

クロロフィル蛍光を用いた
屋内植栽樹のストレス判定に関する研究

佐川 美佳

目次

第1章 序論

1.1 研究の背景	2
1.1.1 屋内植栽の時代的背景と問題点	2
1.1.2 植物のストレス判定法	6
1.1.3 クロロフィル蛍光誘導期現象と蛍光スペクトル	7
1.2 既往の研究	9
1.3 研究の目的と論文の構成	12

第2章 長期弱光ストレスと水ストレス

2.1 はじめに	15
2.2 材料と方法	16
2.2.1 長期弱光ストレス	16
2.2.2 水ストレス	17
2.2.3 クロロフィル蛍光誘導期現象の測定	19
2.2.4 蛍光スペクトルの測定	21
2.3 第2次導関数法による誘導期現象の評価	22
2.4 結果	24
2.4.1 経日変化	24
2.4.2 第2次導関数法による弱光ストレスの影響の検知	24
2.3.3 蛍光スペクトルによる弱光ストレスの影響の検知	24
2.4.4 第2次導関数法による水ストレスの影響の検知	29
2.4.5 蛍光スペクトルによる水ストレスの影響の検知	29
2.4.6 ストレスの有無と評価指標の関係	29
2.5 考察	38
2.6 まとめ	39

第3章 極端な光強度の低下によるストレス	
3.1 はじめに	41
3.2 材料と方法	42
3.2.1 暗黒ストレス	42
3.2.2 クロロフィル蛍光誘導期現象の測定と解析	42
3.2.3 葉内糖含量の測定	43
3.3 結果	46
3.3.1 誘導期現象（第2次導関数法）の変化	46
3.3.2 葉内糖含量の変化	46
3.4 考察	54
3.4.1 誘導期現象（第2次導関数法）	54
3.4.2 葉内糖含量	54
3.4.3 誘導期現象（第2次導関数法）と葉内糖含量の関係	55
3.5 まとめ	57
第4章 季節変化のない環境	
4.1 はじめに	59
4.2 ポータブルな誘導期現象測定1号機（Dias I）の製作	60
4.2.1 製作の目的	60
4.2.2 システム構成	60
4.2.3 Dias I 製作のまとめ	61
4.3 ポータブルな誘導期現象測定2号機（Dias II）の製作	70
4.3.1 製作の目的	70
4.3.2 システム構成	70
4.3.3 Dias II 製作のまとめ	70
4.4 測定装置製作のまとめ	74
4.5 パラメータ MM 法による誘導期現象の評価	75
4.5.1 評価指標	75
4.5.2 計算手順	75
4.5.3 計算結果	76

4.6	実験	80
4.7	結果	83
4.7.1	年間の変化	83
4.7.2	光強度の違い	83
4.7.3	病害の検知	83
4.8	考察	89
4.8.1	季節変化の有無と光強度の影響	89
4.8.2	ストレス判定の限界	89
4.9	まとめ	90
第5章 パラメータ MM によるストレス判定		
5.1	はじめに	92
5.2	解析データ	93
5.3	結果および考察	94
5.3.1	パラメータ MM 法による解析	94
5.3.2	判定基準の設定	101
5.3.3	判定基準によるストレス判定	101
5.3.4	判定基準の妥当性	102
5.4	まとめ	104
第6章 結論		
6.1	本論文のまとめ	106
6.2	問題点と今後の展望	108

引用文献

謝辞

第 1 章 序論

1.1	研究の背景	2
1.1.1	屋内植栽の時代的背景と問題点	2
1.1.2	植物のストレス判定法	6
1.1.3	クロロフィル蛍光誘導期現象と蛍光スペクトル	7
1.2	既往の研究	9
1.3	研究の目的と論文の構成	12

第1章 序論

1.1 研究の背景

1.1.1 屋内植栽の時代的背景と問題点

庭園や街路樹による生活空間への積極的な植物の導入は、これまでも多くの事例がみられる (Gary, 1990)。このように植物を身近に置こうとする傾向は、植物が人の心理面に欠かせない存在であることを示している。

アトリウムに植栽しようとする試みも、身近に植物を置きたい人の気持ちの表れといえる。アトリウム (atrium) とは、元来はラテン語で、古代ローマの住宅における玄関部の広間、初期キリスト教時代のバジリカ式教会堂の前庭などを指し、総じて前室または前庭のことを指す。現代におけるアトリウムとは、ビルなどの大型建築物にある吹き抜けの空間のことをいうが、これも同様に前庭のような役割を果たしている。実際、アトリウムは、建物の入口や建物間をつなぐ緩衝空間として設けられることが多い (日本建築学会, 1994)。

日本では、1990年代初めの平成景気の頃に、大規模な建築物が数多く建てられた。外観デザインの凝った大型ビルは、一際目立つ存在であり、街のランドマークになり得る。これが自社のビルである場合は、ビルの存在そのものが会社の宣伝となる。テナントビルの場合は、テナントステータスの高いビルとして賃料を高く設定できる。ビルのオーナーにとって、大型ビルを建築するメリットはここにある。だが、地域によっては容積率*が規定されている。そのため、ビルの中に空洞の空間であるアトリウムを作らざるを得ない。しかし、このアトリウムをただの空隙にしては、ビルの価値を落としてしまうため、アトリウムの「空間演出」が必要になる。そこで考えられたのが、都会のオフィスという人工的、無機質な空間に、その対極である植物を配置し、ビルの中にあたかも自然を持ち込んだように演出する手法、グリーンアトリウムである。

グリーンアトリウムを創るためには、屋内植栽技術を確立しなければならない。大型建築物が多く建てられた時期に同調して、この技術の確立に建設、造園業界をはじめ多くの関心が高まった (藤井ら, 1994; Mpelkas, 1990; 仁科ら, 1995; Scrivens, 1985)。最も多い手法は、亜熱帯性の観葉植物による緑化であるが、ベンジャミンやカポックなどの観葉植物は、本物からイミテーションプラントまで、室内に持ち込まれた例が非常に多いため、デザインが画一的になりがちであった。そこで、より演出効果が高い植物として、日本の公園植栽によく使われる温帯性常緑樹による植栽が考えられた。屋外にある日常の植栽風景がビルの中にも続くようなイメー

ジを実現する手法である。

一方で、植物が人の心理面に与える影響については、様々な研究がなされている (Asaumi *et al.*, 1995; 近藤・鳥山, 1989; 三浦・飛岡, 1993; 仁科ら, 1995)。冒頭でも述べたように、人はこれまでも、生活の中に植物を置くことに尽力し、造園の技術を研究開発してきている。身の回りに植物を植えることで人々の心を癒すアメニティ空間を創造しようとする試みは、Table 1.1 に示すように 1990 年代に多くのグリーンアトリウムが建設されたことに表れている (荒尾, 1995; Ishikawa and Yamazaki, 1994; 森, 1992; 岡本ら, 1991; 立原ら, 1995; 高橋ら, 1994; 谷山ら, 1995; 山本・土井, 1993)。このような背景から、グリーンアトリウムは、ビルのオーナーとユーザーの両方に付加価値を与える方法だといえる。

現在、社会の関心は、屋内緑化から屋上をはじめとする建物周辺の緑化、いわゆるビル緑化へと移り変わってきている。その理由は、ヒートアイランド現象の低減を目指した国および地方自治体の施策によるビル緑化の義務化や助成金にある。義務づけられているビル緑化は、周辺の建築物と比べて建物の演出上の差別化が図りにくい。そのため、ビル緑化によるオーナーにとってのコストメリットはほとんどない。

大型建築物の建設は、平成景気の時期に限ったことではない。その数こそ減少しているが、好景気が終わり経済低迷といわれる現在でも、街の経済の起爆剤として建築される傾向がある。景気の様相から、大型建築物による経済効果への期待は、より切実になってきている。

屋内植栽は、建物の付加価値を高めるための空間演出法である。屋内に広がる緑化空間のもつ特殊性や非日常性が空間の演出効果につながる。温帯性常緑樹による植栽は、事例が少ないことから、より一層の効果が期待できる。植物のもつ人への心理的効果はもちろんのこと、施工費は都市環境でなくオーナー自身に還元されるため、オーナーにとってのコストメリットの高い手法だといえる。

※ 容積率

建築物の延べ面積の敷地面積に対する割合をいう。建築物の規模とその地域の道路等の公共施設の整備状況とのバランスを確保すること等を目的として、都市計画区域内においては、用途地域の種別および前面道路の幅員により、その最高限度が制限されている (建築基準法 52 条)。容積率は、地域ごとに自治体によって 50~1000%の間に定められている。

(参考 1) 東京都江藤区の臨海副都心の準工業地域の法定容積率は 300%

(参考 2) 新宿区の商業地域の法定容積率は 500%

Table 1.1 Major green-atriums in Japan.

No.	Building	Location	Completion year	Use	Indoor plants
1	DAIDO LIFE INSURANCE Co. LTD Esaka Building	Suita, Osaka	1972	Office, Store	Evergreen broadleaf tree and 75 others
2	YOSHIMOTO Building	Osaka, Osaka	1986	Hotel	Benjamin
3	MEGURO GAJOEN	Meguro, Tokyo	1991	Ceremony hall	Evergreen broadleaf tree, bamboo and others
4	HIGASHITOTSUKA Education Center Annex	Yokohama, Kanagawa	1992	Training institute	Evergreen broadleaf tree and others
5	APPROOSE TOWER	Osaka, Osaka	1992	Office, Hotel	Washington palm
6	SAPPORO FACTORY	Sapporo, Hokkaido	1993	Store, Office, Hotel	Evergreen broadleaf tree and others
7	SHINJYUKU PARK TOWER (PARK HYATT TOKYO)	Shinjyuku, Tokyo	1994	Hotel	Bamboo and others
8	Kansai International Airport Terminal Building	Izumisano, Osaka	1994	Terminal building	Evergreen broadleaf tree and 30 others
9	SEA HAWK HOTEL & RESORT	Fukuoka, Fukuoka	1995	Hotel	Palm, 200 subtropical plants

緑のある生活に対する潜在的なニーズは存在するものの、それでも現在、オーナーが屋内緑化の導入に積極的でない傾向がある。その理由は、コストがかかる点にある。植栽の施工にかかる費用は、屋外でも屋内でも大きな違いはないが、屋内植栽ではより多くの維持費がかかる。維持費のほとんどは植物の管理費用である。これは、屋内植栽に生じる様々な問題への対処にかかる費用である。屋内植栽樹において留意すべき事項には、次の諸点がある。

(1) 温度

通常は、一般居室の設定温度がそのままアトリウムの温度になり、アトリウムの個別の温度制御は行われない。多くの場合、設定温度は夏期 26℃、冬期 22℃である。

(2) 湿度

湿度の空調制御は行われず、通常は成り行きであるが、温度制御の影響を受け、相対湿度 40%程度になる。

(3) 風速

人に風が吹いている不快感を感じさせないように、建築基準法に則り、 0.5 m s^{-1} 以下になるよう設計されている。

(4) 光

平均して屋外照度の 5%程度といわれている（日本建築学会, 1994）。国内のグリーンアトリウムの実測結果では、夏～秋期の日中における平均照度が、およそ 5,000 lx を下回った。これは、外光を積極的に取り込むと、熱負荷が大きくなって空調運転コストがかかるだけでなく、グレア（まぶしさ）が生じ快適な視環境を作れないなどの問題が生じることから、建築設計の段階から入射光量が抑制されるためである（日本建築学会, 1994; 空気調和・衛生工学会, 2001）。

(5) 美観

ホテルやテナントビルなど、人の往来の多い建物内では、植栽の美観を維持することが強く要求される。そのためには、日常的な清掃が不可欠である。また、大型の樹木では、できるだけ植え替えや鉢の交換などの作業を避けるために、生育状態の悪化を早期に発見し、対策を講じなければならない。

(6) 薬剤散布

アトリウムは人の往来する空間であるため、病害虫が発生した場合の薬剤散布には、十分な配慮が要求される。残留性の強い薬剤は使用できないだけでなく、在館者の有無を考慮した散布のタイミングの検討や樹木周辺の床などに薬剤がかからないよう

にするなどの対策が必要である。

以上のような条件の中で樹木を生育させるため、高い維持費は避けられない。樹木の状態に合わせた剪定や薬剤散布、日々の観察など、専門家による細やかな管理が不可欠である。

その管理のなかでも、生育状態を診断し、良否を見極めることは、特に専門的な知識や経験が要求される。観葉植物と比べ、管理が難しいといわれる温帯性常緑樹を植栽したアトリウムでは、専門家が常駐して植栽管理を行っている例もある。そうした実例の調査では、屋内植栽の管理費が屋外植栽の10倍以上という結果を得ている。この高額な費用がグリーンアトリウムの大きな問題の1つになっている。専門家でなくとも簡単に、樹木が環境によるストレスを受けているかを知ることができれば、専門家の常駐管理は不要になり、管理費用を軽減できる。さらに、樹木の美しさが損なわれるより前に、環境ストレスの有無を判定することができれば、早めに交換や植え替えなどの対策を取ることが可能になる。

1.1.2 植物のストレス判定法

屋内に植栽された温帯性常緑樹のストレス判定に必要な以下2つの条件、

- (1) 非破壊で判定できる、
- (2) 簡単に判定できる、

を満たす手法として光による植物測定法がある。

光による主な植物測定法には、葉色や葉の含水率の情報を得ることができる反射測定（大政ら, 1979; 渡邊ら, 1994; 山本ら, 1991; 山本ら, 1994; 吉田ら, 1999; 吉村ら, 1991）、葉温を測る赤外測定（Bartholic *et al.*, 1972; Clawson and Blad, 1982; 大政ら, 1993; 大政ら, 1990）、そして葉からの蛍光測定がある。本研究では、蛍光測定に着目し、環境によるストレスの有無を判定する手法としての可能性を検討する。

植物に用いられる主な蛍光測定には、クロロフィル蛍光の誘導期現象測定、飽和パルス法、蛍光スペクトル測定、蛍光寿命測定がある。ここで、実用性の観点から、屋内植栽樹のストレス判定法に求められる項目は以下の諸点である。

- (1) 安価な装置であること
- (2) 特別な技能・技術を要求しない装置であること
- (3) ポータブルであること
- (4) 測定に時間がかからないこと

以上の点から、蛍光測定の各手法を検討すると、飽和パルス法や蛍光寿命は費用の点から除

外される。飽和パルス法は光合成研究手段としては強力な手法であり、光合成の機能解明に有用な取り組み (Cerovic *et al.*, 1996; Krause *et al.*, 1982; Morales *et al.*, 1999; Schreiber *et al.*, 1986; Tobe and Omasa, 1999) がなされているが、本研究の目的は光合成の研究ではないため、必ずしも飽和パルス法で得られる情報が必要とは限らない。また、後述の誘導期現象の測定と比べると、飽和光照射などの機能が必要なことも、費用の点から問題である。蛍光寿命に関する最近の研究には、フェムト～ピコ秒の励起光による植物の反応について調査した結果 (Cerovic *et al.*, 1994; Latouche *et al.*, 2000; Shmuck and Moya, 1994; Schmuck *et al.*, 1992; Takeuchi *et al.*, 2001) があるが、これも装置が高価で、操作も簡単とはいえない。残りの選択肢、誘導期現象と蛍光スペクトルは、蛍光画像を対象とせずスポット測定に限定すれば、基本的に低価格に抑えることが可能である。操作も他の手法と比較して簡単であることから、(1)～(4)のすべての点を満足する可能性をもち、本研究の目的には一番適していると考えられる。励起光に単色性、指向性の高いレーザ光を用いる Laser Induced Fluorescence (LIF) 法を採用すれば、より高い測定精度と将来的な拡張性が期待できる。

1.1.3 クロロフィル蛍光誘導期現象と蛍光スペクトル

誘導期現象とは、約 20 分間、暗適応させた葉に励起光を照射した直後から生じる、クロロフィルからの蛍光強度の時間変化である。クロロフィル蛍光の強度は、Fig. 1.1 に例示したような Kautsky 効果と呼ばれる独特の時間変化を示す (Havaux and Lannoye, 1983; Kautsky and Hirsch, 1931)。Kautsky 効果は、光化学反応の電子伝達系の酸化還元状態を反映することが知られている (Govindjee, 1995; Krause and Weis, 1982)。

蛍光スペクトルとは、励起光によって葉内の色素や化合物などから発せられる蛍光のスペクトル分布である。励起光の波長によって、得られるスペクトル分布は異なるが、健全な葉に紫外線 (UV) を照射した場合には、Fig. 1.2 の例のように 430, 530, 685, 740 nm 付近にピークが出現する。

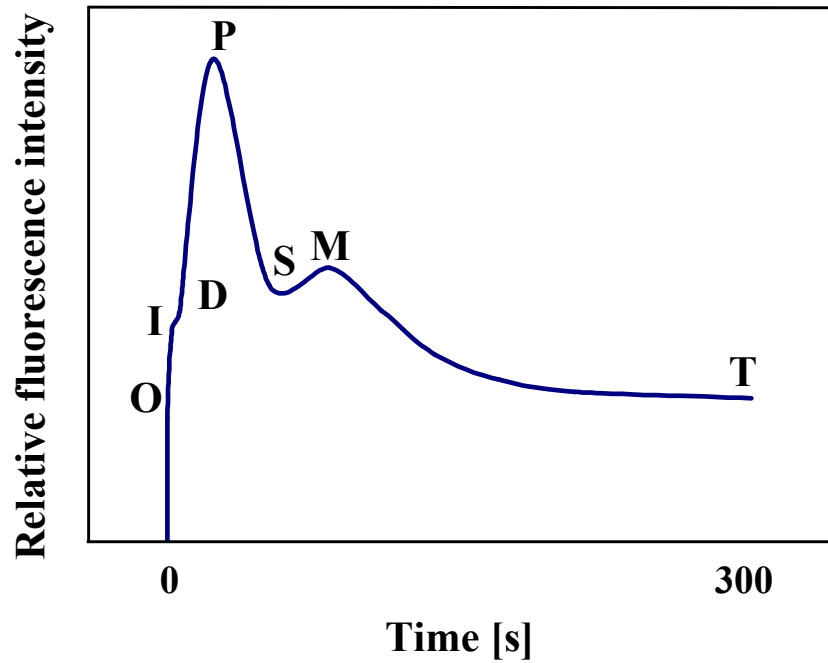


Fig. 1.1 An example of chlorophyll fluorescence induction kinetics upon illumination of a dark-adapted green leaf. O: origin, I: intermediate, D: dip, P: peak, S: first steady-state, M: maximum, T: terminal state.

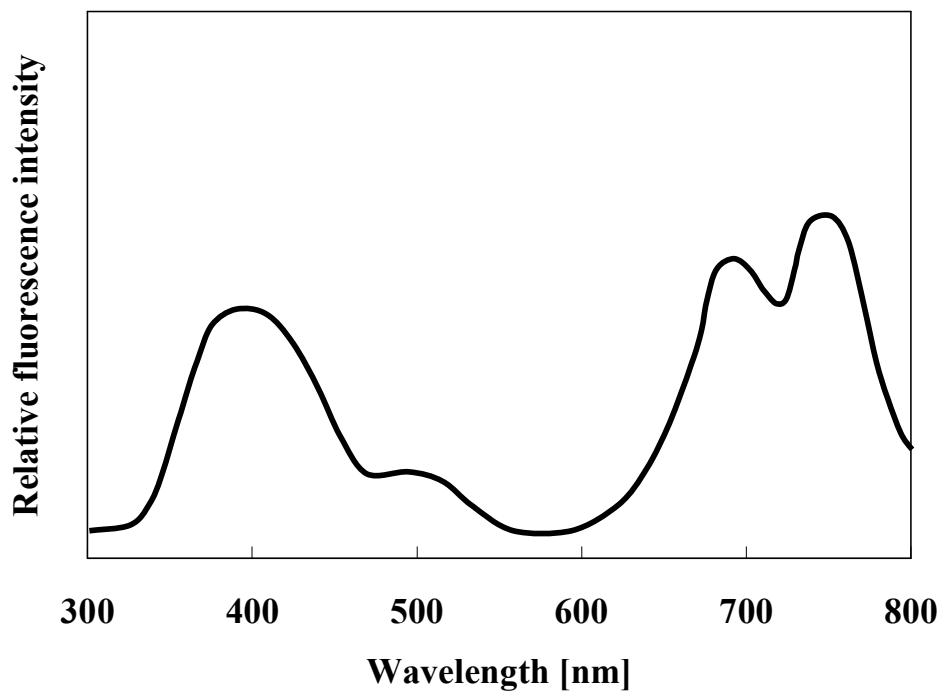


Fig. 1.2 An example of UV induced fluorescence spectra of a green leaf.

1.2 既往の研究

ストレスに対する植物の反応をクロロフィル蛍光の誘導期現象で検知する多くの研究 (Table 1.2) に加え、クロロフィル含量と蛍光の関係 (高橋ら, 1992), 陽葉と陰葉の違い (Lichtenthaler *et al.*, 1981; Lichtenthaler *et al.*, 1986; Lichtenthaler and Rinderle, 1988; Stein *et al.*, 1990), 葉の表裏の違い (Lichtenthaler and Rinderle, 1988; Shreiber *et al.*, 1977), 葉の生育段階の変化 (Croxdale and Omasa, 1990a; Croxdale and Omasa, 1990b) などの研究がある。これらの研究に用いられた植物の種類は、藻類から作物, 樹木まで幅広い。生葉からの情報だけでなく, 抽出したクロロプラストを用いた研究も多い。生葉を用いた蛍光測定では, 小麦や豆などの作物が主な材料である。また, 誘導期現象を数値で評価した研究もいくつかある (Govinjee *et al.*, 1981; Havaux and Lannooye, 1983; Schreiber *et al.*, 1978; Smillie, 1982; Smillie and Hetheington, 1983; Smillie and Nott, 1982)。その1つに, Lichtenthaler ら (1986) が提唱した *Rfd* 値がある。*Rfd* 値は, 他のいくつかの研究 (Méthy, *et al.*, 1994; Subhash and Mohanan, 1994) でも様々なストレスの影響の評価に用いられている有用な指標であるが, *Rfd* 値を算定するためには測定時間に約 5 分間を要するという問題がある。

蛍光スペクトルによる研究は, 室内での実験から, 植生調査を目指すリモートセンシングへと領域が広がっている (Cerovic *et al.*, 1999)。ストレス反応を検知する研究を Table 1.3 に示す。リモートセンシングの領域では, 色素とスペクトルの関係を示した研究 (Chapplle *et al.*, 1990; Chapplle *et al.*, 1991; Gitellson *et al.*, 1999; Lang and Lichtenthaler, 1991; Lang *et al.*, 1991; Stober *et al.*, 1994; Subhash *et al.*, 1999; 高橋ら, 1995; 高橋ら, 1997; 高橋ら, 1991) があり, 種ごと, 季節ごとに異なるスペクトルを明らかにした研究 (Chappelle and Williams, 1986; Mineuchi *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1998; 高橋ら, 1993) がある。

以上のように, 誘導期現象と蛍光スペクトルに関する研究は数多くあるが, 屋内環境が樹木の誘導期現象や蛍光スペクトルに与える影響の検知と, 樹木のストレス判定への応用を目的とした定量評価を試みた研究は見当たらない。

Table 1.2 Studies on detecting plant stresses using chlorophyll fluorescence induction kinetics.

No.	Stress	Reference
1	Herbicide diuron	Krause and Weis, 1984; Krause <i>et al.</i> , 1982; Shimazaki <i>et al.</i> , 1984
2	CO ₂	Krause and Weis, 1984
3	Water	Govindjee <i>et al.</i> , 1981; Havaux and Lannoye, 1983; Lichtenthaler <i>et al.</i> , 1986; Wiltens <i>et al.</i> , 1978
4	Nutrient	Subhash and Mohanan, 1994
5	SO ₂	Omasa <i>et al.</i> , 1987; Shimazaki <i>et al.</i> , 1984
6	O ₃	Schreiber <i>et al.</i> , 1978
7	UV	Smillie, 1983
8	Salt	Smillie and Nott, 1982
9	Temperature	Méthy <i>et al.</i> , 1994; 大川原・金子, 1993 Smillie and Hetherington, 1983; 高橋ら, 1992
10	Air pressure	Lichtenthaler and Rinderle, 1988

Table 1.3 Studies on detecting plant stresses using fluorescence spectra.

No.	Stress	Reference
1	UV	Mineuchi <i>et al.</i> , 2001
2	Water	Chappelle <i>et al.</i> , 1984; Valentini <i>et al.</i> , 1994
3	Metal	Banninger <i>et al.</i> , 1990
4	Herbicide diuron	Kim <i>et al.</i> , 2001; Chappelle <i>et al.</i> , 1984
5	O ₃	Kim <i>et al.</i> , 2001; 高橋ら, 1993
6	Temperature	高橋ら, 1997; Takahashi <i>et al.</i> , 1994
7	NO _x	Takahashi <i>et al.</i> , 1994
8	SO _x	Takahashi <i>et al.</i> , 1994
9	Nutrient	Chappelle and Williams, 1986; McMurtrey <i>et al.</i> , 1990
10	Light	Lichtenthaler <i>et al.</i> , 1982; Stober and Lichtenthaler, 1993; Valentini <i>et al.</i> , 1994

1.3 研究の目的と論文の構成

本研究の目的は、屋内植栽樹の管理費用を低減するために、樹木の葉のクロロフィル蛍光誘導期現象と蛍光スペクトルを、高精度かつ高拡張性をもつ LIF 法で測定し、そのデータを定量評価して環境ストレスの有無を判定する技術を確立することである。

本研究では、屋内植栽樹に想定される、

- (1) 長期間にわたる弱光環境
- (2) 灌水停止などによる水欠乏
- (3) 屋外から屋内への搬入による極端な光強度の低下
- (4) 季節のない環境

以上4つの環境条件下におくことで (Fig. 1.3) 樹木に環境ストレスを与える実験を行い、その影響を LIF 法で検知する。4つの環境条件の影響を調べる際は、樹木の環境ストレスへの応答を速めるため、比較的極端な環境条件を与え実験する。実験の詳細については、各章で述べる。加えて、屋内植栽樹では落葉や葉の変色より前に検知することが重要であるため、この点も確認する。その際、ストレス判定のソフトウェアだけでなく、装置の操作性および製作費を含め、総合的に検討していく。

以降、特に記述しない場合、本研究でいうストレスとは非生物的な物理的環境条件に起因するストレスを指す。

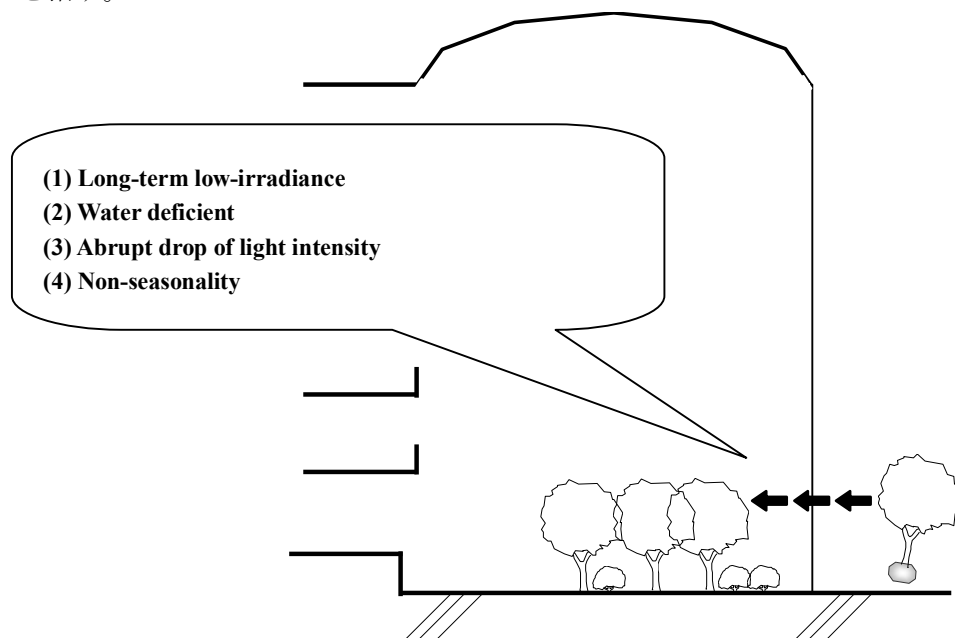


Fig. 1.3 The primary environmental factors which atrium trees should experience.

本論文は次のように構成される。

第1章では、屋内植栽の時代的背景と問題点、および問題解決に至る技術的背景について述べ、本研究の目的である樹木のストレス判定技術確立の必要性を示している。ストレスの有無を判定する手法として、LIF法によるクロロフィル蛍光の誘導期現象と蛍光スペクトル測定を選択した理由についても述べている。

第2章では、屋内に植栽した樹木に想定される長期弱光ストレスと水ストレスについて、クロロフィル蛍光の誘導期現象と蛍光スペクトルで測定した結果を述べる。誘導期現象の測定結果を評価する解析手法として第2次導関数法を提案する。

第3章では、屋外から屋内への搬入時に想定される極端な光強度低下によるストレスを再現するために、樹木を暗黒下に置いた実験について述べる。樹木が暗黒下でストレスを受ける過程をクロロフィル蛍光の誘導期現象によって検知する。

第4章では、空調された季節変化のない環境下における樹木の挙動をクロロフィル蛍光の誘導期現象によって追跡する。ここでは、誘導期現象を解析する新たなパラメータMM法を提案する。加えて、ポータブル型装置の製作についても述べ、その実用性を検討する。

第5章では、パラメータMMによるストレス判定を提案する。環境ストレスを受けた樹木の葉の誘導期現象をパラメータMMで解析した結果を述べ、その結果を基に定めたストレス判定基準の妥当性から、パラメータMMによる判定の有効性を提示する。

最後に第6章では、本研究のまとめと問題点、今後の展望について述べ、本論文を結ぶ。

第2章 長期弱光ストレスと水ストレス

2.1	はじめに	15
2.2	材料と方法	16
2.2.1	長期弱光ストレス	16
2.2.2	水ストレス	17
2.2.3	クロロフィル蛍光誘導期現象の測定	19
2.2.4	蛍光スペクトルの測定	21
2.3	第2次導関数法による誘導期現象の評価	22
2.4	結果	24
2.4.1	経日変化	24
2.4.2	第2次導関数法による弱光ストレスの影響の検知	24
2.4.3	蛍光スペクトルによる弱光ストレスの影響の検知	24
2.4.4	第2次導関数法による水ストレスの影響の検知	29
2.4.5	蛍光スペクトルによる水ストレスの影響の検知	29
2.4.6	ストレスの有無と評価指標の関係	29
2.5	考察	38
2.6	まとめ	39

第2章 長期弱光ストレスと水ストレス

2.1 はじめに

本章では、屋内で想定される弱光環境と水欠乏の影響が、LIF法によるクロロフィル蛍光の誘導期現象と蛍光スペクトルによって、検知できるかを確認する。

環境条件の制限を受けるアトリウムでは、光と水は最も強く影響する要因である。アトリウムは屋外と比較して弱光であるため、樹種によっては光量の不足によって生育できない場合がある。また、樹木は定期的な灌水によって生育する。多くのアトリウムでは、タイマーによって灌水を制御しているが、電気系統の故障やそのほかの原因で灌水が停止した場合には、樹木が水欠乏によるストレスを受けることが考えられる。

そこで本章では、以下に示す弱光ストレスと水ストレスの影響を調べる実験を行う。

- (1) 樹木を長期間にわたり弱光環境下で生育させる実験
- (2) 葉に水欠乏を与える実験

これらの実験における反応が、LIF法を用いたクロロフィル蛍光誘導期現象と蛍光スペクトルによって検知できるかを調べる。

誘導期現象と蛍光スペクトルによる検知結果が、樹木のストレスの有無を判定する方法として適切かは、

- (i) 弱光および水ストレスの強さに応じた蛍光情報の変化
- (ii) 葉色に現れるより早い蛍光情報の変化

この2点が検知できるかによって判断し、ストレス判定法としての適性を評価する。

2.2 材料と方法

2.2.1 長期弱光ストレス

実験には、樹高 3–4 m 程度のクスノキ (*Cinnamomum camphora*) とシラカシ (*Quercus myrsinifolia*) を使用した。この 2 種は、日本の公園に一般的に植えられる樹木であり人気が高い。これらの樹木は、つくば市内の屋外実験施設において、寒冷紗を用いて光強度を調整した試験区内で 5 年以上生育させた。試験区の概要を Fig. 2.1 に、各試験区の年間平均光合成有効光量子束密度 (PPFD) を Table 2.1 に示す。なお、対照区の年間平均 PPFD は、昼間を 1 日 12 時間とした屋外での実測値であり、その他の試験区の値は対照区の実測値と寒冷紗の遮光率から求めている。S60~S98 の遮光率は、寒冷紗の仕様によって制限される。遮光率の異なる寒冷紗を複数枚組み合わせることによって、異なる光強度の試験区を設置した。5 段階の光強度の中で、最も暗い S98 における年間平均 PPFD は、建物内での細かい視作業に必要な照度 (照明学会, 1999) と同程度の光強度に設定されている。1996 年 7~9 月に月 1 回のクロロフィル蛍光の測定を行い、この 3 ヶ月間の平均を求めた。測定には、1 つの試験区あたり 5 枚の葉を使用した。

なお、Table 2.1 に示す 5 段階の光強度で樹木を生育させた結果、陽樹に分類されるクスノキは、S98 (遮光率 98%) の試験区では生育できずに枯死した。そこで、対照区、S60 (遮光率 60%)、S83 (遮光率 83%) および S93 (遮光率 93%) の 4 試験区の測定を行った。陰樹に分類されるシラカシの測定も行った。シラカシは、S98 でも枯死しなかったため、5 段階の光強度から代表的な、対照区、S60 および S98 の測定を行った。

測定装置の概要および測定手順について述べる。測定装置が実験室内に設置され、葉をサンプルフォルダにセットして測定するシステムであること、測定装置が木更津市にあることなどの制約のため、本実験では樹木から葉を採取し、つくば市から木更津市に運んで測定した。試料は枝単位で切り取った後、乾燥を防ぐため切り口をぬれたペーパータオルで包んで保護し、ビニール袋へ入れてから発泡スチロールボックスへ収納し、車で木更津市まで運んだ。ボックスは車内の空調された温度条件下に置いた。運搬後の試料は葉の萎れを防ぐため、十分に水分を与え、約 7–8°C の暗黒下で保管し、蛍光測定の 30 分前に室温に戻した。測定は、葉の採取後から 36 時間以内に行った。温度の低下と再上昇が葉内に含まれる Rubisco の反応に影響し (牧野, 2002; Ramalho *et al.*, 2004)、誘導期現象にも影響を及ぼす可能性があるが、すべての試料を同一条件で取り扱っているため、試料間の相対的な誘導期現象を比較できると考えた。

誘導期現象の測定時には、採取した葉は葉柄部で切り取り、切り口をぬれたペーパータオル

で包み、乾燥から保護した後、試料フォルダにセットし、20分間の暗処理を行った。暗処理後、葉にレーザ光を照射し、照射直後からの蛍光強度の時間変化を測定した。

蛍光スペクトルの測定では、葉は葉柄部で切り取って試料フォルダにセットし、ただちに測定を行った。

2.2.2 水ストレス

実験には、木更津市の遮光していない状態で屋外に生育する、クスノキとシラカシの葉を各々3枚ずつ用いた。クロロフィル蛍光の誘導期現象は、1999年7月に測定を行い、蛍光スペクトルは1999年1月に測定した。葉を葉柄部で切り取った後、空調条件下（室温24°C、相対湿度40%、PPFD $13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）に放置し、時間経過にともなう生重量（Shimadzu, AEU-210）、色彩色差（MINOLTA, CR-200）、誘導期現象および蛍光スペクトルの変化を測定した。測定は葉を切り取った直後を0時間とし、その後は2時間おきに、20時間経過後まで行った。

実際に、灌水が長期にわたり停止したような場合、樹木が水ストレスを感じるまでには、長い時間がかかると考えられる。ここでは水ストレスに対する樹木の応答速度を速めるために、葉を切り取って放置する極端な水ストレスを与えた。

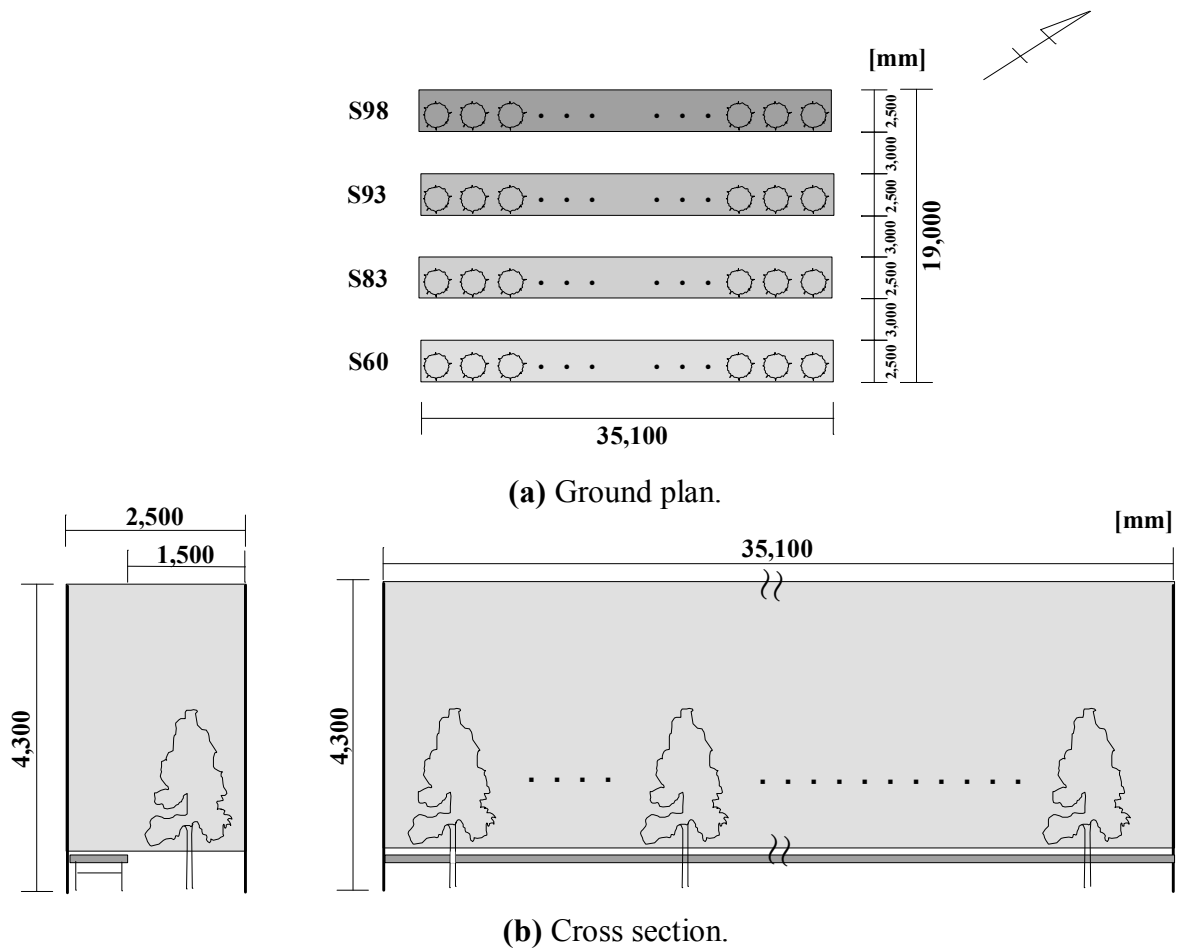


Fig. 2.1 Illustration of outdoor shading experimental site. Trees were enclosed with cheesecloths with different shading percentages shown in Table 2.1.

Table 2.1 Shading percentage and PPFD of each treatment. PPFD of the control was the annual average PPFD measured outdoors, assuming daytime to be 12 hours per day. PPFD in each treatment was calculated as the product of PPFD of the control and the shading percentages.

Treatment code	Shading percentage [%]	PPFD [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
Control	0	660
S60	60	264
S83	83	112
S93	93	46
S98	98	13

2.2.3 クロロフィル蛍光誘導期現象の測定

クロロフィル蛍光の誘導期現象の測定装置は、光源部、検知部、およびデータ処理部で構成されている (Fig. 2.2)。

光源には、クロロフィルの吸収帯波長の光を発振する連続発振 (continuous wave; 以後, cw) 半導体レーザー (東芝, TOLD9220, 発振波長 659.2 nm, 半値幅 3.2 nm, 出力 1 mW) を使用し、葉への入射角は 45° とした。

検知部は、試料フォルダ、光ファイバ、光電子増倍管 (浜松ホトニクス, R758), マルチデジタルタイザ (オートニクス, APC-204) で構成されている。試料フォルダは、レーザー光源と蛍光検知用の光ファイバを備え付けてあり、フォルダ内へは、外乱光が入射しない構造になっている。

光ファイバから取り込んだ蛍光を 738 nm の干渉フィルタ (日本真空光学, 直径 20 mm ϕ , 中心波長 738 nm, 半値幅 3.5 nm, 透過率 84%) を介して光電子増倍管にて検知し、マルチデジタルタイザに保存した。

これらの機器は、測定パラメータも含め、データ処理部であるパーソナルコンピュータ (NEC, PC-9801RA) によって、レーザー光照射と同時に 192 秒間の蛍光強度の変化を検知するように制御されている (高橋ら, 1992)。

測定波長を 738 nm にした理由について述べる。可視光を照射したときのクロロフィルからの蛍光スペクトルには、2つのピーク (685 nm, 738 nm) がある。実験開始前に、685 nm と 738 nm の2波長を同時に測定し、蛍光強度変化を比較した結果、Fig. 2.3 に示すように、その強度変化パターンに明確な変化が認められなかった。そこで、738 nm に限定して測定を行うこととした。これは、本実験で使用した発振波長 659.2 nm のレーザーの場合、685 nm 付近の蛍光検知時に励起光の迷光の影響がでる可能性が考えられ、これを回避するためである。

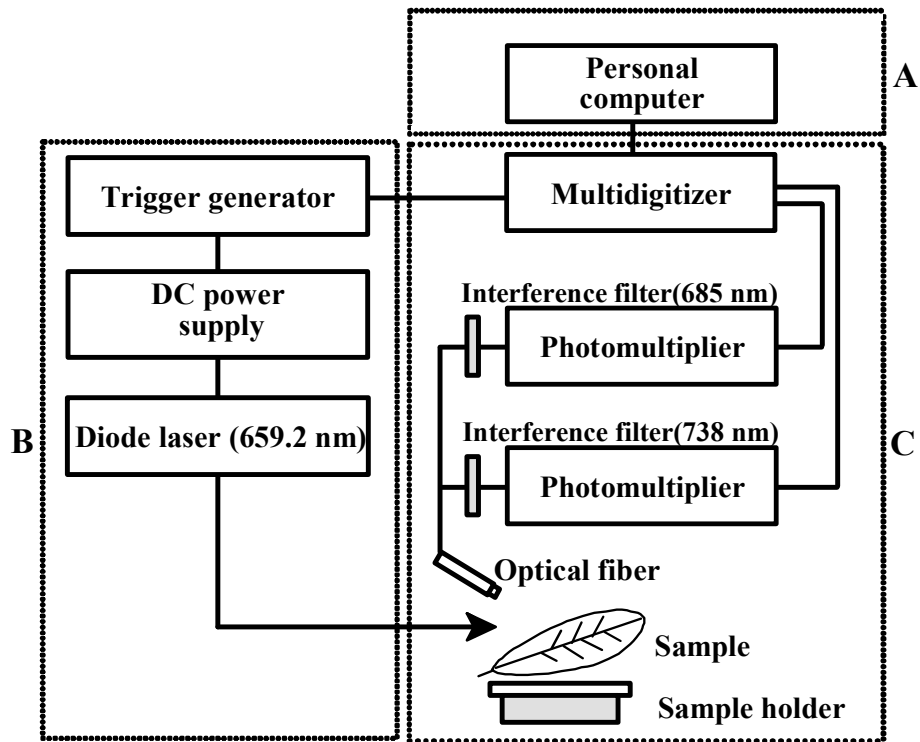


Fig. 2.2 Block diagram of the measurement system of chlorophyll fluorescence induction kinetics. A: data processing unit, B: light source unit, C: spectrophotometry unit.

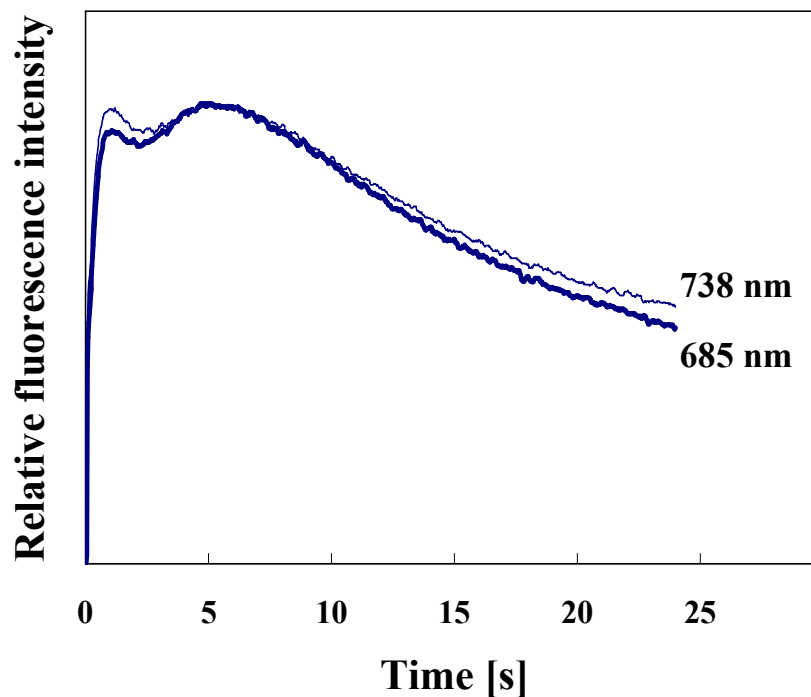


Fig. 2.3 Comparison of the fluorescence induction kinetics of a leaf of *C. camphora* at 685 nm and 738 nm.

2.2.4 蛍光スペクトルの測定

蛍光スペクトルの測定装置は、光源部、分光測光部および試料フォルダで構成されている (Fig. 2.4)。光源は cw Ar⁺レーザー (NEC GLG3028, 351–364 nm, 20 mW) を用いた。露光時間を 1.0 秒で、葉表面に照射した。

分光測光部は、シャープカットフィルタ (東芝, L-39, L-42) を付けた光ファイバ、分光器 (リツエー工業光学, MC-25NP, 回折格子 150 本/mm, ブレーズ波長 500 nm), Image Intensifier 付きダイオードアレイ検知器 (Tracor Northern USA, TN-6133, 512 素子), MDS (Multipurpose Data Processing System, セキテクノトロン, SK-300) で構成され、パーソナルコンピュータ (NEC, PC-9801RX) によって制御されている。レーザー励起直後の蛍光が検知でき、検知波長領域は、可視域から遠赤色光までの 418.7–754.2 nm である。

試料フォルダはクリップ式で、葉の固定面に対して 45° で光ファイバを取り付けることのできる構造となっている (高橋ら, 1995)。

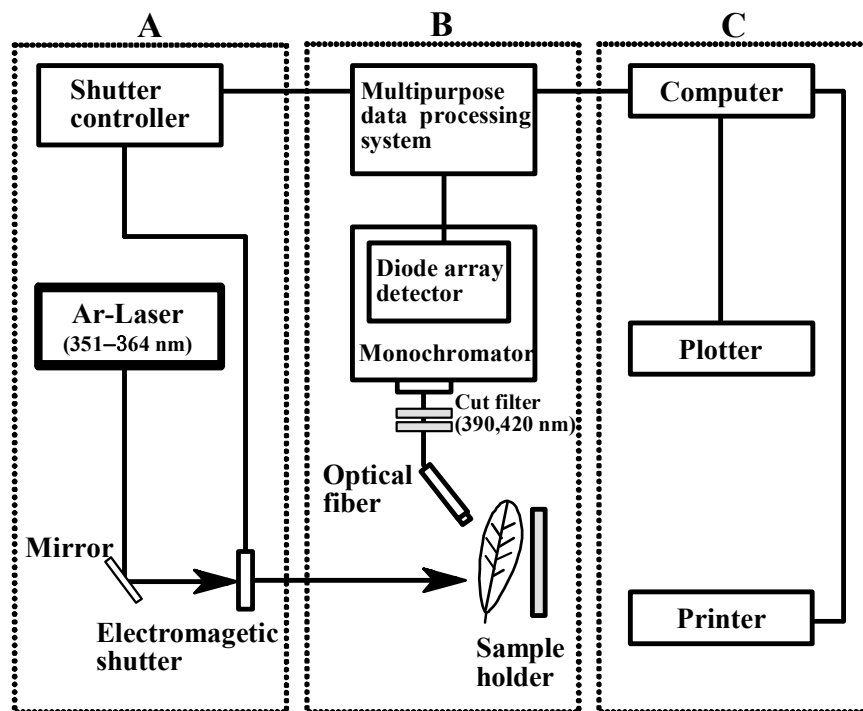


Fig. 2.4 Block diagram of LIF spectra measurement system. A: light source unit, B: spectrophotometry unit, C: data processing unit.

2.3 第2次導関数法による誘導期現象の評価

レーザー光によって誘起された蛍光は、光合成の初期過程の酸化還元反応にともなって、Fig. 2.5 に示すように、励起光照射開始直後に強い蛍光を示し (P)、一旦、強度が減衰した後、再び蛍光強度が上昇し (M)、その後、強度は緩やかに減衰する (T)。このクロロフィル蛍光の誘導期現象について、励起光照射開始から 192 秒間の測定を行った。光や水のストレスを与えた場合の影響を比較した結果、その影響が最も明確に現れるのは、励起光照射から誘導期現象の M を経て、緩やかに蛍光強度を減衰させ始める過程であることがわかった。励起光照射から 24 秒経過後の地点を T' と定義する。0-24 秒間のなかでも、弱光および水ストレスによる差が顕著であり、その差の評価が容易である時間領域は、およそ 5 秒後に出現する M から T' までの区間を示す 5-24 秒間であった。この区間は、光化学反応系 II における Q_A が、 Q_A 以降の電子伝達速度等の影響を受けて再還元される状態を反映している (Krause *et al.*, 1982) と考えられるが、ここでは減衰する曲線の形状のみに着目して評価を行った。

測定の結果、弱光および水ストレスを与えることによって、M-T'間に変曲点をもつ S 字型の減衰曲線が緩やかな形状に変化していくことがわかった。そこで減衰曲線を 3 次式で近似し、近似曲線上の変曲点を求め、近似式の係数および変曲点の値を比較することによって評価を行った。これを第 2 次導関数法とする。3 次式で近似した理由は、実験条件にともなう M-T'の形状の変化に関わらず、近似した際の R^2 がほとんどの場合 0.9 以上の値を取り、M-T'をよく表したためである。

以下に、評価手順を示す。誘導期現象の 5-24 秒間の曲線を 3 次式で近似し、(1)式の $a \sim d$ の値を得る。時間[s]を x 、相対蛍光強度を y とすると、

$$y = ax^3 + bx^2 + cx + d \quad (a \neq 0) \quad \dots (1)$$

(1)式を 2 回微分し、変曲点の x 座標 (I_p) を求める。

$$\begin{aligned} d^2y/dx^2 &= 6ax + 2b = 0 \text{ とおくと,} \\ I_p &= -b/3a \quad (a \neq 0) \quad \dots (2) \end{aligned}$$

(2)式の a および I_p の値を試験区間および葉採取後の放置時間で比較した。

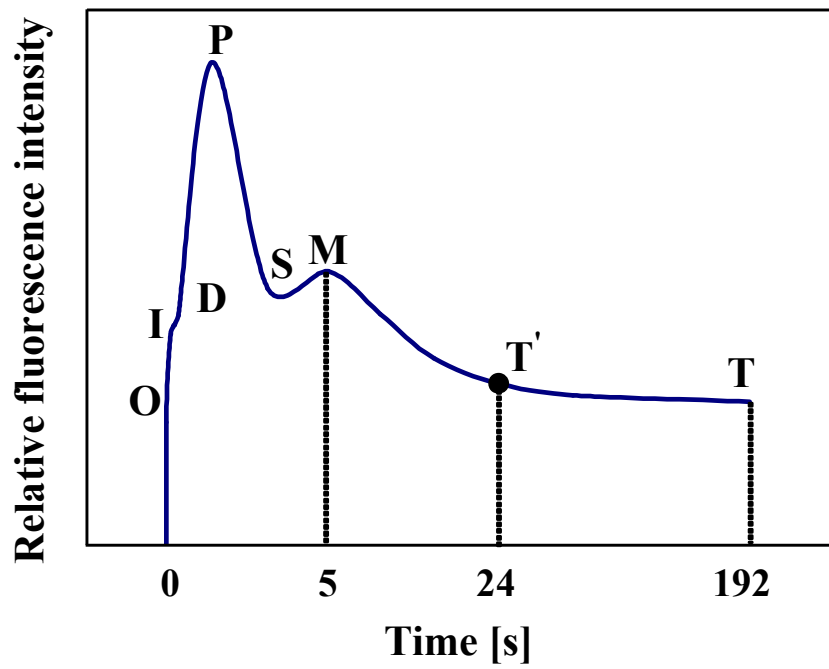


Fig. 2.5 An example of laser induced chlorophyll fluorescence induction kinetics upon illumination of a dark-adapted green leaf. O: origin, I: intermediate, D: dip, P: peak, S: first steady-state, M: maximum, T': after 24 s state, T: terminal state. M–T' of induction kinetics is analyzed by the second derivative method.

2.4 結果

2.4.1 経日変化

試料の採取から測定までに運搬時間を要するため、その影響を確認する試験を行った。

試験は、試料を採取し、つくば市から木更津市へ運んだ後、採取当日の蛍光の誘導期現象を測定（1日目）、以降続けて、採取後2～9日目まで毎日、ほぼ同時刻に測定を行った。比較は、誘導期現象を示す蛍光強度変化曲線の形状を対象とし、特に0-24秒間のO-Tの形状に注目した。その結果、採取後48時間以内であれば誘導期現象は大きく変化しないことを確認した（Fig. 2.6）。

2.4.2 第2次導関数法による弱光ストレスの影響の検知

クスノキの測定結果を Fig. 2.7 (a) に、シラカシの結果を Fig. 2.8 (a) に示す。その結果、弱光下で生育させた樹木ほど、P-M間の蛍光強度の変化が減少し、M-T間の減衰部も緩慢な減衰へと変化し、全体的に平坦な形状になることがわかった。M-Tを前述の評価法により第2次導関数で表すと Fig. 2.7 (b) , Fig. 2.8 (b) のようになる。その結果、対照区では $a < 0$ であるのに対し、遮光率の高い S93, S98 では $a > 0$ を示した。また、 $a > 0$ である関数において、 $d^2y/dx^2=0$ となる変曲点 I_p の値を比較すると、遮光率の高い試験区ほど I_p が大きい値を示した（Table 2.2）。

2.4.3 蛍光スペクトルによる弱光ストレスの影響の検知

生育時の光強度による蛍光スペクトルの違いを Fig. 2.9 に示す。蛍光スペクトルは、738 nm 付近のピークを基準値として規格化した。蛍光スペクトルには、430, 685, 738 nm 付近に明らかなピークが出現した。試験区の違いは、430 nm 付近のピークに最もよく現れ、対照区で最も大きい値を示し、遮光率が高い試験区ほど低い値を示した。

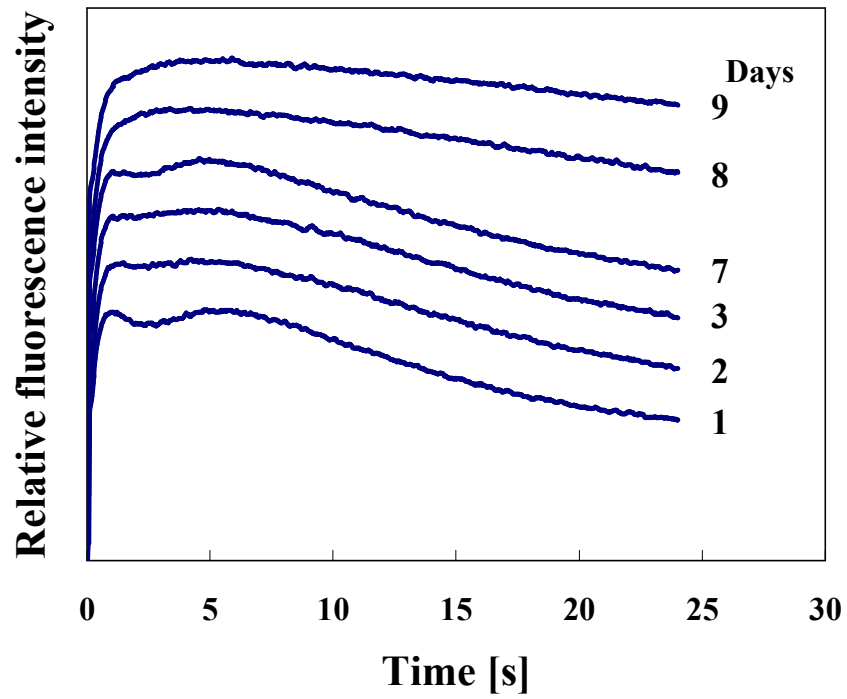


Fig. 2.6 Changes in induction kinetics of a detached leaf of *C. camphora*. Days are the durations after the detachment.

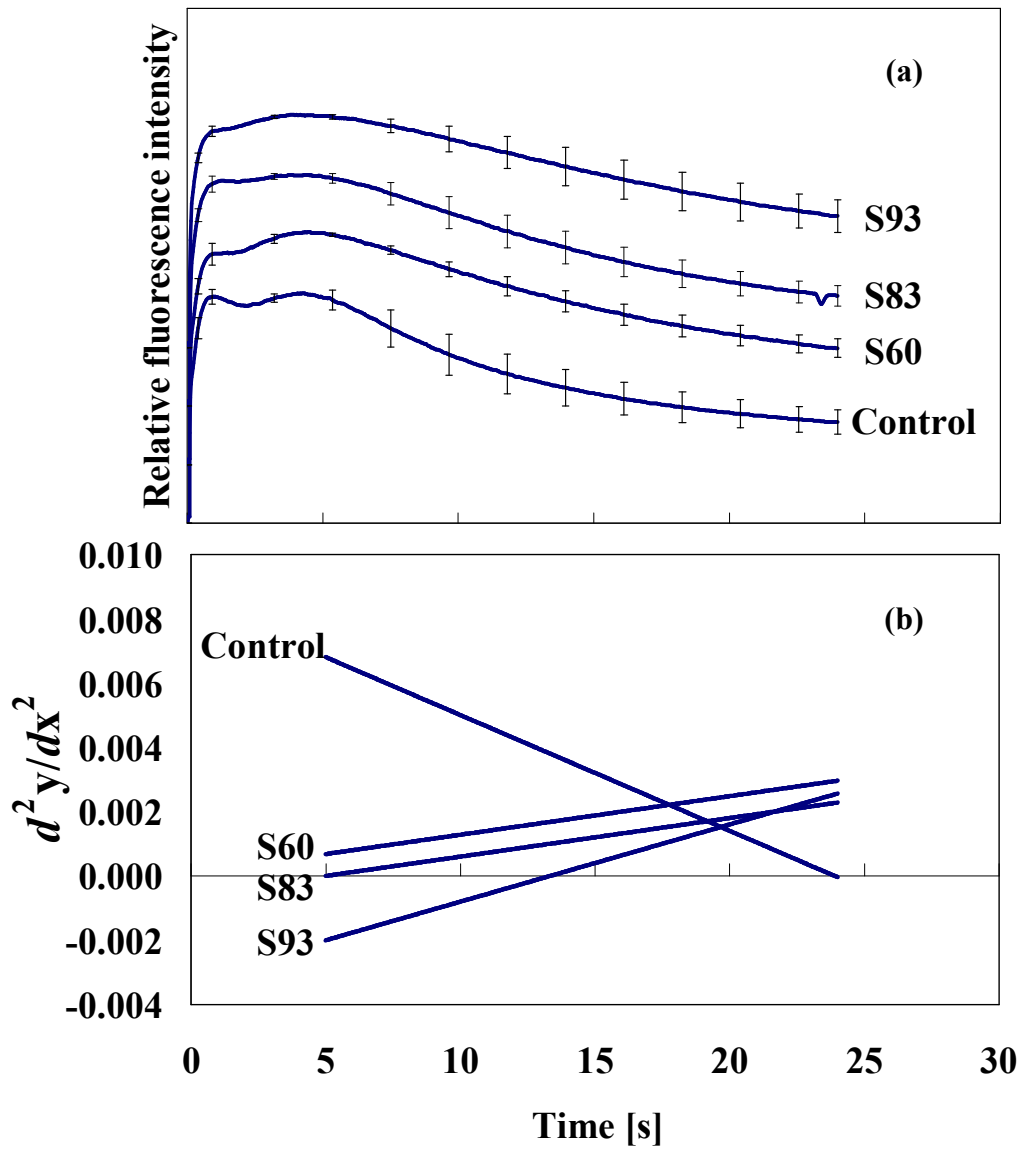


Fig. 2.7 Effects of shading treatments on (a) induction kinetics of leaves of *C. camphora*, and (b) the second derivative of 5–24 s curves shown in (a). For Control, S60, S83 and S93, see Table 2.1. The vertical bar indicates \pm SD in (a).

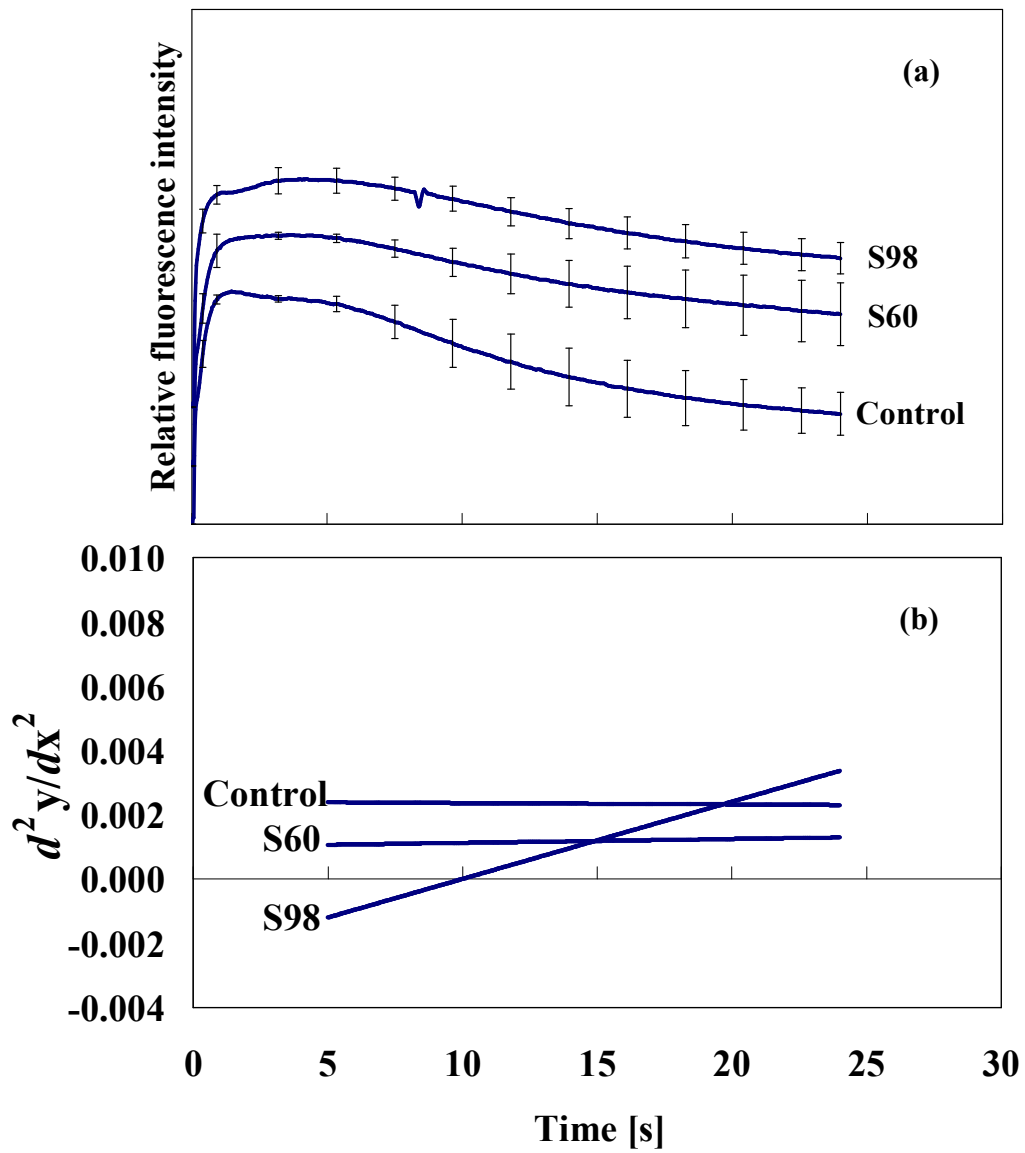


Fig. 2.8 Effects of shading treatments on (a) induction kinetics of leaves of *Q. myrsinifolia*, and (b) the second derivative of 5–24 s curves shown in (a). For Control, S60 and S98, see Table 2.1. The vertical bar indicates \pm SD in (a).

Table 2.2 The coefficient a of Eq. 1 and the inflection point Ip (Eq. 2) of the curves in Fig. 2.7 (*C. camphora*) and Fig. 2.8 (*Q. mysinifolia*). * x not calculated in case of $a < 0$, * y not measured, * z withered and dead.

Treatment code	<i>C. camphora</i>		<i>Q. mysinifolia</i>	
	$a [s^{-3}]$	$Ip [s]$	$a [s^{-3}]$	$Ip [s]$
Control	-6.0×10^{-5}	* x	-7.0×10^{-7}	* x
S60	2.0×10^{-5}	-0.7	2.0×10^{-6}	-83
S83	2.0×10^{-5}	5	* y	* y
S93	4.0×10^{-5}	13	* y	* y
S98	* z	* z	4.0×10^{-5}	10

2.4.4 第2次導関数法による水ストレスの影響の検知

実験開始から時間の経過にともない、誘導期現象の曲線が平坦な形状を示した。クスノキの結果を Fig. 2.10 (a) に示す。誘導期現象の曲線を第2次導関数法で解析した結果は Fig. 2.10 (b) のようになる。実験開始時 (0 h) には、 $a < 0$ であるが、水ストレスを与えてから2時間目以降 (2-20 h) には $a > 0$ を示す結果となった。 I_p 値には、時間経過にともなう一定の傾向はみられなかった (Table 2.3)。

Fig. 2.6 には、乾燥を防ぐため切り口をぬれたペーパータオルで包んで保護した葉の誘導期現象の経日変化を示している。このように乾燥から保護した葉では、誘導期現象が1日ごとに比較的緩慢に変化することがわかる。そこで、水ストレスの実験では、対照葉 (同一条件下で水ストレスを与えない葉) の測定をしていないが、Fig. 2.6 の1日目と2日目の曲線が大きく変化しないことから、Fig. 2.10 では水ストレスに対する時間ごとの応答が得られていると考えた。

生重量は時間の経過にしたがって減少したのに対して、色差は実験開始から10時間後までは大きな変化が現れず、水ストレスの影響で葉色に変化するには、時間がかかることが判明した (Fig. 2.11)。シラカシでも同様の結果が得られた (Fig. 2.13, Table 2.4)。ただし、色の変化は生重量の変化とともに観察された (Fig. 2.14)。0時間目と10時間後あるいは20時間後の葉の様子を Fig. 2.12 と Fig. 2.15 に示す。

2.4.5 蛍光スペクトルによる水ストレスの影響の検知

結果を Fig. 2.16 に示す。実験開始時と比べて、20時間後の蛍光スペクトルには、430, 530 nm 付近のピークが大きくなる傾向がみられた。しかし、2-10時間経過後の変化は、明確には検知できなかった。

2.4.6 ストレスの有無と評価指標の関係

近似式の係数および変曲点の値を用いて、クロロフィル蛍光の誘導期現象を評価した結果、弱光ストレスと水ストレスの影響は次のようであった。

弱光ストレスの度合いを遮光率で表すと、

- ・遮光率 0% のとき $a < 0$
- ・遮光率 60% 以上のとき $a > 0$

また、弱光ストレスを与えた場合の I_p 値に関しては、 $a > 0$ のとき、 I_p 値が大きいほど弱光ストレスの影響を受けているという傾向がみられた。

水ストレスは、ストレスを与えた時間で次のように表すことができた。

- ・0 時間のとき $a < 0$
- ・2 時間以上のとき $a > 0$

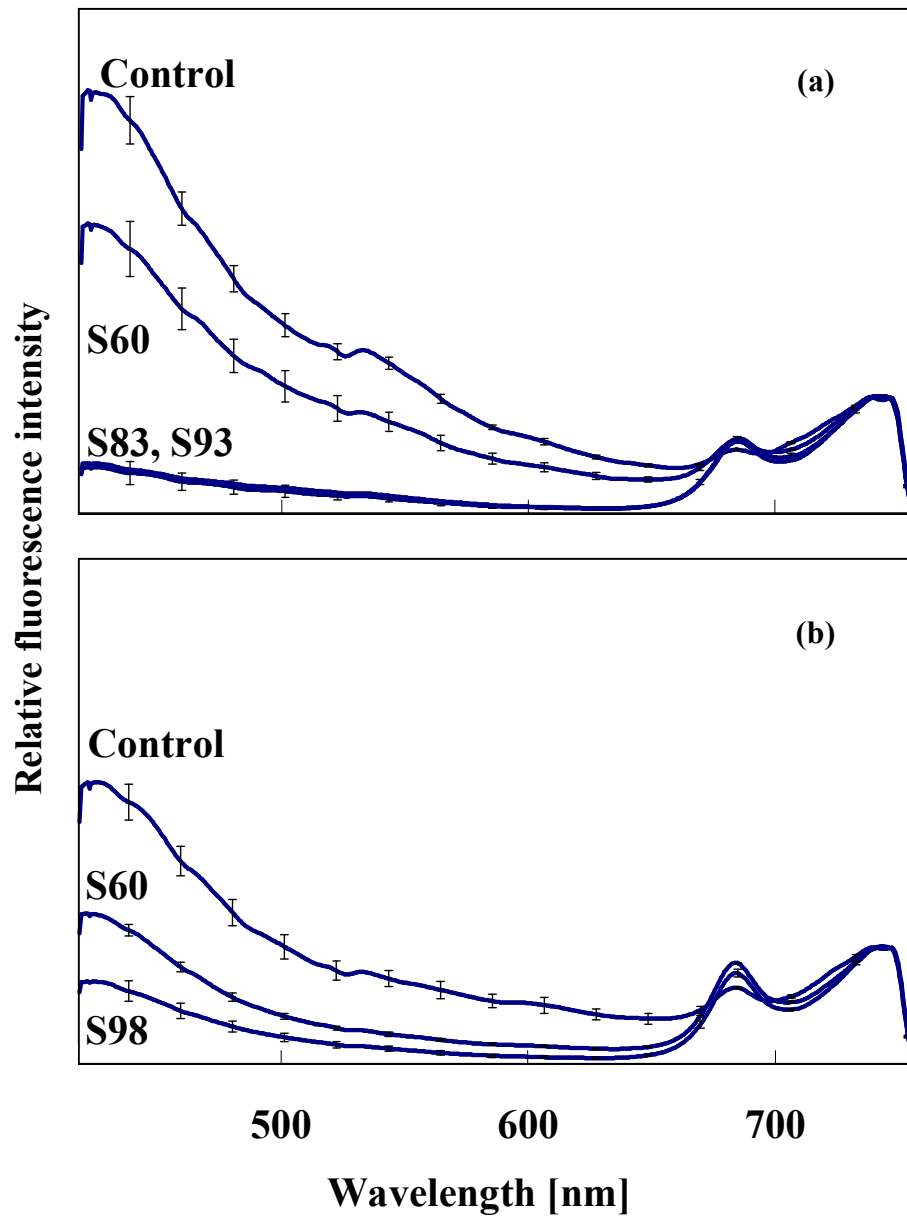


Fig. 2.9 Effects of shading treatments on LIF spectra of leaves of (a) *C. camphora*, and (b) *Q. myrsinifolia*. Spectra are normalized by the values at 738 nm. For Control, S60, S83, S93 and S98, see Table 2.1. The vertical bar indicates \pm SD.

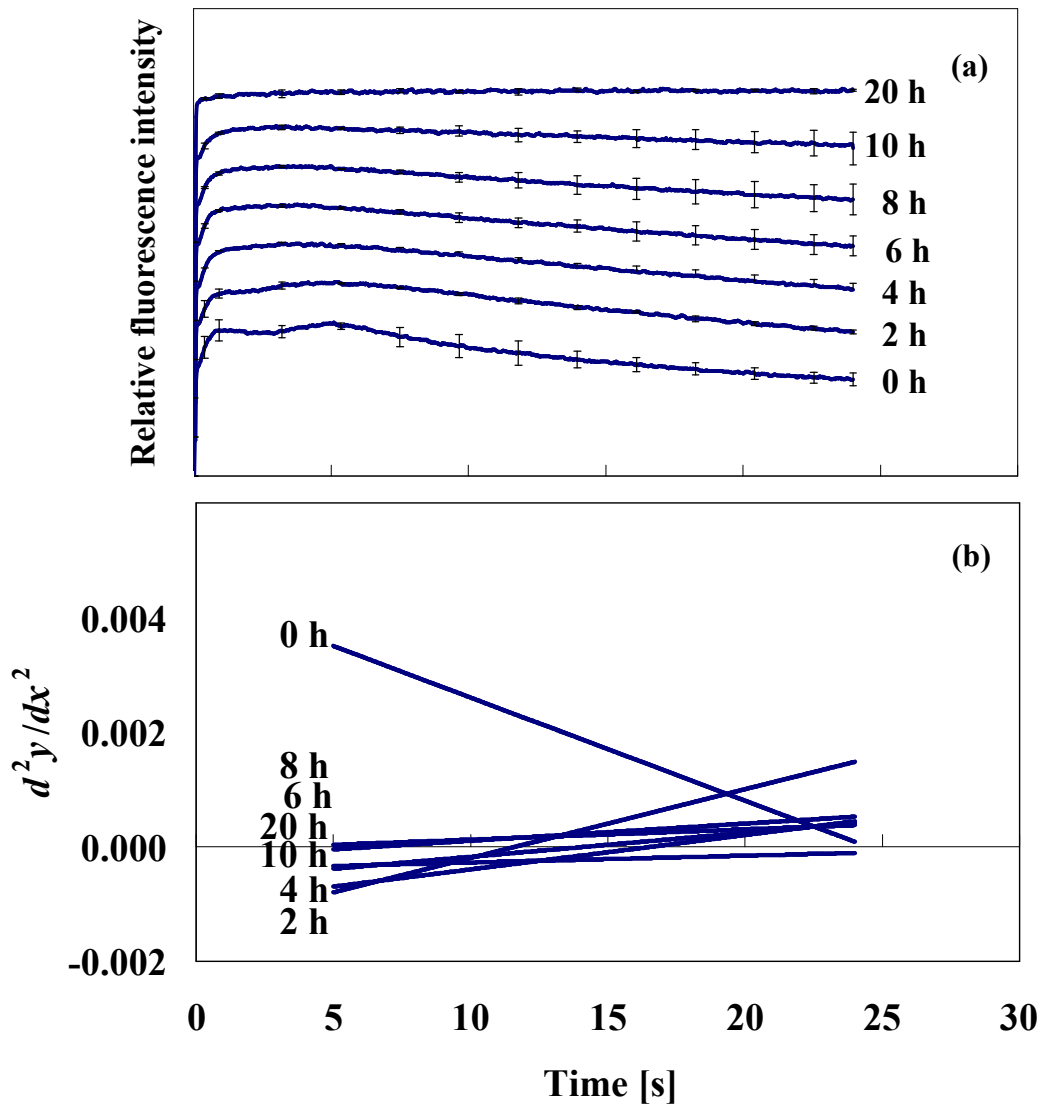


Fig. 2.10 Effects of water stress on (a) induction kinetics of leaves of *C. camphora*, and (b) the second derivative of 5–24 s curves shown in (a). Times [h] in figure are the lapsed time after the detachment. The vertical bar indicates \pm SD in (a).

Table 2.3 The coefficient a of Eq. 1 and the inflection point I_p (Eq. 2) of the curves in Fig. 2.10 for leaves of *C. camphora*. Times are the lapsed time after the detachment. * x not calculated in case of $a < 0$.

Time [h]	a [s^{-3}]	I_p [s]
0	-3.0×10^{-5}	* x
2	2.0×10^{-5}	12
4	1.0×10^{-5}	17
6	5.0×10^{-6}	7
8	3.0×10^{-6}	3
10	7.0×10^{-6}	14
20	2.0×10^{-6}	33

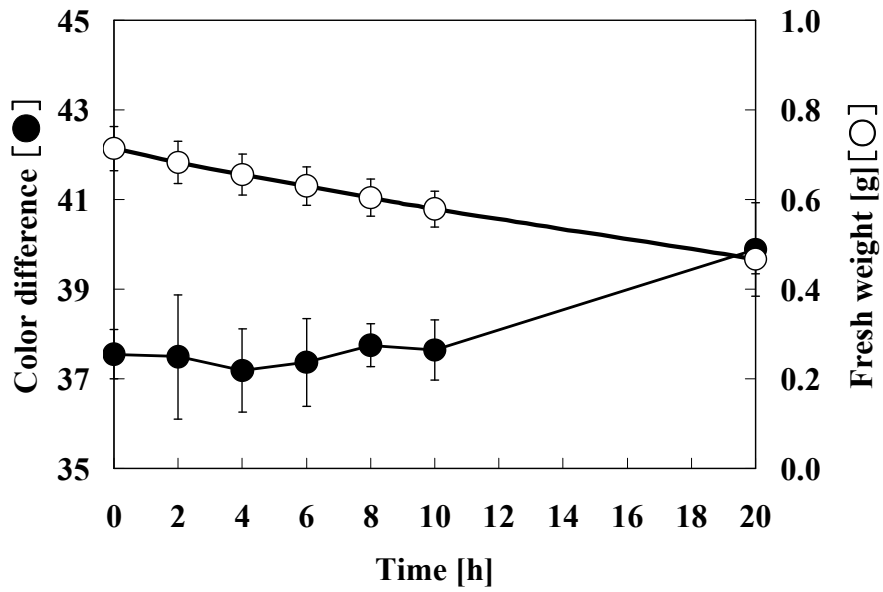


Fig. 2.11 Changes in fresh weight and color difference of the detached leaves of *C. camphora*. Time is the lapsed time after the detachment. The vertical bar indicates \pm SD.

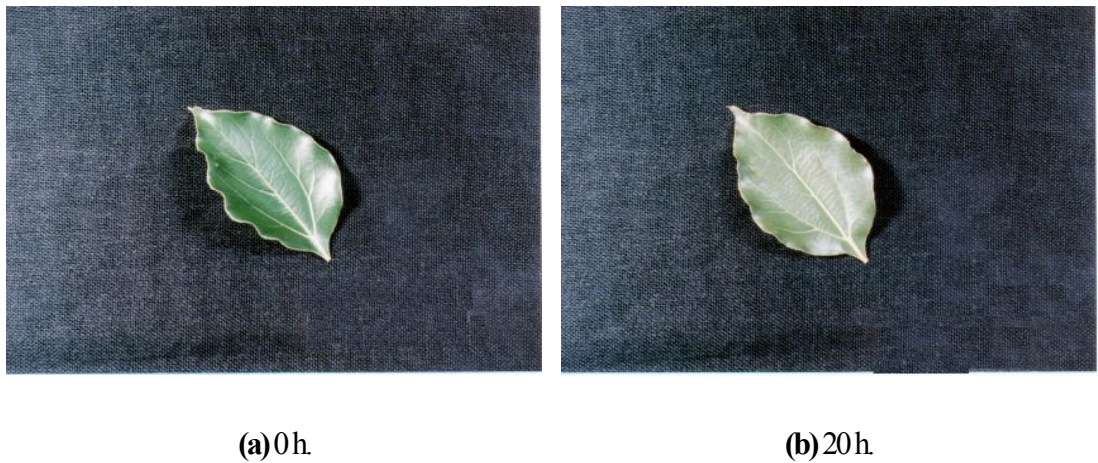


Fig. 2.12 The detached leaves of *C. camphora* after 0 and 20 hours.

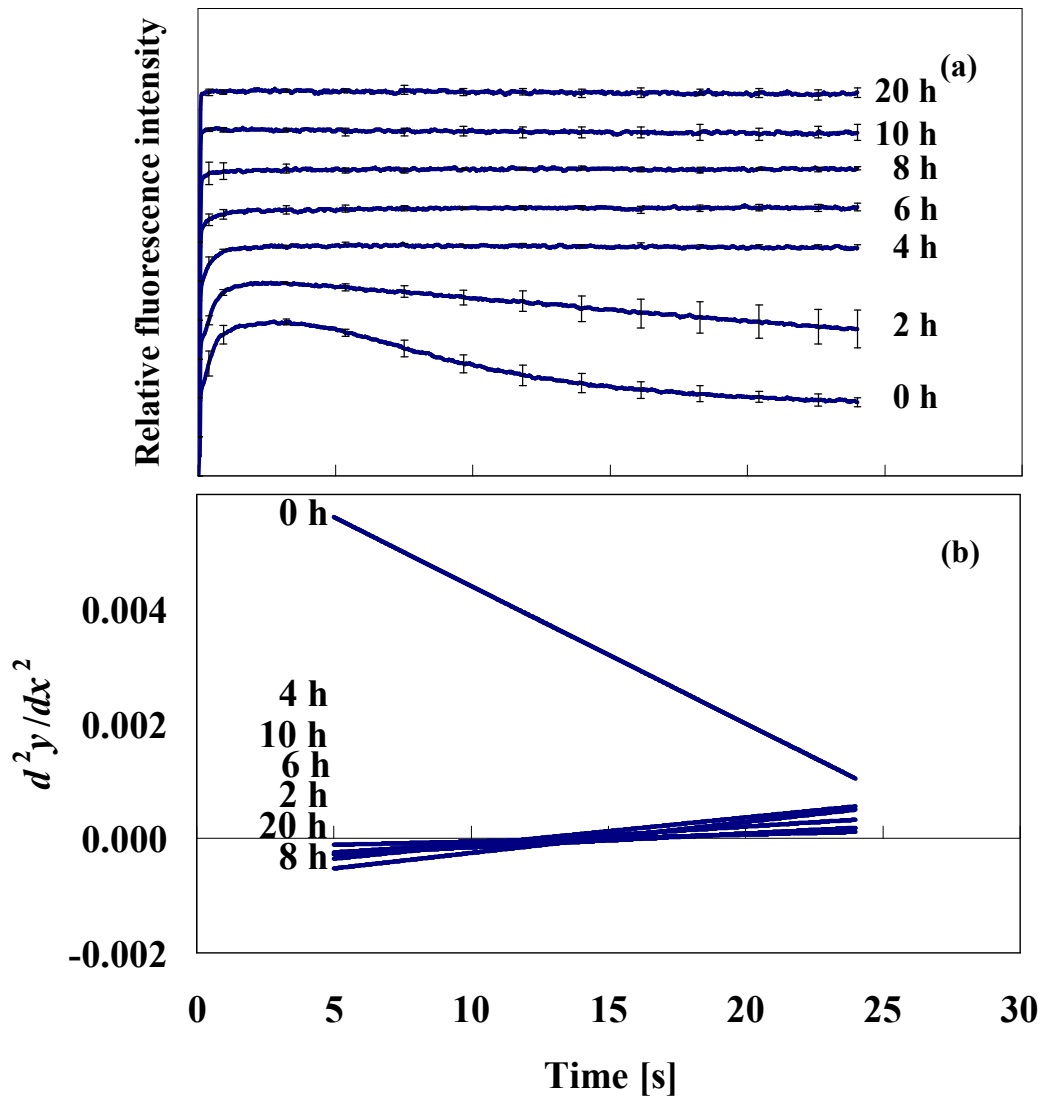


Fig. 2.13 Effects of water stresses on (a) induction kinetics of leaves of *Q. myrsinifolia*, and (b) the second derivative of 5–24 s curves shown in (a). Times [h] in figure are the lapsed time after the detachment. The vertical bar indicates \pm SD in (a).

Table 2.4 The coefficient a of Eq. 1 and the inflection point I_p (Eq. 2) of the curves in Fig. 2.13 for leaves of *Q. myrsinifolia*. Times are the lapsed time after the detachment. *x not calculated in case of $a < 0$.

Time [h]	a [s^{-3}]	I_p [s]
0	-4.0×10^{-5}	*x
2	8.0×10^{-6}	13
4	2.0×10^{-6}	15
6	4.0×10^{-6}	17
8	9.0×10^{-6}	15
10	4.0×10^{-6}	17
20	5.0×10^{-6}	13

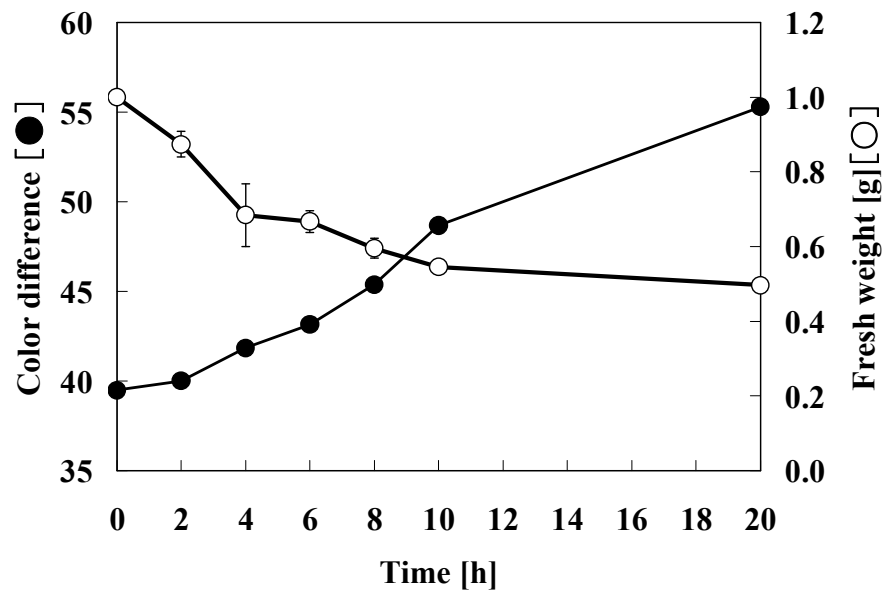


Fig. 2.14 Changes in fresh weight and color difference of the detached leaves of *Q. myrsinifolia*. Time is the lapsed time after the detachment. The vertical bar indicates \pm SD.



(a) 0h.

(b) 10h.

Fig. 2.15 The detached leaves of *Q. myrsinifolia* after 0 and 20 hours.

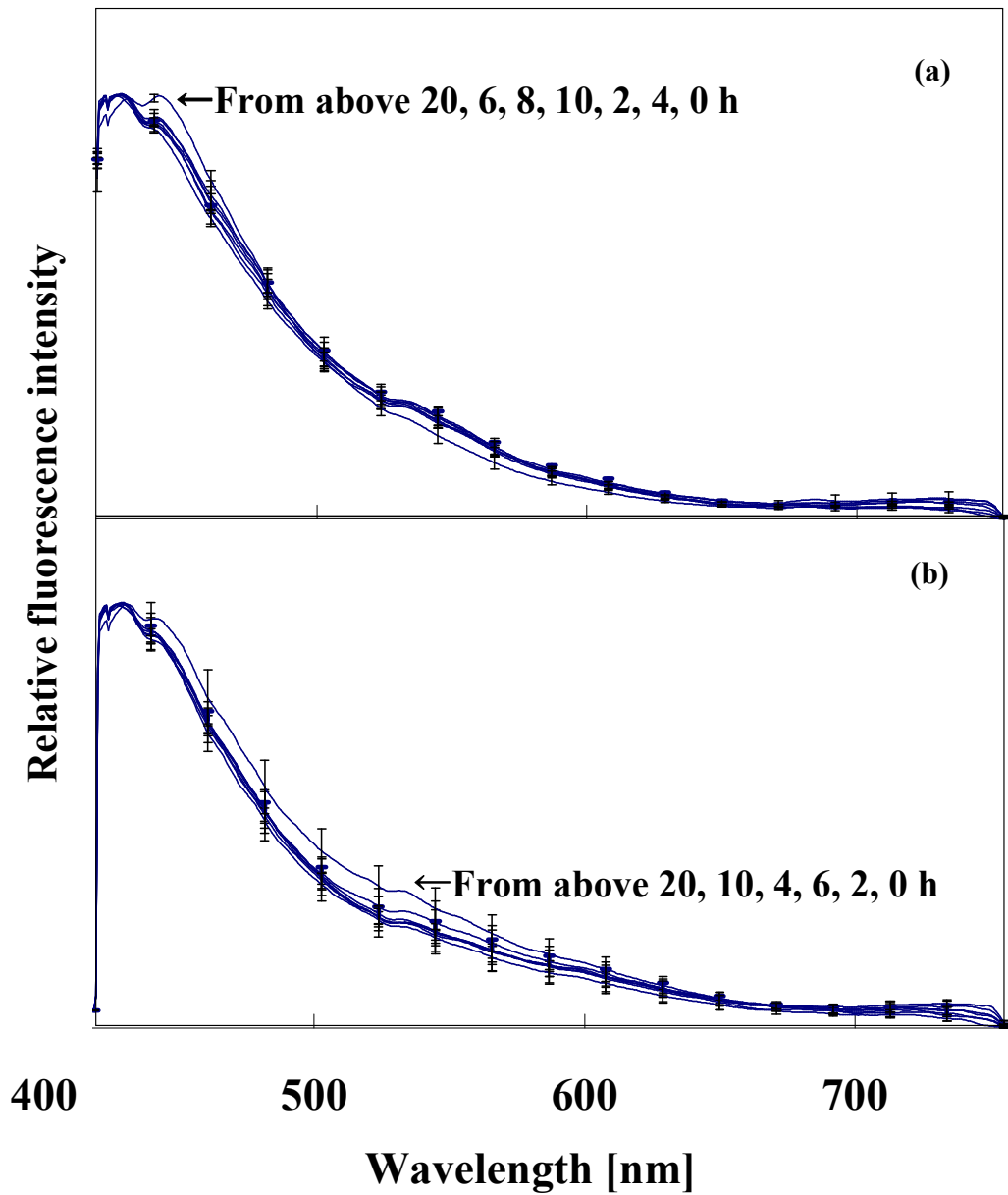


Fig. 2.16 Effects of water stress on LIF spectra of the detached leaves of (a) *C. camphora* and (b) *Q. myrsinifolia*. Spectra are normalized by the values at 738 nm. Times in figure are the lapsed times after the detachment. The vertical bar indicates \pm SD.

2.5 考察

Fig. 2.7~2.9の結果は、クロロフィル蛍光の誘導期現象の第2次導関数法による解析値および蛍光スペクトルが、弱光ストレスの影響を検知できることを示した。どちらの測定結果も、弱光ストレスの影響の検知が可能である。

水ストレスの実験における誘導期現象の変化には、

- ①水ポテンシャルの低下
- ②気孔の閉鎖と光合成速度の低下

の2つの影響が考えられる。①は直接的な水分欠乏であり、②は二次的な影響である。アトリウムにおいて灌水が停止した際には、②が生じた後、①の影響が現れると予想できる。本実験では、Fig. 2.11, 2.14に示した生重量の減少から、切り取った葉からの水分の蒸発が確認できる。このことから、主に①の水ストレスがかかっている可能性が高い。比較的極端な状態であるが、アトリウムで想定される水ストレスを実験的に再現していると考えられる。Fig. 2.10とFig. 2.13の結果は、水ストレスの影響を、誘導期現象を第2次導関数法で解析し検知できることを示した。特にクスノキの結果では、色差に変化が現れる前、すでに2時間経過後には係数 a に変化が現れた (Fig. 2.10, 2.11)。この結果は、葉色の変化より早く、水ストレスの影響を検知できる可能性を示唆している。

弱光ストレスの影響は、蛍光スペクトルでもクロロフィル蛍光の誘導期現象でも検知できたのに対し、水ストレスの影響は、クロロフィル蛍光の誘導期現象でしか検知できなかった (Fig. 2.16)。蛍光スペクトルで水ストレスを検知できなかった理由は、本実験で与えたような短期的な水ストレスでは、葉内の色素構成に変化が起らなかったためと考えられる。

アトリウムでは、外観の変化より早い時期に樹木がストレスの有無を判定しなければならないことを考えると、本研究の目的には、クロロフィル蛍光の誘導期現象が適しているといえる。

蛍光の誘導期現象は、5-24秒間の誘導期現象曲線を3次式で近似した後、2回微分して、定量的に評価することができた。この評価に必要な測定時間は、Lichtenthalerら(1986)の Rfd 値の測定時間が5分間であるのに比べ、24秒間と短い特徴をもっている。

第2次導関数法による誘導期現象の評価と弱光あるいは水ストレスとの関係は、以下のようにとまとめることができる。

- ・ ストレスを受けていない状態では $a < 0$
- ・ ストレスを受けている状態では $a > 0$

I_p 値は、 $a > 0$ のとき、 I_p 値が大きいほど水ストレスの影響が強い傾向を示す可能性があった。

2.6 まとめ

本章では、LIF法によるクロロフィル蛍光の誘導期現象と蛍光スペクトルの2つの測定手法について、屋内植栽樹のストレスの有無を判定する手法としての可能性を検討した。

屋内で生育する樹木に起こりうる弱光ストレスおよび水ストレスの影響は、クロロフィル蛍光の誘導期現象を第2次導関数法で解析することによって検知できることを提示した。第2次導関数法で解析すると、本章のはじめに掲げた2条件、

- (i) 弱光および水ストレスの強さに応じた変化
- (ii) 葉色に現れるより早い時期の変化

を検知できることを確認し、誘導期現象を第2次導関数法で解析する方法が、ストレス判定法として適当であることを明らかにした。

第3章 極端な光強度の低下によるストレス

3.1	はじめに	41
3.2	材料と方法	42
3.2.1	暗黒ストレス	42
3.2.2	クロロフィル蛍光誘導期現象の測定と解析	42
3.2.3	葉内糖含量の測定	43
3.3	結果	46
3.3.1	誘導期現象（第2次導関数法）の変化	46
3.3.2	葉内糖含量の変化	46
3.4	考察	54
3.4.1	誘導期現象（第2次導関数法）	54
3.4.2	葉内糖含量	54
3.4.3	誘導期現象（第2次導関数法）と葉内糖含量の関係	55
3.5	まとめ	57

第3章 極端な光強度の低下によるストレス

3.1 はじめに

前章では、LIF法によるクロロフィル蛍光の誘導期現象の第2次導関数法による解析値が、弱光ストレスと水ストレスの両方を検知できることから、ストレス判定法としての適性を提示した。

本章では、屋外から屋内へ樹木を搬入する際に生じる、極端な光強度の低下の影響の検知を試みる。前章で述べた長期間にわたる弱光ストレスと比較し、樹木の反応が異なる可能性がある。

最も強い光強度の変化として、屋内環境への順化期間を置かず植栽する場合を想定する。光強度の変化に対する、速やかな反応を得るため、樹木を暗黒下に置いて暗黒ストレスを与え、クロロフィル蛍光の誘導期現象の変化を第2次導関数法で解析する。

さらに、誘導期現象による測定と併せて、葉内糖含量の測定を行う。葉内に蓄積された糖は、光合成産物であり (Austin, 1972; 岩崎ら, 1995), これを調べることによって、光や温度など環境要素の影響だけでなく、光合成産物の転流も推察することができる (増田, 1977; 沢田, 1996)。暗黒ストレスに対する、葉内の主要な糖類の含量の変化を指標に、誘導期現象と比較して、暗黒ストレスに対する樹木の反応を考察する。

3.2 材料と方法

3.2.1 暗黒ストレス

実験には、樹高 2.5–3.0 m の常緑広葉樹から、陽樹に分類されるヤマモモ (*Myrica rubra*) 3 本と陰樹に分類されるモッコク (*Ternstroemia gymnanthera*) 5 本の素焼きの鉢植えを使用した。これらの樹木は、購入後およそ 6 ヶ月～1 年間、つくば市内の屋外で生育させた後、温湿度制御可能なグロースチャンバ (幅 3,600 mm, 奥行き 3,600 mm, 高さ 7,000 mm) 内に搬入した。グロースチャンバ内は、植栽を設けているアトリウムの年間平均温湿度である 24°C, 40% に制御した。光強度の低下に対する応答を速めるため、チャンバ内は照明をせず、暗黒にした。暗黒下にヤマモモを約 1 ヶ月間、モッコクを約 1.5～2 ヶ月間にわたって置き、樹木が著しい落葉に至るまで続けた。暗黒処理の期間中は、鉢土の乾き具合に応じて灌水した。チャンバ内に一度に設置できる最大の鉢数が 3 鉢であったことから、まず 3 鉢の実験を行い、実験が終了次第、次の 3 鉢をチャンバ内へ搬入して、順次実験を行った。合計 8 本の樹木の実験は、約 8 ヶ月の間を、後で述べる A–C 期の 3 回に分けて行い、チャンバ内へ搬入する直前までは屋外で生育させた。Table 3.1 に示すように、A 期は 4～5 月、B 期は 7～8 月そして C 期は 10～11 月に実施した。実験に用いた樹木は、A 期はヤマモモ、B および C 期はモッコクである。

暗黒ストレスを与えた期間中の変化を調べるために、実験開始直後からおよそ 20 日目までは 1 日おきに、それ以降には落葉が著しくなったため、6 日おきに葉を採取し測定を行った。採取した葉は、クロロフィル蛍光の誘導期現象を測定した後、同葉を破碎して高速液体クロマトグラフィによる葉内糖含量の測定を行った。蛍光の誘導期現象および葉内糖含量とも、1 樹木あたり 3 枚の葉を測定した。また、A および B 期の実験が終了した時点で、暗黒ストレスを与えた後の落葉状況を把握する必要があると考え、C 期に実験を行ったモッコク 3 本については、実験開始から終了までの間、樹木 1 本につき任意の枝 15 本の葉数を調べ、実験開始前の葉数と比較して葉の残っている割合 (LR-proportion) を求めた。

3.2.2 クロロフィル蛍光誘導期現象の測定と解析

クロロフィル蛍光の誘導期現象の測定装置は、2 章 2.2.3 項に記載したものと同一装置を使用した。ただし、試料フォルダ下部に恒温槽 (島津製作所, BW-4, SC-1S) からの水流を通し、フォルダ部を一定温度にし、葉面温度を一定に保つことが可能な構造に変更した (Fig. 3.1)。

採取した試料葉は、乾燥を防ぐため、葉柄部切り口をぬれたペーパータオルで包んで保護した。24°C に設定した試料フォルダ内に葉をセットし、20 分間の暗処理を行った後、レーザ光を

照射し、照射開始から 24 秒間の葉表面からの誘導期現象を測定した。

測定で得られた蛍光強度曲線は、前章で提示した第 2 次導関数法で解析した。係数 a と I_p のうち、 I_p に目立った変化が確認できなかったため、本章での評価には係数 a を用いた。

3.2.3 葉内糖含量の測定

誘導期現象を測定した後の葉は、高速液体クロマトグラフィ (Hewlett Packard, HP1050) により葉内の糖含量を測定した。本実験では、スクロース、グルコース、フルクトースの 3 種を測定対象とした。

誘導期現象を測定した後の葉から約 0.5 g を秤量、凍結破碎し、80%エタノールにて糖を抽出、遠心分離 (TOMY, SRX-201) により可溶性糖分画を得た。この分画から減圧遠心 (EYELA, CVE-100) によりエタノールを除去した後、ジクロロメタンおよび前処理カラム (Waters, Sep-Pak PS-2 Plus) にて色素、タンパク質を取り除き、試料を作成した。移動相として H_2O を 1.0 ml min^{-1} の流量で使用した。カラム (Shodex, SP0810P, SP0810) を通過し分離された試料は、示差屈折計検知器 (Shodex, RI-71) によって分離定量した。作業手順を Fig. 3.2 に示した。

Table 3.1 The trees used and the periods of experiments.

Code	Trees	The number of trees	Experimental period
Period A	<i>M. rubra</i>	3	April–May
Period B	<i>T. gymnanthera</i>	2	July–August
Period C	<i>T. gymnanthera</i>	3	October–November

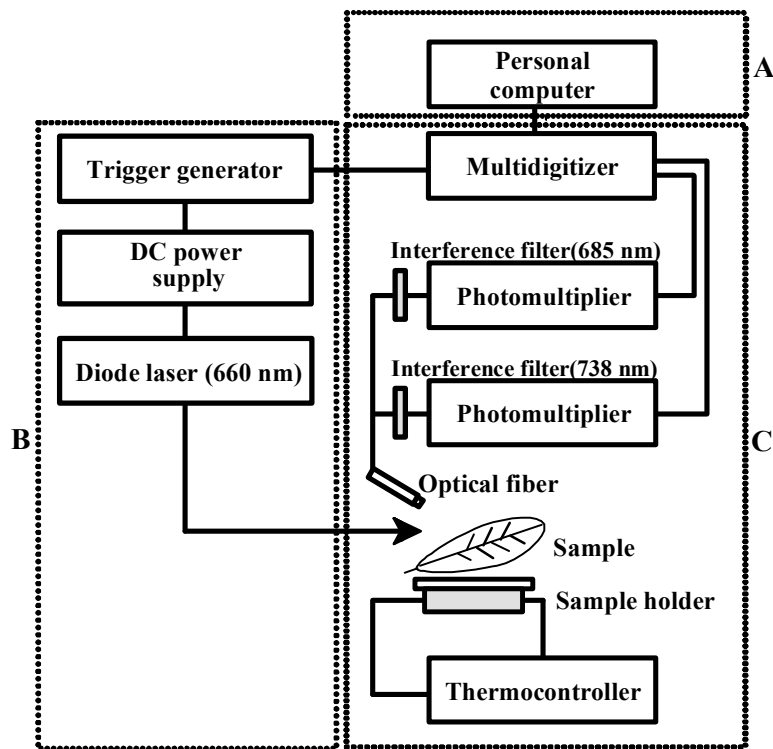


Fig. 3.1 Block diagram of the measurement system of chlorophyll fluorescence induction kinetics. A: data processing unit, B: light source unit, C: spectrophotometry unit.

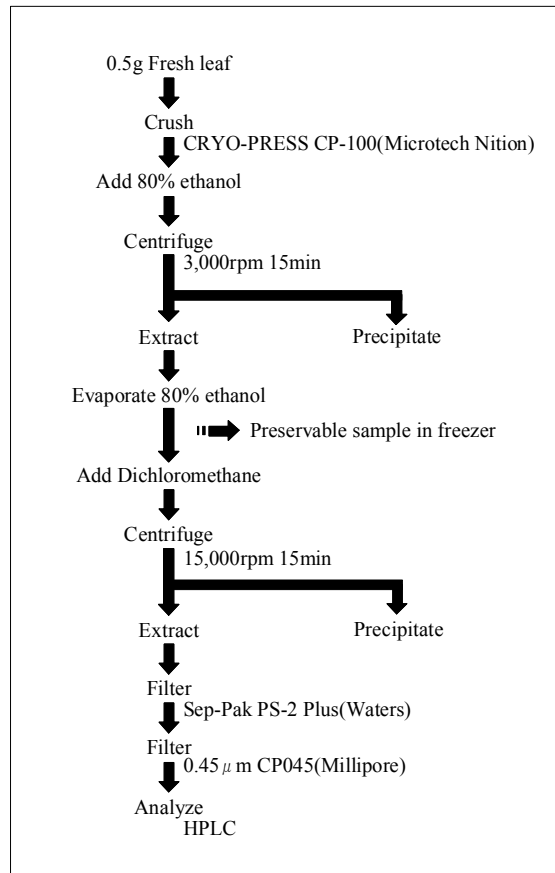


Fig. 3.2 Preparation procedure of HPLC analysis of leaf sugar content.

3.3 結果

3.3.1 誘導期現象（第2次導関数法）の変化

Fig. 3.3 に実験に用いたヤマモモの様子を示す。萌芽の少し前の状態で実験を行ったヤマモモの A 期においては、暗黒下に設置後に蛍光の誘導期現象は大きく変化しなかった (Fig. 3.4)。第2次導関数法で解析した結果でも、暗黒ストレスの影響を明確に検知することはできなかった。

葉が十分に生長した状態の樹木を用いた B 期のモッコクは、暗黒ストレスを与えた後の日数経過にともなって蛍光の誘導期現象に変化がみられた (Fig. 3.5, 3.6)。第2次導関数法による解析の結果、日数の経過にともなって、得られた第2次導関数の傾きが負から正に転じることが示された。

Fig. 3.7 に実験に用いた C 期のモッコクの様子を示す。C 期のモッコクには、A 期ヤマモモの結果と同様、実験開始後の蛍光の誘導期現象に明らかな変化はみられなかった (Fig. 3.8)。

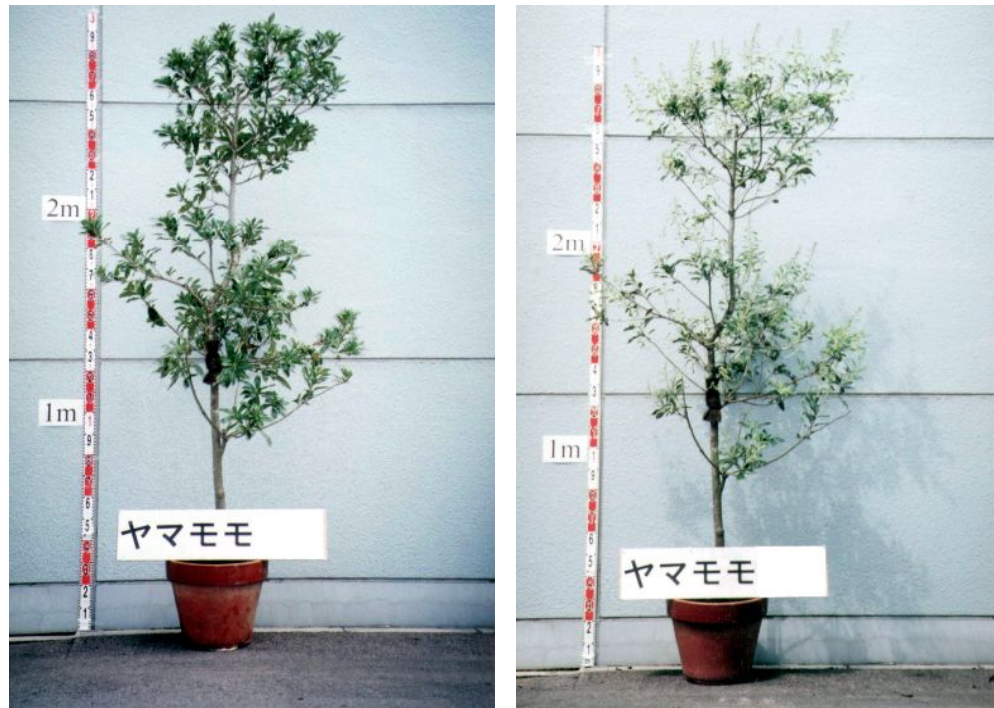
3.3.2 葉内糖含量の変化

測定を行ったスクロース、グルコース、フルクトースとも、実験開始後の含量の変化は、ほぼ同様の傾向を示した。そこで以降は、これらの糖3種を総括して結果を述べる。

実験を行った時期に関係なく、暗黒ストレスを与えた後の日数が進むにつれて、葉内糖含量に変化がみられた (Fig. 3.9)。A 期や C 期には、実験開始後に一旦、葉内糖含量が低下した後、一時的に含量が高くなる現象が観察された (Fig. 3.9 (a), (c))。

B 期は、5月初めに展開した葉が生長を終えた時期である。実験前の葉内糖含量は A および C 期と比較して高い値を示した (Fig. 3.9 (b))。

Fig. 3.9 (c) の結果からは、実験開始から10日目過ぎ、葉内糖含量が下がりきった後に落葉が始まることがわかった。



(a) Before the dark treatment.

(b) After 26 days dark treatment.

Fig. 3.3 The change in *M. rubra* appearance with the dark treatment in April–May (Period A).

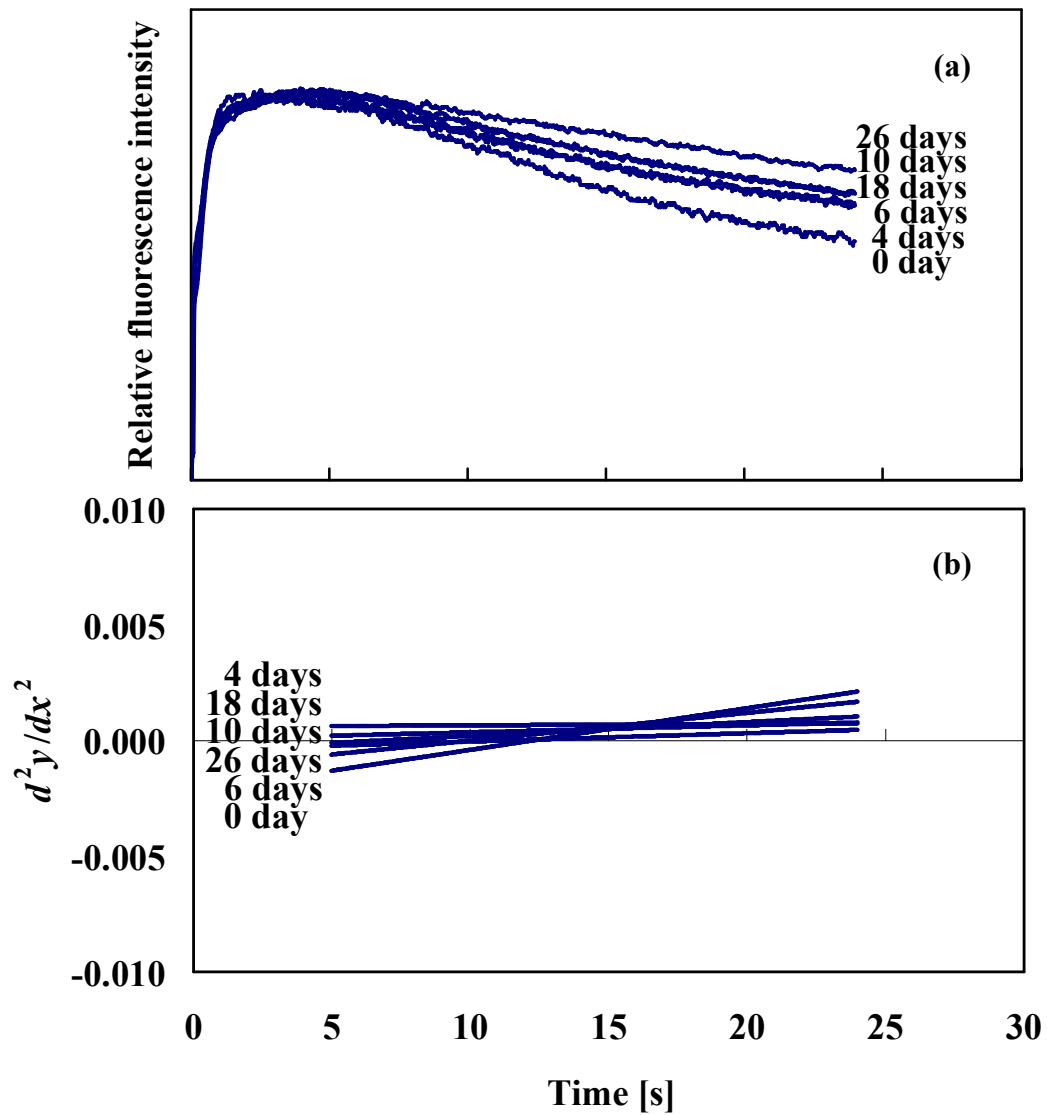
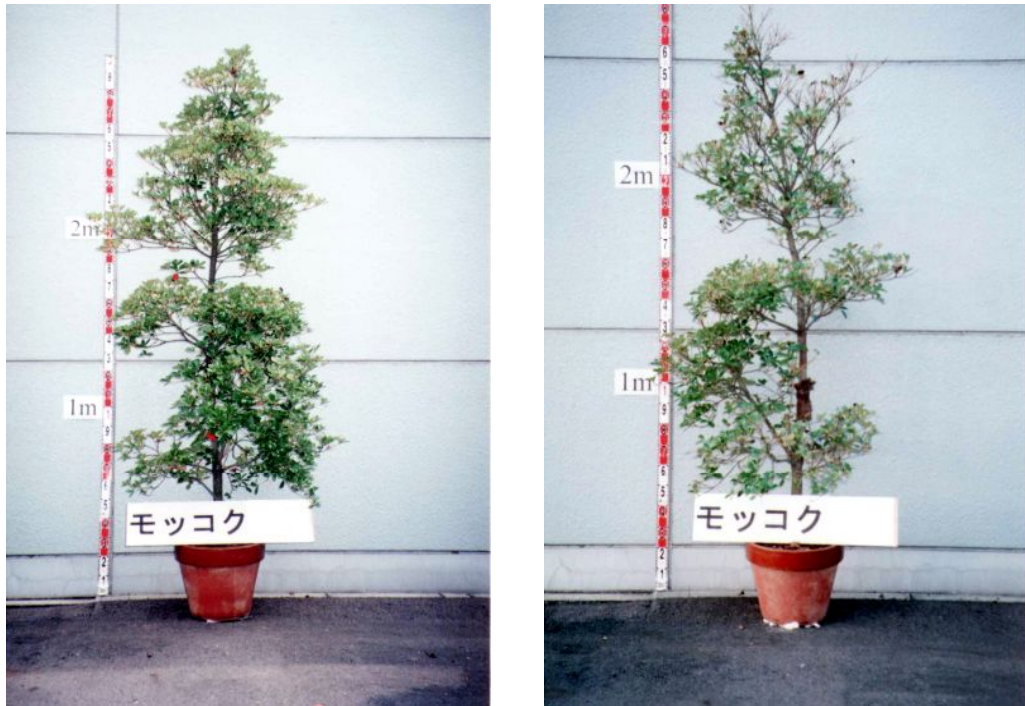


Fig. 3.4 Changes in (a) induction kinetics of leaves of *M. rubra* in April–May (Period A) with the dark treatment and (b) the second derivative of 5–24 s curves shown in (a). Days indicate the duration of dark treatment.



(a) Before the dark treatment.

(b) After 57 days dark treatment.

Fig. 3.5 The change in *T. gymnanthera* appearance with the dark treatment in July–September (Period B).

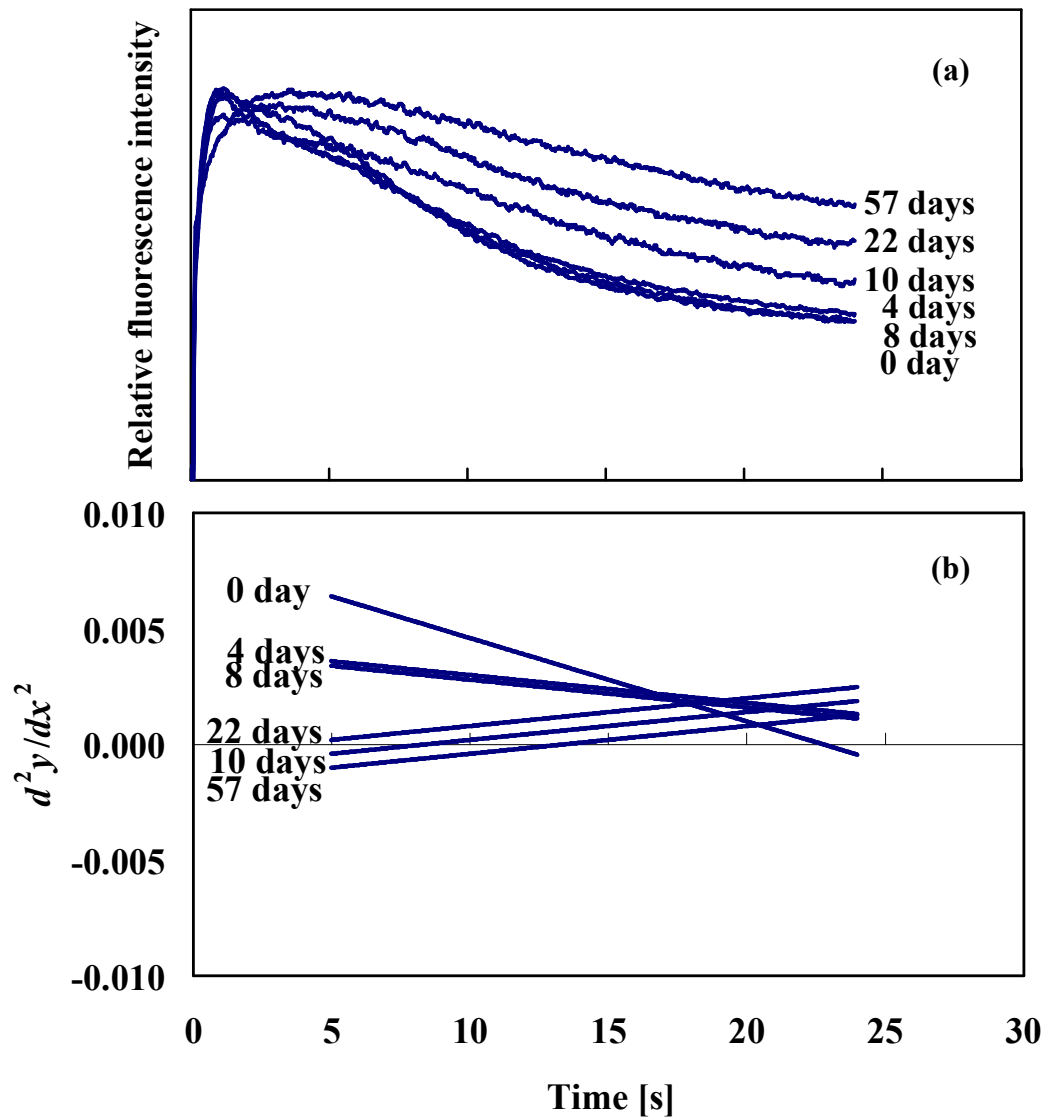


Fig. 3.6 Changes in (a) induction kinetics of leaves of *T. gymnanthera* in July–September (Period B) with the dark treatment and (b) the second derivative of 5–24 s curves shown in (a). Days indicate the duration of dark treatment.



(a) Before the dark treatment.

(b) After 42 days dark treatment.

Fig. 3.7 The change in *T. gymnanthera* appearance with the dark treatment in October–November (Period C).

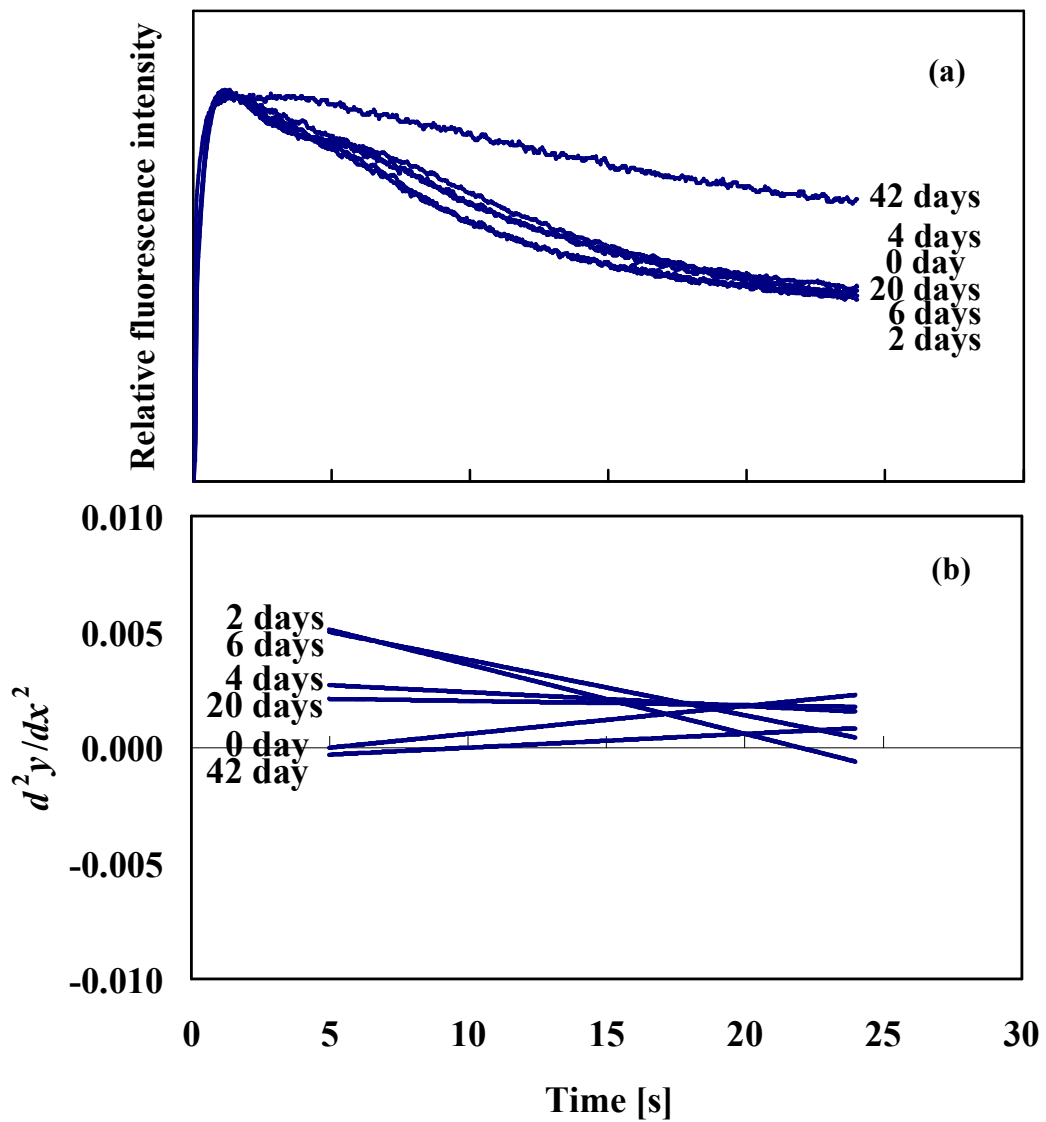


Fig. 3.8 Changes in (a) induction kinetics of leaves of *T. gymnanthera* in October–November (Period C) with the dark treatment and (b) the second derivative of 5–24 s curves shown in (a). Days indicate the duration of dark treatment.

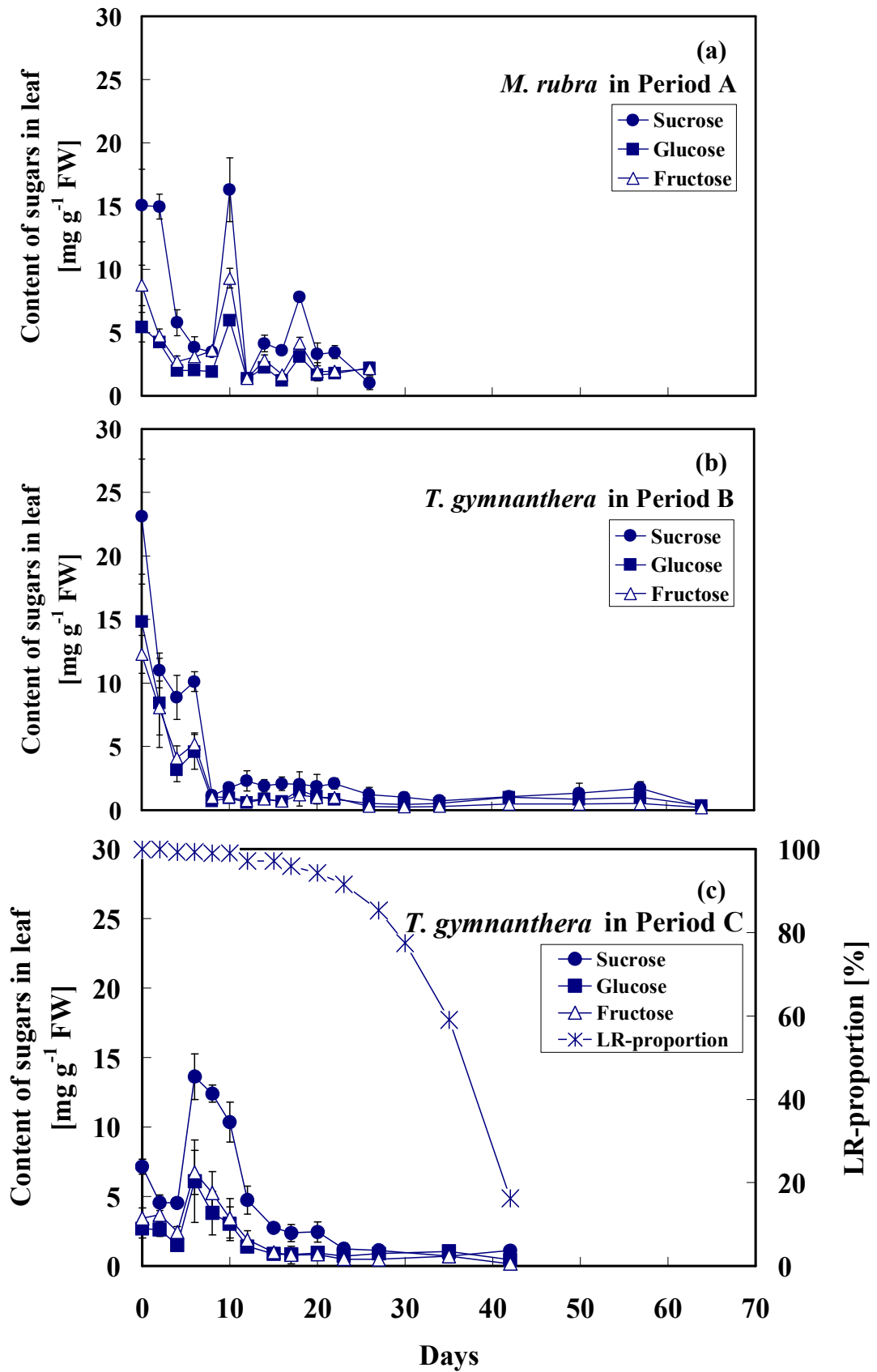


Fig. 3.9 Changes in content of sugars in leaves with the dark treatment. Days indicate the duration of dark treatment. LR-proportion in figure (c) indicates the proportion of leaves remaining on the tree. The vertical bar indicates \pm SD.

3.4 考察

3.4.1 誘導期現象（第2次導関数法）

B期のモッコクの第2次導関数法による解析結果は、前章で提示した弱光および水ストレスの影響と関数の傾きとの関係が本実験にも適用できると仮定すると、実験開始から8日目までは暗黒ストレスの影響が少なく、10日目以降には暗黒ストレスの影響から光化学反応系の酸化還元反応が滞ったと考えられる (Fig. 3.6 (b))。

A期のヤマモモ (Fig. 3.4) およびC期のモッコク (Fig. 3.8) において、蛍光の誘導期現象に変化が現れなかったのは、暗黒ストレスを与える前の屋外の環境が樹木個体や葉に影響を及ぼしたと考えられる。その理由として、暗黒ストレス実験開始時の葉内糖含量の違いが挙げられる (Fig. 3.9)。この糖含量の違いは、季節によって同化器官能力が変動する (岡崎ら, 1978) などの知見から、屋外における季節ごとの気温の変化や、それにもなつて周期的にみられる葉の展開、生長、落葉などの生理的变化の影響を強く受けたためと推察できる。

本実験では、暗黒ストレスに対する樹木ごとの応答特性に違いがないと仮定し、屋内で十分な光を照射した場合の測定をしていない。後述するグロースチャンバ内での年間の誘導期現象の挙動 (Fig. 4.30~32) から、屋内での挙動と暗黒ストレスを与えた樹木の応答特性を比較することができる。

3.4.2 葉内糖含量

Fig. 3.9 (a) および (c) にみられる葉内糖含量の一時的な上昇は、葉内糖含量が減少すると、デンプン等の葉内貯蔵物質の分解が起こり、分解された物質の他器官への転流が生じるという報告 (増田, 1977) から、暗黒ストレスによって光合成機能が停止し、葉内糖含量が減少した後、葉内貯蔵物質の分解が起こったことに起因すると考えられる。特にA期は、芽をたくわえた萌芽直前期であり、その時点で最も新しい葉を測定に用いている。この時期には、多くの貯蔵物質が葉内に存在するため (Lasheen and Chaplin, 1977), Fig. 3.9 (a) にみられる葉内糖含量の上昇が起こったと考えられる。しかし、Fig. 3.9 (a) に顕著にみられる葉内糖含量が減少と増加を繰り返す理由は不明である。

Fig. 3.9 (b) に示すB期のモッコクの葉内糖含量が高い理由として、新葉展開後、光合成活性が高くなっていた (岡崎ら, 1978) ことが考えられる。実験開始後、AおよびC期ほど高い割合で糖含量が上昇しなかったのは、長日時期には葉内貯蔵物質量が低下する (Britz, 1994) ためと推察される。

秋～冬期にかけては、光合成活性が低下するという報告（岡崎ら, 1978; 岡野・松尾, 1994）があり、そのことによってC期における実験前の葉内糖含量は、A期あるいはB期と比べて低い値を示したと考えられる。また、冬期に向けて、あるいは葉の生長にともなって、葉内貯蔵物質が多く生成されることがわかっている（Lasheen and Chaplin, 1977）。このことから、A期と同様の、C期の糖含量の一時的な上昇（Fig. 3.9 (c)）は、B期よりも葉内貯蔵物質が多く生成され、その貯蔵物質の分解されたことに因ると考えられる。

3.4.3 誘導期現象（第2次導関数法）と葉内糖含量の関係

B期における第2次導関数法で解析した誘導期現象と葉内糖含量の挙動を比較する（Fig. 3.10）。比較には、最も含量の変化が大きく現れたスクロースを用いた。スクロースの含量は暗黒ストレスによって低下し、8日目あるいは10日目には、ほぼ底値を示した。その同時期に、第2次導関数の傾きもまた負から正に転じ、第2次導関数法の解析結果と葉内糖含量がよく対応することがわかった。このことから、糖含量が底値を示すときを葉の生理状態の変化を示すひとつの目安とすると、係数 a によるストレス判定の妥当性が明らかになったと考えられる。

Fig. 3.9 (c) から、落葉は葉内糖含量が増加と減少を繰り返した後、低下しきった後に起こることがわかる。このことは、第2次導関数法で解析した誘導期現象が、落葉の前に樹木の光強度の変化によるストレスを検知できる可能性を示している。

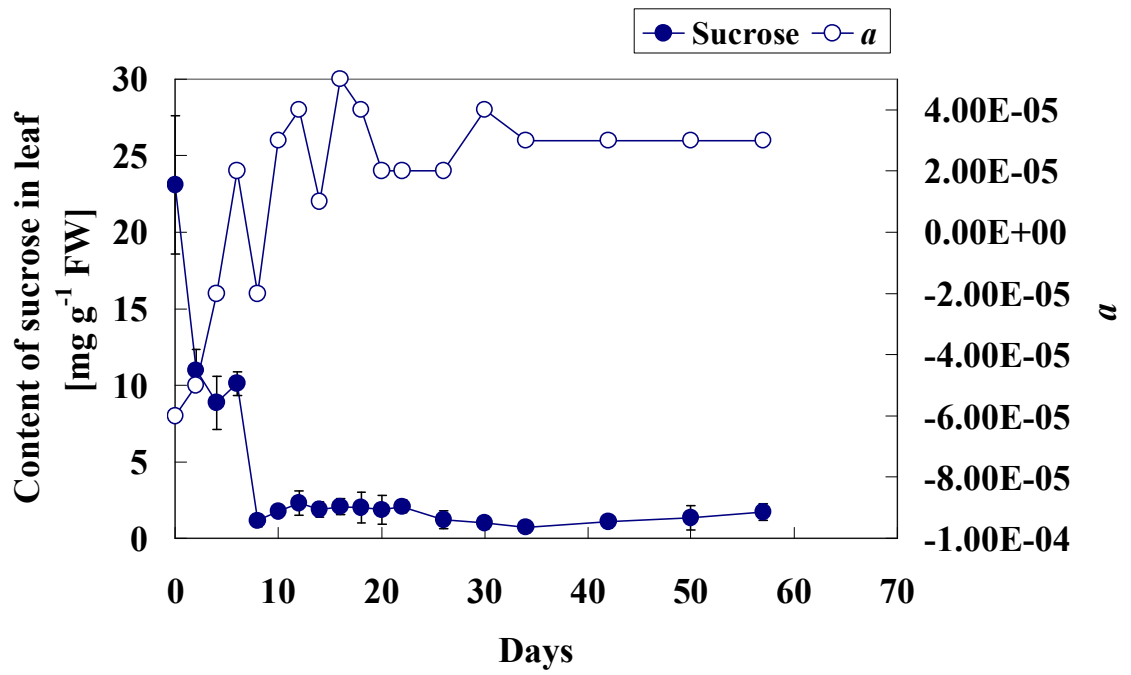


Fig. 3.10 Changes in the content of sucrose in leaves and the coefficient a of the second derivative method of 5–24 s curves in induction kinetics with the duration of dark treatment period (Period B). The vertical bar indicates \pm SD.

3.5 まとめ

本章では、屋外から屋内に樹木を搬入し植栽する際の、極端な光強度の低下によるストレスが、夏期においてはクロロフィル蛍光の誘導期現象を第2次導関数法で解析することによって検知できることを示した。加えて、季節変化によって光合成能力が低下する時期には、そのストレスの影響が現れないという性質も明らかになった。

また、誘導期現象、葉内糖含量、落葉率の推移を調べた結果から、落葉の前にストレスの有無を検知できる可能性を示した。

ここまで、クロロフィル蛍光の誘導期現象を第2次導関数法で解析することで、弱光ストレス、水ストレスおよび極端な光強度の低下によるストレスを多くの場合、検知できることを提示した。しかしこれらはいずれも、屋外環境での、あるいは、屋外環境から屋内環境への変化に関する実験結果である。特に本章で明らかになった季節変化の影響を受ける性質は、年間を通じて環境変動の少ない屋内でも、同様であるかを確認する必要がある。この点を次章で明らかにする。

第4章 季節変化のない環境

4.1	はじめに	59
4.2	ポータブルな誘導期現象測定1号機(Dias I)の製作	60
4.2.1	製作の目的	60
4.2.2	システム構成	60
4.2.3	Dias I 製作のまとめ	61
4.3	ポータブルな誘導期現象測定2号機(Dias II)の製作	70
4.3.1	製作の目的	70
4.3.2	システム構成	70
4.3.3	Dias II 製作のまとめ	70
4.4	測定装置製作のまとめ	74
4.5	パラメータ MM 法による誘導期現象の評価	75
4.5.1	評価指標	75
4.5.2	計算手順	75
4.5.3	計算結果	76
4.6	実験	80
4.7	結果	83
4.7.1	年間の変化	83
4.7.2	光強度の違い	83
4.7.3	病害の検知	83
4.8	考察	89
4.8.1	季節変化の有無と光強度の影響	89
4.8.2	ストレス判定の限界	89
4.9	まとめ	90

第4章 季節変化のない環境

4.1 はじめに

本章では、屋内環境下における誘導期現象の年間の挙動を明らかにする。これにより、3章で示した季節変化と誘導期現象の関係が、屋内でも同様かを検証する。

また本章では、誘導期現象を定量評価する新たなパラメータを提案する。これまでの第2次導関数法は、弱光ストレスや暗黒ストレスの程度を、ストレスの影響の度合いに応じてよく反映したが、水ストレスでは、ストレスの有無は検知するが、ストレスの程度を評価するには至っていなかった。新しいパラメータでは、この点を改良し、ストレスの程度を検知できるようにする。

さらに、新しい測定装置を製作する。2章と3章で用いた蛍光測定装置は、2波長の蛍光を同時に測定する機能を持ち、誘導期現象を3分以上測定できる性能を備えたものであった。しかしこれまでに、短時間かつ1波長の測定データだけで、必要なデータが得られることがわかっている。加えて、年間の継続的な測定には、葉を採取せずに測定できるポータブルな装置が必要である。そこで、ストレス判定に必要なデータのみを測定するポータブルな装置を製作し、本章の測定に使用した。この装置は、将来の実用化をも視野に入れて検討・製作したものである。

4.2 ポータブルな誘導期現象測定1号機 (Dias I) の製作

4.2.1 製作の目的

前章までで用いた、実験室設置型の測定装置の汎用性を、ストレス判定に必要なデータのみを測定する仕様に絞り込み、最低限必要な機能を備え、かつポータブルな測定装置を製作する。製作にあたり、次の諸項目を要求仕様とする。

- (1) ポータブルな装置である
- (2) 床上から 1-3 m 高さの範囲で測定ができる
- (3) 測定中に、人による支持を必要としない
- (4) 葉の 20 分間の暗処理ができる
- (5) 738 nm の蛍光を約 25 秒間測定できる

4.2.2 システム構成

前項の要求仕様を満たす装置を製作し、Dias I (ディアス・ワン) と名付けた。Dias I の測定対象は、床面が平らで障害物のない屋内に植えられた高さ 3 m 程度の樹木の葉である。

Dias I の外観を Fig. 4.1 に示す。Dias I は、測定部と制御部から構成される。測定部は、リーフフォルダと三脚からなる。測定葉の近くに三脚を運び、三脚の上にあるリーフフォルダで葉を挟む。20 分間の暗処理後、自動的にレーザを照射して励起された蛍光の誘導期現象を約 25 秒間にわたり測定する。測定されたデータは、テキストファイルとして保存する。

リーフフォルダの断面図を Fig. 4.2 に示す。クランプ部の開閉操作で葉を挟み、葉面に対して 45° でレーザ光を照射する構造である。励起光源には cw 半導体レーザ(アプライドテクノ, MINI-650F-10, 中心波長 650 nm, 出力 1.0 mW) を用いた。葉からの蛍光は、干渉フィルタ(日本真空光学, 直径 20 mm φ, 中心波長 738 nm, 半値巾 3.5 nm, 透過率 84%) を通して、葉面の直上にある光電子増倍管(浜松ホトニクス, H5784-01) で検知した。

リーフフォルダは、ステンレス製のフレキシブルアーム(外径 16 mm, 長さ 300 mm) と雲台(Manfrotto, 308, 耐荷重 4 kg) を用いて三脚(Manfrotto, 075, 可動範囲床上から 420-2,585 mm) と接続し、人の手を使わずに支持できる構造にした。

制御部であるコンソールボックス(幅 300mm, 奥行き 200 mm, 高さ 50 mm) には、信号制御機器を収納した。光電子増倍管からの信号は A/D 変換し、3 ms 間隔でデータを取り込んだ。測定の ON/OFF およびデータの取り込みはパソコン(NEC, VarsaPro VA60J) で制御した。Dias I のシステム概要を Fig. 4.3 に示す。

Dias I は、リーフフォルダに葉を挟み、パソコン画面でスタートボタンを押した後は、20 分間の暗処理時間をおいた後に自動で測定を開始する。Dias I のシステムタイミングチャートは Fig. 4.4 のようになる。測定制御画面を Fig. 4.5 に示す。

Dias I で測定した誘導期現象のデータを Fig. 4.6 に示す。装置の実際の外観を Fig. 4.7～4.13 に示す。

4.2.3 Dias I 製作のまとめ

4.2.1 項に示した要求仕様をすべて満たすポータブルな測定装置 Dias I を製作した。

Dias I は、葉を挟んでスタートボタンを押すだけで誘導期現象の測定ができ、優れた操作性を有する。製作したリーフフォルダは約 700 g あるが、三脚に固定することによって安定性の高い測定ができた。

特殊な機材を用いていないため、製作費用は比較的安価であり、実用的であった。しかし、操作性に優れる一方で、次のような問題点が明らかになった。

- (1) 葉 1 枚あたりの測定に約 21 分を要し、複数枚を測定する場合には、時間がかかり過ぎる。
- (2) リーフフォルダを含めると約 5 kg ある三脚が重く、移動がしにくい。
- (3) リーフフォルダに葉を挟むときの位置合わせがしにくい。

次項では、これらの問題の解決にあたる。

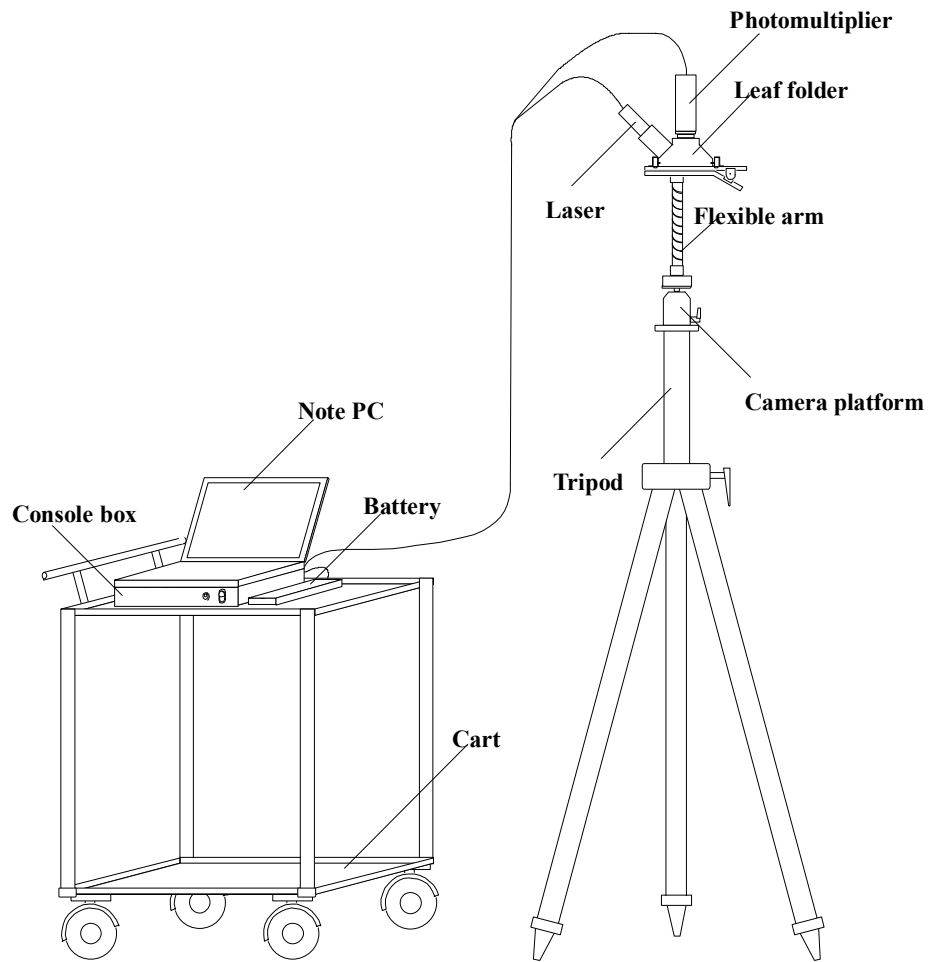


Fig. 4.1 Schematic diagram of the measurement system (Dias I) of laser induced chlorophyll fluorescence induction kinetics for non-detached leaves from a tree.

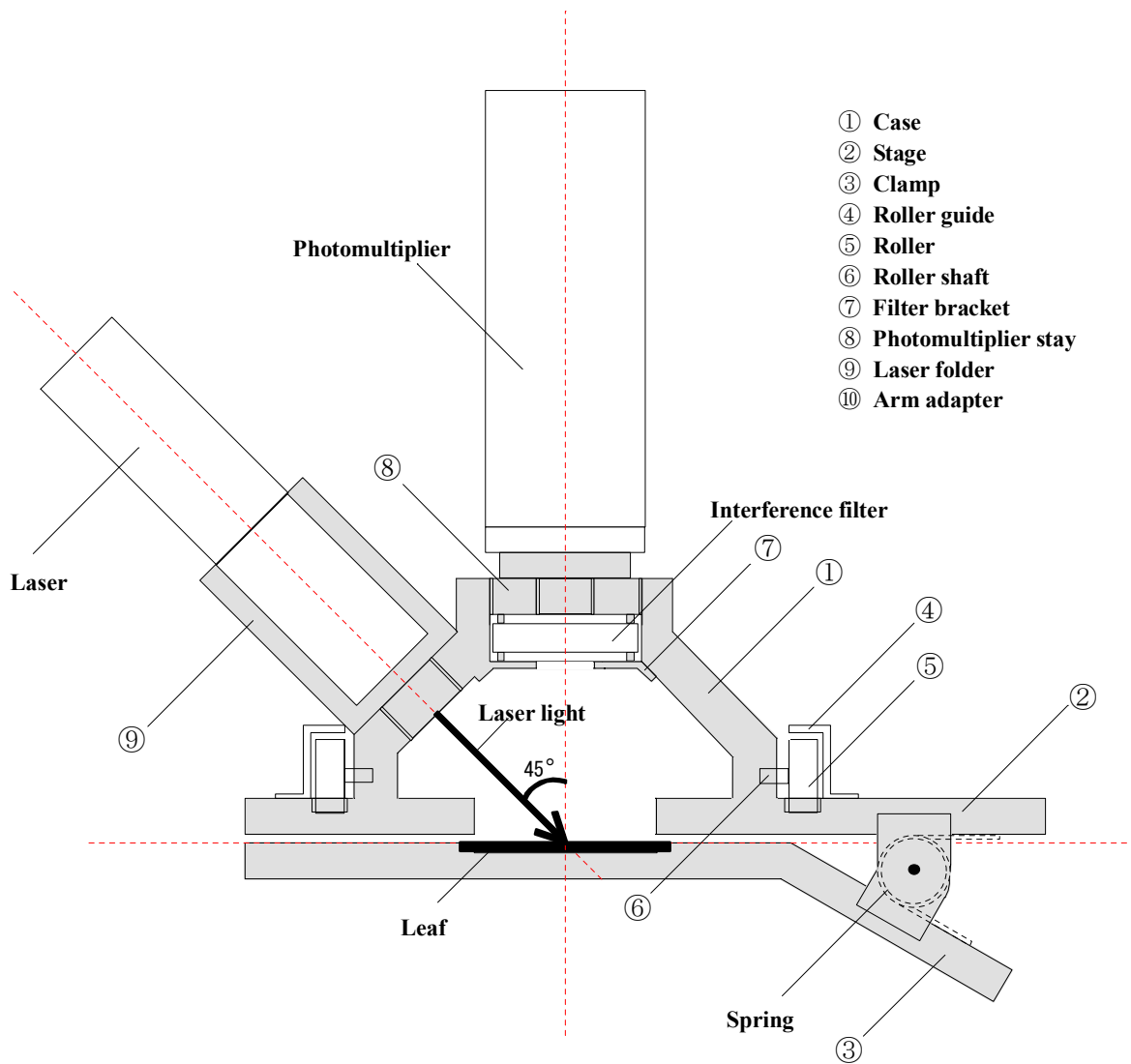


Fig. 4.2 Cross section of leaf folder of Dias I . Laser is incident on the clamped leaf surface at the sample of 45° after the dark treatment.

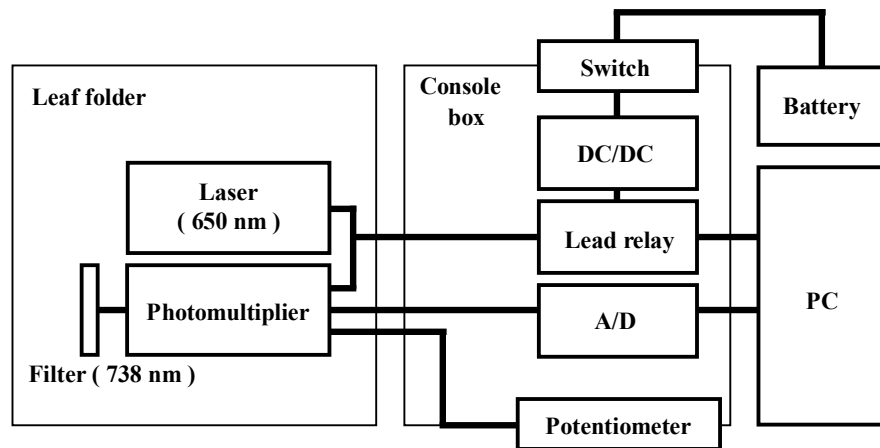


Fig. 4.3 Block diagram of Dias I. The Laser (650 nm) and the photomultiplier are mounted in the leaf folder and fluorescence (738 nm) excited with the laser is measured. The measurement is controlled by the console box and the PC.

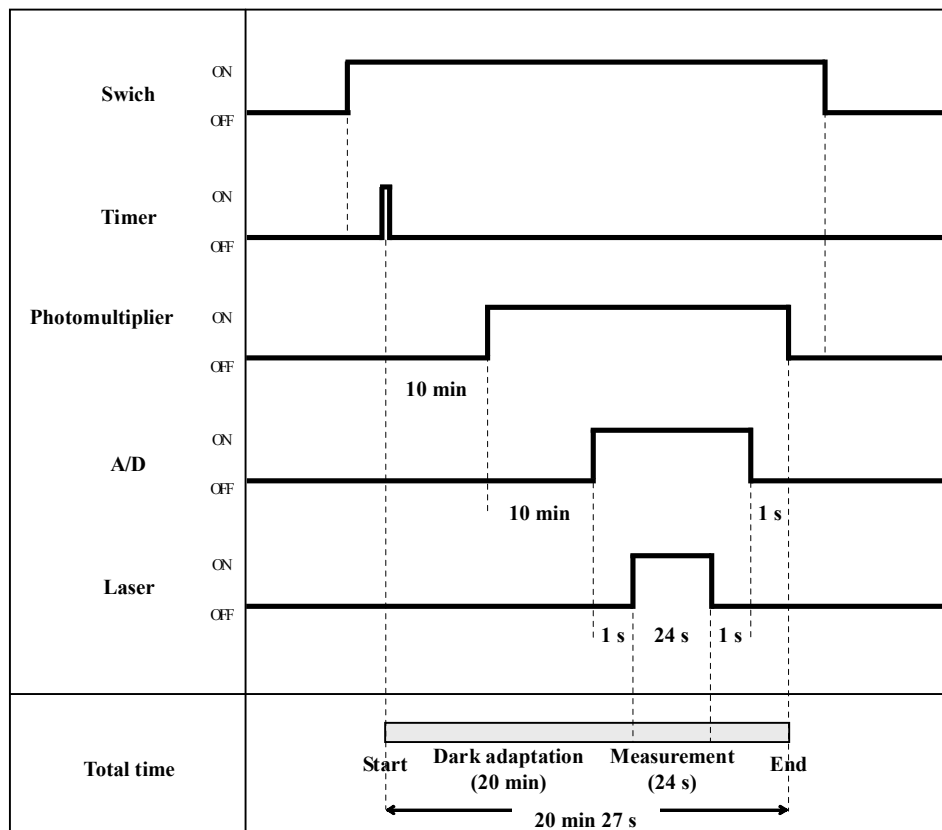


Fig. 4.4 Timing chart of Dias I. It measures fluorescence for 27 seconds after the dark adaptation for 20 minutes.



Fig. 4.5 Graphic user interface of Dias I . Through this interface a user inputs required parameters for the measurement.

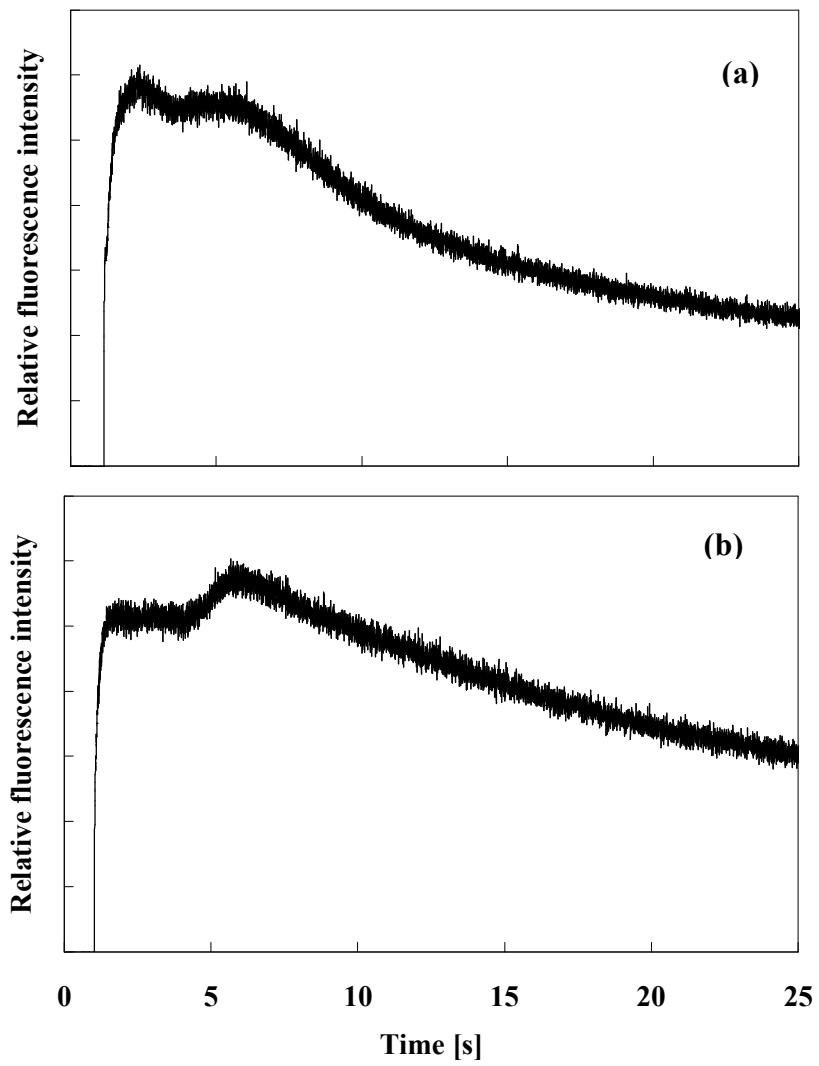


Fig. 4.6 Two examples of fluorescence data obtained using Dias I .



Fig. 4.7 Whole view of Dias I .
Left: leaf folder attached to the tripod,
Right: console box and PC.



Fig. 4.8 Measuring fluorescence using
Dias I . It can measure to a height of 3 m.



Fig. 4.9 Console box and PC of Dias I .



Fig. 4.10 Panel of Dias I .

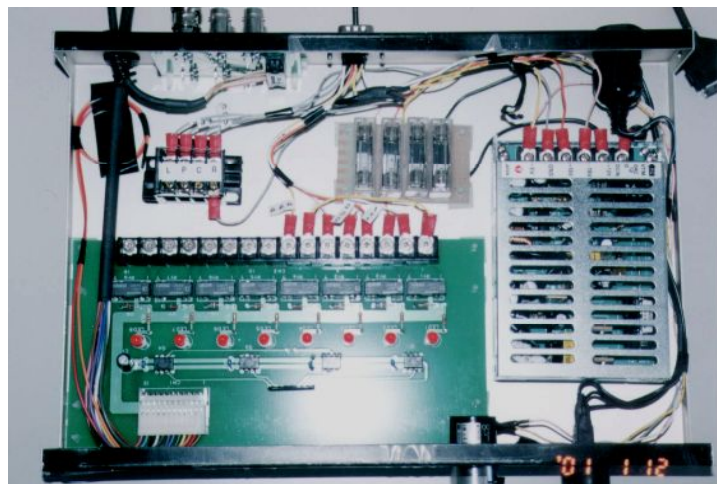


Fig. 4.11 Inside of the console box of Dias I .

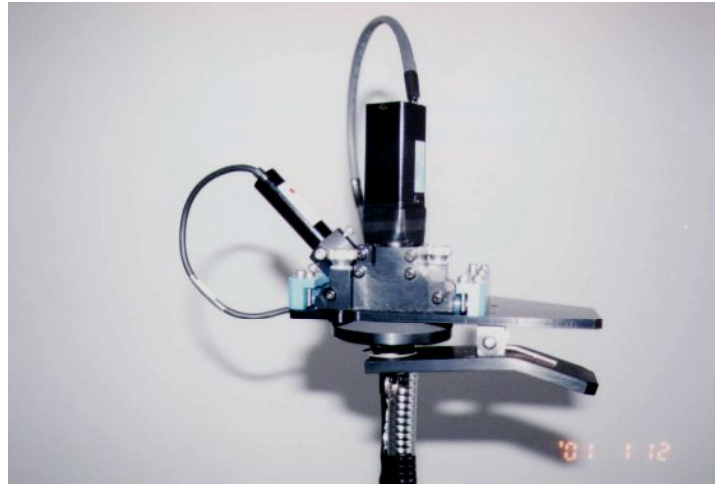


Fig. 4.12 The leaf folder of Dias I . The Laser generator and the photomultiplier are mounted in the leaf folder.



Fig. 4.13 The leaf folder set to a leaf. After setting a cover is slid to make dark adaptation of the leaf.

4.3 ポータブルな誘導期現象測定2号機 (Dias II) の製作

4.3.1 製作の目的

先に述べた Dias I の問題点を解決する、改良型2号機 Dias II (ディアス・ツー) の製作を行う。問題は、リーフフォルダとそれを支持する三脚にあったため、その2点に的を絞って改良を計画する。改良に要求される仕様は、以下の3点である。

- (1) 時間あたりの測定枚数を増やす
- (2) 測定葉を簡単にセットできる
- (3) 装置の移動が楽にできる

4.3.2 システム構成

Dias II のシステム構成を Fig. 4.14 に、システム概要を Fig. 4.15 に示す。本装置では、Dias I の問題点を以下のように解決した。

- (1) 市販の軽量なリーフクリップを使用することで三脚による支持をなくし、複数個のクリップで複数の葉の暗処理が同時にできる構造にした。
- (2) リーフクリップ以外のすべての機器をコンソールボックス内に収納し、コンソールボックスは台車で移動する構造にした。
- (3) 測定する葉へのアプローチは、脚立にのった人の手で行い、光ファイバを用いて励起光を照射し、かつ葉からの蛍光を伝送する構造にした。

リーフクリップ (HEINZ WALZ, DLC-8) には、暗処理のためのスライドカバーがついている。励起光と蛍光の伝送には、樹木の高さに対応できるよう3 m長の光ファイバ (住田光学ガラス, SOG-70) を使用した。改良型である Dias II は、リーフクリップと光ファイバを除き、すべて Dias I と同型の機器を使用した。Dias II の外観を Fig. 4.16~4.21 に示す。

4.3.3 Dias II 製作のまとめ

改良型クロロフィル蛍光誘導期現象測定装置 Dias II を製作した。Dias I と II のサンプルフォルダ部分の違いを Fig. 4.22 に示す。Dias II は、3.7 g/個のリーフクリップを6個使用することで、6枚の葉を同時に暗処理することができる。これにより測定時間を短縮し、効率化を図ることができた。さらに、リーフクリップと3 m長の光ファイバにより、床上から1-3 m高さの測定可能範囲を確保しながら、簡単に葉をはさんで測定できる構造にした。コンソールボックスに収納した機材とパソコンは、台車で簡単に移動できる。

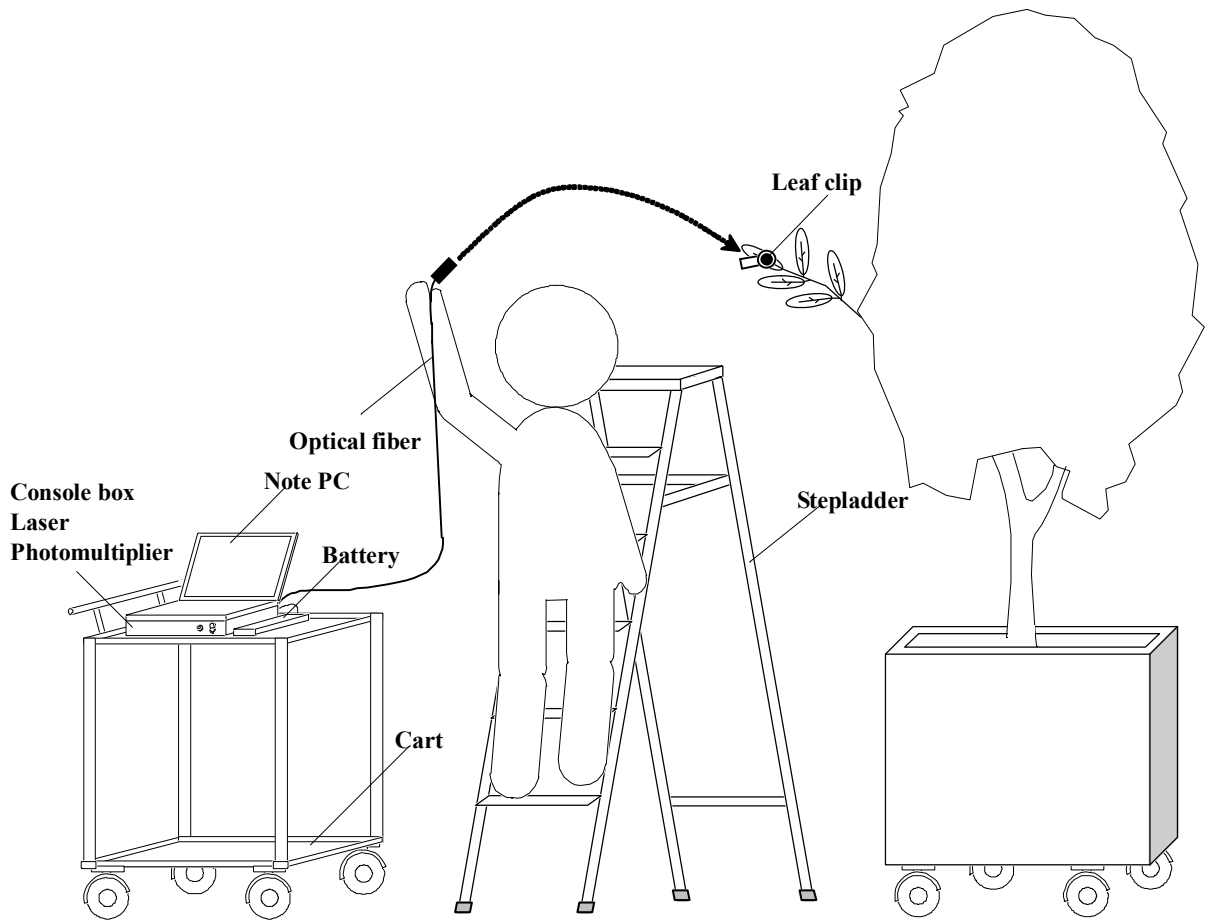


Fig. 4.14 Schematic diagram of the measurement system (Dias II) of laser induced chlorophyll fluorescence induction kinetics for non-detached leaves from a tree. Dias II can simultaneously make dark adaptations of up to six leaves using small clips.

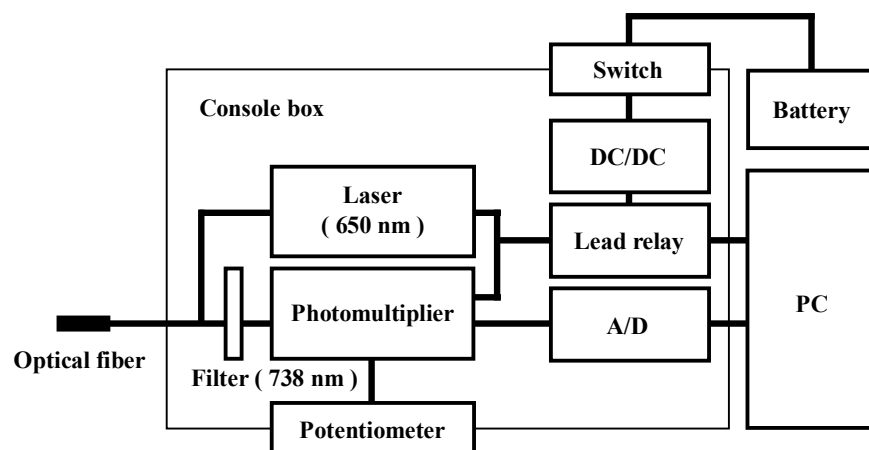


Fig. 4.15 Block diagram of Dias II. The laser generator and the photomultiplier are contained in a console box.



Fig. 4.16 Whole view of Dias II .



Fig. 4.17 Console box and PC of Dias II .



Fig. 4.18 Console box of Dias II (from the side).



Fig. 4.19 Leaves are pinched and dark adapted with the leaf clips.



Fig. 4.20 Measuring fluorescence using Dias II (close up). Laser is irradiated and fluorescence is measured, after setting the optical fiber to a leaf clip.



Fig. 4.21 Measuring fluorescence using Dias II .

4.4 測定装置製作のまとめ

LIF 法によるクロロフィル蛍光誘導期現象のポータブルな測定装置を製作した。製作した Dias I は, Fig. 4.6 のように誘導期現象を正常に測定した。改良型である Dias II は Dias I に比べ, 12 サンプルあたりの測定作業時間をおよそ 1/5 に短縮できた。製作費用も比較的安価で操作も簡単であり, 実用性の高い装置を製作できた。

以降の実験には, Dias I と II を用いた。

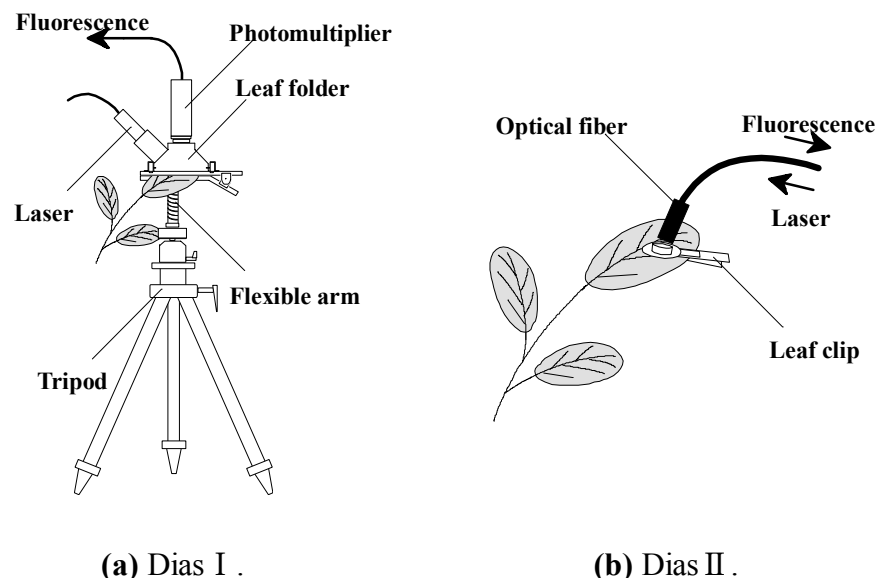


Fig. 4.22 Differences of Dias I and Dias II. (a) the leaf folder is attached to the tripod in Dias I, and (b) the clips can make dark adaptation of some leaves simultaneously in Dias II.

4.5 パラメータ MM 法による誘導期現象の評価

4.5.1 評価指標

誘導期現象を定量評価する新たな解析法として、Fig. 1.1 に示す OIDPSMT で表される蛍光強度の時間変化における M の盛り上がり形状（以下、MM と呼ぶ）を検討した。MM は 25 秒以内の測定データで解析できる。MM を定量評価するために必要な各点および領域を次のように定義した。概要を Fig. 4.23 に示す。

- (1) Ms 現象 P 直後の直線的挙動が、異なる傾きで変化を始める点
- (2) Me Ms から蛍光強度曲線へ引いた接線の接点
- (3) MM 2 点 Ms, Me 間の蛍光強度曲線と線分 MsMe で囲まれる領域

MM の形状を以下の 3 要素で評価する。

- ①線分 MsMe の傾き（以下、MM-gradient と呼ぶ）
- ②2 点 Ms, Me の座標間の距離（以下、MM-distance と呼ぶ）
- ③MM の高さ（蛍光強度曲線上の任意の点 (x, y) から線分 MsMe におろした垂線の長さの最大値）（以下、MM-height と呼ぶ）

MM は、光化学反応系 II における Q_A が、 Q_A 以降のチトクロム b/f や光化学反応系 I、炭酸固定等の影響を受けて再還元される状態を反映している (Krause *et al.*, 1982) と考えられるが、ここでも、2 章の述べた第 2 次導関数法と同様に MM の形状のみに着目して評価する。なお、MM-distance は時間の次元をもつ量であり、distance という用語は距離を連想させるが、ここでは誘導期現象の形状に着目しているため、distance という言葉を使用する。

4.5.2 計算手順

2 点 Ms, Me を求める手順を以下に述べ、Fig. 4.24 にその概略を示す。

(1) 近似曲線を得る

①平滑化

レーザー照射から 24 秒間の曲線は、移動平均（多項式適合法：Savitzky-Golay 法（南, 1986））によって平滑化した。

②多項式近似

曲線の前半部(1.5~15 秒区間)と後半部 (3~25 秒区間) を、各々回帰結果の良好な 9 次式 $f(x)$, $g(x)$ で近似した。

(2) 点 Ms を求める

①極大値算出

$f(x)$ を2回微分し、微分値が極大を示す点の x 座標 Ms' を求めた。

②補正

Fig. 4.25 (a) のような曲線パターンでは、 Ms' が下流側に求められ、MM が算出されない場合がある。そのため Ms' を基準に、次の手順で Ms を求めた。直線 QR を求め、 $f(x)$ との距離 d_1 が十分に大きくなる点 ($d_1 > 0.008$) を Ms とした。距離 d_1 は、Fig. 4.24 に示す相対蛍光強度と時間 (秒) から算出したグラフ上での距離である。ただし、点 Q ($Ms' - 1.5$ 秒, $f(Ms' - 1.5$ 秒)), 点 R ($Ms' - 1.0$ 秒, $f(Ms' - 1.0$ 秒)) とする。

(3) 点 Me を求める

$g(x)$ 上にある任意の1点とその近傍の点 (2点の x 座標間の長さ = 0.003 秒) を通る直線を求め、直線と点 Ms との距離 d_2 が 0 に最も近くなる点 ($d_2 < 0.003$) を Me とした。距離 d_2 も、前述の d_1 と同様に算出したグラフ上の距離である。

4.5.3 計算結果

前述の手順で求めた MM の代表的なパターンを Fig. 4.25 に示す。Fig. 4.25 (e) と (f) については、MM が存在しないため2点 Ms , Me を求めず、P以降の傾きのみを求めた。

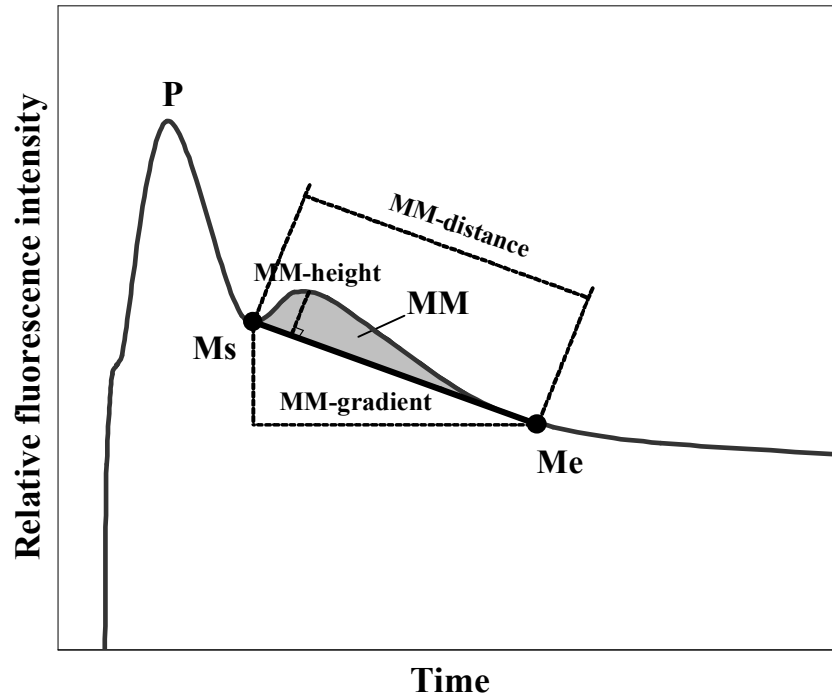


Fig. 4.23 Points Ms, Me and area MM on the induction kinetics curve. Ms is the point at which the slope of the kinetics curve deviates from that of the nearly straight line from point P. Me is the point of contact of the tangent line from Ms. MM is the area bounded by line segment MsMe and induction kinetics curve. MM-shape is analyzed by three parameters, the gradient of line segment MsMe (MM-gradient), the distance between points Ms and Me (MM-distance), and the maximum height of MM (MM-height).

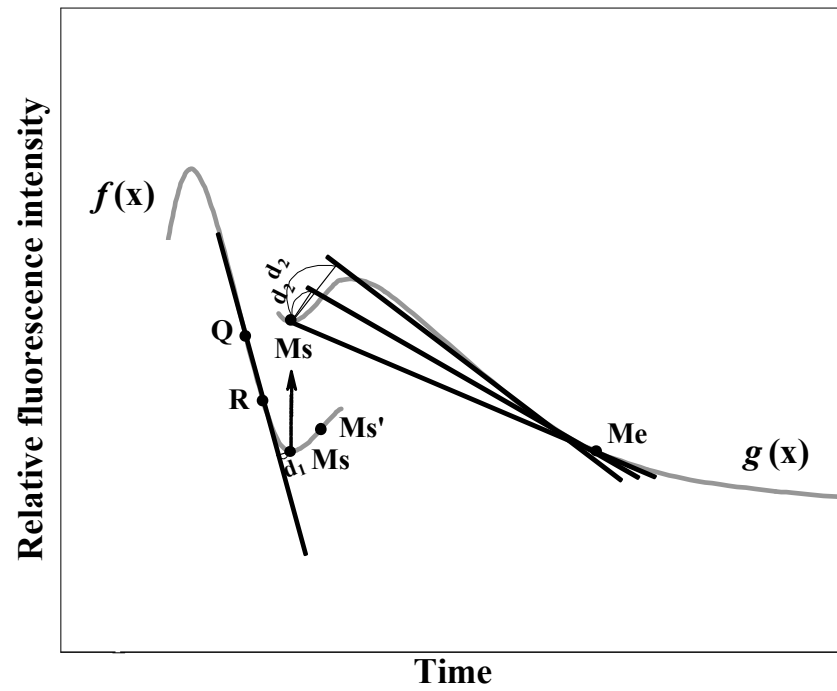


Fig. 4.24 Schematic illustration for determining points Ms and Me . The point Ms is first determined and then point Me is computed on the basis of Ms . For details, see the text.

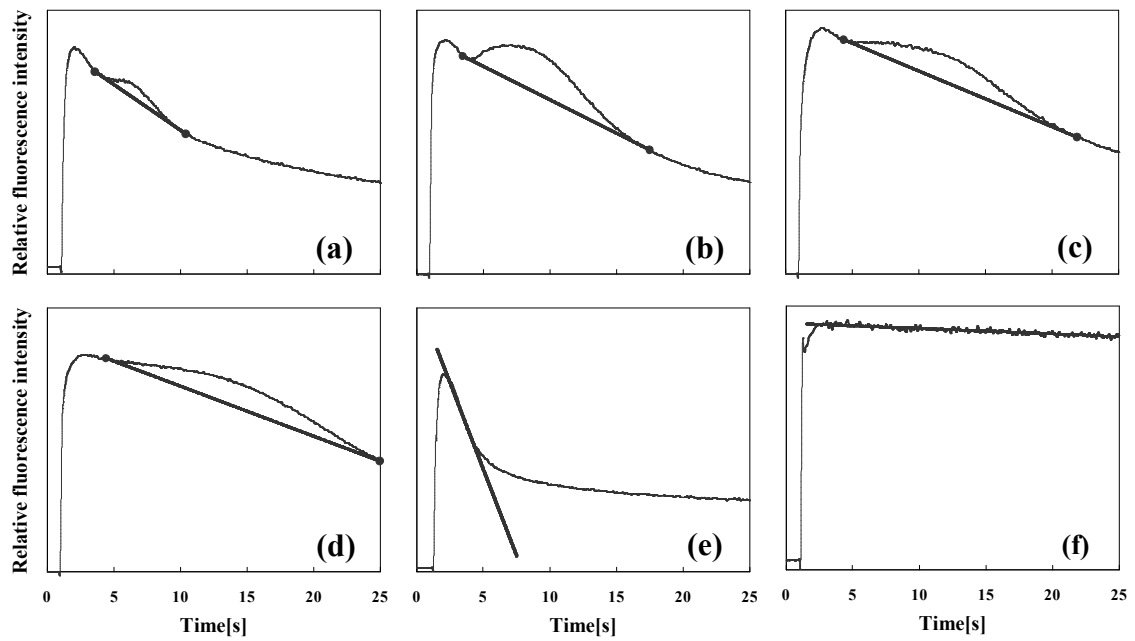


Fig. 4.25 Several examples of the tangent lines. MM-gradient, MM-distance and MM-height are calculated for (a)-(e), and only MM-gradient is calculated for (e) and (f).

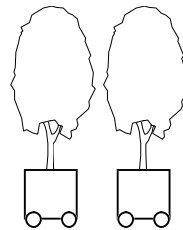
4.6 実験

実験は2001年7月～2002年9月、つくば市内で実施した。樹高約2.5mのクスノキ (*Cinnamomum camphora*) 4本を、赤土、小粒赤玉土および福島パーミキュライトを均等混合した用土を入れたFRP製のプランタ（内寸幅580mm，奥行き580mm，高さ480mm）に植えた。実験条件をTable 4.1とFig. 4.26に示す。実験の様子をFig. 4.27～4.29に示す。屋外に置いた2本を各々OUT1，OUT2とした。残り2本はグロースチャンバ（幅3,600mm，奥行き3,600mm，高さ7,000mm）内に置いた。チャンバ内の環境条件は空調されたアトリウムの年間平均温湿度である24℃，40%に設定し，メタルハライドランプ（MITSUBISHI/OSRAM, MLBOC250F-U）と3波長型蛍光灯（MITSUBISHI/OSRAM, FHF32EX-N）を用いて光を照射した。1日の明期は6～18時とした。1本は樹冠側面に $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光を照射した（以後，CH300），もう1本は $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を照射した（以後，CH50）。以上の4本について，1年2ヶ月にわたって測定した。2002年6月まではDias Iを，それ以降はDias IIを使用した。Dias I，IIのどちらも，葉に20分間の暗処理をした後に励起光を照射し，照射開始から24秒間の誘導期現象を測定した。測定した葉の枚数をTable 4.1に示す。また，必要に応じて色彩色差計（ミノルタ，CR-200）によって色差を測定し誘導期現象との比較を行った。

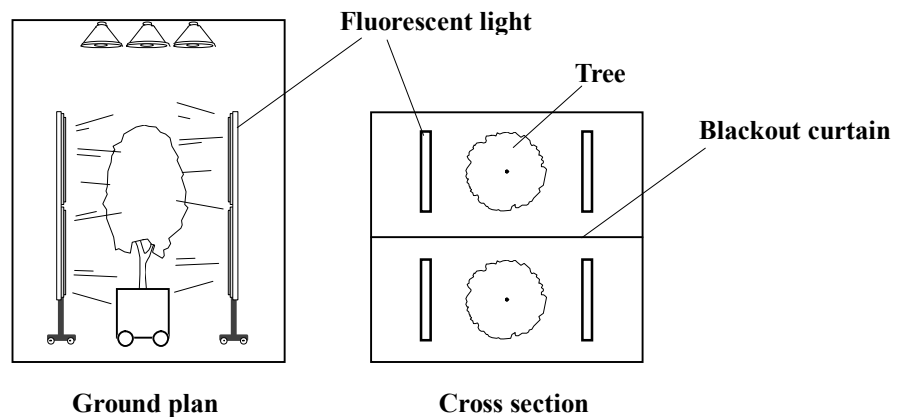
測定は，各樹木において，照明が直接当たる直下の葉を測定対象葉と決めてマーキングし，1～2週間ごとに測定した。対象葉が落葉した場合は，近辺の似通った形の葉を新たな測定対象葉とした。実験中，CH300に白さび病が発生した。対象葉に病害の徴候を確認した場合は，近辺の似通った形で変色してない葉を新たな測定対象としたが，病害の影響で葉の黄化が始まった2002年5月以降のデータは，信頼性に欠けるため参考値とする。

Table 4.1 The experimental conditions of induction kinetics under seasonless circumstances in the chamber and under seasonal circumstances outside.

Tree code	Place	Temperature [°C]	RH [%]	PPFD at the sides of a tree [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	Number of samples [/tree]
OUT1	outside	non-control	non-control	non-control	5
OUT2					5
CH300	chamber	24	40	300	10
CH50				50	10



(a) Outside.



(b) Growth chamber.

Fig. 4.26 Schematic illustration of experimental arrangements (a) outside and (b) in the growth chamber.



Fig. 4.27 The potted trees outdoors used for the experiment.



Fig. 4.28 The potted trees in the growth chamber used for the experiment.



Fig. 4.29 Fluorescent lamps for side-irradiation of a tree.

4.7 結果

4.7.1 年間の変化

Fig. 4.30～4.32 に、年間の誘導期現象の変化を MM-gradient, MM-distance, MM-height で表した結果を示す。実験開始後の経過をみると、OUT1～2 は MM の形状に季節に応じた変化がみられたのに対して、CH300, CH50 は実験期間中ほとんど変化がみられなかった。OUT1～2 の季節変化は、MM-gradient において、最も明確に確認することができた。

4.7.2 光強度の違い

CH300 と CH50 の違いを、MM-gradient (Fig. 4.30) と MM-distance (Fig. 4.31) で確認することができた。光の少ない CH50 では、CH300 に比べ MM-gradient が緩やかで、MM-distance が長くなることがわかった。MM-height (Fig. 4.32) には有意な差をみることはできなかった。

MM-gradient と MM-distance の相関を Fig. 4.33 に示す。両者はまったくの独立したパラメータではなく、緩やかな相関があることがわかった。

4.7.3 病害の検知

CH300 における病害の影響をクロロフィル蛍光の誘導期現象で検知できるかを調べるために黄葉 (y), 病害葉の黄部 (py) と緑部 (pg), 緑葉 (g) について、各々の葉 12～15 枚の誘導期現象と色差を測定した (Fig. 4.34)。色差に有意差があるにも関わらず、MM-gradient には差がみられなかった。MM-distance, MM-height でも同様であった。そこで、誘導期現象の曲線をみると (Fig. 4.35), MM の最大高さの出現時間に差が認められた。しかし、出現時間の差が確認できるのは、葉色の違う場合のみであり、y と py の間、g と pg の間に差はみられなかった。Fig. 4.35 の標準偏差を示した点で、有意差検定を行ったところ、いずれの点でも $P < 0.05$ で有意な差はなかった。各々の葉の様子を Fig. 4.36 に示す。

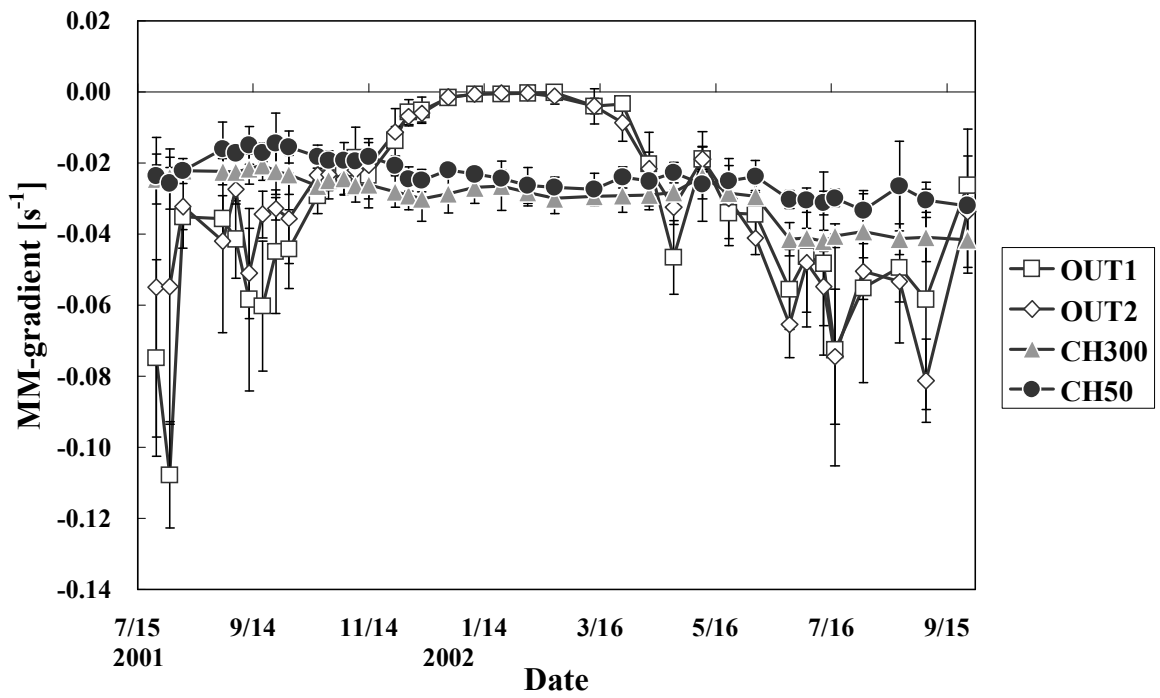


Fig. 4.30 Changes in the MM-gradient over about one year. The vertical bar indicates $\pm SD$.

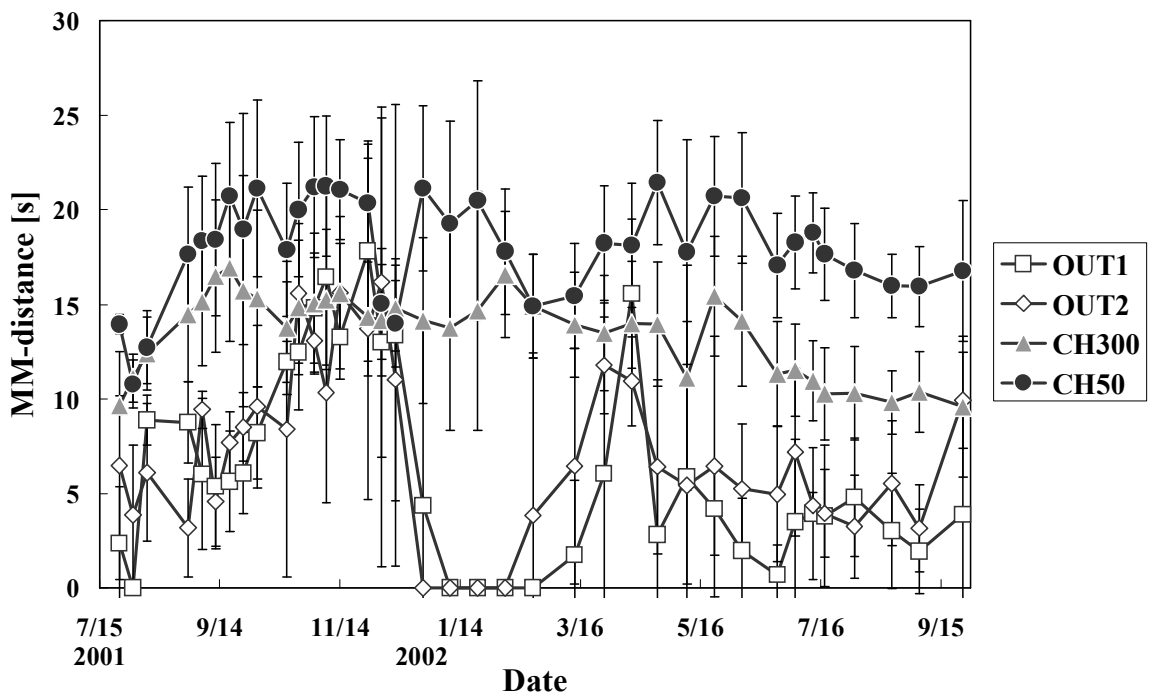


Fig. 4.31 Changes in the MM-distance over about one year. The vertical bar indicates $\pm SD$.

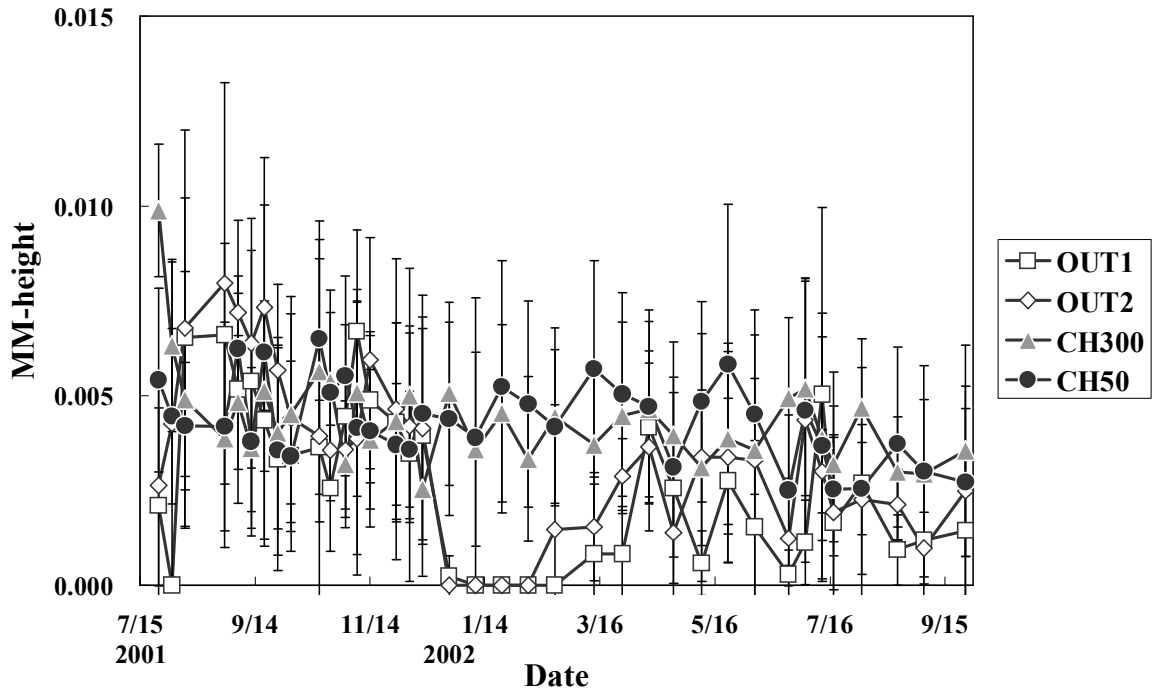


Fig. 4.32 Changes in the MM-height over about one year. The vertical bar indicates \pm SD.

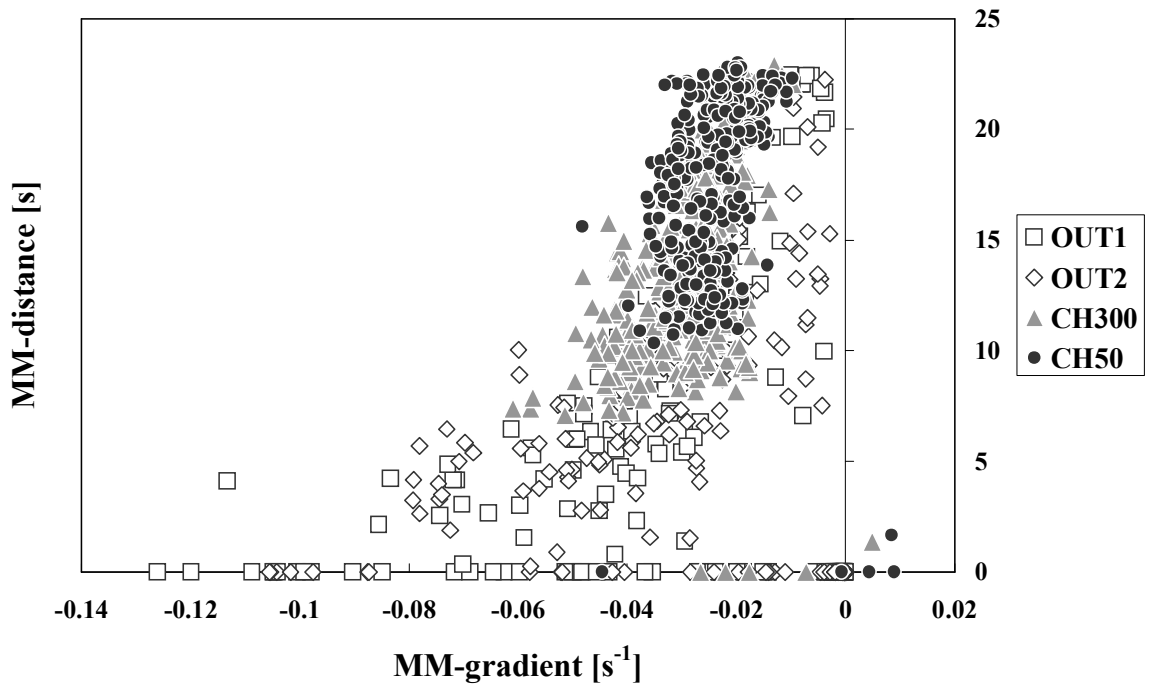


Fig. 4.33 Relationship between the MM-gradient and the MM-distance.

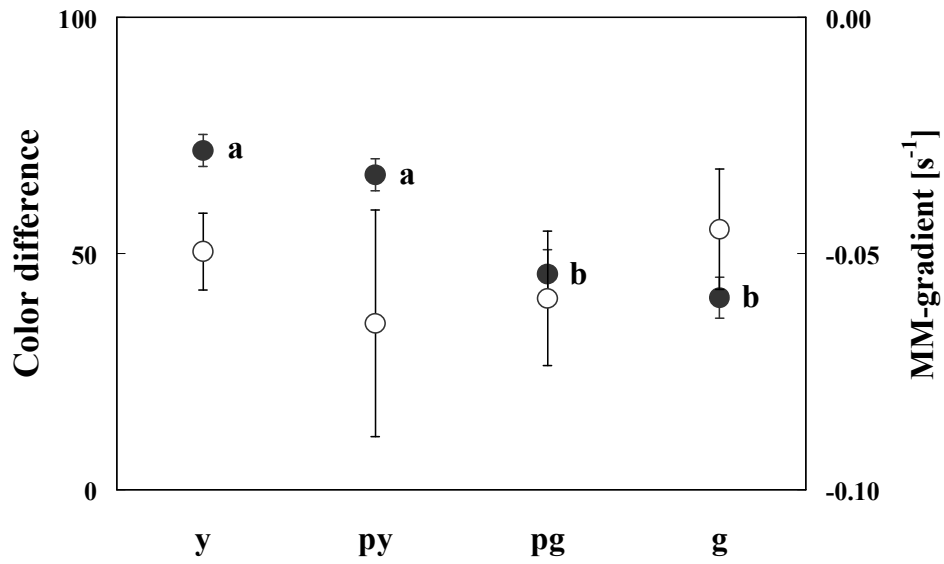


Fig. 4.34 Effects of disease on color difference and MM-gradient. (●): the color difference, (○): the MM-gradient, (y): yellow leaf, (py): yellow part of diseased leaf, (g): green leaf, (pg): green part of diseased leaf. The vertical bar indicates \pm SD. a, b: different letters mean significant difference at $P < 0.05$.

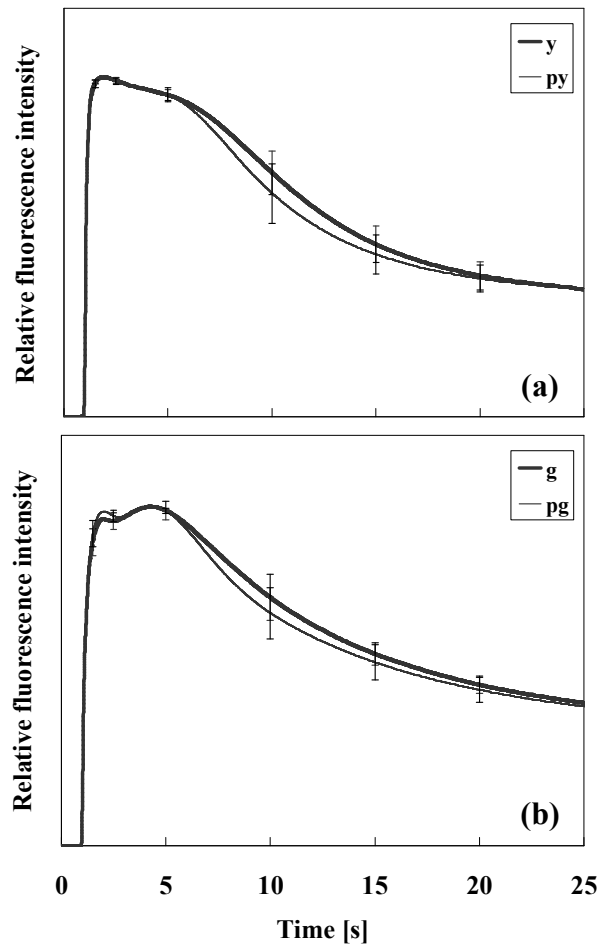


Fig. 4.35 Differences in the chlorophyll fluorescence induction kinetics of diseased leaves. For y, py, g and pg, see the caption of Fig. 5.12. The vertical bar indicates \pm SD.



(a) Green leaves (g).



(b) Partially diseased leaves (pg and py).



(c) Yellow leaves (y).

Fig. 4.36 Green leaves and diseased leaves from a tree in the growth chamber.

4.8 考察

4.8.1 季節変化の有無と光強度の影響

屋外環境下に置いた樹木葉の MM の形状は、季節によって変化することがわかった。これは、葉内のクロロフィル含量と蛍光スペクトルとの相関に関するこれまでの知見 (Lichtenthaler *et al.*, 1982; 高橋ら, 1995; Gitelson, Buschmann and Lichtenthaler, 1999; Subhash, Wenzel and Lichtenthaler, 1999) と蛍光スペクトルの季節変化の知見 (Mineuchi *et al.*, 1999) から、クロロフィルやその他色素の葉内含量の季節変化を反映した結果といえる。

季節変化のない屋内環境下では、少なくとも1年の間は誘導期現象のパラメータ MM は大きく変化しないことが明らかとなった。CH300 と CH50 を比較すると、弱光である CH50 の方が MM の傾きが緩やかに、距離が長くなっていることがわかる。このような MM の変化は、季節変化のない環境や弱光などの影響が現れた状態と考えることができる。こうした変化の検知によって、ストレスの有無を判定できる可能性がある。

以上の季節変化の有無と光強度による MM-gradient, MM-distance の違いは、この2つのパラメータによるストレス判定への応用の可能性を強く示唆している。しかし、今回の実験では、病気の発生を除いて、樹木は実験期間中、正常に維持されていたため、様々な環境ストレスを受けてパラメータが変化していく過程を明示できず、パラメータとしての有用性の最終確認までにはいたらなかった。

4.8.2 ストレス判定の限界

Fig. 4.35 から緑葉と緑斑部の誘導期現象がほぼ同じ形状であることがわかる。黄葉の誘導期現象が M から T に向けて蛍光強度が低下していることから、葉内にクロロフィルが残っていると考えられる。本実験では、クロロフィル含量の測定をしていないため、クロロフィル含量と誘導期現象による検知の限界との関係が示せないが、目視で確認できる病害であっても、誘導期現象で検知できない可能性が示唆された。誘導期現象によってストレスの有無を判定しようとする場合に充分考慮すべき特性が明らかになった。

4.9 まとめ

本章では、光強度・温湿度が制御された屋内環境下で誘導期現象を測定し、屋外でのそれと比較した。

製作したポータブル測定装置（Dias I と Dias II）は、誘導期現象を測定することができ、製作費用の点からも実用性の高い装置であった。

第2次導関数法の課題を解決し、ストレスの程度を評価できるパラメータ MM 法を提案した。Dias I および II で測定した誘導期現象は、パラメータ MM で定量評価した。パラメータ MM は、蛍光強度曲線が盛り上がる箇所（MM）を定義し、MM の傾き（MM-gradient）と距離（MM-distance）で表す。

屋外の樹木はパラメータ MM が明確な季節変化を示したのに対し、屋内の樹木は季節の影響を受けずほぼ一定の値を示した。このことから、季節の影響を受けない屋内ならば、パラメータ MM を定期的にモニタリングすることで、ストレスによって変化する過程を検知できる可能性が示唆された。

また、誘導期現象は、葉の部分的な色素変化を引き起こす病害の影響検知には向かないことが明らかになった。

パラメータ MM のストレス判定指標としての可能性は、強く示唆されたが、屋内で想定されるストレスを受けてパラメータが変化していく過程を示していないため、有用性の最終確認までにはいたらなかった。次章では、パラメータ MM のストレス判定指標としての有用性を最終確認し、さらにストレス判定基準を提案する。

第 5 章 パラメータ MM によるストレス判定

5.1	はじめに	92
5.2	解析データ	93
5.3	結果および考察	94
5.3.1	パラメータ MM 法による解析	94
5.3.2	判定基準の設定	101
5.3.3	判定基準によるストレス判定	101
5.3.4	判定基準の妥当性	102
5.4	まとめ	104

第5章 パラメータ MM によるストレス判定

5.1 はじめに

本章では, 前章で提案したパラメータ MM のストレス判定指標としての有用性を最終確認し, パラメータ MM を用いたストレス判定基準を提案する。

2 および 3 章の実験データに新たなデータを加えて, パラメータ MM 法で解析する。その結果から, 屋内で想定されるストレスの程度に応じて, パラメータ MM の挙動を調べる。さらに, パラメータ MM にストレスの有無を判定する基準を定め, 判定基準の妥当性を明らかにする。以上より, パラメータ MM によるストレス判定の有効性を提示する。

5.2 解析データ

解析に用いたデータの実験概要を記す。以下に示す(1), (2)は2章で, (3)は3章で述べた実験データである。(4)は新たに行った実験である。

(1) 弱光ストレス

寒冷紗で光条件を調節した屋外試験区で, 樹高 3–4 m のクスノキ (*Cinnamomum camphora*) を5年以上生育させた。各試験区の年間平均光量子束密度を Table 2.1 に示す。7~1月の半年間にわたって毎月, 各試験区の樹木から葉を3枚採取し, クロロフィル蛍光の誘導期現象を測定した。ここでは, 無遮光 (Control) とクスノキにおける最大遮光率 (S93) の実験データを解析の対象とした。

(2) 水ストレス

ここでは, 2章の実験データを解析に用いている。屋外で生育しているシラカシ (*Quercus myrsinifolia*) の葉を各々3枚ずつ用いて, 7月に実験を行った。葉を葉柄部で切り取った後, 空調条件下 (室温 24°C, 相対湿度 40%, PPFD 13 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) に放置し, 時間経過に伴う誘導期現象の変化を測定した。測定は2時間おきに20時間後まで行った。

(3) 長期間の暗黒ストレス

樹高 2.5–3.0 m のモッコク (*Ternstroemia gymnanthera*) 5本を使用した。これらの樹木は, 屋外で6ヶ月~1年間生育させた後, 24°C, 40%, 暗黒のグロースチャンバ (幅 3,600 mm, 奥行き 3,600 mm, 高さ 7,000 mm) 内に順次 2~3鉢ずつ搬入した。実験は, 春~秋にかけて3期に分けて行った。各時期の詳細と樹木の本数を Table 3.1 に示す。樹木は著しい落葉が見られるまで暗黒下に置き, その間の誘導期現象の変化を調べた。測定には葉3枚/本を採取して用いた。ここでは, モッコクのB期とC期のデータを解析対象とした (詳細は3章参照)。

(4) 短期間の暗黒ストレス

5月下旬~6月に, 実験3と同様に, 屋外で生育させたヤマモモ (*Myrica rubra*) 2本をグロースチャンバ (室温 24°C, 相対湿度 40%, 暗黒) 内に置き, 暗黒ストレスを与えた。グロースチャンバに置いてから10日目に再び屋外に搬出した。その間に, 葉3枚/本を採取して, 誘導期現象を測定した。測定には, Fig. 3.1 の装置を用いた。

5.3 結果および考察

5.3.1 パラメータ MM 法による解析

(1) 弱光ストレス

解析結果を Fig. 5.1 に示す。Control と S93 の MM-gradient に明らかな差がみられた。極端な弱光ストレスを受けている S93 の MM-gradient は、ほぼ -0.02 s^{-1} 以上の高い値を示した。一方、遮光していない Control の MM-gradient は、ほとんどが -0.02 s^{-1} より低い値を示した。パラメータ MM は遮光の程度を検知したといえる。

S93 の MM-distance は、常に Control より大きな値を示した。Fig. 5.1 の網掛けおよび Table 5.1 については、5.3.2 項で説明する。

(2) 水ストレス

シラカシの解析結果を Fig. 5.2 に示す。MM-gradient は、水ストレスを受けるにしたがって傾きが緩やかになることがわかった。MM-distance は、実験開始後に値が大きくなり、その後消滅 (MM-distance=0 s) した。このことから、パラメータ MM は水ストレスのかかる過程を検知したといえる。

(3) 長期間の暗黒ストレス

Fig. 5.3 にモッコク (B 期) の解析結果を示す。実験開始から 18 日後にかけて、MM-gradient は大きくなり、それ以降は、ほぼ一定の値を示すことがわかった。パラメータ MM は暗黒ストレスのかかる過程を検知した。

Fig. 5.4 にモッコク (C 期) の解析結果を示す。MM-gradient に暗黒ストレスに応じた変化はみられなかった。一方で MM-distance は、B 期と比べて値が小さく、35 日以降には 0 s を示した。

(4) 短期間の暗黒ストレス

Fig. 5.5 にヤマモモの解析結果を示す。実験期間中の MM-gradient に目立った変化はみられなかった。MM-distance は、暗黒下に設置した後に小さくなり、屋外へ搬出した 10 日以降には再び大きな値を示した。パラメータ MM は、暗黒ストレスのかかる過程を検知したといえる。ここで、Fig. 5.5 の標準偏差について述べる。実験に用いた 2 本のヤマモモの暗黒ストレス応答速度に差が生じたため、MM-distance が大きな値あるいは消滅の両方を示す時期があり、そのためばらつきが大きくなっている。

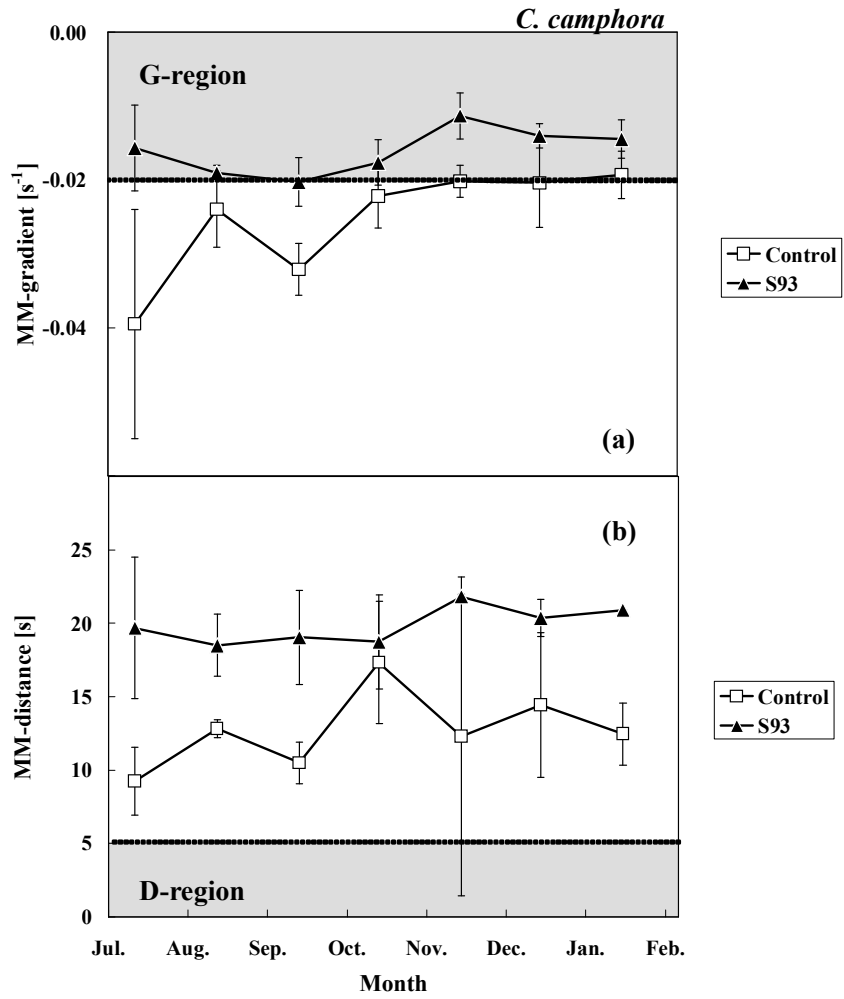


Fig. 5.1 Effects of shading treatments on induction kinetics of leaves of *C. camphora*. (a): MM-gradient, (b): MM-distance. Hatching areas show G-region (MM-gradient ≥ -0.02 s⁻¹) and D-region (MM-distance ≤ 5 s). For Control and S93, see Table 2.1. The vertical bar indicates \pm SD.

Table 5.1 Percentages of measured data belonging to each (non) region in shading experiments. G-region: $MM\text{-gradient} \geq -0.02 \text{ s}^{-1}$, non-G-region: $MM\text{-gradient} < -0.02 \text{ s}^{-1}$, D-region: $MM\text{-distance} \leq 5 \text{ s}$, non-D-region: $MM\text{-distance} > 5 \text{ s}$.

<i>C. camphora</i> Control								
Month	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	All
G-region	0	0	0	33	33	33	33	19
non-G-region	100	100	100	67	67	67	67	81
D-region	0	0	0	0	33	0	0	5
non-D-region	100	100	100	100	67	100	100	95
G-region or D-region	0	0	0	33	67	33	33	24
non-G-region and non-D-region	100	100	100	67	33	67	67	76

<i>C. camphora</i> S93								
Month	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	All
G-region	67	67	67	67	100	100	100	78
non-G-region	33	33	33	33	0	0	0	22
D-region	0	0	0	0	0	0	0	0
non-D-region	100	100	100	100	100	100	100	100
G-region or D-region	67	67	67	67	100	100	100	78
non-G-region and non-D-region	33	33	33	33	0	0	0	22

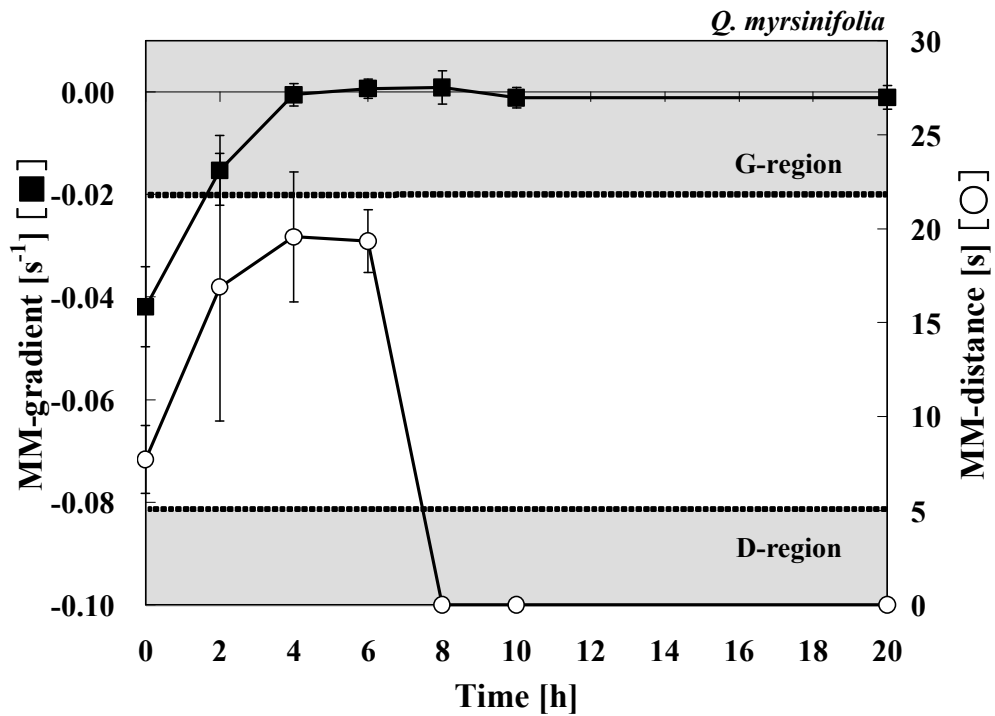


Fig . 5.2 Effects of water stress on induction kinetics of leaves of *Q. myrsinifolia*. Hatching areas show G-region ($\text{MM-gradient} \geq -0.02 \text{ s}^{-1}$) and D-region ($\text{MM-distance} \leq 5 \text{ s}$). Time is the lapsed time after the detachment of leaves from trees. The vertical bar indicates $\pm\text{SD}$.

Table 5.2 Percentages of measured data belonging to each (non) region in water stress experiments. G-region: $\text{MM-gradient} \geq -0.02 \text{ s}^{-1}$, non-G-region: $\text{MM-gradient} < -0.02 \text{ s}^{-1}$, D-region: $\text{MM-distance} \leq 5 \text{ s}$, non-D-region: $\text{MM-distance} > 5 \text{ s}$.

Time [h]	0	2	4	6	8	10	20
G-region	0	67	100	100	100	100	100
non-G-region	100	33	0	0	0	0	0
D-region	0	0	0	0	100	100	100
non-D-region	100	100	100	100	0	0	0
G-region or D-region	0	67	100	100	100	100	100
non-G-region and non-D-region	100	33	0	0	0	0	0

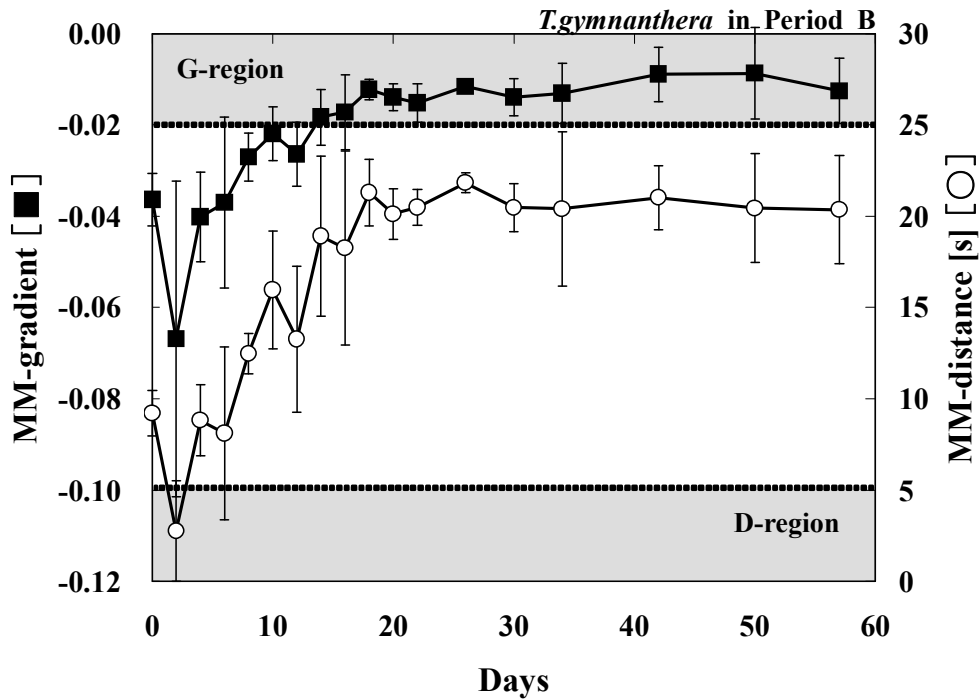


Fig. 5.3 Changes in induction kinetics of leaves of *T. gymnanthera* in July–September (Period B) with the long-darkness stress. Days indicate the duration of dark treatment. Hatching areas show G-region (MM-gradient $\geq -0.02 \text{ s}^{-1}$) and D-region (MM-distance $\leq 5 \text{ s}$). The vertical bar indicates \pm SD.

Table 5.3 Percentages of measured data belonging to each (non) region in the long-darkness stress in period B. G-region: MM-gradient $\geq -0.02 \text{ s}^{-1}$, non-G-region: MM-gradient $< -0.02 \text{ s}^{-1}$, D-region: MM-distance $\leq 5 \text{ s}$, non-D-region: MM-distance $> 5 \text{ s}$.

Days	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	26	30	34	42	50	57
G-region	0	0	0	33	0	33	33	33	67	100	100	100	100	100	67	100	67	100
non-G-region	100	100	100	67	100	67	67	67	33	0	0	0	0	0	33	0	33	0
D-region	0	67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
non-D-region	100	33	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
G-region or D-region	0	67	0	33	0	33	33	33	67	100	100	100	100	100	67	100	67	100
non-G-region and non-D-region	100	33	100	67	100	67	67	67	33	0	0	0	0	0	33	0	33	0

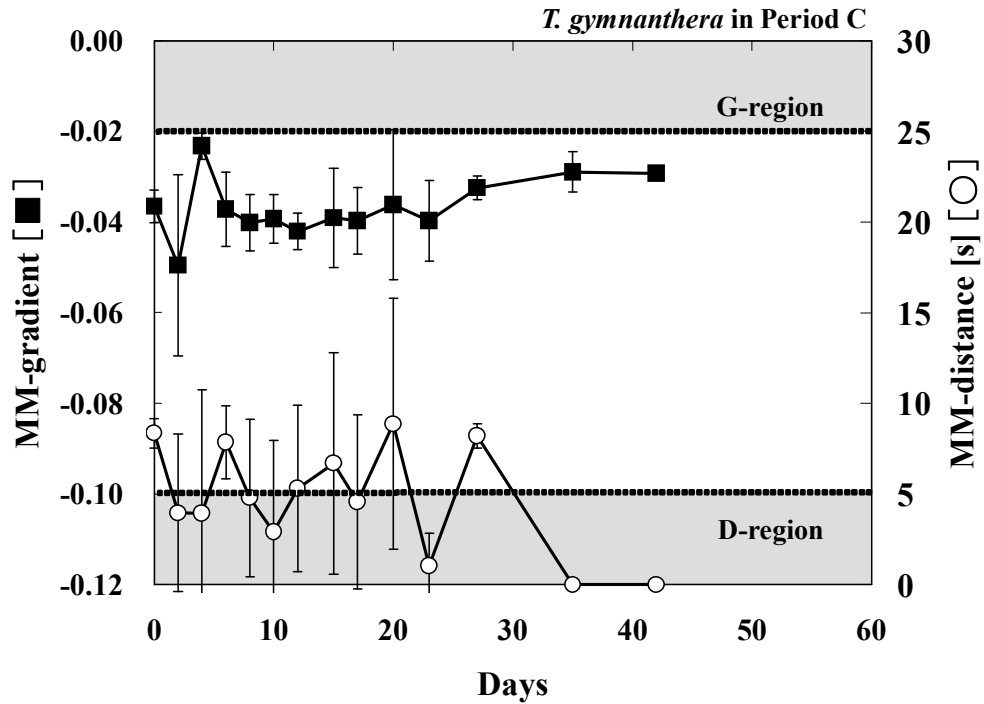


Fig. 5.4 Changes in induction kinetics of leaves of *T. gymnanthera* in October–November (Period C) with the long-darkness stress. Days indicate the duration of dark treatment. Hatching areas show G-region (MM-gradient $\geq -0.02 \text{ s}^{-1}$) and D-region (MM-distance $\leq 5 \text{ s}$). The vertical bar indicates \pm SD.

Table 5.4 Percentages of measured data belonging to each (non) region in the long-darkness stress in period C. G-region: MM-gradient $\geq -0.02 \text{ s}^{-1}$, non-G-region: MM-gradient $< -0.02 \text{ s}^{-1}$, D-region: MM-distance $\leq 5 \text{ s}$, non-D-region: MM-distance $> 5 \text{ s}$.

Days	0	2	4	6	8	10	12	15	17	20	23	27	35	42
G-region	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0
non-G-region	100	100	100	100	100	100	100	100	100	67	100	100	100	100
D-region	0	67	67	0	33	67	33	33	67	33	100	0	100	100
non-D-region	100	33	33	100	67	33	67	67	33	67	0	100	0	0
G-region or D-region	0	67	67	0	33	67	33	33	67	67	100	0	100	100
non-G-region and non-D-region	100	33	33	100	67	33	67	67	33	33	0	100	0	0

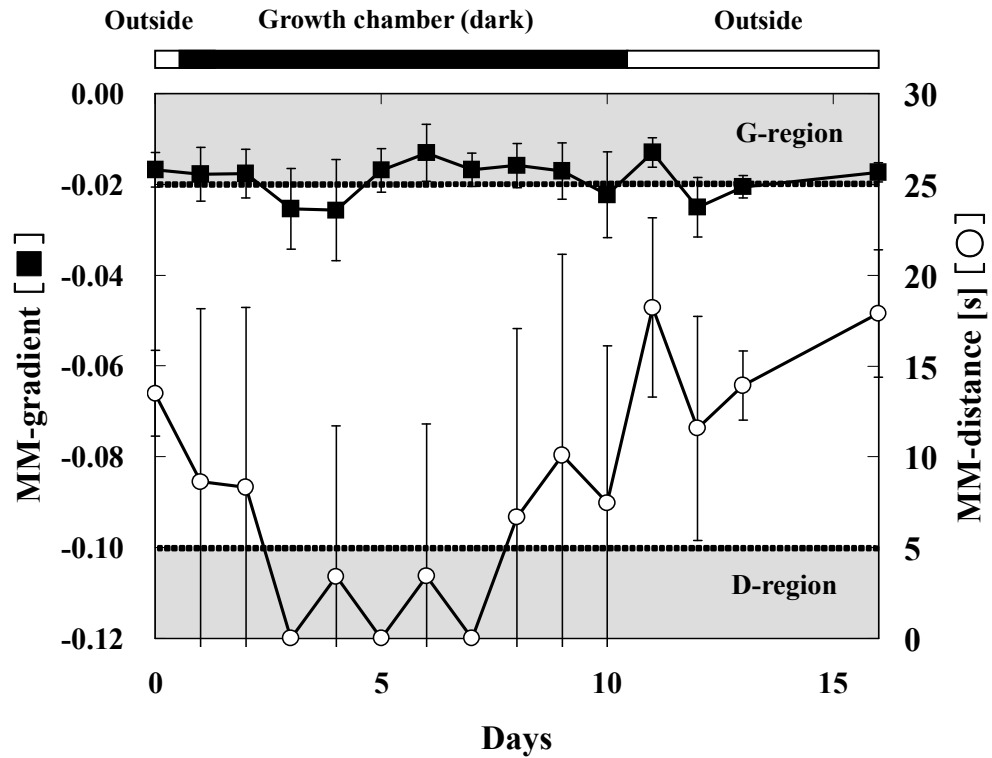


Fig. 5.5 Changes in induction kinetics of leaves of *M. rubra* with the short-darkness stress in a growth chamber. After dark treatment for ten days, trees were taken out to the outdoors. Days indicate the duration of treatment. Hatching areas show G-region ($\text{MM-gradient} \geq -0.02 \text{ s}^{-1}$) and D-region ($\text{MM-distance} \leq 5 \text{ s}$). The vertical bar indicates $\pm\text{SD}$.

Table 5.5 Percentages of measured data belonging to each (non) region in the short-darkness stress in a growth chamber. G-region: $\text{MM-gradient} \geq -0.02 \text{ s}^{-1}$, non-G-region: $\text{MM-gradient} < -0.02 \text{ s}^{-1}$, D-region: $\text{MM-distance} \leq 5 \text{ s}$, non-D-region: $\text{MM-distance} > 5 \text{ s}$.

Days	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	16
Dark or Outside	O	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	O	O	O	O
G-region	83	50	50	33	33	67	83	83	67	67	50	100	33	50	83
non-G-region	17	50	50	67	67	33	17	17	33	33	50	0	67	50	0
D-region	0	50	50	100	83	100	83	100	67	50	50	0	17	0	0
non-D-region	100	50	50	0	17	0	17	0	33	50	50	100	83	100	100
G-region or D-region	83	100	83	100	100	100	100	100	100	100	100	100	50	50	83
non-G-region and non-D-region	17	0	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	50	0

5.3.2 判定基準の設定

パラメータ MM がどの値を示すと樹木がストレスを受けていると判定するかは、重要な課題である。そこで、ストレスを判定する基準について検討する。

Fig. 5.1～5.5 の結果から、ストレスの影響は、2つのパラメータのどちらかに現れる傾向があることがわかった。そこで、2つの判定基準を定めた。提案するストレス判定基準は「 $MM\text{-Gradient} \geq -0.02 \text{ s}^{-1}$ or $MM\text{-distance} \leq 5 \text{ s}$ のときストレスを受けている」である。Fig. 5.1～5.5 の図中に判定範囲を網掛けで示す。提案の根拠を以下に述べる。

Fig. 5.1 の結果から、ストレスの有無を識別する目安として、MM-gradient が -0.02 s^{-1} 以上、あるいはそれより小さいという指標が示唆された。以後、MM-gradient が -0.02 s^{-1} 以上の範囲を G-region と呼び、 -0.02 s^{-1} より小さい範囲を non-G-region と呼ぶ。

Fig. 5.4 の結果は、G-region の基準だけからは、ストレス判定できないことを示している。ほとんどのデータは、non-G-region に入るからである。そこで、ストレス判定基準に D-region を加えた。暗黒ストレスに応じて変化する Fig. 5.5 の MM-distance と合わせて考えると、MM-distance が 5 s 以下の場合、ストレスを受けているといえる。MM-gradient と同様に、ストレスを受けている MM-distance の判定範囲を D-region、受けていない判定範囲を non-D-region と呼ぶ。

5.3.3 判定基準によるストレス判定

前述の判定基準にしたがってストレス判定をする。Table 5.1～5.5 は、Fig. 5.1～5.5 の各々の測定データを用いて、G-region に入る割合と non-G-region に入る割合を計算した結果である。この表には、D-region の統計も加えてある。測定データが判定基準に入る割合を調べるために、G-region or D-region と対偶の non-G-region and non-D-region を記した。これらはそれぞれ、ストレスを受けている、あるいは受けていないと判定される割合を示している。判定の結果を以下に述べる。

(1) 弱光ストレス

Table 5.1 の S93 における G-region or D-region は、実験期間を通して約 70%以上を示した。対偶の non-G-region and non-D-region は、約 30%と小さい。Control の結果では、この傾向が逆転した。

(2) 水ストレス

Fig. 5.2 をみると、2日目以降に G-region と判定でき、8日目以降は D-region も加わるこ

とがわかる。Table 5.2 では、2 時間後に G-region or D-region が約 70%になり、non-G-region and D-region が約 30%になった。4 時間以降の G-region or D-region は 100%を示した。なお、この実験結果は、D-region の基準を加えても、G-region だけの基準と変化はなかった。

(3) 長期間の暗黒ストレス

モッコク (B 期) の実験 (Fig. 5.3) からは、10 日前後から G-region に入ることがわかった。Table 5.3 の結果から、実験が進むにしたがって G-region or D-region は高い割合を示し、non-G-region and non-D-region は低くなることがわかった。

モッコク (C 期) の判定結果を Table 5.4 に示す。27 日目まで G-region or D-region と non-G-region and non-D-region の割合は、ほぼ同程度であった。35 日以降は G-region or D-region が 100%を示した。他の実験と比べ、D-region にデータが入る割合は高いが、暗黒ストレスに対する反応は B 期ほど顕著ではなかった。

(4) 短期間の暗黒ストレス

短期間の暗黒ストレスを与えた実験では (Table 5.5)、実験期間を通して G-region or D-region は高い割合を示した。暗黒ストレスを与えた期間は、その割合が特に高く、ほぼ 100%であった。3, 4 日目の結果は、G-region の基準だけからは、暗黒ストレスを受けていないと判定される割合が高いが、D-region の基準を加えることで、暗黒ストレスを受けたと判定できる。

5.3.4 判定基準の妥当性

ストレス判定基準 $MM\text{-Gradient} \geq -0.02 \text{ s}^{-1}$ or $MM\text{-distance} \leq 5 \text{ s}$ によって、ほとんどの実験データでストレスを検知することができた。

パラメータ MM 法と 2 章で述べた第 2 次導関数法とを比較すると、第 2 次導関数法がストレスを受けた状態を二分して示す解析法であるのに対し、パラメータ MM 法は誘導期現象の曲線を 2 つの指標で定量的に評価するため、ストレスの影響を時系列で表すことができる。そのため、ストレスを受ける過程を検知できる利点がある。

判定基準値、 $MM\text{-gradient} \geq -0.02 \text{ s}^{-1}$ と $MM\text{-distance} \leq 5 \text{ s}$ の妥当性について述べる。

S93 の光強度は、平均的なグリーンアトリウムの年間平均 PPFD $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (実測値) より暗い。したがって S93 は、アトリウムより強い弱光ストレスを受けた状態だと考えられる。

Fig. 5.1 から、S93 の $MM\text{-gradient}$ は、ほとんどが -0.02 s^{-1} 以上である。

長期暗黒ストレスを与えた B 期の実験では、暗黒下に置いて 8 日目に葉内糖含量がほぼ下が

りることがわかっている (Fig. 3.9 (b))。Fig. 5.3 において、10 日目以降の MM-gradient は、ほぼ -0.02 s^{-1} 以上であり、同調している。

MM-distance の明らかな変化は、短期暗黒ストレスを与えたときに起こっている (Fig. 5.5)。Fig. 5.5 から、MM-distance の判定基準は 5–10 s が適当だと考えられる。しかし、MM-distance は MM-gradient に比べ、ばらつきが大きい。基準値を大きくすると、ストレスを受けているという判定が多くなりすぎる可能性がある。これを回避するためには、比較的小さな値の方がよい。これらのことから、 $\text{MM-gradient} \geq -0.02 \text{ s}^{-1}$ 、 $\text{MM-distance} \leq 5 \text{ s}$ は、判定基準としての妥当性が高いと考える。

判定結果が曖昧な Fig. 5.4 および Table 5.4 については、3 章でも考察しているように、季節による光合成能力の低下によって暗黒ストレスの影響が誘導期現象に表れていないと考えられる。

ストレス判定の対象が屋内植栽樹であることから、落葉とストレスとの関係も考慮する必要がある。これについては、3 章の中で、長期暗黒ストレス実験の中で、著しい落葉は、糖含量が下がりきった後しばらく経過してから生じる現象であることを確認している (Fig. 3.9 (c))。MM-gradient の判定基準 -0.02 s^{-1} は、葉内糖含量が下がりきったときの値である。このことから、ストレスを受けていると判定されても、すぐに落葉するわけではないといえる。したがって、継続的なモニタリングによって判定を行えば、落葉する前にストレスを検知することが可能である。

5.4 まとめ

本章では、4章で提案したパラメータ MM のストレス判定指標としての有用性を確認し、ストレスの有無を判定する基準、G-region or D-region を提案した。

弱光ストレス、水ストレス、長期暗黒ストレス、短期暗黒ストレスの実験データをパラメータ MM 法で解析した結果から、屋内で想定されるストレスの程度を定量的によく表すことを示した。また、判定基準は、高い確率でストレスの有無が検知できることを提示した。

第 6 章 結論

6.1 本論文のまとめ	106
6.2 問題点と今後の展望	108

第6章 結論

6.1 本論文のまとめ

本論文では、アトリウムに温帯性常緑樹を植栽する際に、樹木の管理を簡単にする、実用的なストレス判定法の提案に取り組んだ。そのために、LIF法を用いたクロロフィル蛍光の誘導期現象あるいは蛍光スペクトルによって、屋内で樹木の受けるストレスの影響が検知できるかを検証した。屋内植栽樹のストレスとして、以下(1)~(4)の環境ストレスおよび環境を想定した。

(1) 長期間にわたる弱光ストレス

5年以上にわたって弱光下に置いた樹木の葉を用い、第2次導関数法で解析した誘導期現象と蛍光スペクトルが弱光ストレスを検知するかを調べた。その結果、どちらも検知できることを明らかにした。

(2) 水ストレス

葉を切除して放置し、時間経過とともに水ストレスを与え、誘導期現象と蛍光スペクトルが水ストレスを検知するかを調べた。その結果、第2次導関数法で解析した誘導期現象は、葉色の変化するより前に水ストレスの影響を検知することが明らかになった。一方、蛍光スペクトルは検知できないことがわかった。この結果から、本研究の目的には誘導期現象が適していること、誘導期現象の解析法として第2次導関数法が有用であることが示された。また、葉色の変化より早くストレスが検知できる可能性が示唆された。

(3) 極端な光強度の低下によって受けるストレス

樹木が著しく落葉するまで暗黒下に置き、その経過を誘導期現象と葉内糖含量の測定によってモニタリングした。暗黒下での残葉率も測定した。その結果、極端な光強度の低下によるストレスは、夏期であれば第2次導関数法で解析した誘導期現象によって検知できることが明らかになった。光合成能力が低下する季節には、光強度の低下によるストレスの影響が現れないという性質も示された。また、実験の結果から、落葉の前に樹木のストレスを検知できる可能性を示した。

(4) 季節変化のない環境

1年間にわたり空調環境下に置いた樹木の挙動を誘導期現象でモニタリングした。誘導期現象をパラメータ MM 法で解析した結果、パラメータ MM が誘導期現象の変化をよく表すこと、屋内では年間を通じてほぼ一定の値を示すことがわかった。屋内では季節の影響を受けないという結果から、実際に樹木の管理をする上では定期的なモニタリングを行うことによって、樹木がストレスを受ける過程を検知する可能性が明らかになった。そのための指標としてのパラメータ MM の有用性も示された。また、ポータブル測定装置を製作し、その実用性を確認した。

クロロフィル蛍光の誘導期現象から、ストレスの有無を検知する解析法として、第2次導関数法とパラメータ MM 法の2つを提案した。どちらも評価に必要なデータは、約25秒間という比較的短時間の測定で得られる手法である。第2次導関数法は、ストレスを受けているか否かに二分して評価できる特徴をもっている。パラメータ MM は2つのパラメータ、MM-gradient と MM-distance で構成される。このパラメータ MM に適当なストレス判定基準を定めることで、実験データの多くについて、ストレスの有無が判定できることを示した。

以上のことから、安価で操作の簡単な測定装置を使って、葉からのクロロフィル蛍光誘導期現象を定期的にモニタリングし、パラメータ MM によって解析し、ストレス判定基準によって、屋内植栽樹に想定されるストレスの有無をほぼ判定できることを明らかにした。本論文では、実用性の高い管理手法の1つとして、クロロフィル蛍光を用いた屋内植栽樹のストレス判定法を提案した。

6.2 問題点と今後の展望

本研究で提案した屋内植栽樹のストレス判定法は、定期的なモニタリングによって運用することを想定している。今後の課題としては、モニタリング間隔の程度やモニタリングに適した測定葉の選択基準など、運用に必要な条件を明らかにする必要がある。また、ストレス判定基準の一般化の可能性も重要な検討事項である。MM-gradient で判定できる場合と MM-distance で判定できる場合のストレス内容の分析などを行えば、判定精度を高めるなど、今後には広がりが出る可能性がある。また、本研究では、クロロフィル蛍光の誘導期現象では病害の影響が検知できない点を明らかにしている。この点を補うために、他の手法を組み合わせ、複合的なストレス判定技術を構築することも有用である。これらの点を明らかにし、屋内植栽樹のストレス判定法の実用性を確立することが、今後の大きな課題である。

本研究で採用した個葉の測定によるストレス判定法は、判定システムのコストと精度の観点から、非常に有用な手法といえる。しかし、個葉が個体のストレスの状態を必ずしも表さないことは、十分に考慮すべき点である。LIF法の利点を活かし、リモートセンシングへ拡張を図り、樹冠のモニタリング技術の開発を目指すことも今後の重要な課題である。

植物のストレス判定技術の展望には、様々な可能性が考えられる。現在、社会の関心は付加価値から共生に変わり、環境や循環型社会形成に焦点が移っている。自然と人間社会との共存を理想に、廃棄物利用、環境負荷軽減の実現を目指し、様々なアプローチが試みられている。ヒートアイランド現象を低減するために、屋上や壁面、建物の周辺を植栽する、ビル緑化を推進する動きもその1つである。近年では、国土交通省を始め、各地方自治体がビル緑化支援策を打ち出している。2001年には、東京都が一定条件を満たす建築物に対する緑化を義務づける条例「東京における自然の保護と回復に関する条例」を施行した。今後、屋上緑化をはじめビル周辺に植物が増えることは確実な情勢である。

植物の生育管理は、屋内緑化だけでなく、屋上や壁面の緑化、街路樹も含めた都市緑化など、人と植物の接点で常に意識される問題である。植物を管理することの重要性は、疑うところがない。特に、都市緑化において人が求める「自然」とは、手入れのされていない緑地ではない。管理が行き届き、人工的に整備された緑である。この点からも植栽管理の必要性は益々高くなると考えられる。人々が望む形での植物との共存を支援する、植栽管理に関わる技術の開発は、今後も重要な研究課題となる。

引用文献

荒尾和史, 1995: 関西国際空港旅客ターミナルビルの建築設備. 建築設備と配管工事, **33**(8), 52-59.

Asami, H., Nishina, H., Nanba, R., Masui, Y., and Hashimoto, Y., 1995: Evaluation on impression of ornamental foliage plants and psychological rating of rooms with ornamental foliage plants by means of semantic differential method. *J. SHITA*, **7**(1), 34-45.

Austin, R. B., 1972: The Relationship between Dry Matter Increment and Sugar Concentrations in Beetroot Leaves. *Photosynthetica*, **6**(2), 123-132.

Banninger, C., Chappelle, E. W., and McMyrtrey III, J. E., 1990: Variations in fluorescence of stressed and non-stressed Norway spruce needles over the growing season. *IGARSS*, **3**, 1931-1937.

Bartholic, J. F., Namken, L. N. and Wiegand, C. L., 1972: Aerial thermal scanner to determine temperatures of soils and of crop canopies differing in water stress. *Agron. J.*, **64**, 603-608.

Britz, S., 1994: Regulation of assimilate partitioning by day length and spectral quality. *NASA C. P.*, **95**(3309), 19-24.

Cerovic, Z. G., Goulas, Y., Gorbunov, M., Briantais, J.-M., Camenen, L. and Moya, I., 1996: Fluorosensing of water stress in plants: diurnal changes of the mean lifetime and yield of chlorophyll fluorescence, measured simultaneously and at distance with a τ -LIDAR and a modified PAM-fluorimeter, in maize, sugar beet, and kalanchoë. *Remote Sens. Environ.*, **58**, 311-321.

Cerovic, Z. G., Morales, F. and Moya, I., 1994: Time-resolved spectral studies of blue-green fluorescence of leaves, mesophyll and chloroplasts of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Biochimica et Biophysica Acta*, **1188**, 58-68.

Cerovic, Z.G., Guy, S., Morales, F., Tremblay, N. and Moya, I., 1999: Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie*, **19**, 543-578.

Chappelle, E. W. and Williams, D. L., 1986: Laser-induced fluorescence (LIF) from plant. *Proc. IGARSS' Symp. Zürich*, 8-11 Sept., 1591-1598.

Chappelle, E. W., McMyrtrey, J. E., and Kim, M. S., 1990: Laser induced blue fluorescence in vegetation. *IGARSS*, **3**, 1919-1922.

Chappelle, E. W., McMyrtrey III, J. E., and Kim, M. S., 1991: Identification of the pigment responsible for the blue fluorescence band in the laser induced fluorescence (LIF) spectra of green plants, and the potential use of this band in remotely estimation rates of photosynthesis. *Remote Sens. Environ.*, **36**, 213-218.

Chappelle, E. W., Wood, F. M., McMurtrey, J. E. and Newcomb, W. W., 1984: Laser-induced fluorescence of green plants. 1: A technique for the remote detection of plant stress and species differentiation. *Appl. Opt.*, **23**(1), 134-138.

Clawson, K. L. and Blad, B. L., 1982: Infrared thermometry for scheduling irrigation of corn. *Agron. J.*, **74**, 311-316.

Croxdale, J.G. and Omasa, K., 1990a: Chlorophyll a fluorescence and carbon assimilation in developing leaves of light-grown cucumber. *Plant Physiol.*, **93**, 1078-1082.

Croxdale, J.G. and Omasa, K., 1990b: Patterns of chlorophyll fluorescence kinetics in relation to growth and expansion in cucumber leaves. *Plant Physiol.*, **93**, 1083-1088.

藤井修二・湯浅和博・大塚修弘, 1994: 室内緑化空間の二酸化炭素濃度に関する研究. 環境の管理, **11**(14), 9-10.

Gitelson, A.A., Buschmann, C. and Lichtenthaler, H.K., 1999: The chlorophyll fluorescence ratio F735/F700 as an accurate measure of the chlorophyll content in plants. *Remote. Sens. Environ.*, **69**, 296-302.

Govindjee, 1995: Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol.*, **22**, 131-160.

Govindjee, W.J.S., Downton, D.C.F. and Armond, P.A., 1981: Chlorophyll a fluorescence transient as an indicator of water potential of leaves. *Plant Sci. Letters*, **20**, 191-194.

Gray, O. R., 1990: 生活空間と緑～緑の環境設計データブック～. ソフトサイエンス.

Havaux, H. and Lannoye, R., 1983: Chlorophyll fluorescence induction: a sensitive indicator of water stress in maize plants. *Irrig. Sci.*, **4**, 147-151.

Holtzwarth, A. R., Haehnel, W., Rtajczak, R., Bittersmann, E. and Schatz, G. H., 1990: Energy transfer kinetics in photosystem I particles isolated from *Synechococcus* sp. and from higher plants. Current Researches in photosynthesis Vol. II. *Kluwer Academic Publishers*, 611-614.

Ishikawa, M. and Yazawa, K., 1994: HVAC system of the Seavans multi-use complex. *ASHRAE J.*, Dec., 28-34.

岩崎徹・鈴木重俊・樋口春三, 1995: *Ficus benjamina* L.の弱光馴化による光補償点と葉内糖含量の変化. 園学雑 [花き] , **64**(別1), 496-497.

Kautsky, H. and Hirsch, A., 1931: Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften*, **19**, 964.

Kim, M. S., McMyrtrey III, J. E., Mulchi, C. L., Daughtry, C. S. T., Chappelle, E. W., and Chen, Y.,

2001: Steady-state multispectral fluorescence imaging system for plant leaves. *Appl. Optics*, **40**(1), 157-166.

近藤三雄・鳥山貴司, 1989: 室内等の緑による VDT 作業がもたらす視覚疲労の回復効果に関する実験的研究. 造園雑誌, **52**, 139-144.

Krause, G. H., Vernotte, C., and Briantais, J.-M., 1982: Photo induced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae. Resolution into two components. *Biochimica et Biophysica Acta*, **679**, 116-124.

Krause, G. H., and Weis E., 1984: Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis Res.*, **5**, 139-157.

空気調和・衛生工学会編, 2001: 第 13 版空気調和・衛生工学便覧 1 基礎篇. 丸善.

Lang, M., Stober, F., and Lichtenthaler, H. K., 1991: Fluorescence emission spectra of plant leaves and plant constituents. *Rad. Environ. Biophysics*, **30**, 333-347.

Lang, M., and Lichtenthaler, H. K., 1991: Changes in the blue-green and red fluorescence-emission spectra of beech leaves during the autumnal chlorophyll breakdown. *J. Plant Physiol.*, **138**, 550-553.

Lasheen, A. and Chaplin, C., 1977: Seasonal sugar concentration in two peach cultivars differing in cold hardiness. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **102**(2), 171-174.

Latouche, G., Cerovic, Z. G, Montagnini, F. and Moya, I., 2000: Light-induced changes of NADPH fluorescence in isolated chloroplasts: a spectral and fluorescence lifetime study. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1460**, 311-329.

Lichtenthaler, H. K. and Rinderle, U., 1988: The role of chlorophyll fluorescence in the detection

of stress conditions in plants. *Suppl. 1*, **19**, S29-S85.

Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., Doll, M., Fietz, H.-J., Bach, T., Kozel, U., Meier, D. and Rahmsdorf, U., 1981: Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis Res.*, **2**(115), 115-141.

Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., Rinderle, U. and Schmuck, G., 1986: Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiat Env. Biophys.*, **25**, 297-308.

Lichtenthaler, H.K., Kuhn, G., Buschmann, C. and Meier, D., 1982: Adaptation of Chloroplast-ultrastructure and of chlorophyll-protein levels to high-light and low-light growth conditions. *Z. Naturforsch.*, **37**, 464-475.

牧野周, 2002: 作物葉の光合成能力と Rubisco の関係についての解析. 日本土壤肥科学雑誌, **73**(3), 245-248.

増田芳雄, 1977: 植物生理学. 培風館, 203-214.

McMyrtrey III, J. E., Chappelle, E. W., Kim, M. S., Meisinger, J. J., and Bandel A., 1990: Sensing levels of nitrogen deficiency in field and greenhouse grown corn (*Zea mays* L.) with laser induced fluorescence. *IGARSS*, **3**, 1941-1944.

南茂夫, 1986: 科学計測のための波形データ処理, CQ 出版.

Mineuchi, K., Takahashi, K., Komatsu, A. and Tatsumoto, H., 1999: Seasonal variation of laser induced fluorescence spectra in tree leaves. *Environ. Technol.*, **20**, 633-638.

Mineuchi, K., Takahashi, K., and Tatsumoto, H., 2001: Effects of UV-B radiation on laser-induced fluorescence spectra in crop leaves. *Environ. Technol.*, **22**, 151-155.

三浦利夫・飛岡次郎, 1993: 緑空間の心理的機能と評価法に関する研究. 造園雑誌, **56**(5), 235-240.

Morales, F., Bellkhodja, R., Goulas, Y., Abadia, J. and Moya, I., 1999: Remote and near-contact chlorophyll fluorescence during photosynthetic induction in iron-deficient sugar beet leaves. *Remote Sens. Environ.*, **69**, 170-178.

森一朗, 1992: 東京ベイホテル東急. 建築技術, **1**, 168-171.

Mpelkas, C., 1990: Plant lighting in landscaped areas. *Int. Light. Rev.*, **41**(1), 26-30.

Méthy, M., Olioso, A. and Trabaud, L., 1994: Chlorophyll fluorescence as a tool for management of plant resources. *Remote Sens. Environ.*, **47**, 2-9.

日本建築学会編, 1994: アトリウムの環境設計. 彰国社, 149pp.

仁科弘重・中村博文・浅海英記・増井典良・橋本康, 1995: 植物を配置した室内の温熱環境・快適性の予測モデルの作成. 生物環境調節, **33**(4), 277-284.

岡本章・長谷川俊雄・戸河里敏, 1991: KI ビルの空気調和設備. 空気調和・衛生工学, **65**(13), 39-55.

岡野邦夫・松尾喜義, 1994: チャにおける光合成の冬期低下現象と品種及び葉齢との関係. 日作紀, **63**(2), 240-246.

大川原良次・金子誠二, 1993: 芝草 3 草種におけるクロロフィル蛍光の測定と低温下での変化. 大成建設技術研究所報, **26**, 375-380.

岡崎恵視・梅原京子・大浦優子・古谷庫造, 1978: プロダクトメーターによる陸上植物の光合成測定 (II) - イチョウとケヤキの葉における光合成活性の季節的变化. 東京学芸大学

紀要 4 部門, **30**, 265-272.

大政謙次・安保文彰・橋本康・相賀一郎, 1979: 画像処理による植物の大気汚染害の評価. 国立公害研究所研究報告, **10**, 269-274.

Omasa, K., Shimazaki, K., Aiga, I., Larcger, W. and Onoe, M., 1987: Image analysis of chlorophyll fluorescence transients for diagnosing the photosynthetic system of attached leaves. *Plant Physiol.*, **84**, 748-752.

大政謙次・清水英幸・小川和雄・増喜彰久, 1993: サーモグラフィ装置によるヘリコプターからの樹木の診断. 生物環境調節, **31**(3), 161-168.

大政謙次・田島彰・宮坂佳代子, 1990: サーモグラフィによる街路樹 (仙台市ケヤキ並木) の診断. 農業気象, **45**(4), 271-275.

Ramalho, J. C., Quartin, V. L., Leitao, E., Campos, P. S., Carelli, M. L. C., Fahl, J. I. and Nunes, M., A., 2003: Cold acclimation ability and photosynthesis among species of the tropical *coffea* genus. *Plant Biol.*, **5**(6), 631-641.

佐川美佳・蔵田憲次・高橋邦夫・峰内健一, 2001a: レーザ誘起蛍光法による樹木の長期弱光ストレスおよび水ストレス検出の可能性. 農業気象, **57**(1), 41-48.

佐川美佳・蔵田憲次・高橋邦夫・峰内健一, 2001b: 樹木葉の暗処理によるレーザー誘起蛍光誘導期現象および葉内糖濃度の変化. 農業気象, **57**(1), 49-54.

佐川美佳・蔵田憲次・高橋邦夫・福地健一, 2004: 弱光などのストレスを受ける屋内樹木のレーザー誘起蛍光誘導期現象の新たな解析法. 農業気象, **60**(2), 123-131.

Saito, Y., Kanoh, M., Hatake, K., Kawahara, T. D. and Nomura, A., 1998: Investigation of laser-induced fluorescence of several natural leaves for application to lidar vegetation monitoring.

Appl. Opt., **37**(3), 431-437.

照明学会, 1999: 屋内照明基準

沢田信一, 1996: 光合成のソース・シンク制御機構の視点から. 日本生態学会誌, **46**, 103-107.

Schmuck, G. and Moya, I., 1994: Time-resolved chlorophyll fluorescence spectra of intact leaves. *Remote Sens. Environ.*, **47**, 72-76.

Schmuck, G., Moya, I., Pedrini, A., Linde, D., Lichtenthaler, H. K., Stober, F., Schindler, C., and Goulas, Y., 1992: Chlorophyll fluorescence lifetime determination of waterstressed C3- and C4-plants. *Radiat. Environ. Biophys.*, **31**, 141-151.

Schreiber, U., Fink, R. and Vidaver, W., 1977: Fluorescence induction in whole leaves: differentiation between the two leaf sides and adaptation to different light regimes. *Planta*, **133**, 121-129.

Schreiber, U., Schliwa, U. and Bilger, W., 1986: Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.*, **10**, 51-62.

Schreiber, U., Vidaver, W., Runeckles, V. C. and Rosen, P., 1978: Chlorophyll Fluorescence assay for ozone injury in intact plants. *Plant Physiol.*, **61**, 80-84.

Scrivens, S., 1976: Interior landscaping 2 environment and construction. *Arch. J.*, **181**(5), 41-46.

Shimazaki, K., Ito, K., Kondo, N., and Sugihara, K., 1984: Reversible inhibition of the photosynthetic water-splitting enzyme system by SO₂-fumigation assayed by chlorophyll fluorescence and EPR signal in vivo. *Plant Cell Physiol.*, **25**(5), 795-803.

Smillie, R. M., 1983: Chlorophyll fluorescence in vivo as a probe for rapid measurement of tolerance to ultraviolet radiation. *Plant Sci. Letters*, **28**, 283-289.

Smillie, R. M., and Hetherington, S. E., 1983: Stress tolerance and stress-induced injury in crop plants measured by chlorophyll fluorescence in vivo. *Plant Physiol.*, **73**, 1043-1050.

Smillie, R. M., and Nott, R., 1982: Salt tolerance in crop plants monitored by chlorophyll fluorescence in vivo. *Plant Physiol.*, **70**, 1049-1054.

Stein, Y., Buschmann, C., Blaich, R., and Lichtenthaler, H. K., 1990: Induction kinetics of delayed fluorescence of sun and shade leaves of *Fagus sylvatica* in the ms-range. *Radiat. Environ. Biophys.*, **29**, 119-128.

Stober, F., Lang, M., and Lichtenthaler, H. K., 1994: Blue, green, and red fluorescence emission signatures of green, etiolated, and white leaves. *Remote Sens. Environ.*, **47**, 65-71.

Stober, F., and Lichtenthaler, H. K., 1993: Characterization of the laser-induced blue, green and red fluorescence signatures of leaves of wheat and soybean grown under different irradiance. *Physiol. Plantarum*, **88**, 696-704.

Subhash, N., and Mohanan, C. N., 1994: Laser-induced red chlorophyll fluorescence signatures as Nutrient stress indicator in rice plants. *Remote Sens. Environ.*, **47**, 45-50.

Subhash, N., Wenzel, O. and Lichtenthaler, H.K., 1999: Changes in blue-green and chlorophyll fluorescence emission and fluorescence ratio during senescence of tobacco plants. *Remote. Sens. Environ.*, **69**, 215-223.

立原敦・疋田昌之・森川泰成・斉藤正文, 1995: サッポロファクトリーにおねる積雪寒冷都市型アトリウム環境・エネルギー計画. 空気調和・衛生工学, **69**(12) 53-68.

高橋邦夫・峰内健一・江森康文・小林智・石井弘允, 1995: レーザ誘起蛍光法による植物の生育状態のモニタリングに関する基礎的研究. 照明学会誌, **79**(11), 86-92.

高橋邦夫・峰内健一・江森康文・小林智・石井弘允, 1997: レーザ誘起蛍光法による植物の生育状態のモニタリングに関する基礎研究 (第2報). 照明学会誌, **81**(5), 420-429.

高橋邦夫・峰内健一・小林拓・中村時久・小泉美香・狩野宏美, 1992: 植物葉からの蛍光の誘導期現象による生体情報. 木更津工業高等専門学校紀要, **25**, 87-92.

Takahashi, K., Mineuchi, K., Kobayashi, H., Sakurai, N., Komatsu, A., Takahashi, M., Nakamura, T., Koizumi, M., and Kano, H., 1994: Spectral changes of laser induced chlorophyll fluorescence in crop leaves by temperature, air-pollutants and genetic inheritances. *Proc. 6th int. colloquium-phys. Measurements signatures remote sens., Val d'Isère, France.* 17-21 January, 961-968.

高橋邦夫・峰内健一・小林拓・中村時久・小泉美香・狩野宏美, 1993: LIF法によるO₃を暴露したインゲン生葉の蛍光スペクトル計測. 日本リモートセンシング学会 第15回学術講演会論文集, 189-192.

Takahashi, K., Mineuchi, K., Nakamura, T., Sakurai, N., Komatsu, A., Koizumi, M., and Kano, H., 1993: Laser induced fluorescence of tree leaves: spectral changes with plant species and seasons. *IGARSS*, **4**, 1985-1987.

高橋邦夫・中村時久・小泉美香・狩野宏美, 1991: LIF法によるクスノキからの生体情報 I. 木更津工業高等専門学校紀要, **24**, 53-58.

高橋良典・長嶋裕司・古館誠, 1994: 新宿パークタワー. 建築設備, **45**(12), 1-6.

Takeuchi, A., Saito, Y., Kawahara, T. D. and Nomura, A., 2001: Possibility of disease process monitoring of plants by laser-induced fluorescence method –Development and evaluation of LIF measurement systems–. *SPIE*, **4153**, 22-29.

谷山栄一・中野渡晴夫・隅和弘・西端康介・西村泰弘・渡辺博史, 1995: シーホークホテル & リゾート. 建築設備, **46**(8) 1-11.

Tobe, K. and Omasa, K., 1999: Leaf age dependence of chlorophyll fluorescence parameters in water-stressed leaves of *phaseolus vulgaris* L. *J. Agric. Meteorol.*, **55**(2), 155-163.

Valentini, R., Cecchi, G., Mazzinghi, P., Mugnozza, G. S., Agati, G., Bazzani, M., Angelis, P. De., Fusi, F., Matteucci, G., and Raimondi, V., 1994: Remote sensing of chlorophyll a fluorescence of vegetation canopies: 2. Physiological significance of fluorescence signal in response to environmental stresses. *Remote Sens. Environ.*, **47**, 29-35.

渡邊朋也・山本晴彦・寒川一成, 1994: 長距離移動性イネウンカ類の被害解析Ⅱ. 分光反射率を利用したセジロウンカ飛来成虫による水稻書記被害の回復過程の測定. 応動昆, **38**(3), 169-175.

Wiltens, J., Schreiber, U., and Vidaver, W., 1978: Chlorophyll fluorescence induction: an indicator of photosynthetic activity in marine algae undergoing desiccation. *CAN. J. Bot.*, **56**, 2787-2794.

山本敦史・土井章弘, 1993: 東戸塚教育センター新館. 建築保全, **7**(84), 81-85.

山本晴彦・寒川一成・渡邊朋也・樋口博也, 1991: 分光反射特性を用いた食葉性害虫による被害葉面積率の推定. 農業気象, **47**, 15-20.

山本晴彦・鈴木義則・小島孝之・早川誠而・井上康・田中宗浩, 1994: 近赤外域の分光反射特性による植物の葉内水分量の推定. 日本リモートセンシング学会誌, **14**(4), 293-301.

吉田篤正・明石徳之・牧野俊郎, 1999: 植物群落およびその構成要素の太陽光に対する分光指向反射特性計測に関する研究. 太陽エネルギー, **25**(3), 41-46.

吉村晴佳・小橋澄治・大手桂二・妹尾俊夫, 1991: 樹葉の分光反射特性変化およびその色彩の数値的解析についての研究. 日本リモートセンシング学会誌, **11**(2), 5-17.

謝辞

本研究は、東京大学大学院 農学生命科学研究科 生物・環境工学専攻の蔵田憲次教授のご指導の下で行われたものであります。本論文を結ぶにあたり、研究の機会を与えていただき、終始懇切丁寧なるご指導、ご鞭撻を賜りました蔵田憲次教授に衷心より敬意と感謝の意を表します。

また、本論文をまとめるにあたり、貴重なお指示とご指導を賜りました東京大学大学院 農学生命科学研究科 生物・環境工学専攻の大下誠一教授、大政謙次教授、横山伸也教授ならびに富士原和宏助教授、そして、本研究への取り組みを後押しくださった福岡国際大学の高倉直学長に深く感謝いたします。

さらに、本研究を始めるきっかけを作ってください、研究を進めるにあたり常に適切なお指導をいただきました木更津工業高等専門学校 基礎学系物理の高橋邦夫教授、福地健一助教授、信州大学工学部 情報工学科の斉藤保典教授に深く御礼申し上げます。また、糖の分析法について、数々のアドバイスやご助力をいただいた茨城大学 農学部 生物生産科学科の原弘道助教授に心より御礼申し上げます。

このほか、新菱冷熱工業株式会社に在職中の私に本研究の機会を与えてくださった新菱冷熱工業株式会社の加賀美郷会長、坂井英昭社長、新菱冷熱工業株式会社 技術統括部の橋本健部長に厚く御礼申し上げます。また、本研究の円滑な遂行にご配慮いただいた、新菱冷熱工業株式会社 中央研究所の千田公男取締役所長、須藤俊彦主席研究員に感謝いたします。さらに、常に私を勇気づけ励まし続けてくださった新菱冷熱工業株式会社 中央研究所の阿部靖則課長、小島洋志主任、前田真紀子氏（現株式会社レモン）横田昇平氏、田中幸悦主任、酒本晋太郎主任をはじめとする諸先輩、諸兄に深い感謝の意を表します。

最後に、本研究における装置製作にご助力くださった故田中祥夫氏に、謹んで哀悼の意を表します。