

5. 中濃度のオゾン曝露がヒマワリ葉海綿状組織
における葉肉細胞の光合成機能に与える影
響の解析

5.1 研究の背景及び目的

オゾン(O₃)は淡い青色をした酸素(O₂)の同素体であり、実験的には大気への紫外線照射、または酸素中での無声放電などによって発生する。また対流圏では、自動車や工場等から排出される二酸化窒素(NO₂)が、太陽光により酸素原子と酸素分子に分解されることにより形成される。成層圏のオゾンが、宇宙からの紫外線を吸収し地球上の生命の維持に役立っている一方で、対流圏、特に地表付近のオゾンは、光化学スモッグの原因物質として知られている。大気汚染物質としてのオゾンは、高濃度では粘膜への影響などが知られているほか、森林生態系や農作物等の植物への影響も報告されている(Ashmore and Bell, 1991; Nouchi, 2002)。オゾン濃度は、近年の温暖化とともに増加しており、欧米諸国では、オゾンは森林生態系において最も危険な大気汚染物質のひとつであると考えられている(Sander mann et al., 1997)。このため、北米やヨーロッパの森林を構成している植物の成長、ガス交換速度や酵素などの生理機能、フェノロジーなどに対するオゾンの影響に関する研究が野外条件下や実験的条件下で盛んに行われている(Matyssek et al., 1995; Sander mann et al., 1997)。オゾン曝露が植物に与える影響には、活性酸素の増加、Rubisco 活性の低下、エチレンの増加の三つが主要なものとして報告されている。この結果、植物には成長の抑制や光合成の阻害、葉の脱色や組織の細胞の死(壊死)などの障害が起きる。また、障害はモザイク状に現れることが多く、スポット計測での解析は困難である(Leipner et al., 2001)。オゾンの主な侵入経路は気孔であるといわれているが、オゾンは反応性が高く、容易に他の活性酸素系に変換されるため、その作用機作は未だに解明されていない部分が多い。オゾンの侵入経路が気孔であるならば、気孔が密に分布している海綿状組織を対象として、高さ(深さ)方向の光合成活性の解析は作用機作の解明にあたって有効であると考えられる。しかし、オゾン曝露後の海綿状組織について、高さ情報と光合成電子伝達収率の関係について解析した例は見られない。そこで、オゾン曝露に対する感受性の高いヒマワリ葉の3D 蛍光画像を算出し、葉面付近の海綿状組織における個々の細胞の蛍光強度、及び Φ_{PSII} を用いて、中濃度のオゾン曝露がヒマワリ葉海綿状組織における葉肉細胞の光合成機能に与える影響について解析を行った。

5.2 材料及び方法

供試材料にはヒマワリ (*Helianthus annuus* L. cv. Sun Hope) 葉を用いた (Fig. 5-1)。ヒマワリは、研究室の植物育成チャンバ内で、明期 11 時間 (26°C) / 暗期 13 時間 (20°C)、PPF 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光条件下で約 4 週間育成させた。灌水は毎日明期開始時に行った。

計測は次の手順で行った。まず、ヒマワリの成熟葉を顕微鏡のステージ上に固定し、オゾン曝露前のクロロフィル蛍光焦点面画像の取得を行った。対物レンズには 20 倍のレンズ (BD Plan Apo 20 \times , 株式会社ミットヨ) を用いた。明期光強度、飽和パルス光強度は Table 6-1 に示したとおりである。なお、画像取得の前に、蛍光強度が一定になるようにするため、明期光を照射しながら 15 分間静置した。

各焦点面画像を取得する際には、明期光のみを照射させて F 画像を取得し、さらに、F 画像取得直後に飽和パルス光を 1.2 秒間照射して Fm' 画像を取得した。飽和パルス光は、光合成活性が変化しないようパルス照射される光であるが、飽和パルス光が短い間隔で繰り返し照射されると、明期光強度があたかも上昇したかのように植物の熱放散が増加してしまう。そこで、飽和パルス光による熱放散の増加を防ぐため、Fm' 画像を取得後は、次の焦点面の F 画像を取得するまでに 30 秒間のインターバルを設けた。また、焦点面画像取得の際は、初めに視野内の最下部に焦点を合わせた後、さらに幾分下まで対物レンズを下げた。これは、合焦画像算出の際に、焦点の合う範囲が確実に選択されるよう考慮したためである。焦点面は 4 μm 間隔で、計 15 枚を下から上へ順に取得した。なお、視野内の最上部に焦点があったと考えられた際も、上と同様の理由により、さらに幾分上まで対物レンズを上昇させて焦点面画像の取得を行った。なお、対物レンズの上昇は、鏡筒に設置されたステッピングモータを PC で制御することで行った。

次に、ヒマワリをオゾン曝露用インキュベータに移し、オゾンを曝露せずにインキュベータ環境に 12 時間馴化させた後、オゾン曝露を開始した。Table 6-1 に、オゾン曝露条件を示す。曝露用オゾンはオゾン発生器 (OES-10A, DYLEC) を用いて生成した。測定器 (MODEL 1200, DYLEC) を用いて曝露中のオゾン濃度を測定し、インキュベータ内のオゾン濃度が 300ppb に保たれるよう制御した。12 時間のオゾン曝露後、

ヒマワリをインキュベータから取り出して、すばやく顕微鏡のステージ上に固定した。明期光を照射しながら 15 分静置した後、曝露前の画像取得時と同様に、クロロフィル蛍光焦点面画像を取得した。

最後に、このようにして求めた 2 種類の焦点面画像シリーズを用いて、合焦画像、及び 3D 画像の算出を行った。算出の際には、マスクサイズは 7-41 まで用意し、それぞれのピクセルにおいて、最適のマスクサイズで合焦点が求められるようにした。また、ノイズ除去の目的で、合焦画像にはマスクサイズ 3 のメディアンフィルタ、3D 画像にはマスクサイズ 5 のメディアンフィルタ、及び平均値フィルタを用いて画像補正を行った。

さらに、合焦 F 画像と合焦 F_m' 画像を用いて、合焦 Φ_{PSII} 画像の算出を行った。



Fig. 5-1 Visual image of a sunflower (*Helianthus annuus* L. cv. Sun Hope) used for the experiment performed at a PPF of $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Table 5-1 Structural formula of ozone, and other experimental conditions.

Structural formula	$\begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \text{O} - \text{O} \end{array}$
Concentration of ozone	300 ppb
Exposure time	12 h
a PPF of saturation pulse	$3800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
a PPF of actinic light	$300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

5.3 結果

Fig. 5-2 に、3D クロロフィル蛍光顕微画像計測システムを用いて取得した、オゾン曝露前の明期定常状態($\text{PPF } 300\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)における 15 枚のクロロフィル蛍光焦点面画像を示す。本実験では飽和パルス法による計測を行ったため、Fig. 5-2 に示した明期定常状態における焦点面画像のほか、飽和パルス光照射時の焦点面画像も 15 枚取得された。これらについて、それぞれ第 5 章のアルゴリズムにより 3D 画像を算出したところ、ほぼ同様の 3D 画像が出力された。3D 画像の形状がほぼ同一であること、また、本研究では明期定常状態における蛍光強度を考察に使用することから、本研究では、明期定常状態における焦点面画像から算出された 3D 画像を用いて、以降の解析を行うこととした。

Fig. 5-3 にオゾン曝露前における、明期定常状態の 3D クロロフィル蛍光画像を示す。オゾン曝露前のヒマワリ葉は、顕微鏡視野内にわたって、不均一な蛍光強度分布を示した。顕微鏡視野内には凹凸が観察されたが、海綿状組織の凹凸と蛍光強度には、特に一定の関係は見られなかった。Fig. 5-3 中の点線部位のピクセルにおいて蛍光強度と高さの関係をプロットしたグラフを Fig. 5-4 に示す。横軸は、Fig. 5-2 で示した焦点面画像(1)を基準とした時の高さを示し、縦軸は相対的なクロロフィル蛍光強度を示している。グラフが示すように、蛍光強度と高さには特に関係が見られなかった。

Fig. 5-5 に、300ppb オゾンの 12 時間曝露後における、明期定常状態の 3D クロロフィル蛍光画像を示す。オゾン曝露後のヒマワリ葉も、オゾン曝露前同様に顕微鏡視野内にわたって、不均一な蛍光強度分布を示した。顕微鏡視野内においても、オゾン曝露前と同様凹凸が観察されたが、海綿状組織の凹凸と蛍光強度にはある関係性が確認できた。Fig. 5-5 中の点線部位のピクセルにおいて蛍光強度と高さの関係をプロットしたグラフを Fig. 5-6 に示す。グラフが示すように、オゾン曝露後のヒマワリ葉海綿状組織においては、焦点面画像を基準とした高さが高くなるにつれて、クロロフィル蛍光強度が低下した。

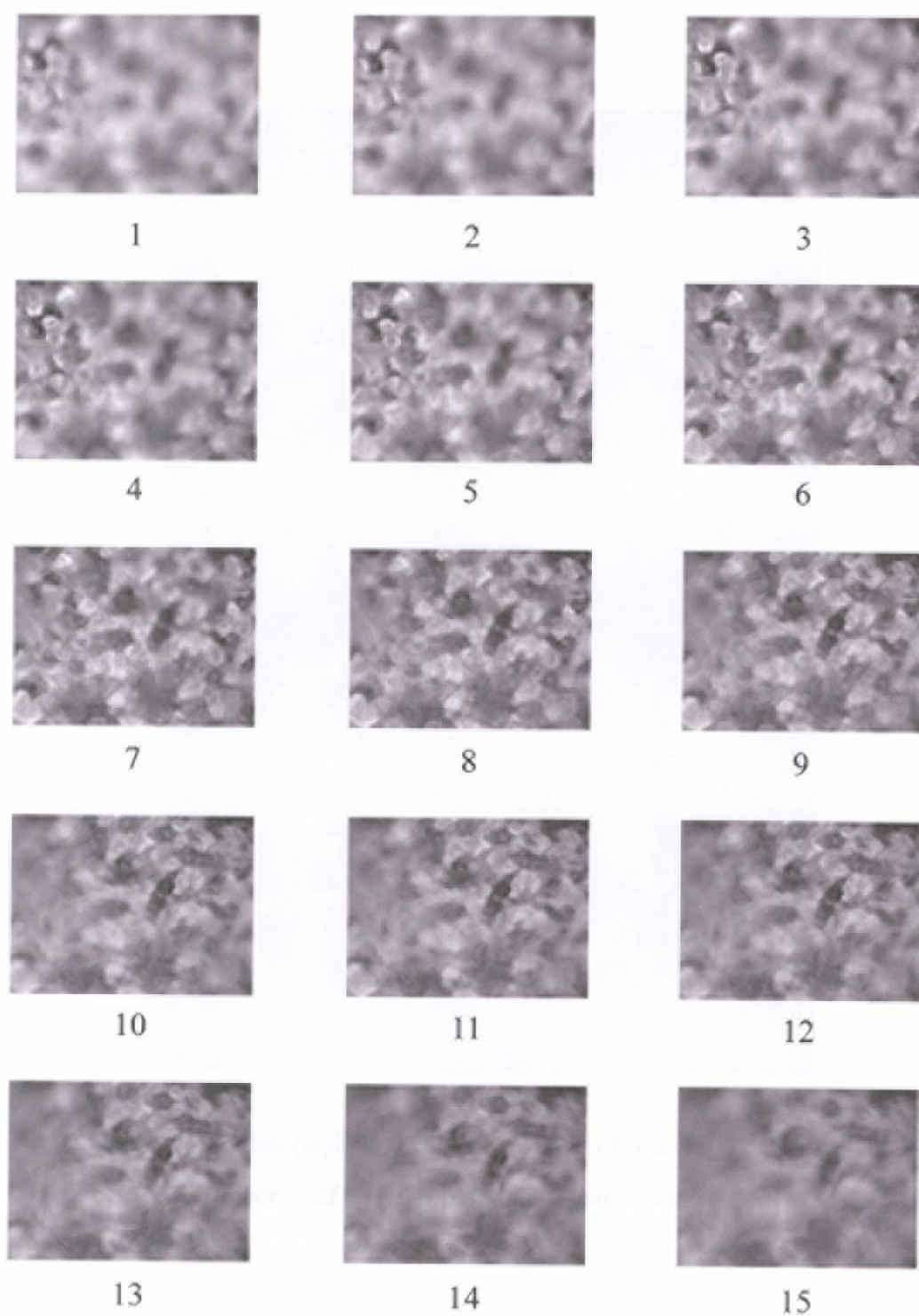


Fig. 5-3 Focal plane chlorophyll fluorescence images from abaxial side of a sunflower leaf captured at steady-state under an actinic irradiance of $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A total of 15 images were captured at $4\mu\text{m}$ intervals using a $20\times$ objective.

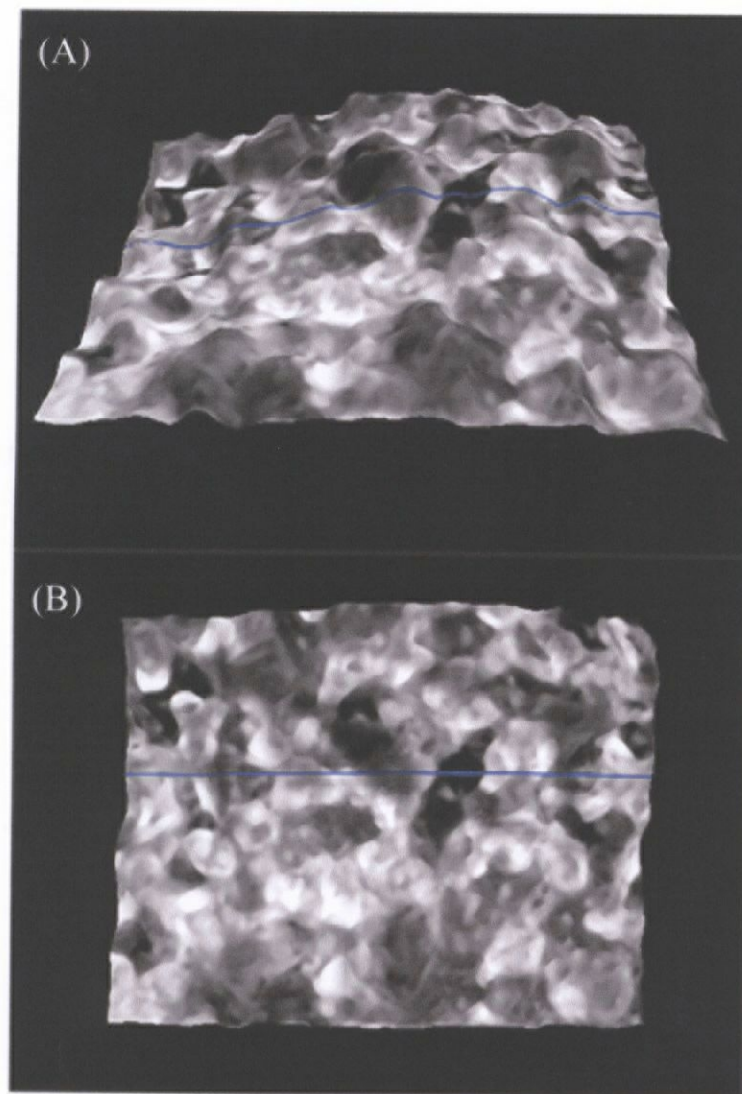


Fig. 5-4 3D chlorophyll fluorescence images of mesophyll cells at the spongy tissue of a sunflower leaf before ozone exposure, calculated by least-square operator and Gaussian approximation. (A) is a birds-eye view. (B) is a right overhead view. Blue line shows the profile analysis line used in Fig. 5-5.

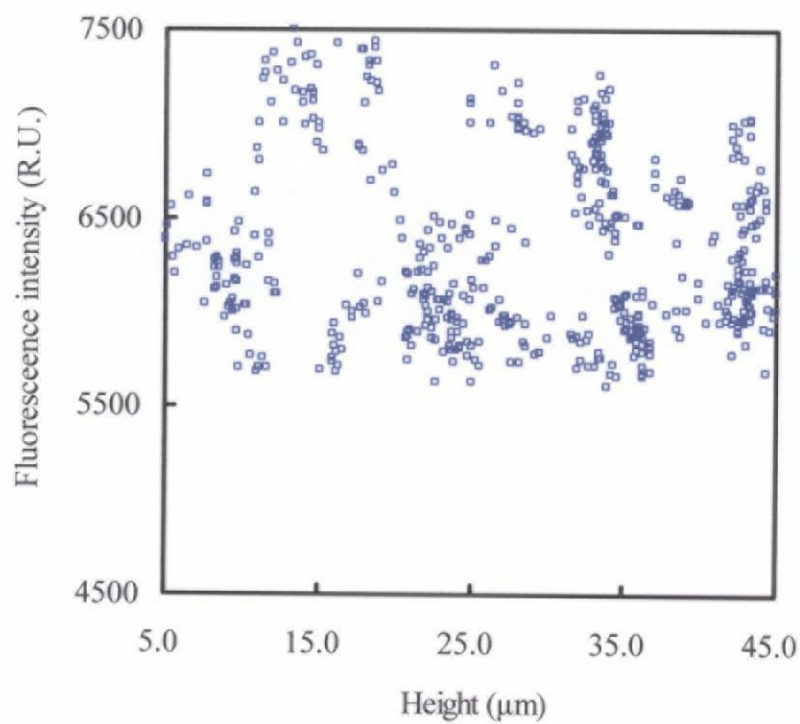


Fig. 5-5 Relationship between height from standard focal plane (Fig. 5-2(1)) and fluorescence intensity before the ozone exposure. The 623 points plotted for measurement were taken along the blue line shown in Fig. 5-4.

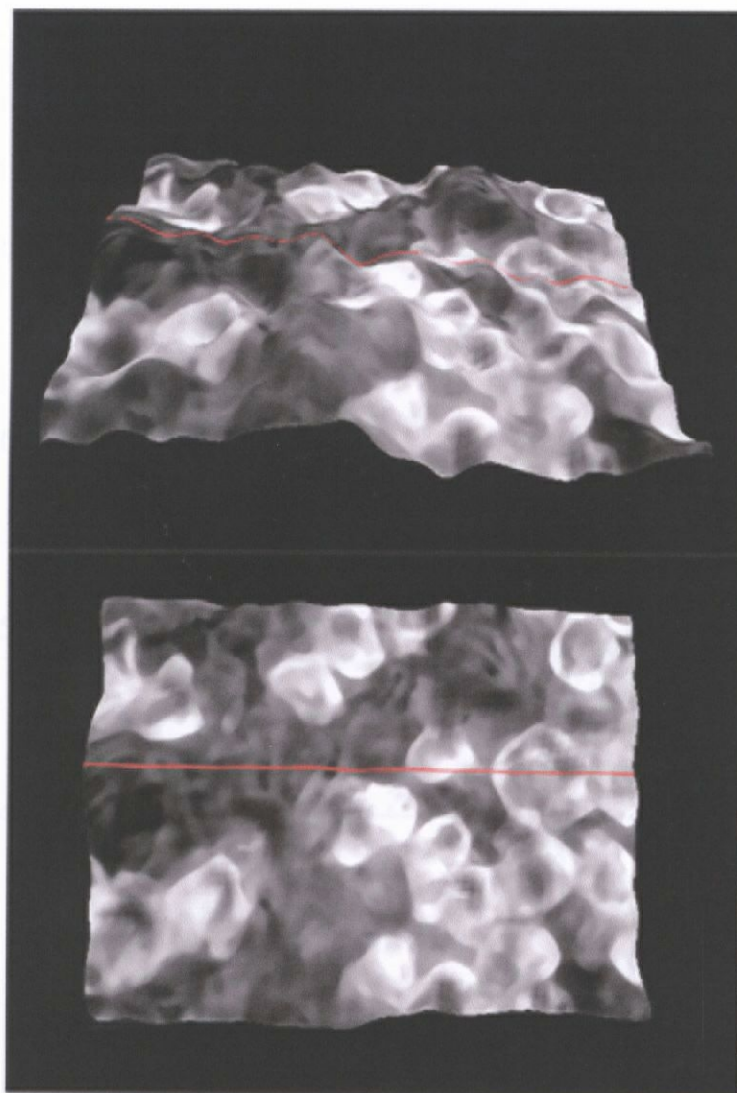


Fig. 5-6 3D chlorophyll fluorescence images of mesophyll cells at the spongy tissue of a sunflower leaf after 300ppb ozone exposure for 12h, calculated by least-square operator and Gaussian approximation. (A) is a birds-eye view. (B) is a right overhead view. Red line shows the profile analysis line used in Fig. 5-7.

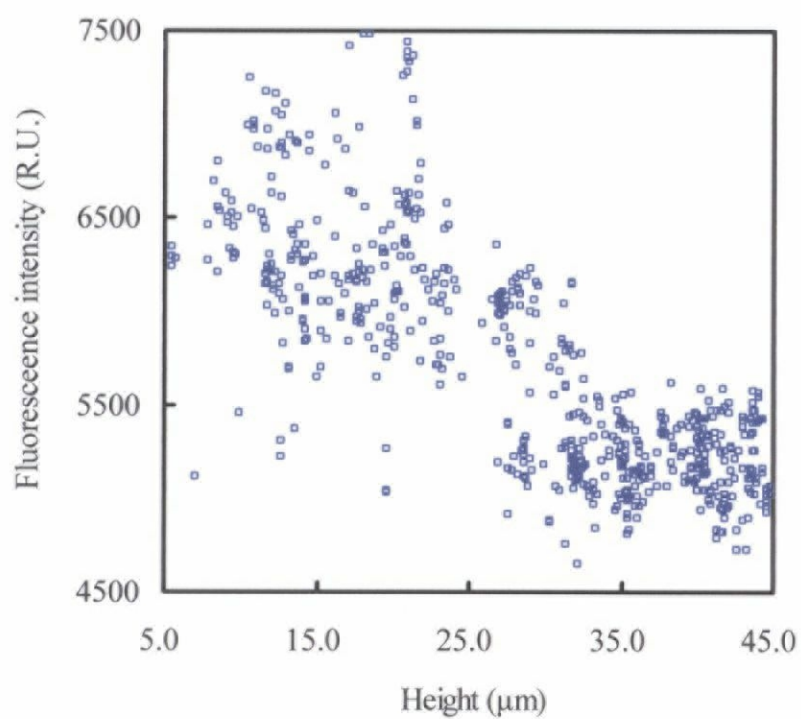


Fig. 5-7 Relationship between height from standard focal plane (Fig. 5-2(1)) and fluorescence intensity after the 300ppb ozone exposure for 12h. The 623 points plotted for measurement were taken along the red line shown in Fig. 5-6.

オゾン曝露前の 3D Φ_{PSII} 画像を Fig. 5-7 に示す。 Φ_{PSII} は、光合成電子伝達収率を表す蛍光パラメータで、吸収された光エネルギーのうちどのくらいの割合が電子伝達に消費されたかを示している。オゾン曝露前における明期定常状態のクロロフィル蛍光強度が不均一性を示した一方で、同じくオゾン曝露前の Φ_{PSII} は 0.43 から 0.52 の間の値をとり、顕微鏡視野全体にわたってほぼ均一に分布していた。この Φ_{PSII} 値は、ヒマワリなどの一般的な C3 植物が、通常の生育条件下で示す値の範囲内であった。Fig. 5-3 中の点線部位のピクセルにおいて、 Φ_{PSII} と高さの関係をプロットしたグラフを Fig. 5-8 に示す。横軸は、Fig. 5-2 で示した焦点面画像(1)を基準とした時の高さを示し、縦軸は Φ_{PSII} を示している。グラフが示すように、 Φ_{PSII} と高さには特に関係が見られなかった。

300ppb オゾンの 12 時間曝露後における 3D Φ_{PSII} 画像を Fig. 5-9 に示す。オゾン曝露前の結果と同様、オゾン曝露後における明期定常状態のクロロフィル蛍光強度が不均一性を示した一方で、オゾン曝露後の Φ_{PSII} は 0.9 から 0.52 の間の値をとり、顕微鏡視野全体にわたってほぼ均一に分布していた。Fig. 5-5 中の点線部位のピクセルにおいて、 Φ_{PSII} と高さの関係をプロットしたグラフを Fig. 5-10 に示す。グラフが示すように、 Φ_{PSII} と高さには特に関係が見られなかった。

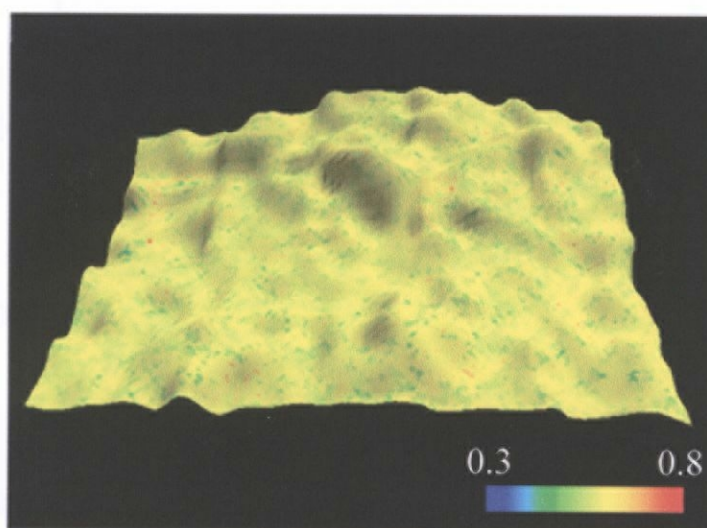


Fig. 5-8 3D Φ_{PSII} image of mesophyll cells at the spongy tissue of a sunflower leaf before the ozone exposure, calculated by least-square operator and Gaussian approximation. Φ_{PSII} image were calculated from two kinds of fluorescence intensity images, taken at PPFs of $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ actinic light and during a saturating light pulse of $3800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

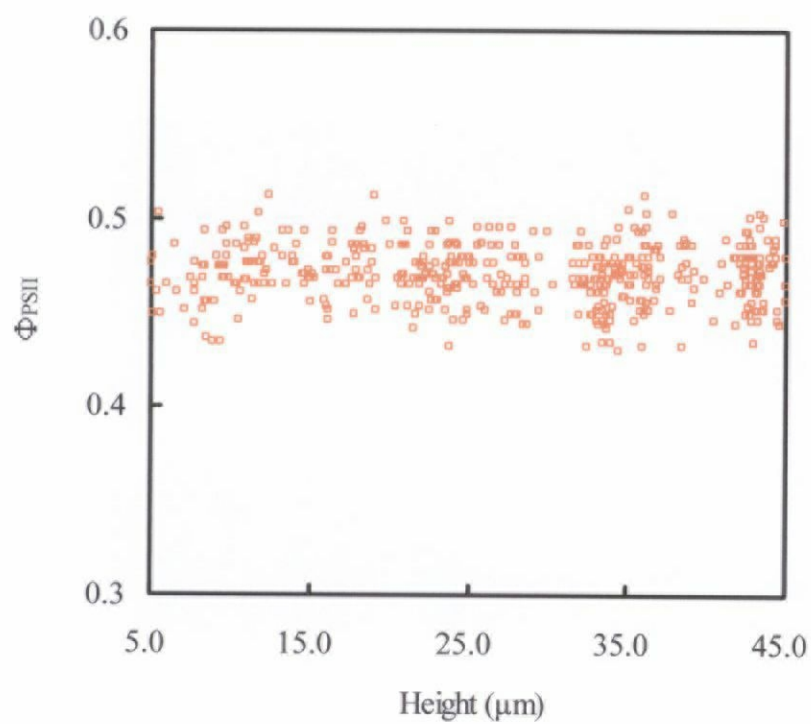


Fig. 5-9 Relationship between height from standard focal plane (Fig. 5-2(1)) and Φ_{PSII} before the ozone exposure. The 623 points plotted for measurement were taken along the blue line shown in Fig. 5-4.

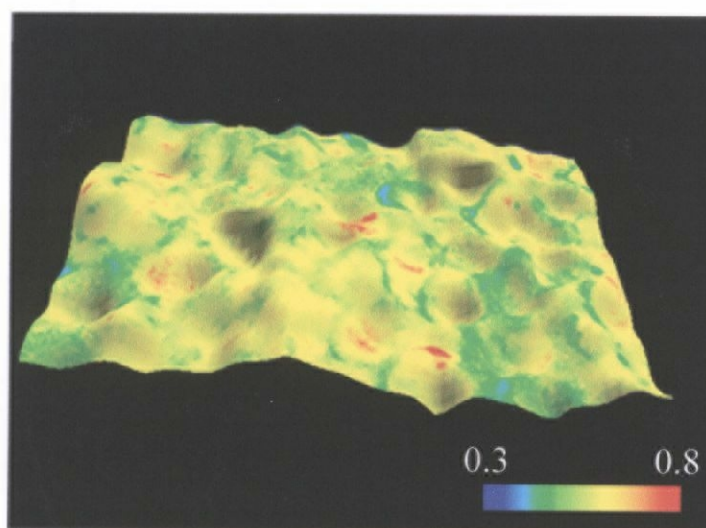


Fig. 5-10 3D Φ_{PSII} image of mesophyll cells at the spongy tissue of a sunflower leaf after the 300ppb ozone exposure for 12h, calculated by least-square operator and Gaussian approximation. Φ_{PSII} image were calculated from two kinds of fluorescence intensity images, taken at PPFs of $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ actinic light and during a saturating light pulse of $3800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

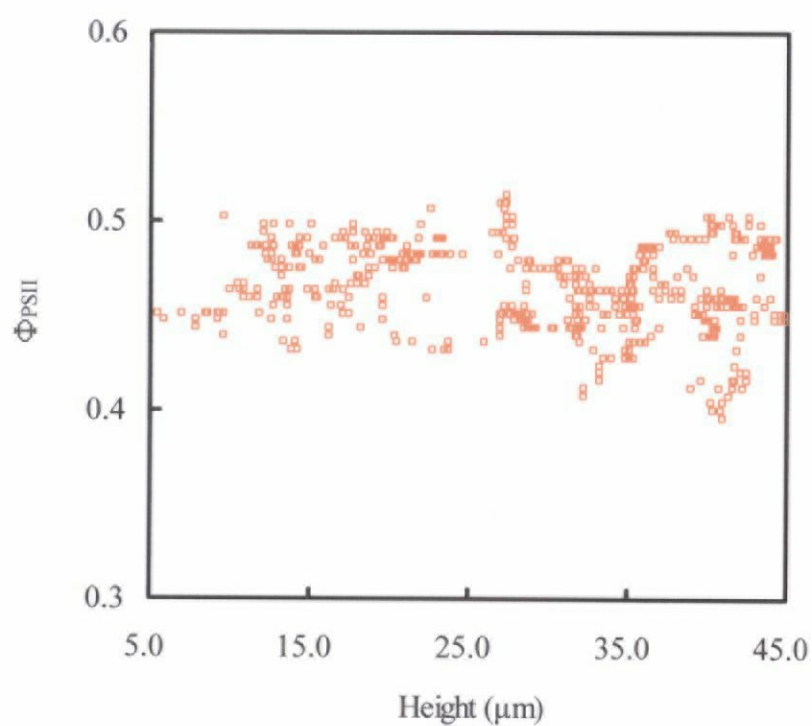


Fig. 5-11 Relationship between height from standard focal plane (Fig. 5-2(1)) and Φ_{PSII} after the 300ppb ozone exposure for 12h. The 623 points plotted for measurement were taken along the red line shown in Fig. 5-6.

5.4 考察

オゾン曝露前のクロロフィル蛍光強度分布の不均一性は、焦点面画像、及び 3D 画像から 2 種類の要因によるものと考察できる。一つ目は、海綿状組織が細胞間隙に富むため、葉肉細胞が顕微鏡視野内に観察されない(顕微鏡の焦点限界よりも深くに細胞が存在して焦点を結べない)ことに起因し、二つ目は葉緑体の蛍光強度そのものが異なって分布していることに起因していると考えられる。しかし、 Φ_{PSII} 画像が、オゾン曝露前後において、顕微鏡視野内全体にわたってほぼ均一であることから、本実験では、クロロフィル蛍光強度分布の不均一性は、葉緑体からの蛍光強度の変化に起因していると考えられた。

この蛍光強度分布について、葉内における高さとの関係を、Fig. 5-2 における焦点面画像(1)を基準として解析したところ、オゾン曝露前のクロロフィル蛍光強度分布と高さ分布には特に関係が見られなかった。しかし、オゾン曝露後では蛍光強度画像の強度分布と高さには関連性が見られた。表皮から離れた海綿状組織では蛍光強度は曝露前でもあまり変わらなかったものの、表皮に近接した海綿状組織では蛍光強度が曝露前より低下していた。蛍光強度の低下には、光合成電子伝達収率の上昇や熱放散の増大、または葉緑体の光エネルギーの吸収量低下という二つの要因が考えられる。今回の実験では、 Φ_{PSII} の値がオゾン曝露の前後で変化しないこと、モザイク状の可視傷害が現れたことから、オゾンによる葉緑体の光エネルギーの吸収量低下が原因であると考えられる。このように、表皮に近い海綿状組織でオゾン障害が確認されたため、気孔の位置と障害の分布を比較した。Fig. 5-11 に、実験に用いたオゾン曝露葉背軸面の反射画像、及び目視により確認した気孔の位置(青線内)と、この気孔の位置を合焦クロロフィル蛍光画像に重ね合わせた画像を示す。なお、ヒマワリ葉をオゾン曝露用インキュベータからとりだして顕微鏡での観察をした時点で、青線枠で示した気孔は既にほぼ閉鎖しており、オゾン曝露中の本気孔の状態を推察することは困難であった。Fig. 5-11(B)において、赤線で囲まれた領域は特にクロロフィル蛍光強度の低い領域を表している。このように、ヒマワリ葉においては、オゾン害が必ずしも気孔周辺部に現れるとは限らないことがわかった。赤線で囲まれた領域は、表皮に最も近接した海綿状組織である。このような領域における蛍光強度

の低下は、オゾンの侵入経路が気孔だけではなく、表皮及びクチクラ上にも存在していることを示唆している(Fig. 5-12)。既往の研究では、オゾンは気孔を介して侵入すると報告されており、数々の研究例から気孔が主要なオゾン侵入経路であることは確実であると考えられるが、ヒマワリのようにクチクラ構造の貧弱な表皮においては、表皮からオゾンが侵入する可能性も十分に考えられる。今回、装置上の制約もあり、気孔の開閉をモニタリングしながらオゾン障害の分布について経時変化を追うことは困難であった。しかし、表皮及びクチクラを介したオゾン侵入経路の存在は、湿度調節等によって気孔を閉鎖した上で同様に実験を行うことによって明らかになると考えられる。

従来報告どおり、オゾンが気孔のみを介して侵入したとすると、表皮に近い海綿状組織の蛍光強度が低下した理由としては、オゾンが進入後高さ方向ではなく横方向に拡散した可能性が考えられる。既往の研究より、オゾンは反応性が大変高く、また、オゾン害は光強度が高い場合ほどその害が顕著であることが知られている。この高い反応性のため、オゾンが葉内の奥深くに侵入する前に消失してしまったとすると、葉内の顕微鏡視野内においても高さ方向のオゾン濃度勾配が生じる可能性がある。さらに、表皮に近い海綿状組織と奥の海綿状組織では、照射光強度に違いがある場合、さらにこの勾配は大きくなる可能性も考えられる。今回得られた 3D 画像から、画像内の葉緑体は表皮付近に存在し、画像内における高低差はおおよそ 20 μ m であった。本仮説は、この範囲における光の減衰による個々の葉緑体の照射光量の差を解析することによって新しい知見を得ることができると考えられる。

このように、オゾン曝露によって表皮に近い海綿状組織の蛍光強度の低下が見られたにもかかわらず、海綿状組織の Φ_{PSII} 値の低下は顕微鏡視野内全体にわたって見られなかった。この結果から、オゾン曝露によって蛍光強度の低下した表皮に近い海綿状組織においても、オゾン曝露前とほぼ同様の電子伝達収率が維持されていることがわかった。このことは、オゾン曝露によって生じる光合成速度の低下が、必ずしも光合成電子伝達収率の低下によってもたらされているわけではないことを示唆している。光合成速度の低下の生理学的な原因は、葉緑体内に存在する集光クロロフィルによる光エネルギー吸収量の低下、及び $PSII$ から PSI への電子伝達収率の低下に大別できる。表皮に近い海綿状組織では、光エネルギーの吸収量低下は示唆さ

れたものの、光合成電子伝達収率の低下は観察されなかった。つまり、オゾンによる光合成速度の低下は、光吸収量の低下に原因があると考えられる。この結果は、不明であったオゾンの攻撃対象に対する新しい知見という点で重要であると考えられる。なお、曝露初期においては気孔周辺部に Φ_{PSII} の低下が見られるとの報告がある。この実験は、異なる植物葉と異なる実験条件を用いているため、厳密な比較はできないが、オゾン曝露による被害がいくつかのステージを持つ可能性を示唆している。これについては、経時変化を追った実験が有効であると考えられる。

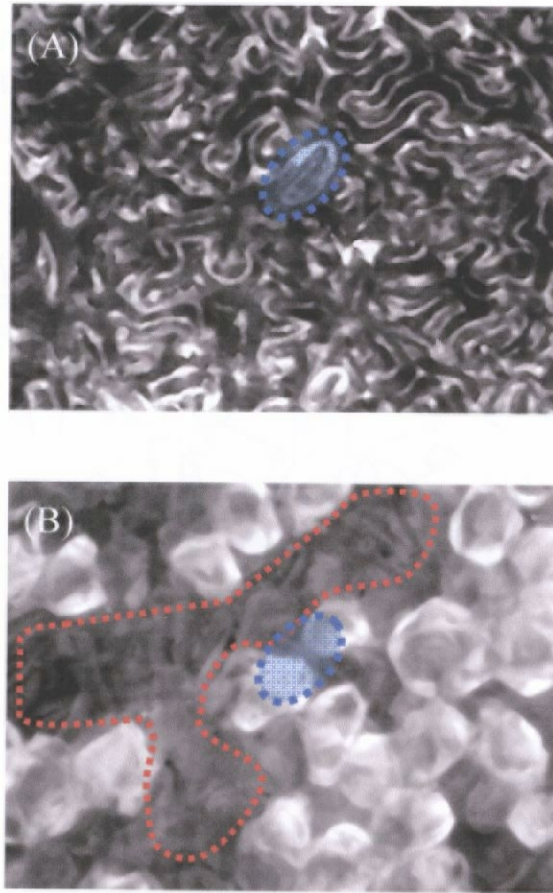


Fig. 5-12 Reflected light image (A) and fluorescence intensity image (B) of of mesophyll cells at the spongy tissue of a sunflower leaf after 300ppb ozone exposure for 12h. A blue area in (A) represents the location of stoma confirmed from reflected light image, and a blue area in (B) shows the same location as the blue area (A). The area framed by the red dotted line shows the area at which fluorescence intensity decreased strongly.

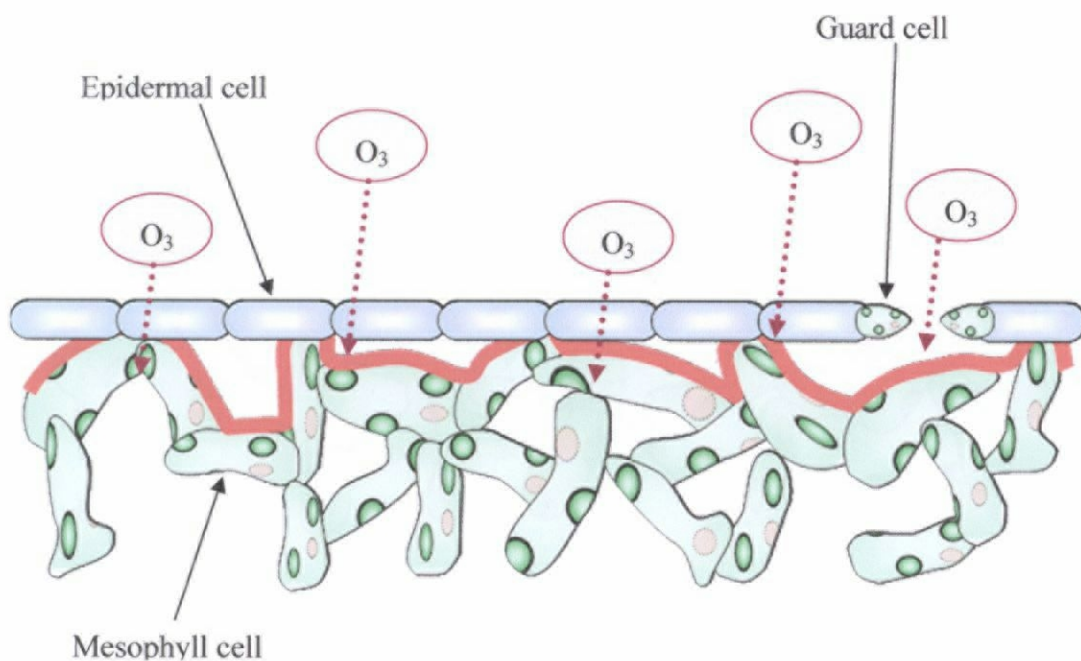


Fig. 5-13 Schematic drawing of penetration pathway (dashed arrows) of ozone which explains our results when ozone can penetrate to internal of a sunflower leaf through epidermis and cuticle. Red line shows the captured area can look by using the 3D chlorophyll fluorescence imaging system (Fig. 5-3, 6-4, 6-5), which captures only fluorescence emitted from chloroplasts of mesophyll cells at the spongy tissue.

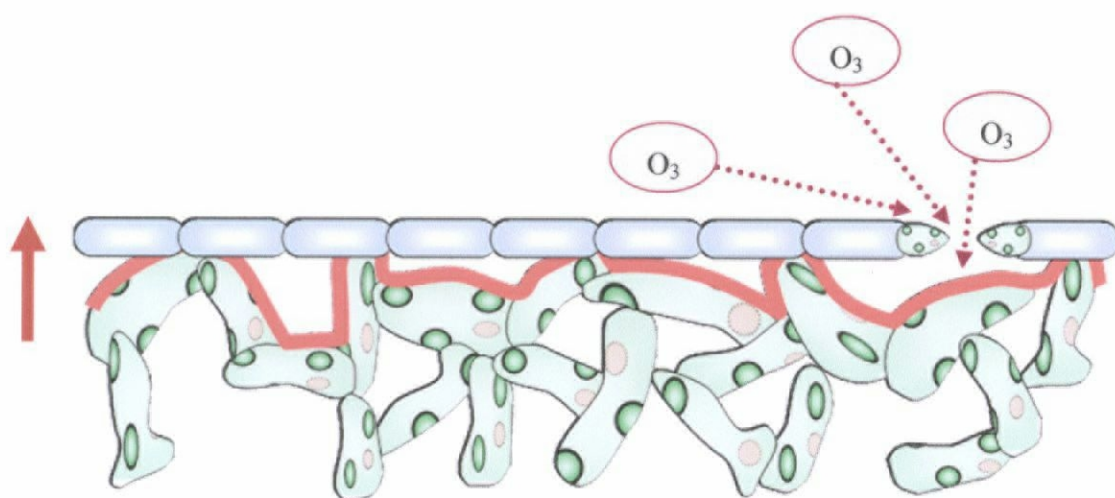


Fig. 5-14 Schematic drawing of penetration pathway (dashed arrows) of ozone which explains our results when ozone can only penetrate to internal of a sunflower leaf through stomata. Red arrow implies a gradient of ozone concentration in a sunflower leaf. Red line shows the captured area can look by using the 3D chlorophyll fluorescence imaging system (Fig. 5-3, 6-4, 6-5), which captures only fluorescence emitted from chloroplasts of mesophyll cells at the spongy tissue.

5.5 本章のまとめ

前章で開発した 3D クロロフィル蛍光顕微画像計測システムを用いて、中濃度オゾン曝露がヒマワリ葉海綿状組織の光合成気能に与える影響の解析を行った。この結果、オゾン曝露前後でクロロフィル蛍光強度は変化したものの、 Φ_{PSII} はほとんど変化しなかった。この結果は、オゾンの攻撃部位が光合成電子伝達系にはないことを示唆していた。また、クロロフィル蛍光強度の低下と表皮からの距離には関係性が見られた一方で、気孔位置とクロロフィル蛍光強度分布には関係性が見られなかった。この結果は、オゾンが、気孔だけではなくクチクラ及び表皮を介した侵入経路も有していることを示唆していた。

6. 総括

6.1 本研究の要約

本研究では、微小領域の立体構造を把握しながら光合成機能の不均一性を可視化できるクロロフィル蛍光顕微画像計測システムを開発し、ストレス下にある微小藻類、及び高等植物の光合成機能障害について、蛍光パラメータを用いて解析を行うことを目的とした。

まず、微小領域における Φ_{PSII} (光合成電子伝達収率と高い相関を持つ蛍光パラメータ)が算出可能な、クロロフィル蛍光顕微画像計測システムを製作した。そして、本システムを用いて、代表的な土壌処理系除草剤の主成分 DCMU が、生育ステージの異なる微小藻類 *Spirogyra distenta* L の光合成機能に与える影響について、飽和パルス法によるクロロフィル蛍光顕微画像計測を行った。飽和パルス法では、明期中に光合成電子伝達を一時的に飽和させる強度のパルス光を照射し、明期定常状態の蛍光収率画像と飽和パルス光照射時の蛍光収率画像を取得する。この二つの蛍光収率から、光合成電子伝達収率と高い関連を示す Φ_{PSII} を算出することができる。DCMU の滴下によって、*Spirogyra distenta* の Φ_{PSII} は低下した。また、 Φ_{PSII} の低下は、生育ステージの若い *Spirogyra distenta* 程顕著であった。これらの結果から、同一濃度の DCMU であっても、生育ステージが若い *Spirogyra distenta* 程深刻な光合成障害が現れる可能性があることがわかった。*Spirogyra distenta* は、春・秋に大きな増殖期を持つなど、季節的な周期を持つ生活環を有している。本結果から、*Spirogyra distenta* に対する農薬害は、季節により異なる可能性があることが示唆された。

次に、組織の構造が発達した高等植物の解析を行うため、3D 画像計測手法をクロロフィル蛍光顕微画像計測システムに導入した。はじめに、同一間隔で複数の焦点面画像を取得した。次に、ピクセル毎の焦点測度を算出して、合焦距離を求めた。この際、各ピクセルにおける最適なマスクサイズが自動的に選択されるよう、従来の焦点測度フィルタを改良した。焦点測度は合焦地点において最大値を取る。また、高さが変化したときの焦点測度グラフは正規曲線をとることが報告されている。そこで、焦点測度の最大値をとる焦点面と、その前後の焦点面の 3 つから正規分布を近似し、その頂点に相当する値をもって合焦地点とした。この処理によって取得する焦点面画像の枚数を大幅に削減し、計測中にサンプルが移動してしまう従来の間

題点を解決することができた。このようにして、ムラサキツユクサ葉の海綿状組織における葉肉細胞を対象に、合焦地点の z 座標から 3D 画像を、またピクセル値から合焦蛍光画像を求めた。さらに、これらを統合して 3D クロロフィル蛍光顕微画像を算出した。

さらに、本システムに飽和パルス法を適用し、中濃度オゾン曝露して可視害が確認されたヒマワリ葉海綿状組織の葉肉細胞に対して、3D クロロフィル蛍光顕微画像計測を行った。そして、取得した焦点面クロロフィル蛍光画像から、合焦蛍光画像と 3D 画像を算出した。さらに、明期定常状態の合焦蛍光画像と飽和パルス光照射時の合焦蛍光画像から合焦 Φ_{PSII} 画像を算出した。これらを用いて、蛍光強度、及び Φ_{PSII} と高さの関係について、ピクセル毎に解析した。オゾン曝露前のヒマワリ葉は、顕微鏡視野内にわたって、ほぼ均一な蛍光強度分布を示した。一方、オゾン曝露後のヒマワリ葉では不均一な蛍光強度の分布が見られた。また、表皮に近い領域ほど蛍光強度は顕著に低下した。可視画像との比較により、蛍光強度分布と気孔の位置には関係がみられなかった。これより、従来気孔のみとされてきたオゾンの侵入経路が、ヒマワリ葉においては、クチクラで覆われた表皮にも存在する可能性が示唆された。次に、 Φ_{PSII} の分布、及び高さとの関係を調べた。オゾン曝露後の蛍光画像が不均一な強度分布を示した一方で、 Φ_{PSII} はオゾン前後で顕著な変化は見られず、顕微鏡視野全体にわたってほぼ均一な値で分布していた。この結果から、オゾン曝露によって蛍光強度の低下した、表皮に近い海綿状組織においても、オゾン曝露前とほぼ同様の電子伝達収率が維持されていることがわかった。このことは、オゾン曝露によって生じる光合成障害が、必ずしも光合成電子伝達収率の低下によってもたらされているわけではないことを示唆していた。

本研究をまとめると、(1)クロロフィル蛍光顕微画像計測システムを製作し、生育ステージの異なる微小藻類に対して、DCMU による光合成機能障害の解析を行った、(2)高倍率での 3D-クロロフィル蛍光顕微画像計測システムを開発し、ムラサキツユクサ葉の海綿状組織における葉肉細胞を対象として 3D-クロロフィル蛍光顕微画像の検証を行った、(3)オゾン曝露後のヒマワリ葉の海綿状組織に対して、飽和パルス法による 3D-クロロフィル蛍光顕微画像計測を行った。そして、蛍光強度、及び Φ_{PSII}

と高さの関係を微小領域毎に解析し、表皮近傍の葉肉細胞ほどオゾンによる障害が顕著であるという現象を新たに見出した。

6.2 今後の課題

本研究では、ストレス前後の比較のみを行ったが、ストレスによる植物の光合成反応は経時的な変化をたどる可能性がある。顕微鏡システムでは、長時間の観察での対象の移動が不可避であるため、サンプルの観察領域の確保が、本システムを用いて経時変化の計測を行う際の課題であるといえる。現在、予備実験により、平面方向の移動に対しては、取得画像の平行移動、及びアフィン変換による位置合わせである程度の対応が可能であるが、Z 軸方向の回転を含む移動に対しては理論上対応が不可能である。これに関しては、供試作物を工夫することにより改善が可能である。例えば、シダ植物の一種アジアタムでは、葉内における葉肉細胞が一層しかなく、その層が大変薄いため葉緑体の回転運動がほとんど観察されない。水生の高等植物の一種オオカナダモも類似の構造をしている。これらは、葉緑体移動の研究材料として頻繁に用いられているものの、葉緑体移動とクロロフィル蛍光について、同時画像解析を行った報告はない。

微小藻類のような水生植物の経時変化観察にあたっては、プレパラート内の水分蒸発も大きな問題である。これに関しては、倒立顕微鏡を用いることによって解決することができる。倒立顕微鏡は試料の底面から画像を取得するため、底面がカバーガラスの倒立顕微鏡シャーレに十分な培養液を満たすことで、水分の蒸発を回避できる。本研究における微小藻類の生育ステージの比較では、分裂中の藻類に対する解析が行えなかった。倒立顕微鏡をシステムに組み込むことによって、分裂前後の藻類におけるクロロフィル蛍光をモニタリングすることができると考えられる。分裂前後は細胞壁、及び細胞膜の構造が一時的に脆弱になることが知られており、除草剤への影響も成熟期の藻類とは異なる様相を見せると考えられる。

飽和パルス法による 3D 画像構築では、正規分布を近似することによって大幅な時間の短縮が可能になった。しかし、飽和パルス光照射後のインターバルは Rolfe and Scholes の報告と同時間のままであった。飽和パルス光は植物の電子伝達反応を一時的に飽和させるための光であるが、照射するパルスの長さが短くなれば、植物の電子伝達が正常に戻る時間(インターバル)も短くなると期待される。これはカメラの感度

に依存するが、飽和パルス光の照射時間の調節によって 3D 画像取得時間の更なる短縮が可能であると考えられる。

オゾン曝露実験においては、中濃度オゾンを 12 時間曝露した実験を行い、高さ方向に依存して葉肉細胞の蛍光強度が異なる現象を見出すことができた。この現象に関して二つの仮説を提唱したが、この検証実験を行う必要があると考えられる。本システムを用いた実験としては、気孔コンダクタンスが最大になるよう湿度を制御したインキュベータ内でオゾンを曝露した試験区 A と、逆に気孔コンダクタンスが最小になるよう湿度を制御してオゾンを曝露した試験区 B とを比較する実験が考えられる。試験区 A と試験区 B の比較から気孔依存性のオゾンの侵入が、また試験区 A の結果から非気孔依存性のオゾンの侵入が解析できると期待される。さらに、気孔コンダクタンスを最小にしてできる限り気孔を閉鎖した上で、同一個体の成熟葉と若い葉について蛍光画像計測を行う。仮にクチクラを介したオゾンの侵入経路が存在すれば、クチクラ構造の発達が未熟な若い葉の方がよりオゾン曝露に敏感であると考えられる。しかし、葉齢の異なる葉では光合成反応も異なる可能性があるため、予備実験により比較可能な葉を慎重に見定める必要がある。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、生物・環境工学専攻生物環境情報工学研究室の大政謙次教授には指導教官及び本論文の主査として多大なご指導を仰いだ。また、副査として、生物環境工学研究室の蔵田憲次教授、生物プロセス工学の大下誠一教授、生物機械工学研究室の芋生憲司助教授、生物環境工学研究室の富士原和宏助教授には適切なお指摘を多々いただいた。また、私が所属する生物・環境工学専攻生物環境情報工学研究室の沖一雄講師、清水庸助手には研究を進めるにあたり数多くの適切なお助言を頂戴した。さらに、千葉大学園芸学部の後藤英司助教授には本論文作成にあたり、有形無形の親身なお助言をいただいた。この場を借りて厚く御礼申し上げる。

また、愛媛大学農学部の高山弘太郎助手とは5年間室を同じくし、同世代の先輩として非常に多くの指針を示していただいた。高山助手なしには決して本研究をまとめることはできなかった。生物環境情報工学研究室の諸子には数々のご協力を頂いた。博士課程1年の小西充洋君は、クロロフィル蛍光画像計測に関する様々な議論を重ね、考察を深めることができた。深く感謝の意を表す。

多くの方々に、ご支援ご教示を頂き、すべての方々のお名前を挙げてお礼を申し上げます。上げられないのは残念であるが、この場を借りて深甚の謝意を表す。

引用文献

- Ashmore MR, Bell JNB. The role of ozone in global change. *ANNALS OF BOTANY*. 67:39-48, 1991
- Baker NR, Oxborough K, Lawson T, Morison JIL: High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cells and chloroplasts in leaves. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 52:615-621, 2001
- Baker NR, Rosenqvist E: Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 55:1607-1621, 2004
- Balachandran S, Osmond CB, Daley PF: Diagnosis of the earliest strain-specific interactions between tobacco mosaic-virus and chloroplasts of tobacco-leaves in-vivo by means of chlorophyll fluorescence imaging. *PLANT PHYSIOLOGY* 104:1059-1065, 1994
- Barbagallo RP, Oxborough K, Pallett KE, Baker NR: Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *PLANT PHYSIOLOGY* 132:485-493, 2003
- Bartak M, Hajek J, Gloser J: Heterogeneity of chlorophyll fluorescence over thalli of several foliose macrolichens exposed to adverse environmental factors: Interspecific differences as related to thallus hydration and high irradiance. *PHOTOSYNTHETICA* 38:531-537, 2000
- Bartak M, Hajek J, Vrablikova H, Dubova J: High-light stress and photoprotection in *Umbilicaria antarctica* monitored by chlorophyll fluorescence Imaging and changes in zeaxanthin and glutathione. *PLANT BIOLOGY* 6:333-341, 2004
- Bilger W, Bjorkman O: Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbency changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *hedera-canariensis*. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 25:173-185, 1990
- Bolharnordenkampe HR, Long SP, Baker NR, Oquist G, Schreiber U, Lechner EG: Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field - a review of current instrumentation. *FUNCTIONAL ECOLOGY* 3:497-514, 1989

- Bowyer WJ, Ning L, Daley LS, Strobel GA, Edwards GE, Callis JB: In vivo fluorescence imaging for detection of damage to leaves by fungal phytotoxins. *SPECTROSCOPY* 13:36-+, 1998
- Bro E, Meyer S, Genty B: Heterogeneity of leaf CO₂ assimilation during photosynthetic induction. *PLANT CELL AND ENVIRONMENT* 19:1349-1358, 1996
- Buschmann C, Lichtenthaler HK: Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. *JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY* 152:297-314, 1998
- Buschmann C, Langsdorf G, Lichtenthaler HK: Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. *PHOTOSYNTHETICA* 38:483-491, 2000
- Campbell D, Hurry V, Clarke AK, Gustafsson P, Oquist G: Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* 62:667-+, 1998
- Carpenter SR, Caraco NF, Correll DL, Howarth RW, Sharpley AN, Smith VH: Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *ECOLOGICAL APPLICATIONS* 8:559-568, 1998
- Cerovic ZG, Samson G, Morales F, Tremblay N, Moya I: Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *AGRONOMIE* 19:543-578, 1999
- Chaerle L, Van der Straeten D: Imaging techniques and the early detection of plant stress. *TRENDS IN PLANT SCIENCE* 5:495-501, 2000
- Chaerle L, Van der Straeten D: Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-GENE STRUCTURE AND EXPRESSION* 1519:153-166, 2001
- Chaerle L, Hulsen K, Hermans C, Strasser RJ, Valcke R, Hofte M, Van der Straeten D: Robotized time-lapse imaging to assess in-planta uptake of phenylurea herbicides and their microbial degradation. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 118:613-619, 2003
- Chaerle L, Hagenbeek D, De Bruyne E, Valcke R, Van der Straeten D: Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant-pathogen interactions at an early stage. *PLANT AND CELL PHYSIOLOGY* 45:887-896, 2004

- Christopher SV, Bird KT: The effects of herbicides on development of myriophyllum-spicatum l cultured invitro. *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL QUALITY* 21:203-207, 1992
- Conrad R, Buchel C, Wilhelm C, Arsalane W, Berkaloﬀ C, Duval JC: Changes in yield in in-vivo fluorescence of chlorophyll a as a tool for selective herbicide monitoring. *JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY* 5:505-516, 1993
- Cornic G, Briantais JM: Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ and O₂ reduction in a C₃ leaf (phaseolus-vulgaris l) at different CO₂ concentrations and during drought stress. *PLANTA* 183:178-184, 1991
- Daley PF, Raschke K, Ball JT, Berry JA: Topography of photosynthetic activity of leaves obtained from video images of chlorophyll fluorescence. *PLANT PHYSIOLOGY* 90:1233-1238, 1989
- Daley PF: Chlorophyll fluorescence analysis and imaging in plant stress and disease. *CANADIAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY-REVUE CANADIENNE DE PHYTOPATHOLOGIE* 17:167-173, 1995
- Demmigadams B, Adams WW: Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY AND PLANT MOLECULAR BIOLOGY* 43:599-626, 1992
- Edwards GE, Baker NR: Can CO₂ assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 37:89-102, 1993
- 遠藤 良輔, 大政 謙次, 近藤 次郎: 微小藻類の in situ クロロフィル蛍光顕微画像計測. *Eco-engineering* 14:17-22, 2002
- Endo R, Omasa K: Chlorophyll fluorescence imaging of individual algal cells: Effects of herbicide on Spirogyra distenta at different growth stages. *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY* 38:4165-4168, 2004
- Fenton JM, Crofts AR: Computer-aided fluorescence imaging of photosynthetic systems - application of video imaging to the study of fluorescence induction in green plants and photosynthetic bacteria. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 26:59-66, 1990
- Fryer MJ, Oxborough K, Mullineaux PM, Baker NR: Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 53:1249-1254, 2002

- Fryer MJ, Ball L, Oxborough K, Karpinski S, Mullineaux PM, Baker NR: Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of Arabidopsis leaves. *PLANT JOURNAL* 33:691-705, 2003
- Genty B, Meyer S: Quantitative mapping of leaf photosynthesis using chlorophyll fluorescence imaging. *AUSTRALIAN JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY* 22:277-284, 1995
- Goh CH, Hedrich R, Nam HG: Evidence for the functional organization of chloroplasts in adaxial guard cells of *Vicia faba* leaves by single cell analysis. *PLANT SCIENCE* 162:965-972, 2002
- Govindjee: 63 years since Kautsky - chlorophyll-a fluorescence. *AUSTRALIAN JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY* 22:131-160, 1995
- Gray GR, Hope BJ, Qin XQ, Taylor BG, Whitehead CL: The characterization of photoinhibition and recovery during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* using chlorophyll fluorescence imaging. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 119:365-375, 2003
- Grunwald B, Kuhl M: A system for imaging variable chlorophyll fluorescence of aquatic phototrophs. *OPHELIA* 58:79-89, 2004
- Gunning BES, Schwartz OM: Confocal microscopy of thylakoid autofluorescence in relation to origin of grana and phylogeny in the green algae. *AUSTRALIAN JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY* 26:695-708, 1999
- Hader DP, Figueroa FL: Photoecophysiology of marine macroalgae. *PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY* 66:1-14, 1997
- Hader DP, Kumar HD, Smith RC, Worrest RC: Effects on aquatic ecosystems. *JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY* 46:53-68, 1998
- Haynes D, Ralph P, Prange J, Dennison B: The impact of the herbicide diuron on photosynthesis in three species of tropical seagrass. *MARINE POLLUTION BULLETIN* 41:288-293, 2000
- Heisel F, Sowinska M, Miehe JA, Lang M, Lichtenthaler HK: Detection of nutrient deficiencies of maize by laser induced fluorescence imaging. *JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY* 148:622-631, 1996
- Hulsen K, Top EM, Hofte M: Biodegradation of linuron in a *Phaseolus* bioassay detected by chlorophyll fluorescence. *NEW PHYTOLOGIST* 154:821-829, 2002

- Jensen M, Siebke K: Fluorescence imaging of lichens in the macro scale. *SYMBIOSIS* 23:183-195, 1997
- Jochem FJ: Probing the physiological state of phytoplankton at the single-cell level. *SCIENTIA MARINA* 64:183-195, 2000
- Jones, H.G. Use of thermography for quantitative studies of spatial and temporal variation of stomatal conductance over leaf surfaces. *PLANT CELL ENVIRONMENT*. 22: 1043–1055, 1999
- Jones, H.G. and Leinonen, I. Thermal imaging for the study of plant water relations. *J. AGRIC. METEOROL.* 59(3): 205–217, 2003
- Kim MS, McMurtrey JE, Mulchi CL, Daughtry CST, Chappelle EW, Chen YR: Steady-state multispectral fluorescence imaging system for plant leaves. *APPLIED OPTICS* 40:157-166, 2001
- Kitin P, Sano Y, Funada R: Three-dimensional imaging and analysis of differentiating secondary xylem by confocal microscopy.. *IAWA JOURNAL* 24:211-222, 2003
- Krause GH, Weis E: Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology .2. interpretation of fluorescence signals. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 5:139-157, 1984
- Krause GH, Weis E: Chlorophyll fluorescence and photosynthesis - the basics. *ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY AND PLANT MOLECULAR BIOLOGY* 42:313-349, 1991
- Krizek DT, Middleton EM, Sandhu RK, Kim MS: Evaluating UV-B effects and EDU protection in cucumber leaves using fluorescence images and fluorescence emission spectra. *JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY* 158:41-53, 2001
- Kruse O, Nixon PJ, Schmid GH, Mullineaux CW: Isolation of state transition mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* by fluorescence video imaging. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 61:43-51, 1999
- Kupper H, Setlik I, Trtilek M, Nedbal L: A microscope for two-dimensional measurements of in vivo chlorophyll fluorescence kinetics using pulsed measuring radiation, continuous actinic radiation, and saturating flashes. *PHOTOSYNTHETICA* 38:553-570, 2000

- Kupper H, Ferimazova N, Setlik I, Berman-Frank I: Traffic lights in *Trichodesmium*. Regulation of photosynthesis for nitrogen fixation studied by chlorophyll fluorescence kinetic microscopy. *PLANT PHYSIOLOGY* 135:2120-2133, 2004
- Lang M, Lichtenthaler HK, Sowinska M, Heisel F, Miehe JA: Fluorescence imaging of water and temperature stress in plant leaves. *JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY* 148:613-621, 1996
- Langsdorf G, Buschmann C, Sowinska M, Babani F, Mokry M, Timmermann F, Lichtenthaler HK: Multicolour fluorescence imaging of sugar beet leaves with different nitrogen status by flash lamp UV-excitation. *PHOTOSYNTHETICA* 38:539-551, 2000
- Lawson T, Oxborough K, Morison JIL, Baker NR: Responses of photosynthetic electron transport in stomatal guard cells and mesophyll cells in intact leaves to light, CO₂, and humidity. *PLANT PHYSIOLOGY* 128:52-62, 2002
- Lawson T, Oxborough K, Morison JIL, Baker NR: The responses of guard and mesophyll cell photosynthesis to CO₂, O₂, light, and water stress in a range of species are similar. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 54:1743-1752, 2003
- Lazar D: Chlorophyll a fluorescence induction. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOENERGETICS* 1412:1-28, 1999
- Leipner J, Oxborough K, Baker NR: Primary sites of ozone-induced perturbations of photosynthesis in leaves: identification and characterization in *Phaseolus vulgaris* using high resolution chlorophyll fluorescence imaging. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 52:1689-1696, 2001
- Lichtenthaler HK: Chlorophylls and carotenoids - pigments of photosynthetic biomembranes. *METHODS IN ENZYMOLOGY* 148:350-382, 1987
- Lichtenthaler HK, Rinderle U: The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC CRITICAL REVIEWS IN ANALYTICAL CHEMISTRY* 19:S29-S85, 1988
- Lichtenthaler HK, Lang M, Sowinska M, Heisel F, Miehe JA: Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY* 148:599-612, 1996
- Lichtenthaler HK: Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. *JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY* 148:4-14, 1996

- Lichtenthaler HK, Miehe JA: Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *TRENDS IN PLANT SCIENCE* 2:316-320, 1997
- Lichtenthaler HK, Lang M, Sowinska M, Summ P, Heisel F, Miehe JA: Uptake of the herbicide diuron as visualised by the fluorescence imaging technique. *BOTANICA ACTA* 110:158-163, 1997
- Lichtenthaler HK, Babani F: Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. *PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY* 38:889-895, 2000
- Lichtenthaler HK, Babani F, Langsdorf G, Buschmann C: Measurement of differences in red chlorophyll fluorescence and photosynthetic activity between sun and shade leaves by fluorescence imaging. *PHOTOSYNTHETICA* 38:521-529, 2000
- Lichtenthaler HK: Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. *BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS* 28:785-789, 2000
- Lohaus G, Heldt HW, Osmond CB: Infection with phloem limited Abutilon mosaic virus causes localized carbohydrate accumulation in leaves of Abutilon striatum: Relationships to symptom development and effects on chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction. *PLANT BIOLOGY* 2:161-167, 2000
- Long SP, Humphries S, Falkowski PG: Photoinhibition of photosynthesis in nature. *ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY AND PLANT MOLECULAR BIOLOGY* 45:633-662, 1994
- Long SP, Bernacchi CJ: Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 54:2393-2401, 2003
- Lu CM, Chau CW, Zhang JH: Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium, *S-platensis* - assessment by chlorophyll fluorescence analysis. *CHEMOSPHERE* 41:191-196, 2000
- Maddess T, Rascher U, Siebke K, Lüttge U, Osmond B: Definition and evaluation of the spatio-temporal variations in chlorophyll fluorescence during the phases of CAM and during endogenous rhythms in continuous light, in thick leaves of *Kalanchoe daigremontiana*. *PLANT BIOLOGY* 4:446-455, 2002

- Matyssek R, Gunthardtgoerg MS, Maurer S, Keller T. Nighttime exposure to ozone reduces whole-plant production. IN *BETULA-PENDULA. TREE PHYSIOLOGY*. 15:159-165, 1995
- Maxwell K, Johnson GN: Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 51:659-668, 2000
- Meng QW, Siebke K, Lippert P, Baur B, Mukherjee U, Weis E: Sink-source transition in tobacco leaves visualized using chlorophyll fluorescence imaging. *NEW PHYTOLOGIST* 151:585-595, 2001
- Meyer S, Genty B: Mapping intercellular CO₂ mole fraction (C_i) in *Rosa rubiginosa* leaves fed with abscisic acid by using chlorophyll fluorescence imaging - Significance of C_i estimated from leaf gas exchange. *PLANT PHYSIOLOGY* 116:947-957, 1998
- Meyer S, Genty B: Heterogeneous inhibition of photosynthesis over the leaf surface of *Rosa rubiginosa* L. during water stress and abscisic acid treatment: induction of a metabolic component by limitation of CO₂ diffusion. *PLANTA* 210:126-131, 1999
- Meyer S, Saccardy-Adji K, Rizza F, Genty B: Inhibition of photosynthesis by *Colletotrichum lindemuthianum* in bean leaves determined by chlorophyll fluorescence imaging. *PLANT CELL AND ENVIRONMENT* 24:947-955, 2001
- Meyer S, Cartelat A, Moya I, Cerovic ZG: UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 54:757-769, 2003
- Mott KA, Cardon ZG, Berry JA: Asymmetric patchy stomatal closure for the 2 surfaces of *xanthium-strumarium* l leaves at low humidity. *PLANT CELL AND ENVIRONMENT* 16:25-34, 1993
- Mott KA, Buckley TN: Stomatal heterogeneity. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 49:407-417, 1998
- Mott KA, Buckley TN: Patchy stomatal conductance: emergent collective behaviour of stomata. *TRENDS IN PLANT SCIENCE* 5:258-262, 2000
- Myers, VI: Remote sensing applications in agriculture. In *Manual of Remote Sensing*. 2nd Ed. Vol.II. Edited by Colwell, R.N. pp.111-2228, 1983

- Myers DA, Vogelmann TC, Bornman JF: Epidermal focusing and effects on light utilization in oxalis-acetosella. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 91:651-656, 1994
- Nayar SK, Nakagawa Y: Shape from focus. *IEEE TRANSACTIONS ON PATTERN ANALYSIS AND MACHINE INTELLIGENCE* 16:824-831, 1994
- Nedbal L, Soukupova J, Kaftan D, Whitmarsh J, Trtilek M: Kinetic imaging of chlorophyll fluorescence using modulated light. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 66:3-12, 2000
- Nedbal L, Soukupova J, Whitmarsh J, Trtilek M: Postharvest imaging of chlorophyll fluorescence from lemons can be used to predict fruit quality. *PHOTOSYNTHETICA* 38:571-579, 2000
- Niyogi KK, Bjorkman O, Grossman AR: Chlamydomonas xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching. *PLANT CELL* 9:1369-1380, 1997
- Niyogi KK: Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY AND PLANT MOLECULAR BIOLOGY* 50:333-359, 1999
- 大政謙次, 近藤矩朗, 井上頼直. 植物の計測と診断. pp. 1-239. 1988. 朝倉書店.
- Omasa, K. Image instrumentation methods of plant analysis. In *Physical Methods in Plant Sciences*. Edited by Linskens, H.F. and Jackson, J.F. pp. 203-243. 1990. Springer-Verlag, Berlin.
- Omasa K, Shimazaki KI, Aiga I, Larcher W, Onoe M: Image-analysis of chlorophyll fluorescence transients for diagnosing the photosynthetic system of attached leaves. *PLANT PHYSIOLOGY* 84:748-752, 1987
- Omasa K, Endo R, Tobe K, Kondo T: Gas diffusion model analysis of foliar absorption of organic and inorganic air pollutants. *PHYTON-ANNALES REI BOTANICAE* 42:135-148, 2002
- Omasa K, Takayama K: Simultaneous measurement of stomatal conductance, non-photochemical quenching, and photochemical yield of photosystem II in intact leaves by thermal and chlorophyll fluorescence imaging. *PLANT AND CELL PHYSIOLOGY* 44:1290-1300, 2003
- 大政 謙次, 丸山 幸夫: 非破壊顕微画像計測法による根の吸水機能変化に対する気孔とその周辺細胞の反応の検討. *農業気象* 45:259-264, 1990

- 大政 謙次: ニンジンの培養組織のクロロフィル蛍光動画画像解析. *生物環境調節* 30:127-131, 1992
- 大政 謙次, 国府田 正樹, 大谷 義彦: Shape-from-Focus法による実生の3次元顕微計測. *計測自動制御学会論文集* 33:752-758, 1997
- 大政 謙次, 国府田 正樹: 3-D color video microscopy of intact plants: A new method for measuring shape and growth. *生物環境調節* 36:217-226, 1998
- 大政 謙次, 高山 弘太郎, 後藤 英司: 除草剤による植物の光合成機能障害の画像診断——クロロフィル α 蛍光解析におけるインダクション法と飽和パルス法の比較. *植物工場学会誌* 13:29-37, 2001
- 大政 謙次: 総説・解説 プレシジョン・アグリカルチャーのための画像センシング. *農業情報研究* 11:213-229, 2002
- Osmond CB, Daley PF, Badger MR, Luttge U: Chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of *Abutilon striatum* Dicks. Infected with *Abutilon mosaic virus*, observed with a field-portable imaging system. *BOTANICA ACTA* 111:390-397, 1998
- Osmond CB, Kramer D, Luttge U: Reversible, water stress-induced non-uniform chlorophyll fluorescence quenching in wilting leaves of *Potentilla reptans* may not be due to patchy stomatal responses. *PLANT BIOLOGY* 1:618-624, 1999
- Oxborough K, Baker NR: An instrument capable of imaging chlorophyll alpha fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at cellular and subcellular levels of organization. *PLANT CELL AND ENVIRONMENT* 20:1473-1483, 1997
- Oxborough K, Baker NR: An evaluation of the potential triggers of photoinactivation of photosystem II in the context of a Stern-Volmer model for downregulation and the reversible radical pair equilibrium model. *B-BIOLOGICAL SCIENCES* 355:1489-1498, 2000
- Oxborough K, Hanlon ARM, Underwood GJC, Baker NR: In vivo estimation of the photosystem II photochemical efficiency of individual microphytobenthic cells using high-resolution imaging of chlorophyll a fluorescence. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY* 45:1420-1425, 2000
- Oxborough K: Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 55:1195-1205, 2004

- Perkins RG, Oxborough K, Hanlon ARM, Underwood GJC, Baker NR: Can chlorophyll fluorescence be used to estimate the rate of photosynthetic electron transport within microphytobenthic biofilms?. *MARINE ECOLOGY-PROGRESS SERIES* 228:47-56, 2002
- Plieth C, Tabrizi H, Hansen UP: Relationship between banding and photosynthetic activity in chara-corallina as studied by the spatially different induction curves of chlorophyll fluorescence observed by an image-analysis system. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 91:205-211, 1994
- Quick WP, Horton P: Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in barley protoplasts .2. resolution of fluorescence quenching by redox state and the transthylakoid pH gradient. *PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON SERIES B-BIOLOGICAL SCIENCES* 220:371-382, 1984
- Rolfe SA, Scholes JD: Quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *NEW PHYTOLOGIST* 131:69-79, 1995
- Rolfe SA, Scholes JD: Extended depth-of-focus imaging of chlorophyll fluorescence from intact leaves. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 72:107-115, 2002
- Saito Y, Hatake K, Nomura E, Kawahara TD, Nomura A, Sugimoto N, Itabe T: Range-resolved image detection of laser-induced fluorescence of natural trees for vegetation distribution monitoring. *REVIEW PAPERS* 36:7024-7027, 1997
- Sandermann H. Ozone and plant health. *ANNUAL REVIEW OF PHYTOPATHOLOGY*. 34:347-366, 1996
- Sayed OH: Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *PHOTOSYNTHETICA* 41:321-330, 2003
- Scholes JD, Rolfe SA: Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): Quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *PLANTA* 199:573-582, 1996
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W: Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 10:51-62, 1986
- Schreiber U: Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 9:261-272, 1986

- Schreiber U, Neubauer C: O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 25:279-293, 1990
- Schreiber U, Reising H, Neubauer C: Contrasting ph-optima of light-driven o₂-reduction and h₂o₂-reduction in spinach-chloroplasts as measured via chlorophyll fluorescence quenching. *ZEITSCHRIFT FUR NATURFORSCHUNG C-A JOURNAL OF BIOSCIENCES* 46:635-643, 1991
- Schreiber U, Hormann H, Neubauer C, Klughammer C: Assessment of photosystem-ii photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis. *AUSTRALIAN JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY* 22:209-220, 1995
- Schreiber U, Muller JF, Haugg A, Gademann R: New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 74:317-330, 2002
- Schwender J, Gemunden C, Lichtenthaler HK: Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. *PLANTA* 212:416-423, 2001
- Seguin F, Le Bihan F, Leboulanger C, Berard A: A risk assessment of pollution: induction of atrazine tolerance in phytoplankton communities in freshwater outdoor mesocosms, using chlorophyll fluorescence as an endpoint. *WATER RESEARCH* 36:3227-3236, 2002
- Shikanai T, Munekage Y, Shimizu K, Endo T, Hashimoto T: Identification and characterization of Arabidopsis mutants with reduced quenching of chlorophyll fluorescence. *PLANT AND CELL PHYSIOLOGY* 40:1134-1142, 1999
- Siebke K, Weis E: Assimilation images of leaves of glechoma-hederacea - analysis of nonsynchronous stomata related oscillations. *PLANTA* 196:155-165, 1995
- Siebke K, Weis E: Imaging of chlorophyll-a-fluorescence in leaves: Topography of photosynthetic oscillations in leaves of Glechoma hederacea. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 45:225-237, 1995
- Soukupova J, Smatanova S, Nedbal L, Jegorov A: Plant response to destruxins visualized by imaging of chlorophyll fluorescence. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 118:399-405, 2003

- Takahashi K, Mineuchi K, Nakamura T, Koizumi M, Kano H: A system for imaging transverse-distribution of scattered-light and chlorophyll fluorescence in intact rice leaves. *PLANT CELL AND ENVIRONMENT* 17:105-110, 1994
- 高山 弘太郎, 大政 謙次: 除草剤による植物の光合成機能障害の画像診断——尿素系土壌処理剤が in situ のキュウリ葉に与える影響の解析. *植物工場学会誌* 13:247-253, 2001
- Terashima I: Anatomy of nonuniform leaf photosynthesis. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 31:195-212, 1992
- 戸部 和夫, 大政 謙次: Leaf age dependence of chlorophyll fluorescence parameters in water-stressed leaves of phaseolus vulgaris L.. *農業気象* 55:155-163, 1999
- Torrie J, Mayfield CI, Inniss WE: A microcomputer-based image-analysis system and applications to chlorophyll fluorescence studies. *JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS* 6:199-210, 1987
- vandeVen M, Schrijver B, Ciscato M, Valcke R, Ameloot M: Non-destructive chlorophyll fluorescence imaging of aging white cabbage.. *BIOPHYSICAL JOURNAL* 84:274A-274A, 2003
- Vandeven MJ, Holub O, Gohlke C, Govindjee, Valcke R, Ameloot M, Clegg RM: Fast, macroscopic chlorophyll fluorescence lifetime imaging of apple fruit skin. *BIOPHYSICAL JOURNAL* 82:502A-502A, 2002
- Vankooten O, Snel JFH: The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *PHOTOSYNTHESIS RESEARCH* 25:147-150, 1990
- Vogelmann TC, Bornman JF, Yates DJ: Focusing of light by leaf epidermal cells. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 98:43-56, 1996
- Weis E, Berry JA: Quantum efficiency of photosystem-ii in relation to energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA* 894:198-208, 1987
- Yanase D, Andoh A: Translocation of photosynthesis-inhibiting herbicides in wheat leaves measured by phytofluorography, the chlorophyll fluorescence imaging. *PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY* 44:60-67, 1992

Zarco-Tejada PJ, Miller JR, Mohammed GH, Noland TL, Sampson PH: Chlorophyll fluorescence effects on vegetation apparent reflectance: II. Laboratory and airborne canopy-level measurements with hyperspectral data. *REMOTE SENSING OF ENVIRONMENT* 74:596-608, 2000