and organic acid in Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) seedlings. *Environ. Sci.* **6**: 185-196.
- 大河内 博・長島 律・補伽栄一・井川 学 (1993) 丹沢山塊大山の土壌の酸性度と化学組成. 環境科学会誌 **6**: 29-34.
- Okochi, H. and Igawa, M. (2001) Elevational patterns of acid deposition into a forest and nitrogen saturation on Mt. Oyama, Japan. *Water Air Soil Pollut.* **130**: 1091-1096.
- 大原真由美・村野健太郎・瀬戸信也・福山 力・溝口次男 (1988) 中国山地に発生する放射霧の化学組成. 大気汚染学会講演要旨集 326.
- 大石興弘・宇都宮彬・岩本真二・下原孝章・浜村研吾・石橋龍吾・村野健太郎 (1990) 三郡山における雲水・雨水調査について. 大気汚染学会講演要旨集 432.
- Pei, Z., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E. and Schroeder, J.I. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734.
- Percy, K.E. and Baker, E.A. (1990) Effect of simulated acid rain on epicuticular wax production, morphology, chemical composition and on cuticular membrane thickness in two clones of Sitka spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.]. *New Phytol.* **116**: 79-87.
- Percy, K.E., Jensen, K.F., and McQuattie, C.J. (1992) Effects of ozone and acidic fog on red spruce needle epicuticular wax production, chemical composition, cuticular membrane ultrastructure

- and needle wettability. *New Phytol.* **122**: 71-80.
- Powles, S.B., Berry, J.A. and Björkman, O. (1983) Interaction between light and chilling temperature on the inhibition of photosynthesis in chilling-sensitive plants. *Plant Cell Environ.* **6**: 117-123.
- Price, A.H., Taylor, A., Ripley, S.J., Griffiths, A., Trewavas, A.J. and Knight, M.R. (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* **6**: 1301-1310.
- Puempel, U.B., Gaebl, F., and Tranquillini, W. (1975) Growth, mycorrhizae and frost resistance of *Picea abies* following fertilization with different levels of N. *Eur. J. For.* **5**: 83-97.
- Rengel, Z. (1996) Tansley Review No.89 Uptake of aluminium by plant cells. *New Phytol.* **134**: 389-406.
- Rollwagen, B.A. and Zasoski, R.J. (1988) Nitrogen source effects on rhizosphere pH and nutrient accumulation by Pacific Northwest conifers. *Plant Soil* **105**: 79-86.
- Sakaki, T., Kondo, N. and Sugahara, K. (1983) Breakdown of photosynthetic pigments and lipids in spinach leaves with ozone fumigation: role of active oxygens. *Physiol. Plant.* **59**: 28-34.
- Sakata, M. and Suzuki, K. (2000) Evaluating possible causes for the decline of Japanese fir (*Abies firma*) forests based on $\delta^{13}\text{C}$ records of annual growth rings. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 373-376.
- 佐久川 弘・竹野律子・松木佳奈子・三宅隆之・竹田一彦・藤原祺多夫 (1995) 広島県における大気および雨水中の有機酸の測定. 日本化学会誌 823-829.
- 佐瀬裕之・高松武次郎 (2000) 樹木葉ワックスの役割と分析. (酸性雨研究と環境試料分析. 佐竹研一編, 291 pp, 愛智出版, 東京). 128-132.
- Satsumabayashi, H., Kurita, H., Yokouchi, Y., and Ueda, H. (1989) Mono- and di-carboxylic acids under long-range transport of air pollution in central Japan. *Tellus* **41B**: 219-229.
- Satsumabayashi, H., Kurita, H., Yokouchi, Y., and Ueda, H. (1990) Photochemical formation of particulate dicarboxylic acids under long-range transport in central Japan. *Atmos. Environ.* **24A**: 1443-1450.

- Schaberg, P.G., DeHayes, D.H., Hawley, G.J., Strimbeck, G.R., Cumming J.R., Murakami, P.F., and Borer, C.H. (2000) Acid mist and soil Ca and Al alter the mineral nutrition and physiology of red spruce. *Tree Physiol.* **20**: 73-85.
- Schwanz, P. and Polle, A. (2001) Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pendunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO₂ concentrations. *J. Exp. Bot.* **52**, 133-143.
- Seinfeld, J.H. (1986) Air Pollution, 195-249 pp, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Sheppard, L.J., Cape, J.N., and Leith, I.D. (1993a) Influence of acidic mist on frost hardness and nutrient concentrations in red spruce seedlings. 1. Exposure of the foliage and rooting environment. *New Phytol.* **124**: 595-605.
- Sheppard, L.J., Cape, J.N., and Leith, I.D. (1993b) Influence of acidic mist on frost hardness and nutrient concentrations in red spruce seedlings. 2. Effects of misting frequency and rainfall exclusion. *New Phytol.* **124**: 607-615.
- Sheppard, L.J., Leith, I.D., Murray, M.B. Cape, J.N., and Kennedy, V.H. (1998) The response of Norway spruce seedlings to simulated acid mist. *New Phytol.* **138**: 709-723.
- Sheppard, L.J., Leith, I.D., Smith, C.M.S., and Kennedy, V.H. (1995) Effects of soil chemistry on the response of potted Sitka spruce to acid mist in open-top chambers. *Water Air Soil Pollut.* **84**: 347-366.
- Siegel, N. and Haug, A. (1983) Calmodulin-dependent formation of membrane potential in barley root plasma membrane vesicles: A biochemical model of aluminum toxicity in plants. *Physiol. Plant* **59**: 285-291.
- 鈴木 清 (1992) 神奈川県大山のモミ林枯損経緯とその周辺地域の年輪幅の変化. 神奈川県林業試験場研究報告 **19**: 23-42.
- 高見智香・吉田耕治・竹中千里・手塚修文 (2002) 神奈川大山に生育するモミの生理状態. 第 113 回日本林学会大会学術講演集: 760 pp, 461.

- Takenaka, C., Yamada, T., and Iwata, S. (1996) Ethylene emission from seedlings of hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) under acidic stress. *J. For. Res.* **1**: 183-185.
- Tanaka, K., Suda, Y., Kondo, N. and Sugahara, K. (1985) O₃ tolerance and the ascorbate-dependent H₂O₂ decomposing system in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **26**: 1425-1431.
- Tanaka, K. and Sugahara, K. (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.
- 谷川 昇 (1990) 都市ごみ焼却に伴う大気汚染物質の推移. 公害と対策 **26**: 1399-1402.
- 谷本丈夫・劉 岩・里道知佳・大久保達弘・二瓶幸志 (1996) 奥日光・足尾・赤城山地における森林衰退と立地環境. 森林立地 **38**: 1-12.
- Tarabula, T. (2000) The influence of experimental soil acidification and liming on concentrations of some basic and trace metals in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Pol. J. Ecol.* **48**: 63-75.
- Taylor, G.E., Norby, R.J., McLaughlin S.B., Johnson, A.H., and Turner, R.S. (1986) Carbon dioxide assimilation and growth of red spruce (*Picea rubens* Sarg.) seedlings in response to ozone, precipitation chemistry, and soil type. *Oecologia* **70**: 163-171.
- Tezuka, T., Ogawa, T., Matsumoto K., Katou, K., Ishizaka, Y., and Takenaka, C. (1998) Organic acid in acidic fog are an important effector contributing to forest stress. *Environ. Sci.* **6**: 99-106.
- Tezuka, T., Tsuruhara, A., Suzuki, H. and Takahashi, S.Y. (1997) A connection between the self-incompatibility mechanism and the stress response in lily. *Plant Cell Physiol.* **38**: 107-112.
- Tomioka, R. and Takenaka, C. (2001) Differential ability of the root to change rhizosphere pH between *Chamaecyparis obtusa* Sieb. (hinoki) and *Quercus serrata* Thunb. (konara) under aluminium stress. *Water Air Soil Pollut.* **130**: 1013-1018.
- Tomioka, R., Takenaka, C., Saitoh, K. and Sera, K. (2002) Influence of aluminum on elemental contents in white roots of *Chamaecyparis obtusa* Sieb. and *Quercus serrata* Thunb. *Int. J.*

PIXE 12: 35-40.

Truman, R.A., Humphreys, F.R. and Ryan, P.J. (1986) Effect of varying solution ratios of Al to Ca and Mg on the uptake of phosphorus by *Pinus radiata*. *Plant Soil* **96**: 109-123.

Turunen, M. and Huttunen, S. (1990) A review of the response of epicuticular wax of conifer needles to air pollution. *J. Environ. Qual.* **19**: 35-45.

植田洋匡 (1990) 酸性雨. (講座[地球環境] 1.地球規模の環境問題. 大来佐武郎監修, 390 pp, 中央法規, 東京). 205-208.

van Breemen, N., Burrough, P.A., Velthorst, E.J., van Dobben, H.F., de Wit, T., Ridder, T.B. and Reijnders, H.F.R. (1982) Soil acidification from atmospheric ammonium sulfate in forest canopy throughfall. *Nature* **299**: 548-550.

Wagatsuma, T. and Ezoe, Y. (1985) Effect of pH on ionic species of aluminum in medium and on aluminum toxicity under solution culture. *Soil Sci. Plant Nutr.* **31**: 547-561.

Watanabe, K., Ishizaka, Y., Minami, Y., and Yoshida, K. (2001) Peroxide concentrations in fog water at mountainous sites in Japan. *Water Air Soil Pollut.* **130**: 1559-1564.

Watanabe, K., Ishizaka, Y., and Takenaka, C. (1999) Chemical composition of fog water near the summit of Mt. Norikura in Japan. *J. Meteor. Soc. Jpn.* **77**: 997-1006.

Watanabe, K., Ishizaka, Y., and Tanaka, H. (1995) Measurements of atmospheric peroxides concentrations near the summit of Mt. Norikura in Japan. *J. Meteor. Soc. Jpn.* **73**: 1153-1160.

Watanabe, T., Osaki, M. and Tadano, T. (1998) Effects of nitrogen source and aluminum on growth of tropical tree seedlings adapted to low pH soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* **44**: 655-666.

渡辺 司・伊豆田 猛・横山政昭・戸塚 績 (1999) シラビソ苗の成長, ガス交換速度及び栄養状態に及ぼす人工酸性雨の影響. 大気環境学会誌 **34**: 407-421.

Westman, W.E. and Temple, P.J. (1989) Acid mist, ozone effects on the leaf chemistry of two western conifer species. *Environ. Pollut.* **57**: 9-26.

Weiser, C.J. (1970) Cold resistance and injury in woody plants. *Science* **169**: 1269-1278.

- Yamamoto, K. (2000) Estimation of the canopy-gap size using two photographs taken at different heights. *Ecol. Res.* **15**: 203-208.
- 山家義人 (1978) 都市における環境悪化の指標としての樹木衰退と微生物層の変動. 林業試験場報告 **301**: 119-129.
- Yang, C., Wessler, A. and Wild, A. (1993) Studies on the diurnal courses of the contents of abscisic acid, 1-aminocyclopropane carboxylic acid and its malonyl conjugate in needles of damaged and undamaged spruce trees. *J. Plant Physiol.* **141**: 624-626.
- 横堀 誠 (1981) 茨城県内でのスギ樹勢衰退とその要因に関する研究. 茨城県林業試験場研究報告 **13**: 1-33.
- Yoshida, K., Inaba, S., Takenaka, C. and Tezuka, T. (in press) Effects of chronic acid fog exposure with soil acidification or nitrogen loading on nutrient status in *Abies firma* seedlings. *J. For. Res.*
- Yoshida, K., Shibasaki, R., Takami, C., Takenaka, C., Yamamoto, K. and Tezuka, T. (2004) Response of gas exchange rates in *Abies firma* seedlings to various additional stresses under chronic acid fog stress. *J. For. Res.* **9**: 195-203.
- 吉田耕治・竹中千里 (2004) 酸性霧が樹木生理に及ぼす影響. 日本林学会誌 **86**: 54-60
- Yoshida, K., Takenaka, C. and Tezuka, T. (submitted) Effects of complex stress of chronic acid fog exposure with rhizosphere aluminum on nutrient status in *Abies firma* seedlings.
- 吉武 孝・増田久夫 (1986) 苫小牧地域におけるストロームマツ等の異常落葉に関する考察. 林業試験場研究報告 **337**: 1-28.

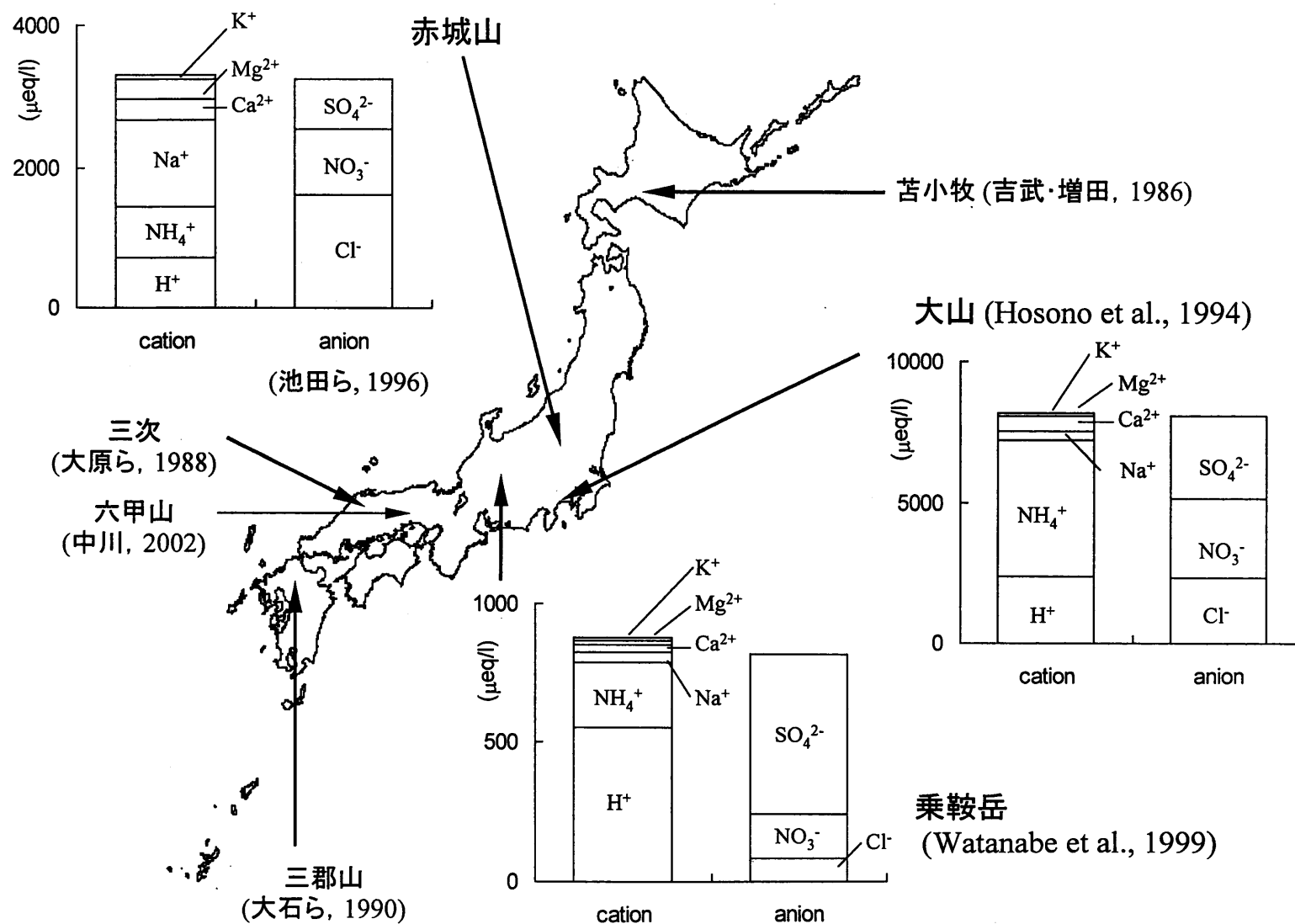


図1-1. 日本における酸性霧観測地点と霧水の組成例



図2-1. モミ苗木への酸性霧の暴露

中央のチャンバー内にモミ苗木を置き、左の超音波加湿器から酸性霧を供給する。なお、この写真は別の実験での酸性霧暴露の様子を撮影したものであるが、使用した器材は本研究のものと同一である。

図2-2. 酸性霧暴露と各付加ストレスの処理期間

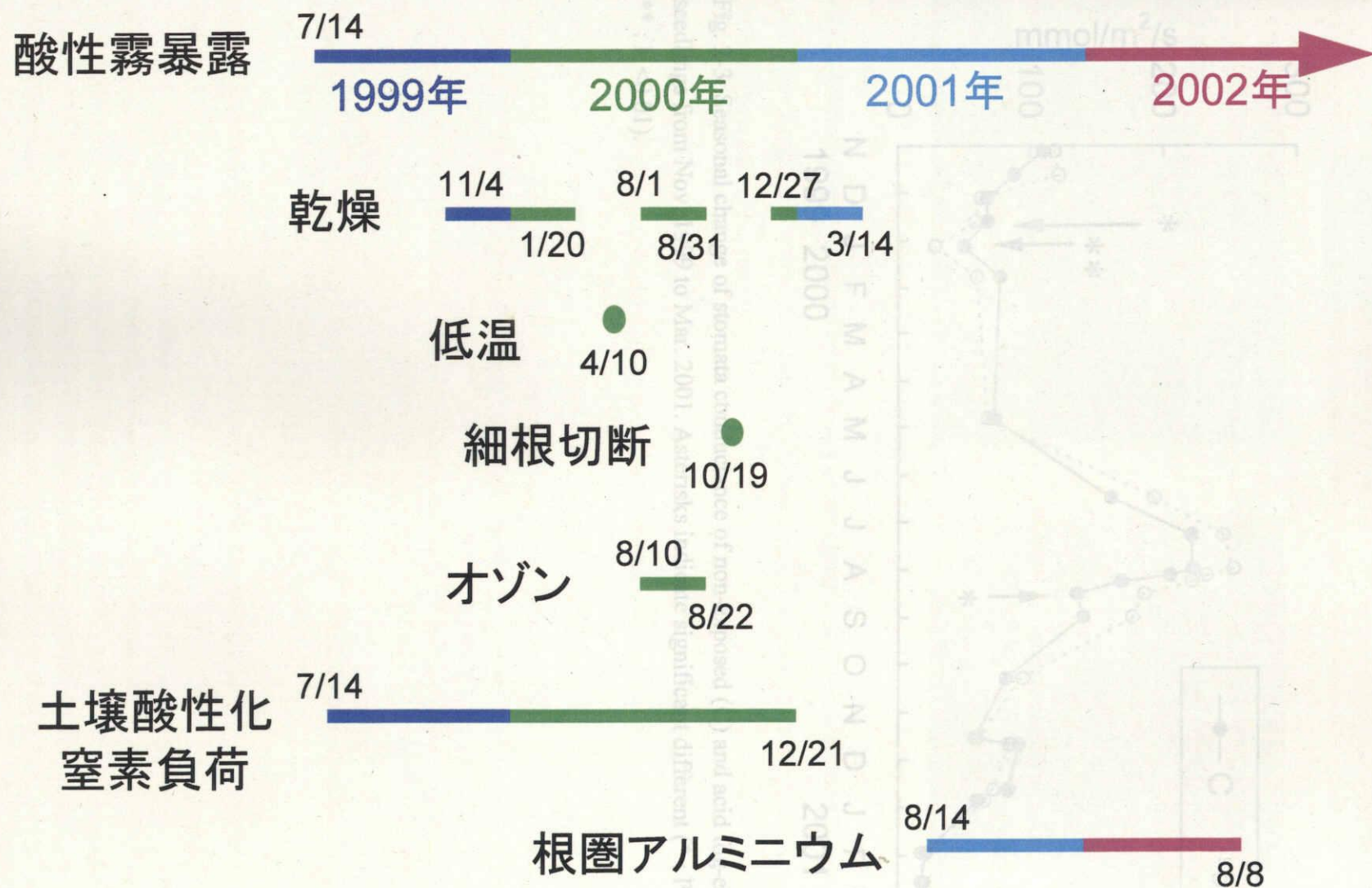


図2-2. 酸性霧暴露と各付加ストレスの処理期間

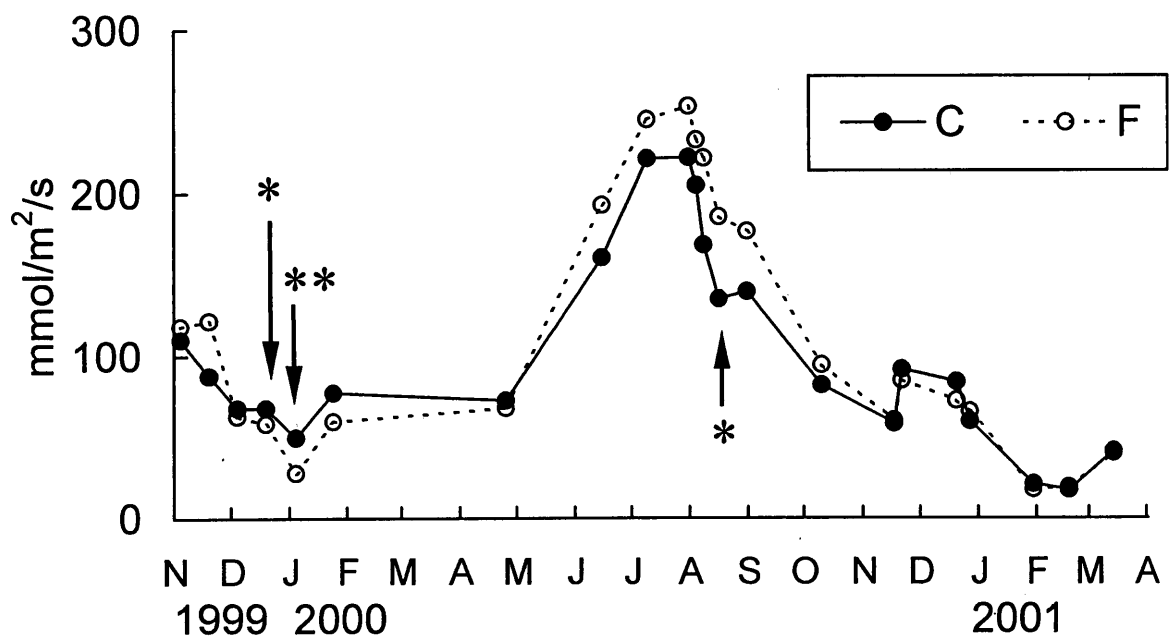


Fig. 2-3. Seasonal change of stomata conductance of non-exposed (C) and acid fog-exposed seedlings from Nov. 1999 to Mar. 2001. Asterisks indicate significant different (* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$).



(a)



(b)

Fig. 2-4. Photographs of momi fir seedlings under chronic acid fog with ozone exposure (a, FO seedlings) and ozone exposure (b, O seedlings). The photographs were taken 9 days after the first ozone exposure.

Fig. 2-3. The effects of simulated acid fog with nitrogen load on posttreatment chlorophyll concentrations of momi fir (*Abies firma*) seedlings. C, N, F and FN indicate no treatment, nitrogen load, acid fog exposure and nitrogen load with acid fog. Values are the mean values, and no shading column, black shading column and vertical bars indicate chlorophyll a, chlorophyll b concentrations and standard errors of total chlorophyll concentrations, respectively. Signs with different letters indicate significant different ($P < 0.05$).

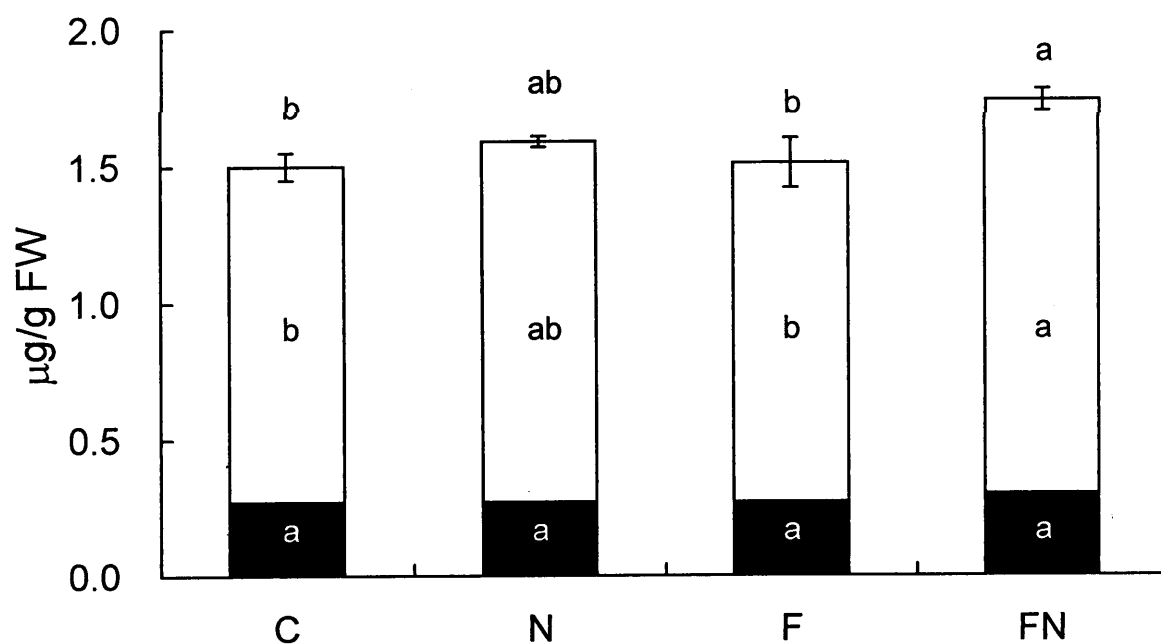


Fig. 2-5. The effects of simulated acid fog with nitrogen load on posttreatment chlorophyll concentrations of momi fir (*Abies firma*) seedlings. C, N, F and FN indicate no treatment, nitrogen load, acid fog exposure and nitrogen load with acid fog. Values are the mean values, and no shading column, black shading column and vertical bars indicate chlorophyll a, chlorophyll b concentrations and standard errors of total chlorophyll concentrations, respectively. Signs with different letters indicate significant different ($P < 0.05$).

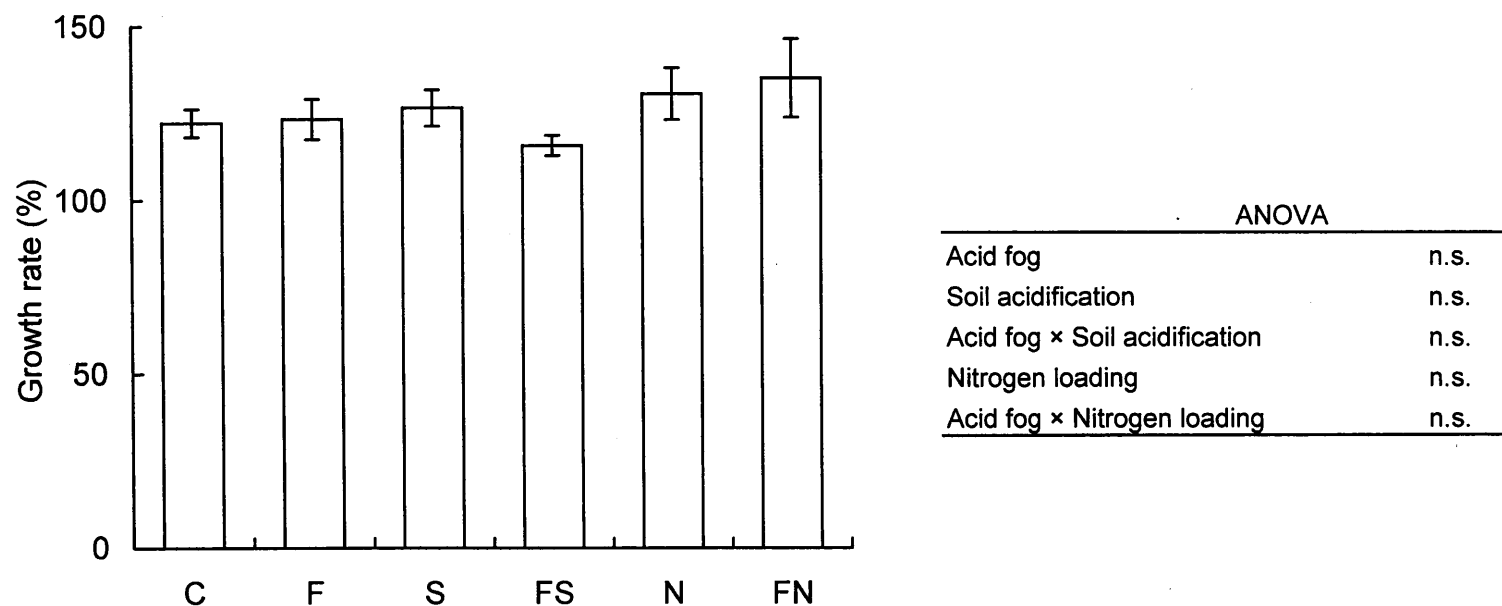


Fig. 3-1. Effects of acid fog exposure, soil acidification and nitrogen loading treatment on growth rate of shoots of momi fir (*Abies firma*) seedlings. Values are the mean of 8 determinations, which is the posttreatment height (Dec. 2000) standardized by pretreatment height (Jul. 1999). Vertical bars indicate standard errors with. C, F, S, FS, N and FN stand for control, acid fog exposure, soil acidification, acid fog with soil acidification, nitrogen loading, and acid fog with nitrogen loading, respectively. Significance of effects was determined by two-way ANOVA ($P < 0.05$): n.s., not significant.

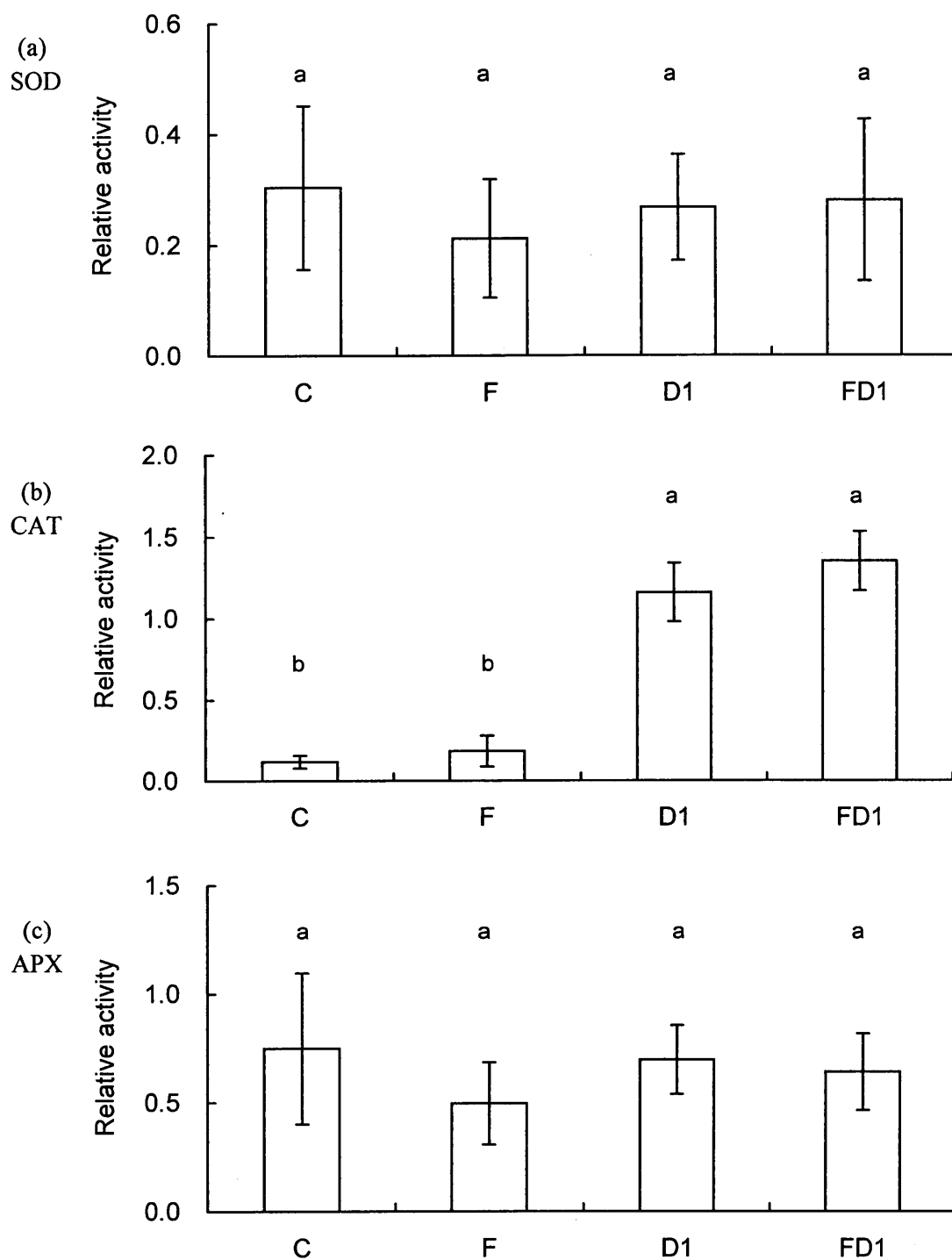


Fig. 4-1. The effects of chronic acid fog with drought treatment on SOD (a), CAT (b) and APX (c) activities in current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings. Values are the posttreatment relative values standardized by pretreatment values with their standard error. C, F, D1 and FD1 stand for control, acid fog exposure, drought treatment and acid fog with drought treatment, respectively. Signs with different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$ according to Fisher's LSD- test.

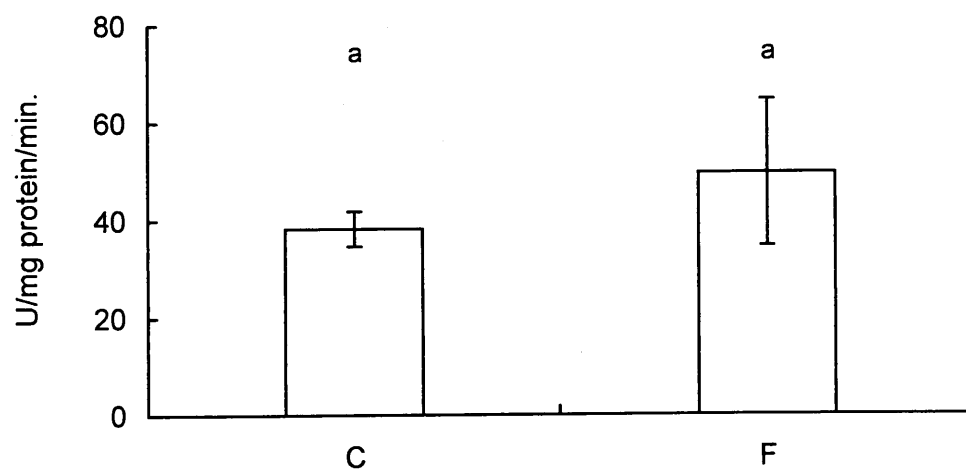


Fig. 4-2. The effects of chronic acid fog exposure on SOD activity in current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings. Values are the mean values with their standard error. C and F stand for control and acid fog exposure, respectively. Signs with different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$ according to Fisher's LSD- test.

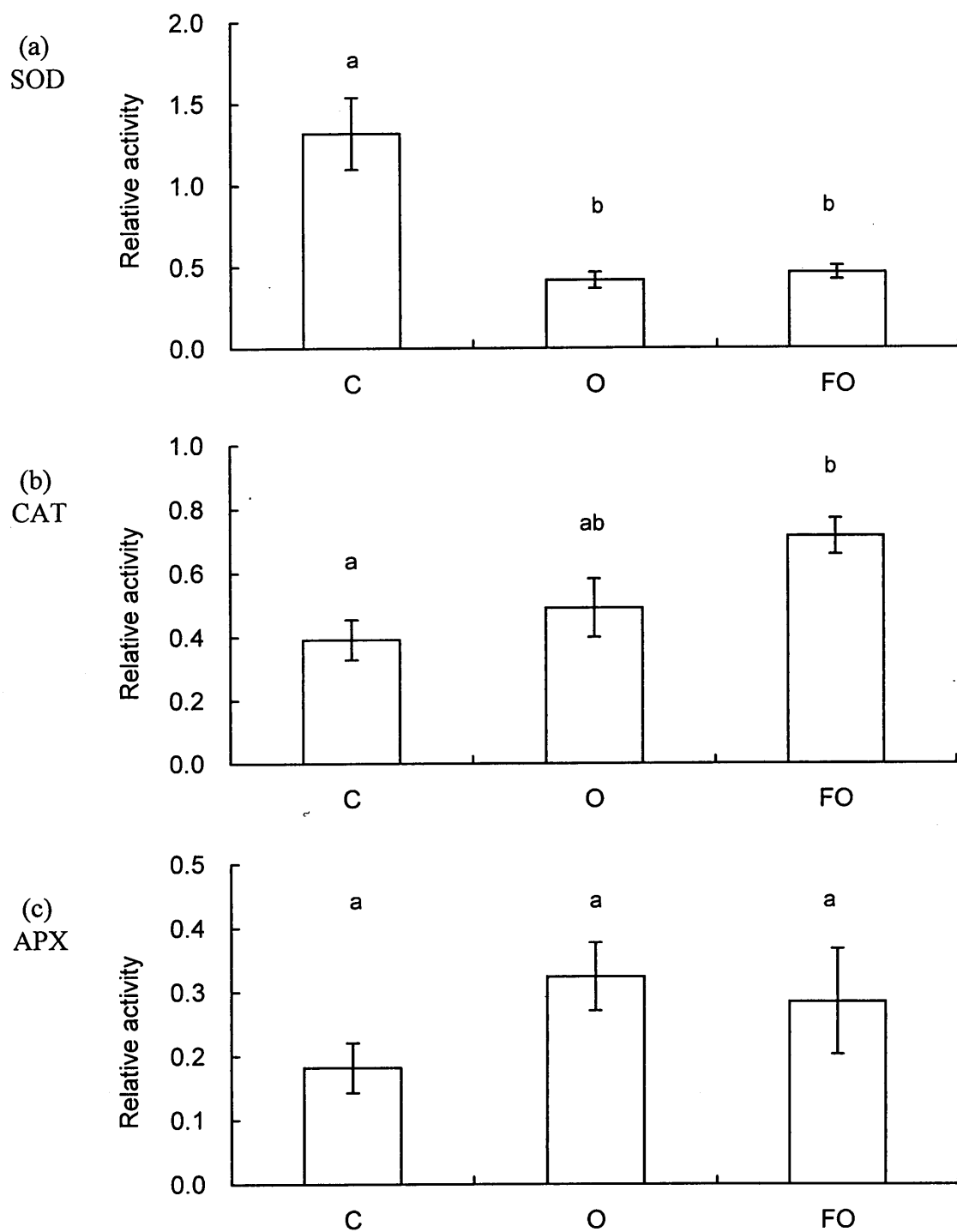


Fig. 4-3. The effects of chronic acid fog with ozone exposure on SOD (a), CAT (b) and APX (c) activities in current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings. Values are the posttreatment relative values standardized by pretreatment values with their standard error. C, O and FO stand for control, ozone exposure and acid fog with ozone exposure, respectively. Signs with different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$ according to Fisher's LSD- test.

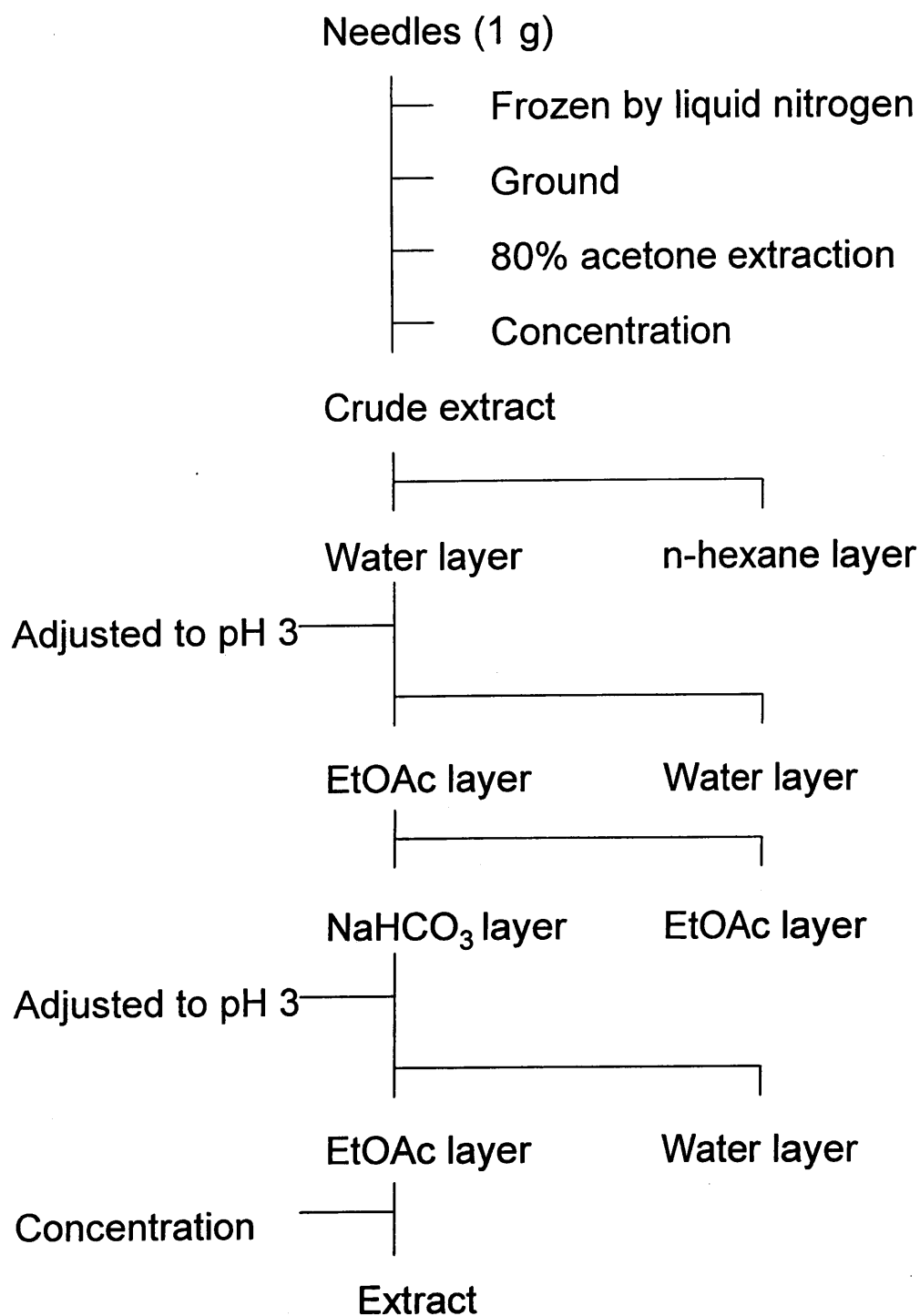


Fig. 5-1. The extraction flow of abscisic acid from momi fir (*Abies firma*) needles.

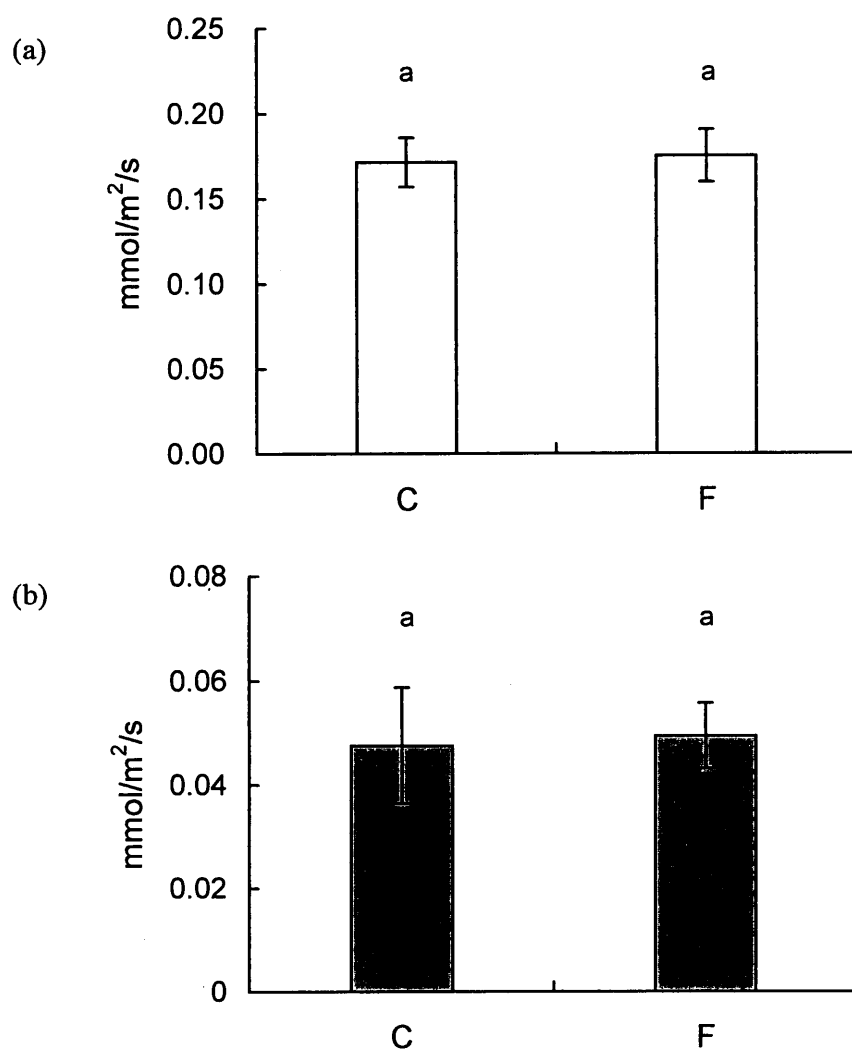


Fig. 5-2. The effects of chronic acid fog exposure on stomata conductance under saturated light (a) and transpiration rate under dark (b) in current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings in February 2003. Values are mean values with their standard error. C and F stand for control and acid fog exposure, respectively. Signs with different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$ according to Fisher's LSD- test.

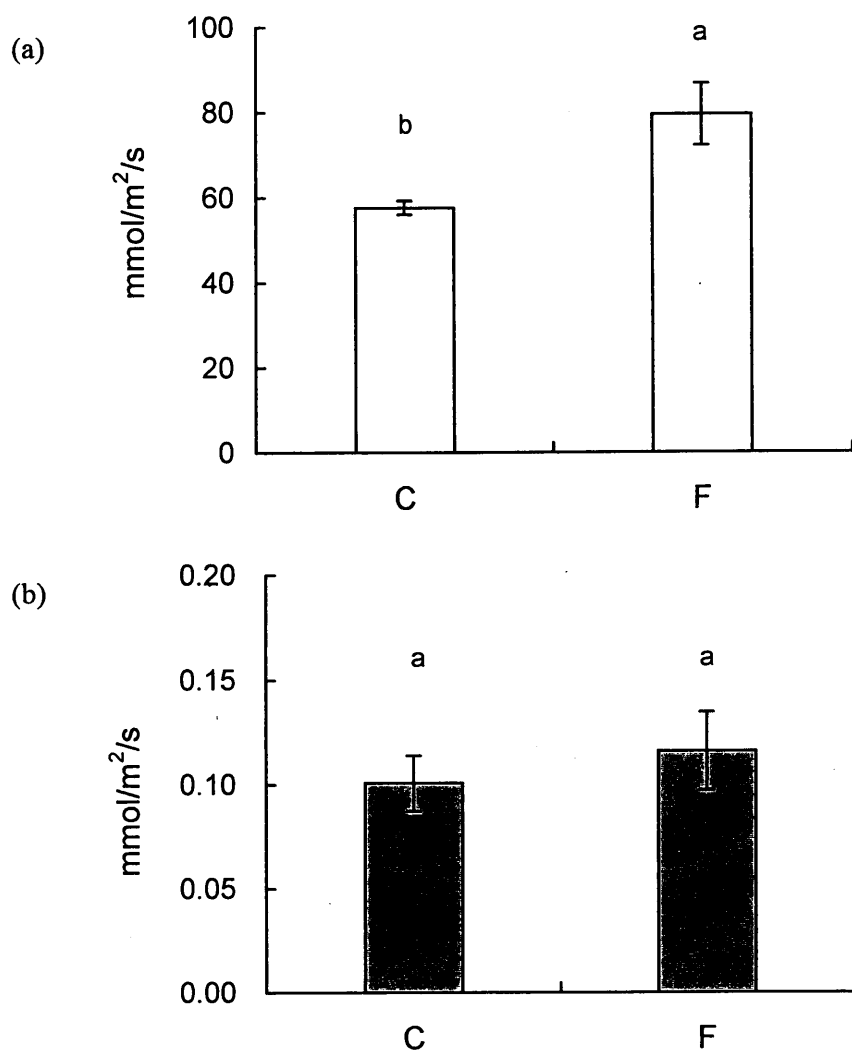


Fig. 5-3. The effects of chronic acid fog exposure on stomata conductance under saturated light (a) and transpiration rate under dark (b) in current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings in November 2003. Values are mean values with their standard error. C and F stand for control and acid fog exposure, respectively. Signs with different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$ according to Fisher's LSD- test.

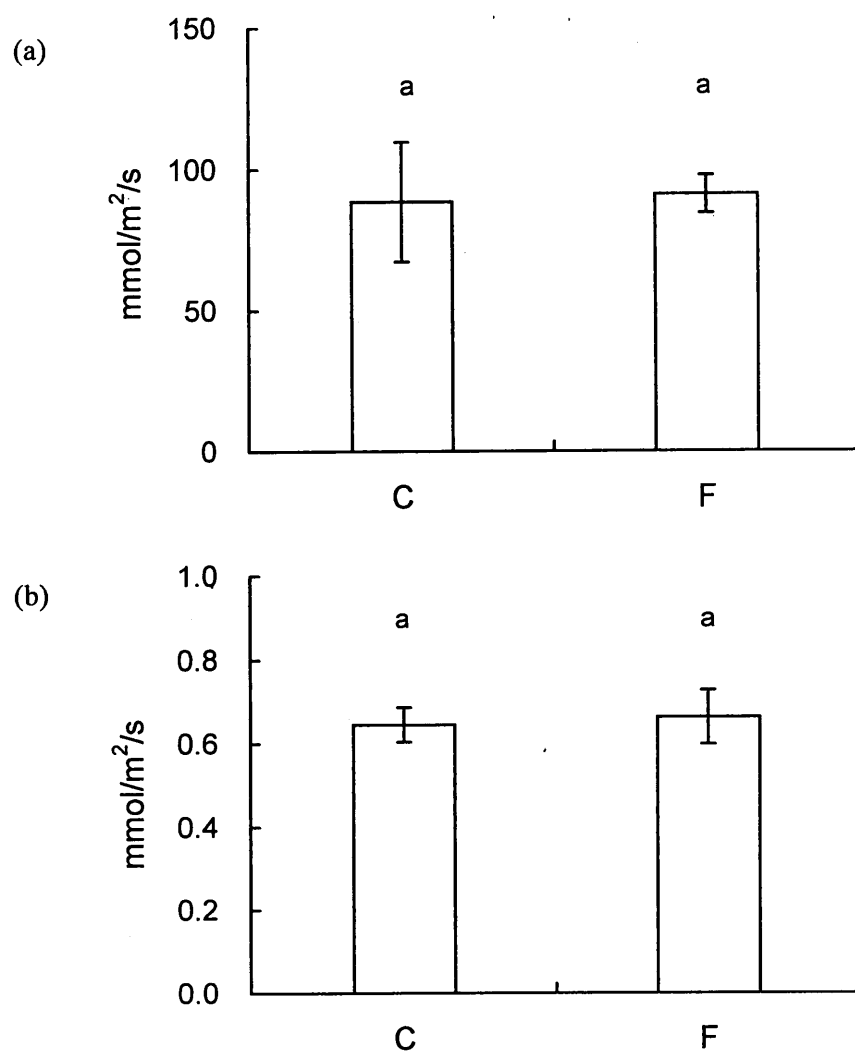
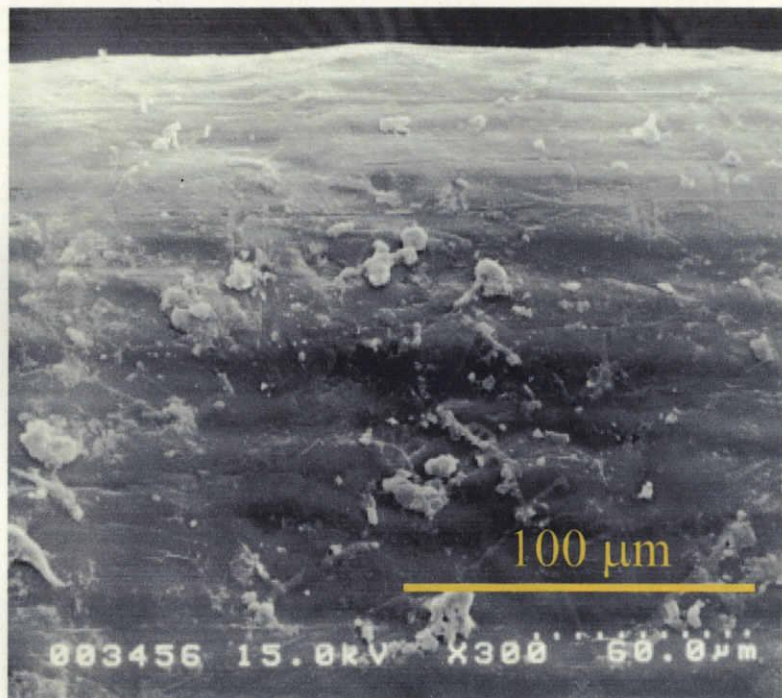
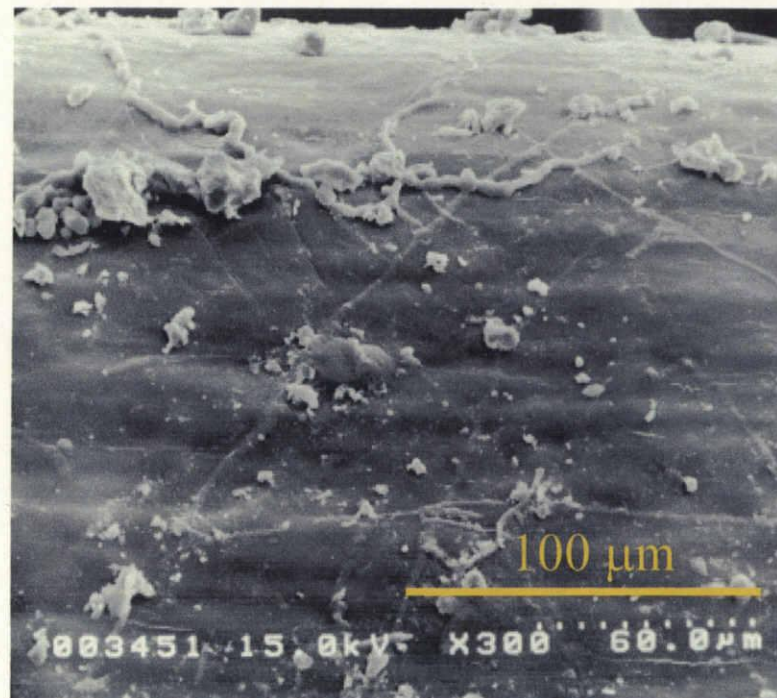


Fig. 5-4. The effects of chronic acid fog exposure on stomata conductance (a) and transpiration rate (b) in current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings in March 2004. Values are mean values with their standard error. C and F stand for control and acid fog exposure, respectively. Signs with different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$ according to Fisher's LSD- test.

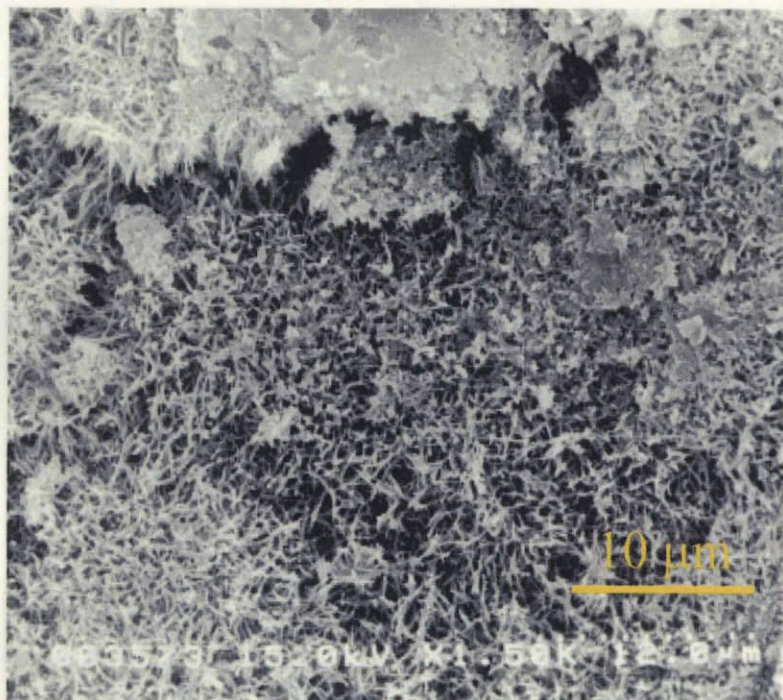


C

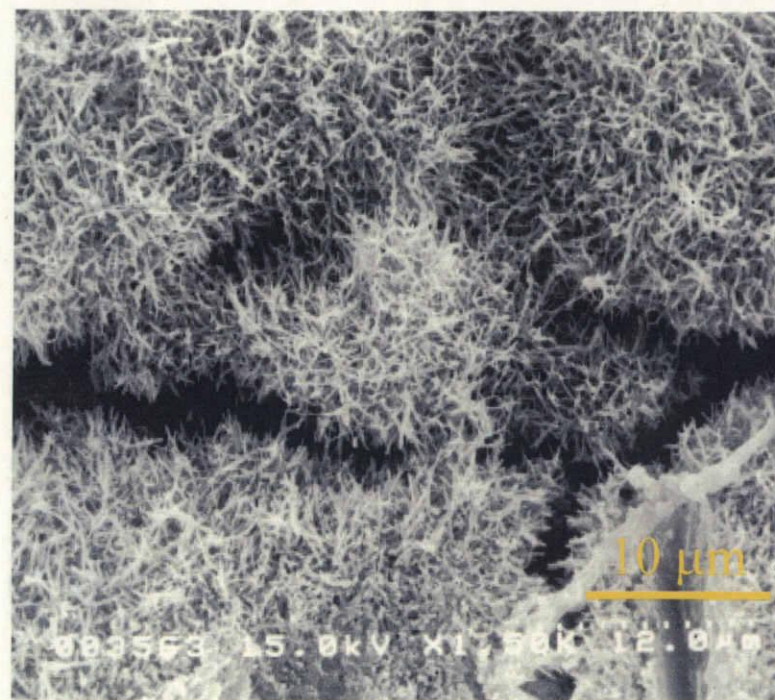


F

Fig. 5-5. Photograph of upper surface of current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings. C and F stand for control and chronic acid fog exposure, respectively.

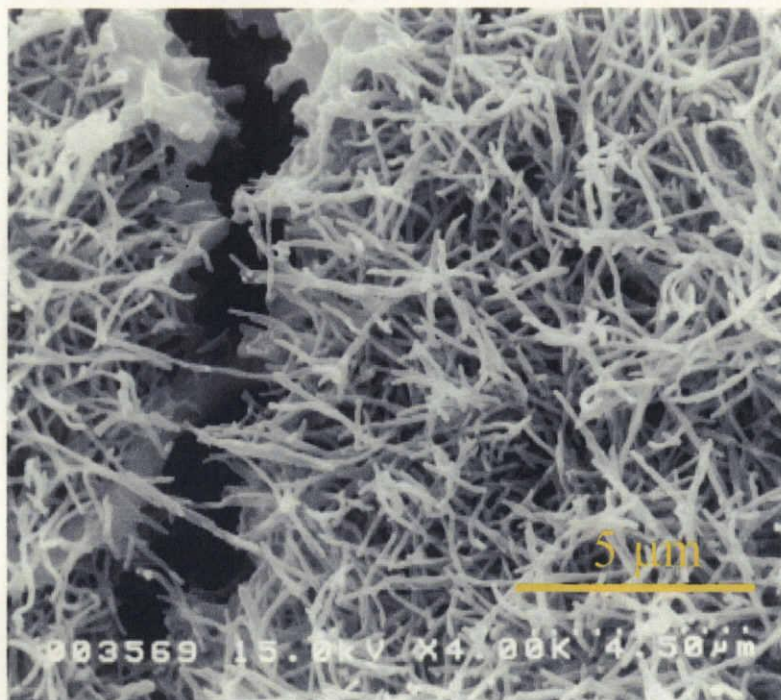


C

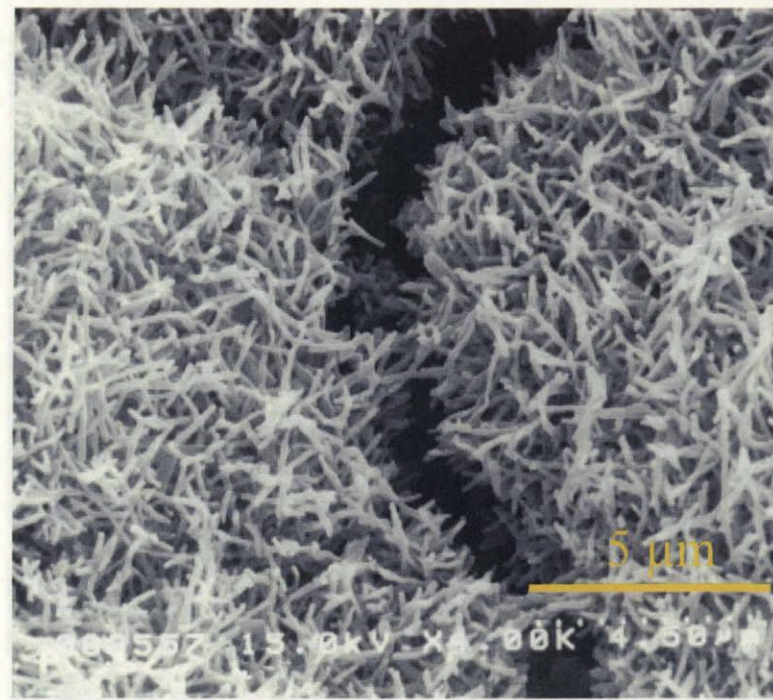


F

Fig. 5-6. Photograph of wax layer on downward surface of current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings. C and F stand for control and chronic acid fog exposure, respectively.



C

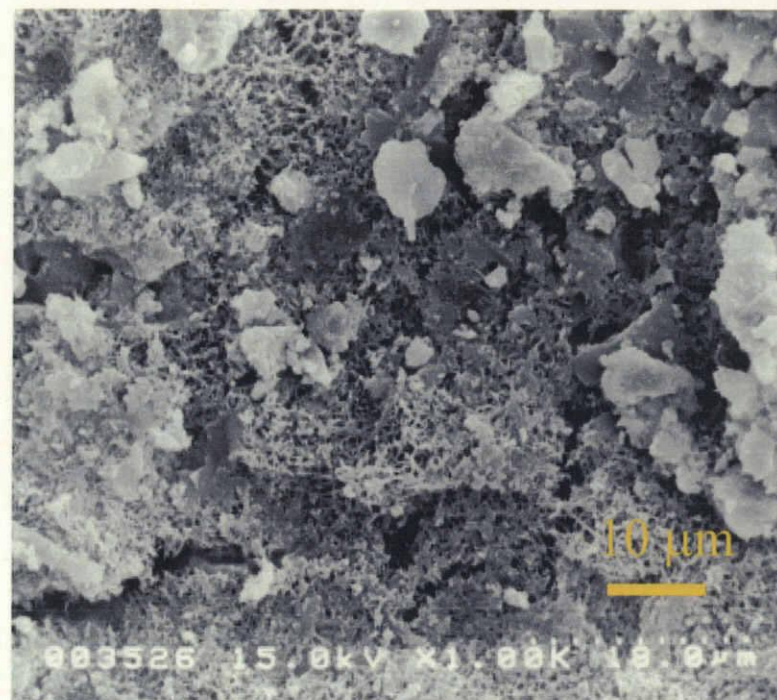


F

Fig. 5-7. Photograph of the crystal of epicuticular wax on downward surface of current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings. C and F stand for control and chronic acid fog exposure, respectively.

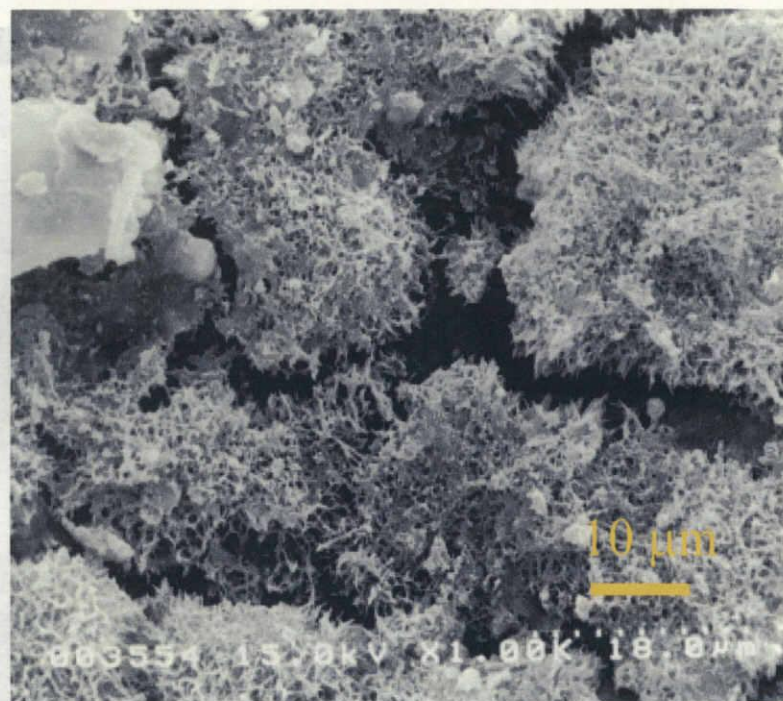


C

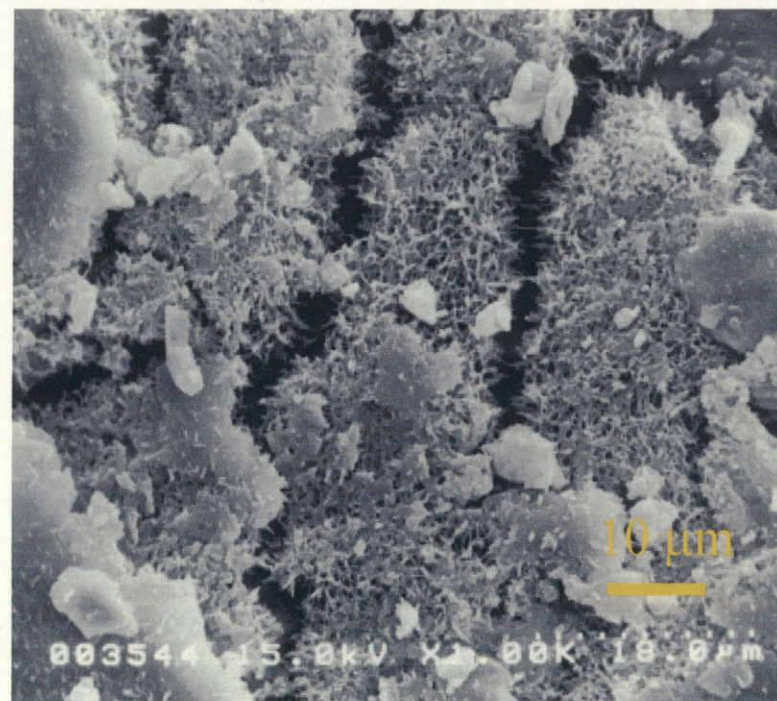


F

Fig. 5-8. Photograph of wax layer on downward surface of one-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings. C and F stand for control and chronic acid fog exposure, respectively.

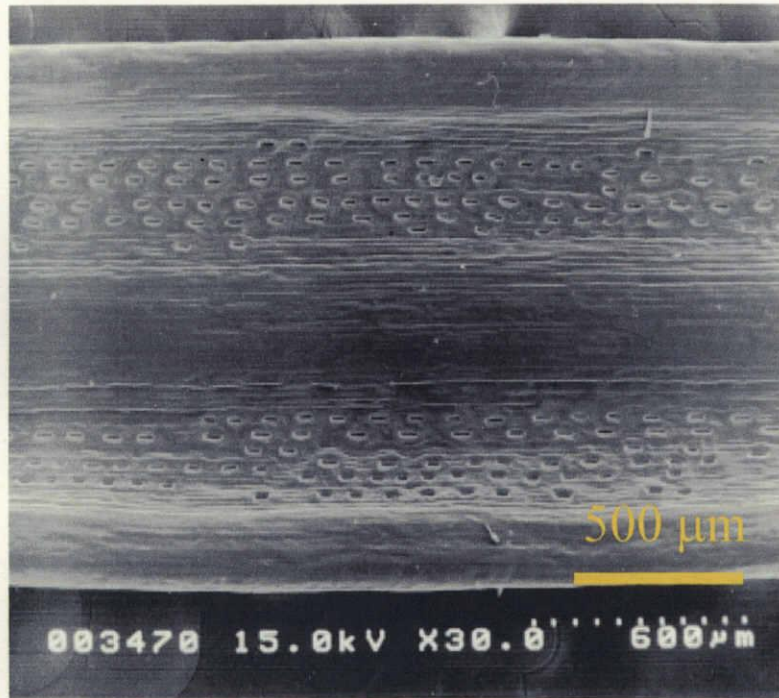


C

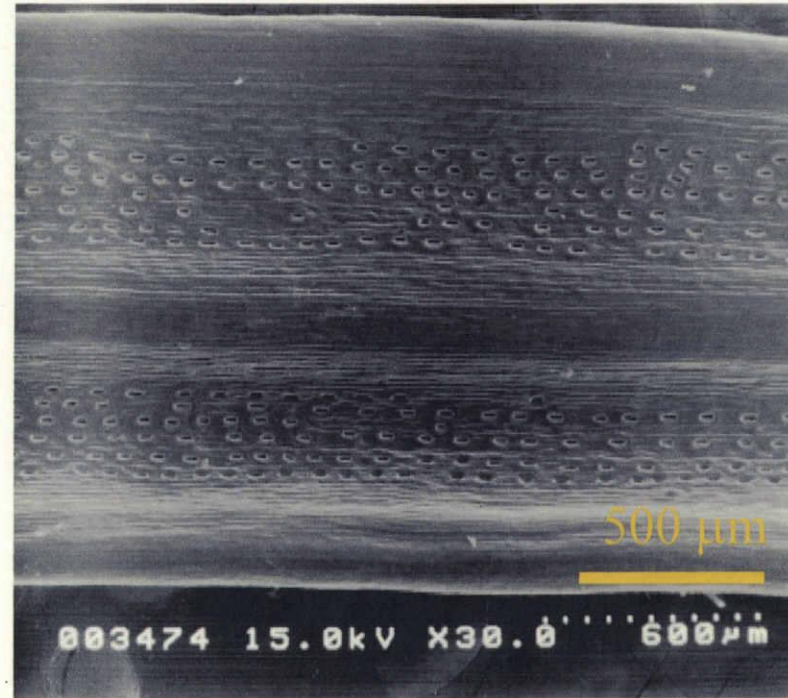


F

Fig. 5-9. Photograph of wax layer on downward surface of two-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings. C and F stand for control and chronic acid fog exposure, respectively.

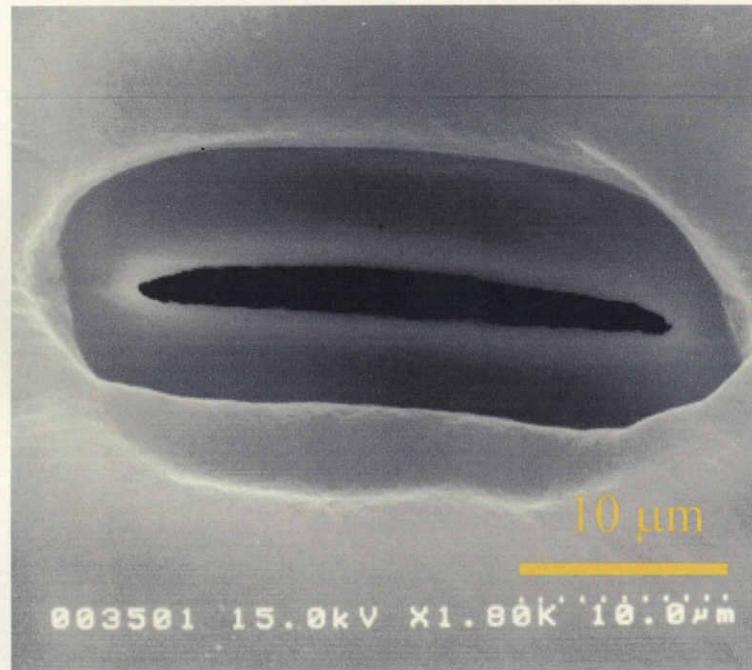


C

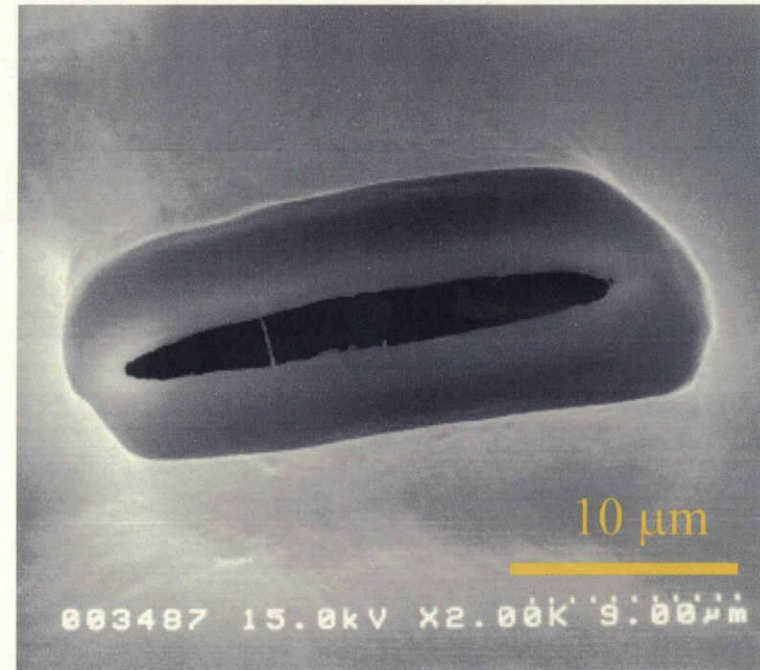


F

Fig. 5-10. Photograph of downward surface of current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings after wax was removed by chloroform. C and F stand for control and chronic acid fog exposure, respectively.



C



F

Fig. 5-11. Photograph of stomata of current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings after wax was removed by chloroform. C and F stand for control and chronic acid fog exposure, respectively.

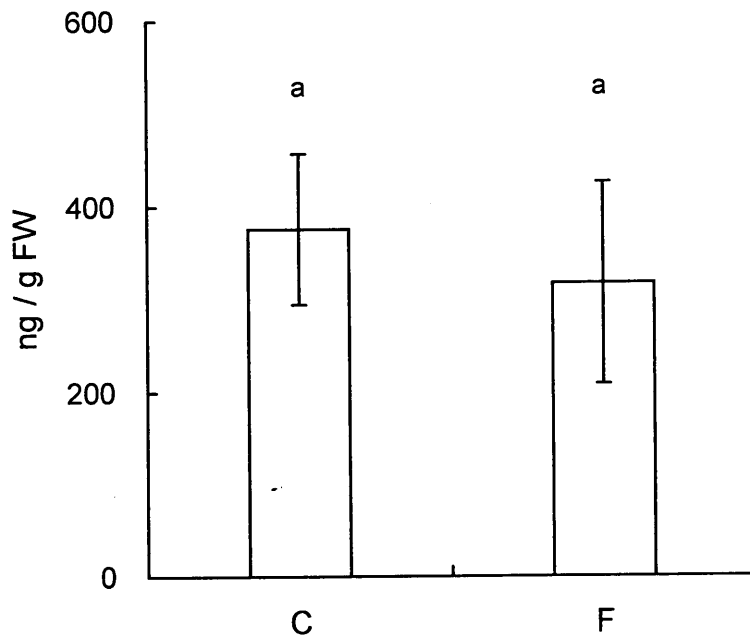


Fig. 5-12. The effect of chronic acid fog exposure on abscisic acid (ABA) concentrations in current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings. Values are mean values with their standard error. C and F stand for control and acid fog exposure, respectively. Signs with different letters indicate a significant difference at $P < 0.05$ according to Fisher's LSD-test.

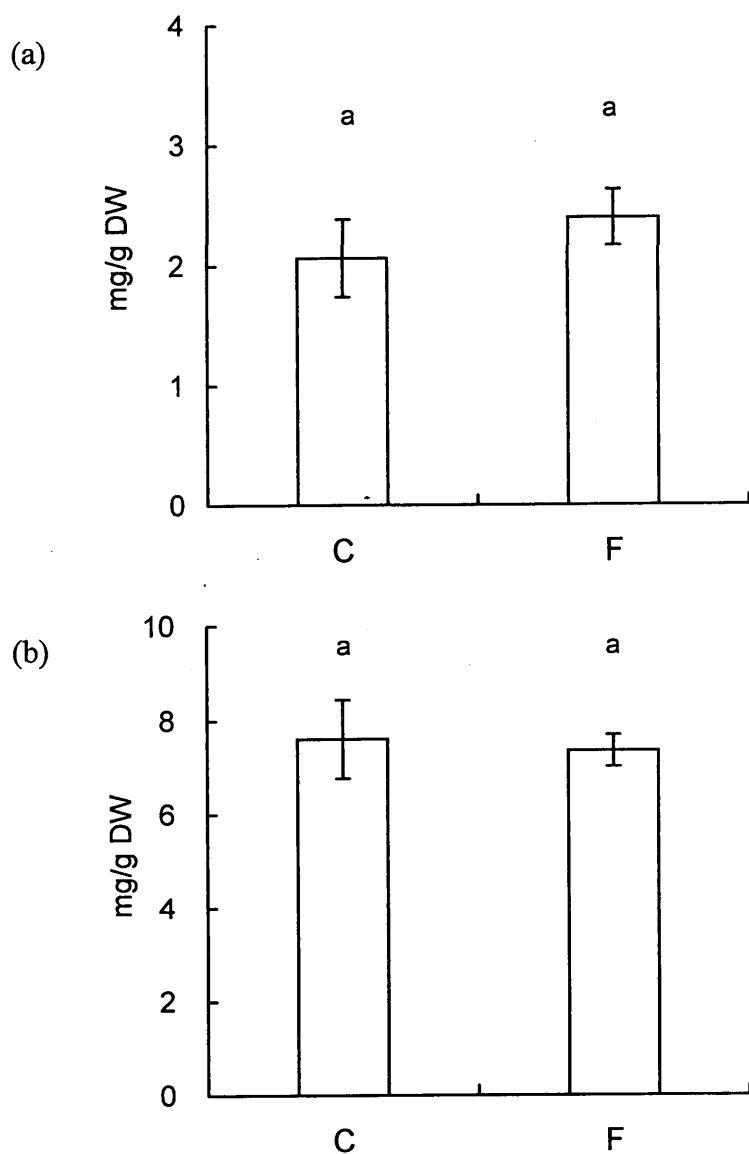


Fig. 5-13. The effects of chronic acid fog exposure on Ca (a) and K (b) concentrations in current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings. Values are mean values with standard error. C and F stand for control and acid fog exposure, respectively. Signs with different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$ according to Fisher's LSD- test.

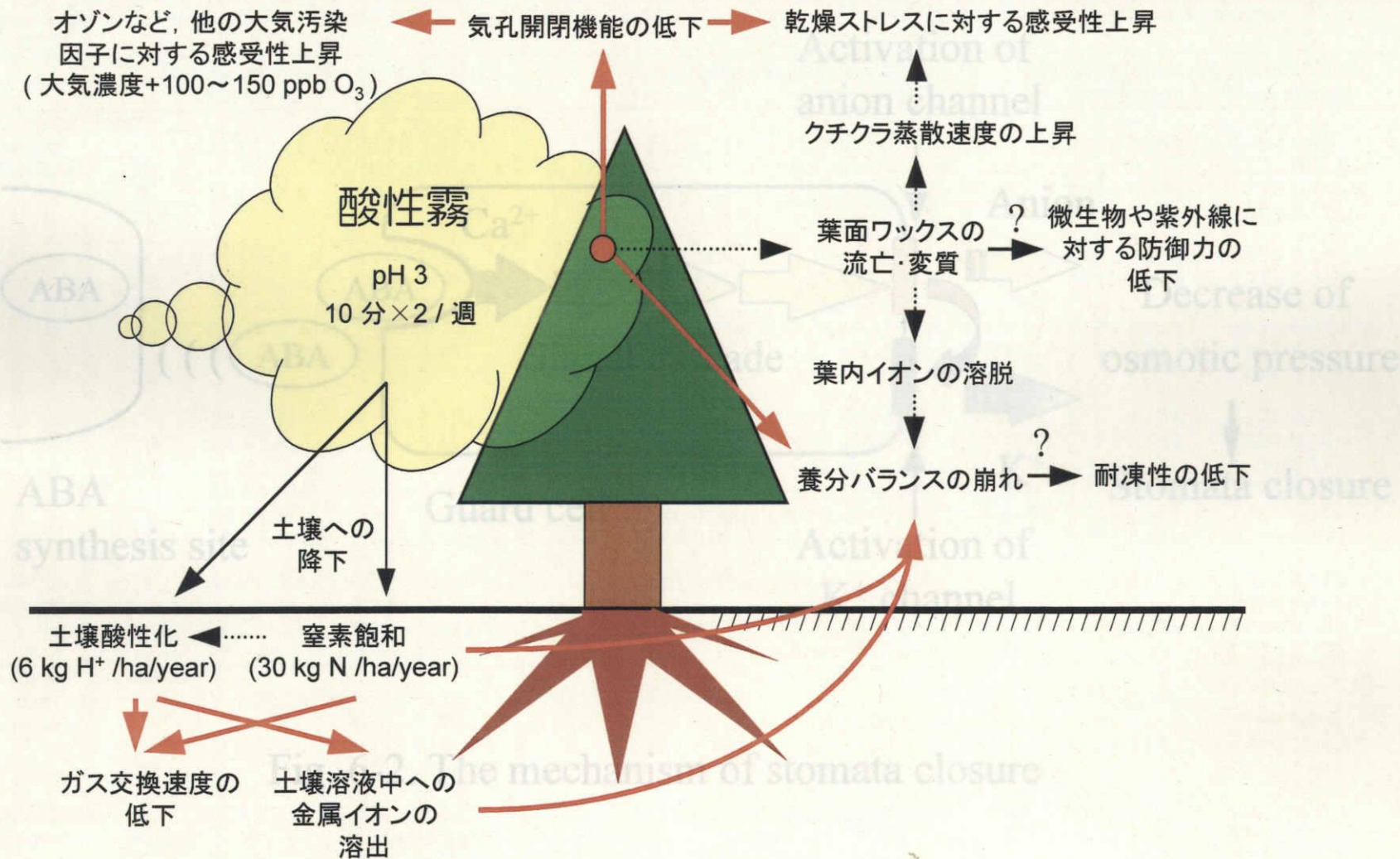


図6-1. 酸性霧が樹木生理に及ぼす影響の概念図。

赤線は本研究でその可能性が示された影響を, 点線は本研究で認められなかった影響を示す。

Table 2-1. The effects of chronic acid fog with additional climate and air pollutant factors on gas exchange rates of mormo fir (*Abies firma*) seedlings. Values are the mean values with their standard error before and after the additional stress. Signs with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

		Stomata conductance ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)		Transpiration rate ($\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$)		Net photosynthesis rate ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	
		Pretreatment	Posttreatment	Pretreatment		Pretreatment	Posttreatment
< Climate factors >							
Drought	C	132 \pm 11.1 a	26.7 \pm 3.34 a	C	1.88 \pm 0.12 a	C	9.05 \pm 0.44 a
	D1		10.5 \pm 0.66 b	D1		D1	0.57 \pm 0.34 b
	F	118 \pm 5.55 a	17.2 \pm 2.08 a	F	1.12 \pm 0.06 a	F	3.24 \pm 0.43 a
	FD1		16.7 \pm 2.08 a	FD1		FD1	1.27 \pm 0.44 ab
90-winter	C			C		C	
	D1			D1		D1	
	F			F		F	
	FD1			FD1		FD1	
Drought	C	195 \pm 16.1 ab	41.1 \pm 3.81 a	C	1.88 \pm 0.09 a	C	6.84 \pm 0.17 ab
	D1	160 \pm 19.2 a	21.1 \pm 3.35 c	D1	0.23 \pm 0.02 b	D1	0.21 \pm 0.01 b
	F	225 \pm 13.5 a	28.1 \pm 2.69 bc	F	1.8 \pm 0.06 a	F	7.12 \pm 0.23 a
	FD1	181 \pm 8.40 b	39.3 \pm 3.35 c	FD1	0.51 \pm 0.11 a	FD1	6.13 \pm 0.37 a
90-winter	C			C		C	
	D1			D1		D1	
	F			F		F	
	FD1			FD1		FD1	
Drought	C	64.2 \pm 2.32 a	41.1 \pm 3.81 a	C	0.27 \pm 0.02 ab	C	4.65 \pm 0.36 a
	D1	45.4 \pm 3.63 b	21.1 \pm 3.35 c	D1	0.23 \pm 0.02 b	D1	3.85 \pm 0.42 a
	F	52.1 \pm 5.76 ab	28.1 \pm 2.69 bc	F	0.26 \pm 0.02 ab	F	4.48 \pm 0.38 a
	FD1	60.6 \pm 3.50 a	39.3 \pm 3.35 c	FD1	0.29 \pm 0.02 a	FD1	4.61 \pm 0.38 a
90-winter	C			C		C	
	D1			D1		D1	
	F			F		F	
	FD1			FD1		FD1	
Drought	C	59.6 \pm 4.33 a	32.5 \pm 4.51 ab	C	0.30 \pm 0.01 a	C	4.62 \pm 0.46 a
	D1			D1		D1	
	F			F		F	
	FD1			FD1		FD1	
Low temperature	C	125 \pm 13.8 a	98.3 \pm 32.2 a	C	0.37 \pm 0.03 a	C	3.67 \pm 0.70 a
	L		91.6 \pm 20.8 a	L		L	2.59 \pm 0.39 ab
	F	116 \pm 15.7 a	97.9 \pm 27.1 a	F	0.35 \pm 0.04 a	F	3.39 \pm 0.29 a
	FL		114 \pm 47.6 a	FL		FL	1.04 \pm 0.54 b
< Air pollutant factors >							
Ozone exposure	C	119 \pm 22.2 b	119 \pm 10.5 a	C	1.49 \pm 0.11 b	C	5.77 \pm 0.34 b
	O		71.3 \pm 7.77 b	O		O	4.76 \pm 0.18 a
	F	186 \pm 19.2 a	139 \pm 12.7 a	F	1.84 \pm 0.10 a	F	6.78 \pm 0.29 a
	FO			FO		FO	5.72 \pm 0.44 b
Rhizosphere Al stress	C	98.5 \pm 11.4 a	118 \pm 19.0 a	C	0.95 \pm 0.08 a	C	4.88 \pm 0.33 a
	A		113 \pm 48.5 a	A		A	3.81 \pm 0.37 a
	F	110 \pm 13.9 a	129 \pm 25.3 a	F	0.96 \pm 0.06 a	F	5.21 \pm 0.19 a
	FA		140 \pm 25.5 a	FA		FA	4.33 \pm 0.31 a

The treatment group labels indicate as follows: C: control (no treatment); F: acid fog exposure; D: drought stress treated from 99-winter; D1: drought stress treated from 00-spring; FD, FD1: complex stress of acid fog exposure and drought; 1, 2, 3: the first, second, third treatment of drought stress, respectively; L: low temperature stress; O: ozone exposure; A: rhizosphere Al stress; FL, FO, FA: complex stress of acid fog exposure and low temperature, or ozone, or rhizosphere Al, respectively.

Fig. 6-2. The mechanism of stomata closure

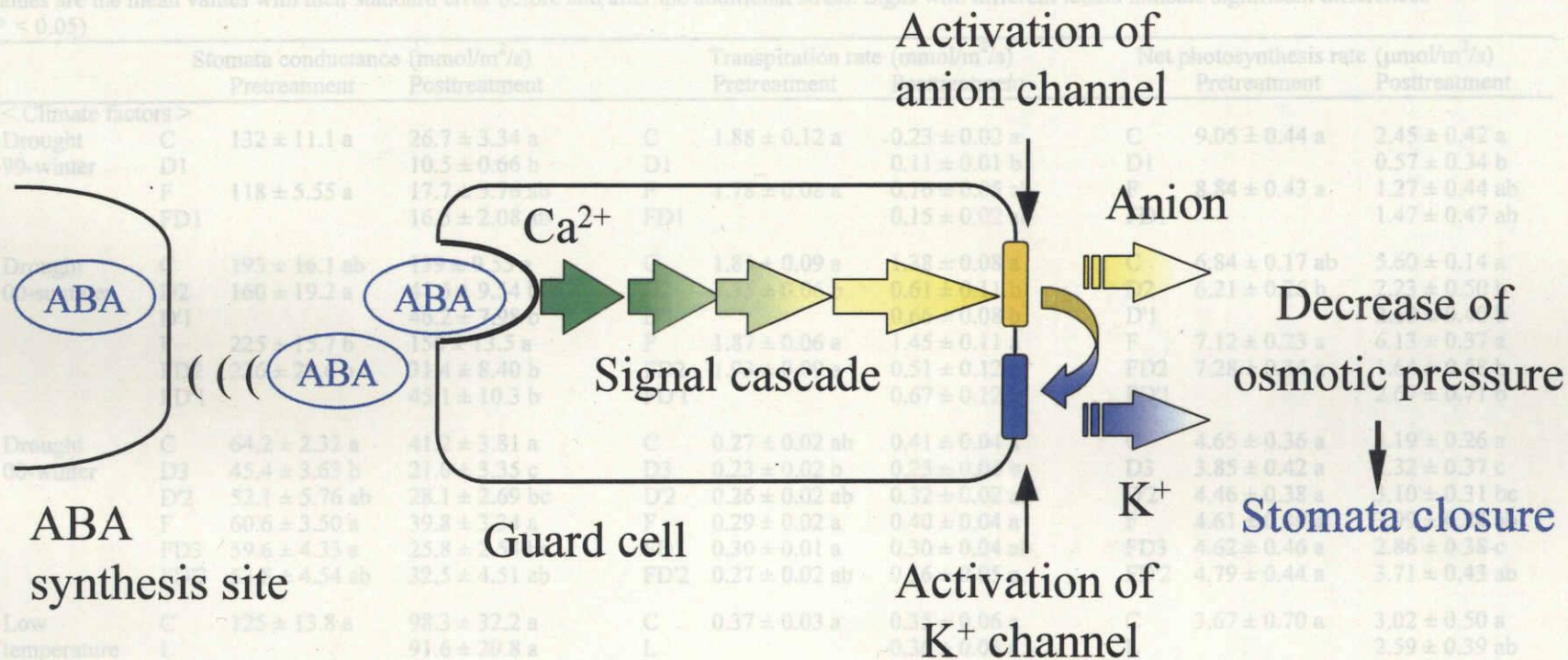


Table 2-1. The effects of chronic acid fog with additional climate and air pollutant factors on gas exchange rates of momi fir (*Abies firma*) seedlings. Values are the mean values with their standard error before and after the additional stress. Signs with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

		Stomata conductance (mmol/m ² /s)		Transpiration rate (mmol/m ² /s)		Net photosynthesis rate (μmol/m ² /s)	
		Pretreatment	Posttreatment	Pretreatment	Posttreatment	Pretreatment	Posttreatment
< Climate factors >							
Drought 99-winter	C	132 ± 11.1 a	26.7 ± 3.34 a	C	1.88 ± 0.12 a	0.23 ± 0.02 a	C 9.05 ± 0.44 a 2.45 ± 0.42 a
	D1		10.5 ± 0.66 b	D1		0.11 ± 0.01 b	D1 0.57 ± 0.34 b
	F	118 ± 5.55 a	17.7 ± 5.76 ab	F	1.78 ± 0.08 a	0.16 ± 0.05 ab	F 8.84 ± 0.43 a 1.27 ± 0.44 ab
	FD1		16.5 ± 2.08 ab	FD1		0.15 ± 0.02 ab	FD1 1.47 ± 0.47 ab
Drought 00-summer	C	193 ± 16.1 ab	139 ± 9.55 a	C	1.81 ± 0.09 a	1.38 ± 0.08 a	C 6.84 ± 0.17 ab 5.60 ± 0.14 a
	D2	160 ± 19.2 a	41.5 ± 9.54 b	D2	1.55 ± 0.06 b	0.61 ± 0.11 b	D2 6.21 ± 0.26 b 2.23 ± 0.50 b
	D'1		46.2 ± 7.98 b	D'1		0.66 ± 0.08 b	D'1 2.60 ± 0.40 b
	F	225 ± 15.7 b	156 ± 13.5 a	F	1.87 ± 0.06 a	1.45 ± 0.11 a	F 7.12 ± 0.23 a 6.13 ± 0.37 a
	FD2	226 ± 29.6 b	31.4 ± 8.40 b	FD2	1.93 ± 0.09 a	0.51 ± 0.12 b	FD2 7.28 ± 0.34 a 1.64 ± 0.58 b
	FD'1		45.1 ± 10.3 b	FD'1		0.67 ± 0.12 b	FD'1 2.67 ± 0.71 b
Drought 00-winter	C	64.2 ± 2.32 a	41.2 ± 3.81 a	C	0.27 ± 0.02 ab	0.41 ± 0.04 a	C 4.65 ± 0.36 a 4.19 ± 0.26 a
	D3	45.4 ± 3.63 b	21.0 ± 3.35 c	D3	0.23 ± 0.02 b	0.25 ± 0.04 b	D3 3.85 ± 0.42 a 2.32 ± 0.37 c
	D'2	52.1 ± 5.76 ab	28.1 ± 2.69 bc	D'2	0.26 ± 0.02 ab	0.32 ± 0.02 ab	D'2 4.46 ± 0.38 a 3.10 ± 0.31 bc
	F	60.6 ± 3.50 a	39.8 ± 3.34 a	F	0.29 ± 0.02 a	0.40 ± 0.04 a	F 4.61 ± 0.49 a 3.99 ± 0.24 ab
	FD3	59.6 ± 4.33 a	25.8 ± 2.54 bc	FD3	0.30 ± 0.01 a	0.30 ± 0.04 ab	FD3 4.62 ± 0.46 a 2.86 ± 0.38 c
	FD'2	53.8 ± 4.54 ab	32.5 ± 4.51 ab	FD'2	0.27 ± 0.02 ab	0.36 ± 0.05 a	FD'2 4.79 ± 0.44 a 3.71 ± 0.43 ab
Low temperature	C	125 ± 13.8 a	98.3 ± 32.2 a	C	0.37 ± 0.03 a	0.35 ± 0.06 a	C 3.67 ± 0.70 a 3.02 ± 0.50 a
	L		91.6 ± 29.8 a	L		0.36 ± 0.03 a	L 2.59 ± 0.39 ab
	F	110 ± 15.1 a	97.9 ± 27.1 a	F	0.35 ± 0.04 a	0.38 ± 0.06 a	F 3.39 ± 0.29 a 2.65 ± 0.58 a
	FL		114 ± 47.6 a	FL		0.34 ± 0.08 a	FL 1.04 ± 0.54 b
< Air pollutant factors >							
Ozone exposure	C	119 ± 22.2 b	119 ± 10.5 a	C	1.49 ± 0.11 b	1.48 ± 0.07 a	C 5.77 ± 0.34 b 6.51 ± 0.13 ab
	O		71.3 ± 7.77 b	O		1.13 ± 0.06 b	O 4.76 ± 0.18 c
	F	186 ± 19.8 a	139 ± 12.7 a	F	1.84 ± 0.10 a	1.56 ± 0.10 a	F 6.78 ± 0.29 a 6.68 ± 0.38 a
	FO		135 ± 20.3 a	FO		1.53 ± 0.08 a	FO 5.72 ± 0.44 b
Rhizosphere Al stress	C	98.5 ± 11.4 a	118 ± 19.0 a	C	0.95 ± 0.08 a	0.92 ± 0.06 a	C 4.88 ± 0.33 a 4.66 ± 0.31 a
	A		113 ± 48.5 a	A		0.87 ± 0.08 a	A 3.81 ± 0.37 a
	F	110 ± 12.9 a	129 ± 25.3 a	F	0.96 ± 0.06 a	0.91 ± 0.06 a	F 5.24 ± 0.19 a 4.47 ± 0.31 a
	FA		140 ± 25.5 a	FA		0.92 ± 0.06 a	FA 4.33 ± 0.31 a

The treatment group labels indicate as follows: C: control (no treatment); F: acid fog exposure; D: drought stress treated from 99-winter); D': drought stress treated from 00-summer; FD, FD': complex stress of acid fog exposure and drought; 1, 2, 3: the first, second, third treatment of drought stress, respectively; L: low temperature stress; O: ozone exposure; A: rhizosphere Al stress. FL, FO, FA: complex stress of acid fog exposure and low temperature, or ozone, or rhizosphere Al, respectively.

Table 2-2. The effects of chronic acid fog with low temperature on gas exchange rates of momi fir (*Abies firma*) seedlings. Measurement was performed 13-day after the treatment. Values are the mean values with their standard error.

Treatment	Stomata conductance mmol/m ² /s	Transpiration rate mmol/m ² /s	Net photosynthesis rate μmol/m ² /s
C	121 ± 23 a	0.91 ± 0.12 a	9.51 ± 0.89 a
L	137 ± 21 a	0.95 ± 0.04 a	9.66 ± 0.45 a
F	123 ± 7 a	0.97 ± 0.08 a	9.37 ± 0.54 a
FL	174 ± 18 a	1.06 ± 0.07 a	10.5 ± 0.5 a

The treatment group labels indicate as follows: C: control (no treatment); L: low temperature stress only; F: acid fog exposure only; FL: complex stress of acid fog and low temperature

Table 2-3. The effects of chronic acid fog with fine root cutting on gas exchange rates of momi fir (*Abies firma*) seedlings. Values are the posttreatment relative values (Apr. 2001) standardized by pretreatment values (Oct. 2000) with their standard error.

Treatment	Stomata conductance	Transpiration rate	Net photosynthesis rate
C	1.31 ± 0.06 a	1.45 ± 0.06 a	0.91 ± 0.04 a
R	0.88 ± 0.12 b	1.22 ± 0.09 b	0.68 ± 0.04 b
F	1.06 ± 0.15 ab	1.37 ± 0.06 ab	0.76 ± 0.07 ab
FR	0.86 ± 0.16 b	1.21 ± 0.07 b	0.69 ± 0.07 b

The treatment group labels indicate as follows: C: control (no treatment); R: root cutting stress only; F: acid fog exposure only; FR: complex stress of acid fog and root cutting.

Table 2-4. The effects of chronic acid fog with soil acidification and nitrogen load on gas exchange rates of momi fir (*Abies firma*) seedlings. Values are the mean values with their standard error in 11-month and posttreatment (17-month). Signs with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

		Stomata conductance (mmol/m ² /s)		Transpiration rate (mmol/m ² /s)		Net photosynthesis rate (μmol/m ² /s)			
		11-month	Posttreatment			11-month	Posttreatment		
Soil acidification	C	125 ± 8.14 a	84.2 ± 8.99 a	C	1.17 ± 0.13 a	0.47 ± 0.04 a	C	5.45 ± 0.31 a	5.40 ± 0.35 a
	S	80.6 ± 11.5 b	64.6 ± 6.00 ab	S	0.85 ± 0.05 b	0.32 ± 0.02 b	S	3.90 ± 0.21 b	4.13 ± 0.16 b
	F	117 ± 10.2 a	72.1 ± 6.17 ab	F	1.15 ± 0.08 a	0.37 ± 0.05 ab	F	5.06 ± 0.57 a	4.77 ± 0.30 ab
	FS	82.7 ± 10.2 b	58.8 ± 6.98 b	FS	0.93 ± 0.06 b	0.31 ± 0.03 b	FS	4.07 ± 0.27 b	3.99 ± 0.30 b
Nitrogen load	C	160 ± 10.4 ab	84.2 ± 8.99 a	C	1.79 ± 0.07 a	0.47 ± 0.04 a	C	6.19 ± 0.13 a	5.40 ± 0.35 a
	N	132 ± 18.4 b	47.6 ± 6.01 c	N	1.48 ± 0.08 b	0.30 ± 0.03 b	N	4.70 ± 0.27 b	3.75 ± 0.30 c
	F	173 ± 21.2 ab	72.1 ± 6.17 ab	F	1.84 ± 0.14 a	0.37 ± 0.05 ab	F	5.97 ± 0.49 a	4.77 ± 0.30 ab
	FN	202 ± 22.3 a	57.7 ± 6.73 bc	FN	1.66 ± 0.08 ab	0.35 ± 0.03 b	FN	5.52 ± 0.27 ab	4.24 ± 0.21 bc

The treatment group labels indicate as follows: C: control (no treatment); F: acid fog exposure only; S: soil acidification only; FS: complex stress of acid fog and soil acidification; N: nitrogen load only; FN: complex stress of acid fog and nitrogen load

Table 3-1. Effects of chronic acid fog exposure and/or soil acidification and nitrogen loading on soil pH (H₂O) and element concentrations in soil extracted by ultrapure water.

Treatment	Soil pH	Element concentrations in soil									
		Ca	K	Mg	P	Al	B	Cu	Fe	Mn	Zn
C	6.68 ± 0.02	98.7	78.1	22.8	7.41	458	108	24.4	199	204	85
F	6.67 ± 0.02	93.4	72.6	23.6	6.99	483	98	34.2	165	217	97
S	6.58 ± 0.02	94.9	59.4	23.3	5.11	494	107	26.0	180	269	112
FS	6.59 ± 0.03	90.8	48.2	20.4	6.33	444	104	23.5	156	230	102
N	6.63 ± 0.03	89.5	58.8	22.9	4.99	487	118	34.0	154	205	105
FN	6.66 ± 0.01	88.8	51.2	21.4	6.40	515	105	29.2	189	233	95
Effects											
Acid fog		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Soil acidification		n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Acid fog × Soil acidification		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Nitrogen loading		n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Acid fog × Nitrogen loading		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

C, F, S, FS, N and FN stand for control, acid fog exposure, soil acidification, acid fog with soil acidification, nitrogen loading, and acid fog with nitrogen loading, respectively.

The upper table shows the mean values of 8 determinations. Element concentrations : Ca, K, Mg, P (mg/g DW); Al, B, Cu, Fe, Mn, Zn (µg/g DW)

The lower table shows the effects of chronic acid fog exposure and/or soil acidification and nitrogen loading. Significance of effects was determined by two-way ANOVA: n.s., not significant ; **P < 0.01.

Table 3-2. Effects of chronic acid fog exposure and/or soil acidification and nitrogen loading on element concentrations in fine roots of momi fir (*Abies firma*) seedlings.

Treatment	Element concentrations in fine roots										
	Ca	K	Mg	N	P	Al	B	Cu	Fe	Mn	Zn
C	7.92	6.18	1.57	19.7	1.80	1565	12.3	31.9	1257	81.7	64.6
F	7.21	5.88	1.47	18.8	1.93	1573	11.9	28.4	1006	76.9	58.1
S	7.50	6.20	1.46	20.4	1.80	1746	12.2	31.8	1154	74.3	59.3
FS	6.77	5.07	1.46	18.9	2.13	1471	11.1	26.9	961	77.8	66.6
N	7.02	6.18	1.51	21.0	1.80	1529	12.3	26.2	1022	78.5	61.6
FN	7.49	6.65	1.54	20.1	1.76	1577	12.0	33.6	1337	85.2	63.6
Effects											
Acid fog	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Soil acidification	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Acid fog × Soil acidification	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Nitrogen loading	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Acid fog × Nitrogen loading	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

C, F, S, FS, N and FN stand for control, acid fog exposure, soil acidification, acid fog with soil acidification, nitrogen loading, and acid fog with nitrogen loading, respectively.

The upper table shows the mean values of 8 determinations. Element concentrations : Ca, K, Mg, N, P (mg/g DW); Al, B, Cu, Fe, Mn, Zn (µg/g DW). The lower table shows the effects of chronic acid fog exposure and/or soil acidification and nitrogen loading.

Significance of effects was determined by two-way ANOVA: n.s., not significant.

Table 3-3. Effects of chronic acid fog exposure and/or soil acidification and nitrogen loading on element concentrations and N/P ratio in current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings.

Treatment	Element concentrations in current-year needles											N/P
	Ca	K	Mg	N	P	Al	B	Cu	Fe	Mn	Zn	ratio
C	3.37	6.79	1.15	17.9	1.76	167	56.2	5.44	184	40.4	39.5	10.0
F	3.86	6.02	1.15	17.9	1.74	129	40.3	4.92	149	47.1	37.0	10.4
S	4.11	6.60	1.17	18.5	1.77	177	43.2	5.78	188	50.8	41.2	10.6
FS	4.22	5.74	1.02	18.2	1.84	153	43.5	5.07	153	35.9	40.4	10.0
N	4.25	6.79	1.24	18.9	1.59	197	46.3	5.57	206	41.5	43.1	12.0
FN	3.74	6.78	1.00	18.3	1.60	153	50.9	5.35	151	27.7	39.0	11.8
Effects												
Acid fog	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.
Soil acidification	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Acid fog × Soil acidification	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Nitrogen loading	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*
Acid fog × Nitrogen loading	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

C, F, S, FS, N and FN stand for control, acid fog exposure, soil acidification, acid fog with soil acidification, nitrogen loading, and acid fog with nitrogen loading, respectively.

The upper table shows the mean values of 8 determinations. Element concentrations : Ca, K, Mg, N, P (mg/g DW); Al, B, Cu, Fe, Mn, Zn (µg/g DW). The lower table shows the effects of chronic acid fog exposure and/or soil acidification and nitrogen loading. Significance of effects was determined by two-way ANOVA: n.s., not significant ; *P < 0.05; **P < 0.01.

Table 3-4. Effects of chronic acid fog exposure and/or soil acidification and nitrogen loading on element concentrations in one-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings.

Treatment	Element concentrations in one-year needles										
	Ca	K	Mg	N	P	Al	B	Cu	Fe	Mn	Zn
C	5.37	4.84	1.05	13.7	0.46	295	55.0	7.2	359	36.5	48.1
F	5.49	4.74	1.04	13.7	0.41	241	59.2	5.9	268	30.3	37.3
S	5.64	4.92	1.12	13.3	0.49	439	46.0	11.5	392	41.7	43.6
FS	5.42	3.98	1.06	14.6	0.45	222	51.4	5.6	258	28.7	37.8
N	5.86	4.94	1.14	14.8	0.44	340	59.8	6.8	403	31.1	45.5
FN	5.06	4.49	0.90	15.2	0.45	238	64.4	6.0	254	31.6	36.4
Effects											
Acid fog	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	**	n.s.	**
Soil acidification	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.
Acid fog × Soil acidification	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.
Nitrogen loading	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Acid fog × Nitrogen loading	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

C, F, S, FS, N and FN stand for control, acid fog exposure, soil acidification, acid fog with soil acidification, nitrogen loading, and acid fog with nitrogen loading, respectively.

The upper table shows the mean values of 8 determinations. Element concentrations : Ca, K, Mg, N, P (mg/g DW); Al, B, Cu, Fe, Mn, Zn (µg/g DW). The lower table shows the effects of chronic acid fog exposure and/or soil acidification and nitrogen loading.

Significance of effects was determined by two-way ANOVA: n.s., not significant ; *P < 0.05; **P < 0.01.

Table 3-5. Effects of acid fog exposure and/or rhizosphere aluminum treatment on element concentrations in fine roots of momi fir (*Abies firma*) seedlings.

Treatment	Element concentrations in fine roots										
	Ca	K	Mg	P	S	Al	B	Cu	Fe	Mn	Zn
C	5.81	13.4	1.75	3.71	2.09	1562	15.2	30.3	1294	522	67.2
F	5.73	16.3	1.79	3.64	2.04	1575	13.7	34.5	1280	478	72.1
A	0.75	15.4	0.63	3.90	2.42	9896	10.2	45.7	1092	61	31.0
FA	0.81	15.8	0.65	3.68	2.64	10909	10.1	52.4	1203	71	37.5
Effects											
Acid fog	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Rhizosphere Al	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	**	**	**	n.s.	**	**
Acid fog × Rhizosphere Al	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

C, F, A and FA stand for control, acid fog exposure, rhizosphere Al treatment, and acid fog with rhizosphere Al, respectively.

The upper table shows the mean values of 8 determinations. Element concentrations : Ca, K, Mg, P, S (mg/g DW); Al, B, Cu, Fe, Mn, Zn (µg/g DW). The lower table shows the effects of acid fog exposure and/or rhizosphere Al treatment.

Significance of effects are determined by two-way ANOVA: n.s., not significant ; ** $P < 0.01$.

Table 3-6. Effects of chronic acid fog exposure and/or rhizosphere aluminum treatment on element concentrations in current-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings.

Treatment	Element concentrations current-year needles										
	Ca	K	Mg	P	S	Al	B	Cu	Fe	Mn	Zn
C	1.82	13.4	0.83	2.04	1.31	160	21.9	9.6	171	180	30.0
F	1.78	13.7	0.78	2.16	1.18	86	21.0	7.2	97	174	22.9
A	1.36	16.4	0.49	1.63	1.06	525	21.4	9.0	112	161	20.0
FA	1.27	16.2	0.61	1.60	1.00	468	19.2	12.4	131	167	20.8
Effects											
Acid fog	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	*
Rhizosphere Al	**	**	**	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**
Acid fog × Rhizosphere Al	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.

C, F, A and FA stand for control, acid fog exposure, rhizosphere Al treatment, and acid fog with rhizosphere Al, respectively.

The upper table shows the mean values of 8 determinations. Element concentrations : Ca, K, Mg, P, S (mg/g DW); Al, B, Cu, Fe, Mn, Zn (µg/g DW). The lower table shows the effects of acid fog exposure and/or rhizosphere Al treatment.

Significance of effects are determined by two-way ANOVA: n.s., not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Table 3-7. Effects of chronic acid fog exposure and/or rhizosphere aluminum treatment on element concentrations in one-year needles of momi fir (*Abies firma*) seedlings.

Treatment	Element concentrations in one-year needles										
	Ca	K	Mg	P	S	Al	B	Cu	Fe	Mn	Zn
C	2.83	8.02	0.81	1.45	1.52	306	26.7	7.34	409	105	43.3
F	2.52	7.04	0.72	1.69	1.50	181	25.9	5.39	236	87	35.5
A	3.18	7.26	0.74	1.19	1.33	380	29.5	2.87	410	171	48.1
FA	3.29	8.63	0.76	1.13	1.26	334	31.8	2.02	320	164	38.5
Effects											
Acid fog	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	**	n.s.	**
Rhizosphere Al	*	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	**	*	n.s.	**	n.s.
Acid fog × Rhizosphere Al	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

C, F, A and FA stand for control, acid fog exposure, rhizosphere Al treatment, and acid fog with rhizosphere Al, respectively.

The upper table shows the mean values of 8 determinations. Element concentrations : Ca, K, Mg, P, S (mg/g DW); Al, B, Cu, Fe, Mn, Zn (µg/g DW). The lower table shows the effects of acid fog exposure and/or rhizosphere Al treatment.

Significance of effects are determined by two-way ANOVA: n.s., not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

表6-1. 各負荷ストレス実験の結果

付加ストレス	内容	結果
乾燥 (99冬処理)	灌水を一時停止	ガス交換速度が低下。酸性霧との複合ストレスでは有意差なし。
乾燥 (00夏処理)	〃	ガス交換速度に有意差なし
乾燥 (00冬処理)	〃	ガス交換速度に有意差なし
低温ストレス	苗木を 12℃ から -5℃ まで冷却	酸性霧との複合ストレスで光合成速度が低下(処理直後のみ)
細根切断	細根を半量切断	ガス交換速度が低下(酸性霧の複合影響なし)。
オゾン暴露	大気濃度+100~150 ppb のO ₃ を暴露	酸性霧との複合ストレスで可視障害が発生
土壌酸性化	6 kgH ⁺ /ha/year の酸を土壌に負荷	ガス交換速度が低下(酸性霧の複合影響なし)。養分状態が変化。
窒素負荷	30 kgN/ha/year の窒素を土壌に負荷	ガス交換速度が低下(酸性霧の複合影響なし)。養分状態が変化。
根圏Al処理	1mM Al ³⁺ を根圏に負荷	ガス交換速度に有意差なし。養分状態が変化。

報 文 目 録

1. Koji Yoshida, Ryota Shibasaki, Chika Takami, Chisato Takenaka, Kazukiyo Yamamoto and Takafumi Tezuka

Response of gas exchange rates in *Abies firma* seedlings to various additional stresses under chronic acid fog stress.

Journal of Forest Research. Vol. 9: 195-203. (2004)

2. Koji Yoshida, Shoko Inaba, Chisato Takenaka and Takafumi Tezuka

Effects of chronic acid fog exposure with soil acidification or nitrogen loading on nutrient status in *Abies firma* seedlings.

Journal of Forest Research. (Accepted)

3. Koji Yoshida, Chisato Takenaka and Takafumi Tezuka

Effects of complex stress of chronic acid fog exposure with rhizosphere aluminum on nutrient status in *Abies firma* seedlings.

Journal of Forest Research. (Submitted)