

博士論文

フラウンホーファー線を用いたクロロフィル蛍光
パラメータの推定と精度検証

冨布新巴雅尔

目次

第1章	序論	1
1.1	研究背景	2
1.2	既往の研究	3
1.3	研究目的	3
1.4	本論文の構成	3
第2章	光合成色素および蛍光	4
2.1	光合成色素の蛍光	5
2.2	クロロフィル蛍光	5
2.2.1	クロロフィルの吸収	5
2.2.2	葉の吸収	5
2.2.3	クロロフィルの抽出	5
2.2.4	クロロフィル蛍光	5
2.2.5	クロロフィル蛍光収率比	5
2.2.6	クロロフィル蛍光パラメータ	5
第3章	定常クロロフィル蛍光の測定	3
3.1	本研究の目的	4
3.2	植物材料及び生育環境	4
3.3	人工光励起の定常クロロフィル蛍光の測定	5
3.3.1	測定システムの概要	2
3.3.2	励起光源とフィルター特性	2
3.3.3	クロロフィル蛍光のスペクトル特性	2
3.4	太陽光励起の定常クロロフィル蛍光の測定	3
3.4.1	蛍光の受動型測定の現状	3
3.4.2	FLD法による蛍光推定	2
3.4.3	システムの概要	2
3.4.4	FLD法の応用	2
3.5	結果	3
3.6	考察	3

3.7	本章のまとめ	3
第4章	飽和パルス法によるクロロフィル蛍光の測定	3
4.1	本研究の目的	4
4.2	植物材料及び生育環境	4
4.3	飽和パルス光によるクロロフィル蛍光の測定	4
4.3.1	測定システムの概要	2
4.3.1	飽和パルス光の波長と強度	2
4.3.3	飽和パルス光による蛍光測定	2
4.4	結果	3
4.4.1	パプリカ	2
4.4.2	トウモロコシ	2
4.4.3	パキラ	2
4.5	考察	3
4.5.1	光化学系Ⅱの量子収率	2
4.5.2	非光化学消光	2
4.5.3	電子伝達率	2
4.5.4	蛍光パラメータ間関係とFLD法の有効性の検証	2
4.6	本章のまとめ	3
第5章	総括	3
5.1	本研究の要約	2
5.2	今後の課題	2

謝辞

引用文献

第 1 章、序論

1. 序論

1.1 研究背景

植物光合成は明反応系と暗反応系に分かれ、吸収された光エネルギーを化学エネルギーに変換し、その化学エネルギーを用い二酸化炭素を Rubisco の触媒によりカルビン—ベンソン回路に取り込み、炭水化物を生成過程である (佐々木 2009)。光合成を行う全ての真核藻類や陸上植物は細胞小器官である葉緑体を持ち、その中に含まれるクロロフィル (葉緑素) が光を吸収する主な役割を果たしている (Porcar-Castell et al. 2014)。吸収されたエネルギーの中、ほんの一部が電子伝達と光合成による炭酸同化を駆動する反応に使われ、大部分は熱として失われ、更に少ない割合の約 1~2% がクロロフィル蛍光としてより長い波長で再び放出される (Jones and Vaughan 2010)。

1931年、ドイツの科学者 Kautsky と Hirsch による植物の蛍光強度の急速な変化が発表されて以来、クロロフィル蛍光は光合成研究に便利な指標として長い間研究されてきた (Govindjee 1995, Baker 2008, Omasa et al. 2009)。クロロフィル蛍光はクロロフィル含有量の推定等の基礎的な研究から農業、園芸、森林学などの研究に適用され、光合成装置、葉の成長プロセス、健在状態、ストレス現象などを評価する幅広い分野に使われている (Gitelson et al. 1998, Buschmann 2007, Konishi et al. 2009)。690 nm と 730 nm 付近のレーザー励起の最大蛍光比と定常蛍光比 (Hak et al. 1990) と、685 nm と 735 nm 付近の定常蛍光比 (Gitelson et al. 1997) が共にクロロフィル含有量と高い相関を示し、クロロフィル含有量を非破壊推定できる指標として使われている。

クロロフィル蛍光測定は能動型と受動型に分かれる。能動型蛍光測定システムは、主に実験室内または室外の数m以内の励起光の補助で行われるが、フィルターで励起光と蛍光の波長を絞る必要がある。能動型は光合成機能のリモートセンシングやストレスの研究に広く適用されてきたが、近距離の測定であるため、小さい植物や個々の葉を対象とした計測に限られる (Kolber et al. 2005)。更に開発された変調パルス光 (PAM) 方法は、変調させたクロロフィル蛍光信号を測定し、蛍光パラメータと光化学系 II の最大量子収率、非光化学消光 (NPQ) や、電子伝達を計算し、二酸化炭素固定速度の推定に利用できる (Schreiber et al. 1986, Bilger and Bjorkman 1991, Parinaz et al. 2012)。

クロロフィル蛍光遠隔測定には、受動型蛍光測定システム—太陽光励起蛍光測定が有効である。これは、760nm 付近のフラウンホーファー線深度 (Fraunhofer line depth: FLD) を利用し、放射輝度に基づき蛍光を抽出する方法である (Moya et al. 2004)。近年、受動型蛍光測定は、飛行機または衛星からの遠距離の計測に応用され、成果を上げている。しかし、太陽光の高

いバックグラウンド反射から如何に非常に弱い蛍光を検出するかは、高スペクトル分解能搭載の測定器械に期待される (Meroni and Colombo 2006, Meroni et al, 2009)。

現在、PAM 法に基づく能動的なクロロフィル蛍光測定法と太陽光クロロフィル蛍光測定法には固有の違いがあり、生じる課題に遭遇している。具体的に、葉レベルの実験では、太陽光と PAM による計測されたクロロフィル蛍光パラメータの関係性に特徴づける必要がある (Tubuxin et al. 2015)。

1.2 既往の研究

植物は地球上で最も進化した生き物の一つで、自ら光合成過程を経て、自分の命を維持するために必要な栄養を生成する。この過程で、太陽光エネルギーが吸収され、水と二酸化炭素が炭水化物として蓄積され、動物に必要な酸素を放出する。生体内では、主にクロロフィルによる吸収された光エネルギーが全て光合成に使われなく、熱として逃がされる割合が大きく、また約3%以下が蛍光として放出される。この三つの過程はお互いに競争しながら存在し、どちらかの収率が上がると残りの二つの収率が下がる (Krause and Wei 1991, Maxwell and Jonson 2000, Jones and Vaughan 2010, Porcar-Castell et al. 2014)。これと対照に、エーテルなどの有機溶媒で抽出されたクロロフィルが強い蛍光を放出し、クロロフィル a の蛍光量子収率が約30%に達する (Barber et al. 1989)。

クロロフィル蛍光の測定は光合成を研究する最も広く使用されている方法の一つであり、植物、緑藻類、珪藻の蛍光について異なる研究方法や意見が数多く発表されている (Papageorgiou et al. 2007, Logan et al. 2007, Omasa et al. 2009, Murchie and Lawson 2013)。クロロフィル蛍光シグナルの内容は非常に豊富で、光合成の変化に非常に敏感であり高い精度で記録される。多くのプロセスは蛍光収率または強度に影響を与え、フラッシュ光、パルス光、連続光等の光プロトコルのさまざまな方法で異なるプロセスが研究されている。しかし、ほとんどの研究者は限られたセットの実験プロトコルを使用し実験を行っている (Kalaji et al. 2014)。クロロフィル蛍光の特徴は、非破壊、非接触で、細胞レベルから葉、個体、群落レベルまで迅速に測定ができることである。クロロフィル蛍光の測定は光の測定で、比較的簡単で、低コストであるため、生体情報を測定分野に注目されている (Omasa et al. 1987 and 2007, Lichtenthaler et al. 1992, Kolber et al. 1998, Kim et al. 2001, Omasa and Takayama 2003, Schreiber, 2004, Moya et al. 2004, Konishi et al. 2009, Pieruschka et al. 2012 and 2014)。

クロロフィル蛍光測定は励起光の特徴により能動型と受動型に分かれる。能動型は人工光やレーザー光などの励起光源の下で測定が行われ、受動型は太陽光の自然光下でクロロフィル蛍光測定を行う方法である。また、クロロフィル蛍光信号を抽出方法により、分光特性法、パルス変調測定法、フラウンホーファー線法、二次元又は三次元画像化法に分けられる。

能動型測定法は、小さい植物や個々の葉を対象とした近距離での測定に限られるが、レーザーなどのパルス光と組合せることで、長距離や群落レベルで蛍光測定が可能になっている。しかし、この方法と遠くても50m 範囲内に限

られ、衛星リモートセンシングからの測定には課題が残されている (Kolber et al. 2005, Pierurschka et al. 2012; 2014)。能動的測定法の一つであるパルス変調測定法を用い、光化学系Ⅱの量子収率($\Phi_{PSⅡ}$)、非光化学消光(NPQ)、電子伝達率(ETR)などの蛍光パラメータを推定することができ (Schreiber et al. 1986, Krause and Weis 1991)。

受動型クロロフィル蛍光測定は主に、衛星リモートセンシングデータを解析し、蛍光情報を抽出する方法である (Meroni et al. 2009)。この方法は、人工光の励起を必要なく、航空機や衛星を用い群落レベルのより広い範囲で測定ができる利点がある。しかし、太陽光の不安定な強い背景分光特性から非常に弱い蛍光成分を精度よく分離するかは、高い分解能の精度のある装置に期待される (Meroni and Colombo, 2006)。近年、太陽光励起の定常クロロフィルの測定が盛んになり、測定精度や解析方法の改善が報告されている (Plascyk et al. 1975, Moya et al. 2004, Liu et al. 2005, Corp et al. 2006, Meroni et al. 2006 and 2009, Rascher et al. 2008, Liu and Cheng 2010, Zarco-Tejada et al. 2012)。GOSAT衛星から太陽光励起の定常クロロフィル蛍光の測定により、地球規模での炭素循環を評価し、注目を集めている (Frankenberg et al. 2011, Joiner et al. 2011, Porcar-Castel et al. 2014)。

Omasaら(1987)によって開発されたクロロフィル蛍光の画像化技術は非破壊非接触測定を更に拡張させた。この研究で、キュウリ葉面のSO₂曝露直後、及び回復時にクロロフィル蛍光経時変化が不均一であることが示された。気孔開口、非光化学消光、光化学系Ⅱの量子収率など蛍光パラメータを二次元又は三次元で画像化し、光合成情報を葉面上立体化させることができた (Omasa and Takayama 2003, Omasa et al. 2007)。蛍光画像化は、細胞内、葉、または全植物の蛍光強度の空間的な不均一性の研究を可能にする。伝統的な方法より葉の広い領域から蛍光信号を分析することができる。これらの研究は、人工光源の下で行われ、太陽光の下でフラウンホーファー線法による蛍光パラメータの画像化はまだ行われていない。

最近の太陽光励起の定常クロロフィル蛍光測定(FLD法)の流行は、この方法の更なる評価の必要性を示している。PAM法に基づく能動型クロロフィル蛍光法と太陽光励起の定常クロロフィル蛍光法には、固有の違いがあり、生じる課題に遭遇している。具体的には、葉レベルでの実験では、FLD法とPAM法による計測されたクロロフィル蛍光の関係性に特徴づける必要がある (Porcar-Castel et al. 2014)。定常状態クロロフィル蛍光は、クロロフィルによって再吸収されることが知られ、クロロフィル含有量が分かる時のクロロフィル蛍光の評価が必要であると考えられる。総一次生産と植生指数がバイオマスやクロロフィル含有量と相関すると同様に、太陽光励起の定常状態

クロロフィル蛍光と光合成反応の関連性が注目を集めている (Frankenberg et al. 2011, Joiner et al. 2011, Van der Tol et al. 2014)。

蛍光の量子収率は、蛍光発色団の性質とその周辺に依存する。環境条件一定であっても、熱放散活性や光化学反応の変化に伴い変化し、複雑な挙動をする。蛍光収率の減少は、光化学消光 (PQ) と非光化学消光 (NPQ) に起因するので、光合成反応を様々方法で評価する貴重なツールとなっている (Schreiber et al. 1986, Campbell et al. 1998, Franck et al. 2002, Omasa and Takayama 2003, Omasa et al. 2007, Rahimzadeh-Bajgiran et al. 2012, Gorbe and Calatayud 2012, Guanter et al. 2014)。

1.3 研究目的

クロロフィル蛍光は主にクロロフィル a から放出され、光合成の反応に関する情報は豊富である。クロロフィル蛍光の測定は、光合成研究のために広く使用されている方法の1つである。

そこで本研究では、太陽光励起下でフラウンホーファー線（酸素吸収帯： O_2B と O_2A ）を用いたクロロフィル蛍光測定法を従来法である人工光励起の測定法と比較し、クロロフィル含有量の推定を検証することが一つ目の目的である。

また、酸素吸収帯 O_2A であるフラウンホーファー線を用い、光化学系 II の量子収率 (Φ_{PSII})、化学消光 (NPQ) と電子伝達率 (ETR) を推定する新しい方法を提案し、従来の PAM 法と比較研究を行い、フラウンホーファー線法によるクロロフィル蛍光パラメータの推定を検証することが二つ目の目的である。

1.4 本論文の構成

本論文は5章で構成される。第1章の序論では、本研究の背景及びクロロフィル蛍光の既往の研究を纏めた。なぜクロロフィル蛍光の測定が重要か、能動方式の蛍光測定は方法的に確立されており、高精度での蛍光測定が可能であるのに対して、受動方式の蛍光測定は、非常に弱い蛍光信号を分光放射輝度から推定するため、測定法としての検証が必要であることを説明した。第2章の序論では、クロロフィル蛍光の基礎知識について述べた。クロロフィル蛍光の波長分光特性を紹介し、葉の再吸収のクロロフィル蛍光への影響について述べた。第3章の序論では、定常クロロフィル蛍光について、能動方式と受動方式で測定された蛍光収率とクロロフィル含有量との関係を検討した。太陽光励起の定常クロロフィル蛍光を測定し、クロロフィル含有量の推定の有効性について検証した。第4章では、飽和パルス光によるクロロフィル蛍光の測定において、能動方式と受動方式で測定された蛍光パラメータ (Φ_{PSII} 、NPQ、ETR) を比較し、精度検証を行った。第5章は、本論文の総括であり、本研究の結果を纏めた。本論文では、太陽光励起下でフラウンホーファー線 (酸素吸収帯: O_2B と O_2A) を用いたクロロフィル蛍光測定法について検討し、クロロフィル含有量の影響やクロロフィル蛍光パラメータ (Φ_{PSII} 、NPQ と ETR) の推定精度の検討を、従来法との比較で行った。本研究で提案された新しい方法によるクロロフィル含有量やクロロフィル蛍光パラメータの推定の有効性が検証された。

第 2 章、光合成色素および蛍光

2. 光合成色素および蛍光

2.1 光合成色素の蛍光

光合成色素には、クロロフィル、カロテノイド、フィコビリンの3種類が存在し、光合成生物はクロロフィルとカロテノイドを必ず持ち、フィコビルンはシアノバクテリアや真核藻類など一部の藻類にしか存在しない。これらの色素は、光エネルギーを吸収し、反応中心へエネルギーを効率よく移動させる働きをする（佐藤 2002）。

異なる色素は異なる波長の光を吸収するので、植物も様々な色に見える。クロロフィルは、青いと赤い光をよく吸収するので、多くの植物は残りの緑色光の散乱や、反射で緑色に見える。カロテノイドは主に青い波長(400-500nm)の光を吸収するので、オレンジ色に見える。フィコビルンは緑色波長の光を吸収するので、青から紫色に見える（園池）。

植物光合成の中でクロロフィルは最も重要な色素であり、反応中心の電子伝達と光捕集の二つの役割を担う。カロテノイドは吸収したエネルギーをクロロフィルに渡す機能と、励起されたクロロフィルや活性酸素を除去し無毒化することで光合成装置を光酸化反応から守る役割も果たす(塩井ら 2012)。フィコビルンは光化学系 II のアンテナとして主に働き、吸収されたエネルギーの一部を光化学系 I にも渡す。しかし、このエネルギー分配の仕組みはまだ明らかになっていない（園池）。

光合成色素に吸収されたエネルギーの中、一部が電子伝達と光合成による炭酸同化を駆動する反応に使われ、大部分は熱として失われ、非常に少ない割合がクロロフィル蛍光として放出されることが知られている(図 2-1)。光合成反応中心にクロロフィルが存在するため、クロロフィル蛍光が長い間光合成研究に使われてきた。クロロフィル蛍光について数多くの報告があり、様々な方法で蛍光パラメータによる光合成装置の組織、機能、順応等が細胞レベルから葉レベルまで徐々に明らかになり、レビューされた (Krause and Weis 1991, Govindjee 1995, Maxwell and Johnson 2000, Buschmann 2007, Baker 2008, Meroni et al. 2009, Stirbet and Govindjee 2012, Lichtenthaler et al. 2013, Murchie and Lawson 2013, Kalaji et al. 2014, Porcar-Castell et al. 2014)。

一方、アセトンなど溶媒に抽出されたカロテノイドの一種類である β -carotene は 560-620 nm 付近で非常に弱い強度の緑蛍光を発光するが (Gillbro and Cogdell 1989)、秋のクロロフィル濃度が十分に落ちたイチヨウ葉も 530-620 nm 付近の広い範囲で蛍光ピークを待ち (Lang et al. 1991)、カロテノイド蛍光は *in vitro* と *in vivo* で非常に似たスペクトル特徴を示し

た。

また、ハイパースペクトル共焦点蛍光イメージング (Hyperspectral confocal fluorescence imaging) によるシアノバクテリアの光合成色素であるクロロフィル、カロテノイドとフィコビリンを局在化する研究では、色素それぞれの蛍光を *in vivo* で分離することができた (Vermaas et al. 2008)。この研究によると細胞壁やチラコイド膜から非常に弱いカロテノイド蛍光 (550-600 nm) が計測された。フィコビルン蛍光 (640 nm) は細胞の周辺から強く発せられ、チラコイドの外側に存在することが確認された。クロロフィル蛍光 (685 nm と 698 nm) は細胞全体から均等に計測された。

ここで、本研究の対象でもある光合成研究にもっとも重要視されているクロロフィルとその蛍光について説明する。

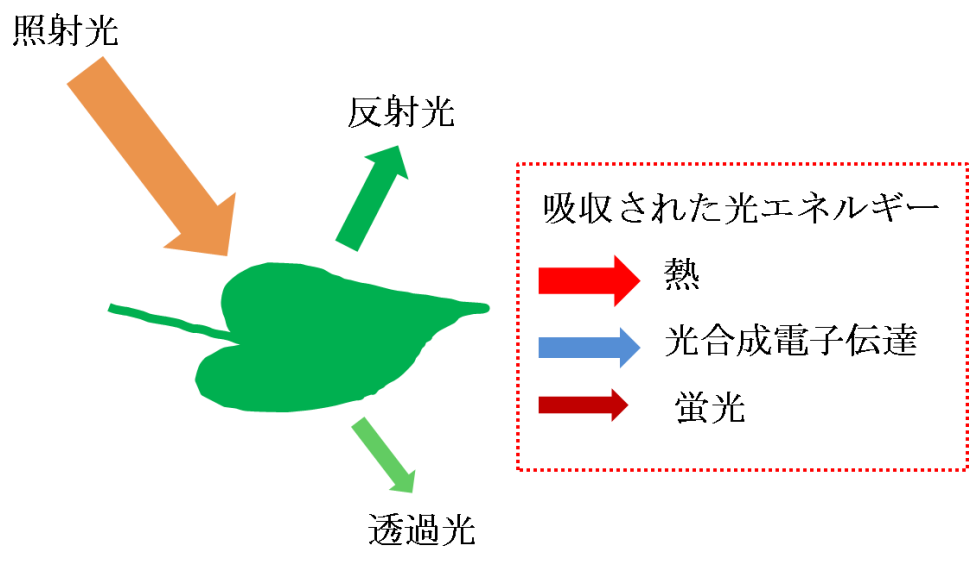


図 2-1 葉の光エネルギーの収支と蛍光発光の概念図

2.2 クロロフィル蛍光

2.2.1 クロロフィルの吸収

クロロフィルはMgを配位した環状テトラピロールの金属錯体であり、種類も多く、地球上もっとも多い色素である(三室 2011)。その合成は葉緑体内で行われ、植物の葉では乾物量の約2%を占める(塩井ら 2012)。クロロフィルaは酸素発生型光合成生物に共通して存在し、クロロフィルbは高等植物などに見られ、クロロフィルcは珪藻や褐藻に存在し、クロロフィルdは特定のシアノバクテリアに見られる。

高等植物の光合成反応では、光エネルギーを化学エネルギーに変換する光反応がクロロフィル等の色素や電子伝達成分を含んだ反応中心複合体と呼ばれるタンパク質(光化学系I、光化学系II)内で行われる。葉緑体には、集光性色素タンパク質(LHC: light harvesting chromoprotein)に含まれるクロロフィルaとbが光合成反応に使われる光(a: 430nmと660nm, b: 450nmと640nm付近で吸収ピークを持つ、三室 2011)を吸収する役割を果たす。ほとんどのクロロフィルaは光を補足するアンテナクロロフィルとして働き、ごく一部が光エネルギーを化学エネルギーに変換する反応中心クロロフィルとして機能する。一方、クロロフィルbが吸収したエネルギーをクロロフィルaに渡すアンテナクロロフィルとして働く。

図2-2は光合成反応系と電子伝達概念図である。室温で、クロロフィル蛍光は二つの光化学反応系の内、主に光化学反応系IIから発光される(Kalaji et al. 2014, Porcar-Castell et al. 2014)。ここで赤い矢印の点線は電子の動きを示す。アンテナクロロフィルから伝えられたエネルギーで光化学系II反応中心の電子供与体P680(クロロフィル2量体)が励起状態になり、電子をプラストキノン(Q_A)に渡し酸化状態になる。マンガングラスタと呼ばれる酸素発生複合体(oxygen-evolving complex)内で水が酸素と水素イオン(H^+)に分解され、得られた電子がP680に渡される。 Q_A に渡された電子が2個と2個のプロトン(H^+)が Q_B と結合し、還元型のキノン(QH_2)になり、更にシトクロム b_6f 、PC、PS Iを介して炭酸固定に到達する。全体の光合成過程では、8光量子のエネルギーが使われて、1分子の CO_2 が糖になる(佐藤 2002)。

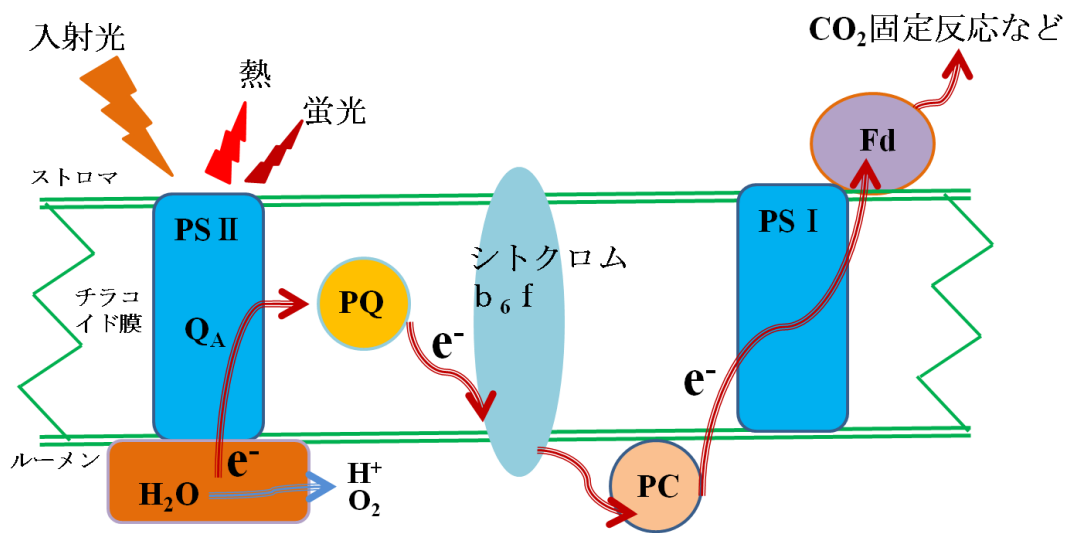


図 2-2 光合成反応系と電子伝達系の概念図。

2.2.2 葉の吸収

葉の吸収

光合成色素であるクロロフィルやカロテノイドに吸収される光波長は400-700 nm であり、これを光合成有効放射 (photosynthetically active radiation: PAR) と呼ぶ。葉の吸収分光特性は光合成色素の有機溶媒で抽出された液の吸光度と大きく異なる (Pfündel and Ghazlen 2007)。葉に当たった光放射は、表面反射、内部散乱と反射、色素による吸収、透過などのプロセスに遭遇する (図 2-1)。

図 2-3(A) で、葉の反射と透過に挟まれた領域が吸収を示す。積分球が付属する分光光度計 (V570, JASCO) を用い、2 nm の分解能で 400-800 nm 範囲の反射 (R) と透過 (T) を測定した。硫酸バリウムのスペクトルを測定し、反射基準とした。黒ウール紙を葉の裏側に設置し、透過光の再反射を防げた。青いと赤い波長域で強い吸収が見られる。

図 2-3(B) は異なるクロロフィル濃度の三つの葉の吸収係数に換算した図である。葉の吸収分光特性は $1-T-R$ により計算した (Buschmann et al. 1994; Gitelson et al. 1998 and 2003)。クロロフィル濃度の抽出について次章で説明する)。青いと赤い波長域では葉の吸収が大きく、緑波長域では反射と透過が大きい。植物が緑色に見える原因をこれで説明できる。また、クロロフィル濃度が落ちると、葉の吸収も著しく落ち、特に長波長側で落ち率が大きかった。

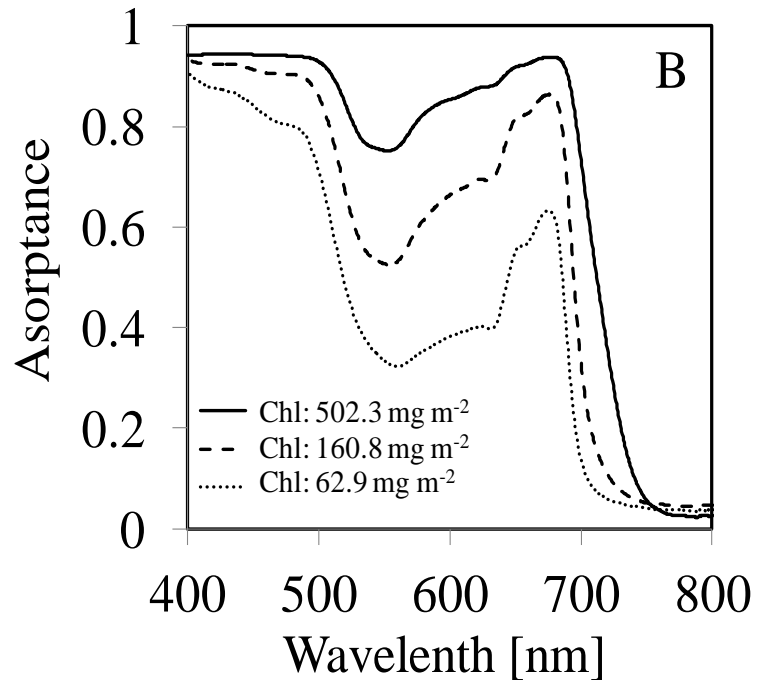
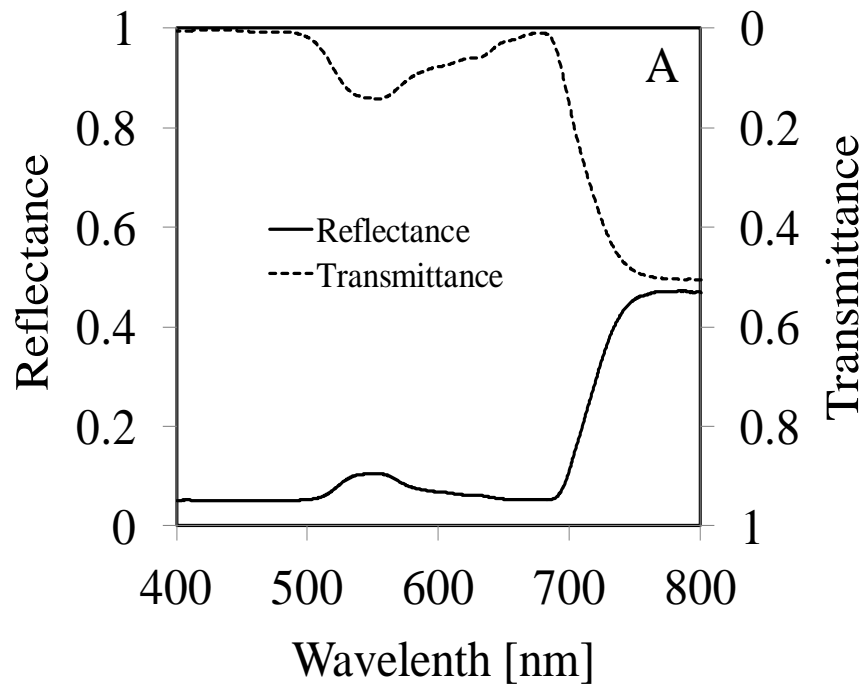


図 2-3 A: パプリカ葉の反射（実線）と透過（破線）の分光特性。B: クロロフィル含有量が異なるパプリカ葉の吸収分光特性。

2.2.3 クロロフィルの抽出

本研究の一連の実験では葉に傷のない、クロロフィル濃度が均一且葉脈が少ない部分を選んで測定に用いた。

クロロフィル蛍光とクロロフィル含有量との関係を求めるため、クロロフィル濃度を定量化する必要がある。クロロフィルの定量化には様々な方法あり、用途によって80%のアセトンによる抽出、100%メタノールによる抽出、ジメチルホルムアミド(DMF)による抽出、吸収分光特性からの推定などがある(園池)。

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いることで高純度のクロロフィルを定量化できる。試料による抽出方法はもっとも基本的であるが、光と酸素がある条件で酸化されてしまい、また、クロロフィルの金属部分が抜かれてフェフィチンなど副産物を生じさせることもある。抽出から測定までの時間を出来るだけ短縮する必要がある(三室 2011)。

今回は、比較的簡単に定量化できるエタノールによる方法を使用した。まずは、葉の測定部分をリーフパンチで1.5 cm の円で打ち抜き、重量を測った。葉を刻んで乳鉢に入れ、8ccのエタノール(96%)を加え乳棒で磨り潰した。合計20ccのエタノールを加え、ホモジナイザーでホモジナイズした。10ccずつ遠心分離管に入れ、2000 rpmで5分間遠心分を行った。分離された液の上層の溶液を3cc石英セルに入れ、分光光度計V570(JASCO)で吸光度を測った。0.5 nm分解能で600-800 nmの波長範囲の分光特性を2回計測し、平均値を取った(図2-3)。クロロフィル濃度は、WintermansとdeMots(1965)が発表した数式により吸収分光特性から算出した：

$$\text{Chlorophyll a} = 13.70 \times (A665 - A750) - 5.76 \times (A649 - A750)$$

$$\text{Chlorophyll b} = 25.80 \times (A649 - A750) - 7.60 \times (A665 - A750)$$

$$\text{Chlorophyll a + b} = 6.10 \times (A665 - A750) + 20.04 \times (A649 - A750)$$

表 V-570 分光光度計測定条件：

測定モード	Abs	測定範囲	600-800 nm
レスポンス	Medium	データ取込間隔	0.5 nm
バンド幅	1.0 nm	光源切替波長	340 nm
バンド幅 (近赤外)	20.0 nm	回折格子切替波長	790 nm
走査速度	400 nm/min		

2.2.4 クロロフィル蛍光

クロロフィル蛍光は、吸収された光エネルギーの放射損失である (Porcar-Castell et al. 2014)。吸収された光エネルギーの一部が熱として失われ、一部が光合成反応に使われるので、放出される光の波長は吸収された光波長より長波長側になる。この現象は Stokes shift 現象として知られている (Buschmann 2007)。光で励起された光合成色素はそのエネルギーを光合成反応の消費、熱放散と蛍光発光に伴い、基底状態に戻る。有機溶媒液では、クロロフィルが高い蛍光収率を示すが、カロテノイドの蛍光収率は極めて低い (Gillbro and Cogdell 1989, Barber 1989)。これに対して、生体内での定常クロロフィル蛍光収率が非常に低く、3%に満たない (Krause and Wei 1991)。

図2-4はパプリカ葉の吸収分光特性と同じサンプルの蛍光分光特性である。吸収分光特性の測定は Fig. 2-3B と同じである。蛍光分光特性の測定方法については次章で説明する。葉は青いと赤い光をよく吸収し、赤と遠赤域で蛍光を発光した。吸収ピークは 684nm 付近、蛍光ピークは 689nm 付近であり、Stokes shift は約 5nm であった。

クロロフィル蛍光と光合成反応、熱放散との関係を調べるには、蛍光の性質と波長特徴を特定する必要がある。また、蛍光と葉のクロロフィル含有量、葉の吸収との関係を把握する必要がある。図 2-4 に示した濃い緑色葉 ($\text{Chl}: 502.3 \text{ mg m}^{-2}$) の蛍光波長は、686nm の小さいピークと 740nm 付近の大きいピークを持つ。蛍光 686nm のピークは葉の 680nm 付近の強い吸収帯と重なり、かなりの量が再吸収されたと考えられる。室温で、この定常クロロフィル蛍光スペクトルはほとんど光化学系 II からの発光であり、熱放散能力の高い光化学系 I の蛍光強度が非常に小さい (Covindjee 1995, Buschmann 2007)。ただし、液体窒素温度 (-196°C) では、740nm 付近で光化学系 I から強い蛍光強度が計測された (Strasser and Butler 1977)。

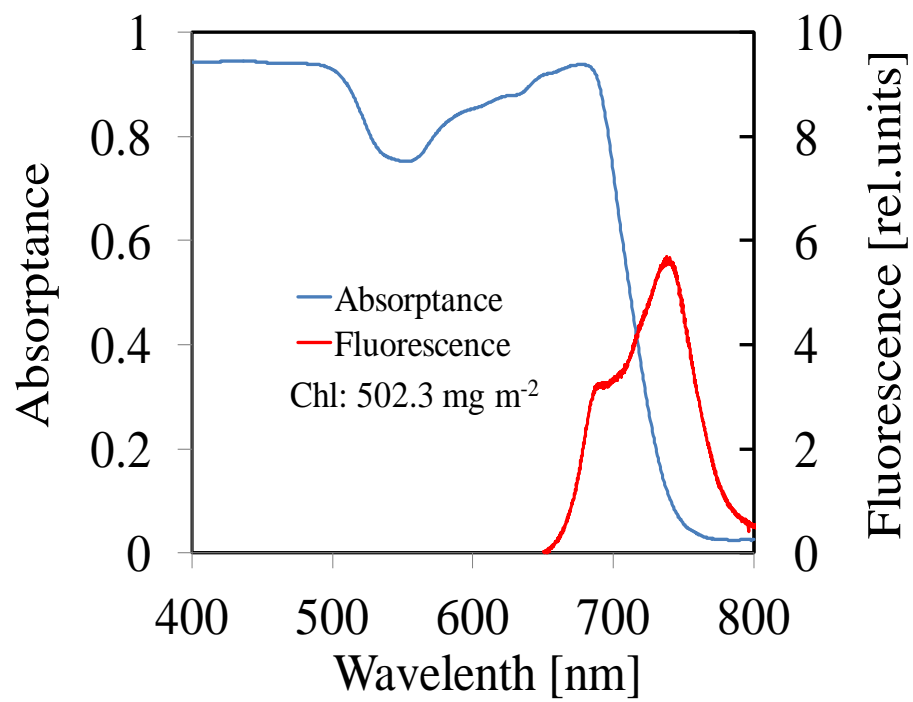


図2-4 葉の吸収と蛍光の分光特性。

2.2.5 クロロフィル蛍光収率比

蛍光値それ自体が意味を持たない(Kalaji et al. 2014)が、まだ多くの研究では“蛍光強度”が使われている。蛍光強度が測定条件によって変化が大きいので、少なくとも励起光との関係を表すため、蛍光収率を求めることが必要である(Omasa and Takayama 2003, Omasa et al. 2009)。

吸収された光量子数に対して蛍光として発せられた光量子数の比を蛍光量子収率(ΦF)と呼び、次式で表す：

$$\Phi F = \frac{F}{I}$$

ここで、Iは吸収された光量子数、Fは蛍光として発せられた光量子数である。本研究において、Fは測定された蛍光強度又は推定された蛍光強度の値で代用した。Iは光の照射強度を葉の吸収係数の経験値である0.84でかけた値で代用した。

蛍光の量子収率は、蛍光発色団の性質とその周辺の両方に依存する。蛍光収率の減少は、光化学消光(PQ)と非光化学消光(NPQ)に起因するので、光合成反応を様々方法で評価する貴重なツールとなっている(Schreiber et al. 1986, Adams et al. 1990, Campbell et al. 1998, Omasa et al. 2007, Zarco-Tejada et al. 2009, Rahimzadeh-Bajgirani et al. 2012, Takayama et al. 2013, Guanter et al. 2014)。

定常クロロフィル蛍光の強度が非常に低く、絶対的な測定は非常に困難であり、慎重な校正が求められ、データもほとんど相対単位を取る。測定器械、励起光の強度、測定角度など測定条件の影響を除去するため、蛍光シグナルは主に F690/ F735 や F690/ F740 など赤や遠赤領域の蛍光比で表される(Buschmann 2007)。F685/F730、F690/F735、F685/F735は光合成作用の変化に左右され、クロロフィル含有量とよい相関を示す(Lichtenthaler and Rinderle 1988, Agati et al. 1995, Gitelson et al. 1998)。太陽光下では、F690/F760は植物の光利用効率の潜在的な指標である(Freedman et al. 2002)。

そこで、本研究では、Moyaら(2004)が提案したフラウンホーファー線法を用い、686nmと760nm付近の酸素吸収帯で蛍光の解析を行い、蛍光収率やその比を求めた。

2.2.6 クロロフィル蛍光パラメータ

クロロフィル蛍光は植物が光合成を行う反応過程で主にクロロフィル a から放出され、光合成の反応に関する情報を豊富に含んでいる。光合成、熱放散、蛍光に行き渡るエネルギーの分配は常に変わり、何れかの収率が変化すると残りの二つの収率も変化する関係にある。

クロロフィル蛍光の能動的な蛍光測定で、市販の変調パルス光 (PAM) 装置を用いれば、 Φ_{PSII} 、NPQ、ETR などの蛍光パラメータを測定できる。しかし、近距離での測定に限定され、遠距離や広範囲での測定には適さない。

Schreiber ら (1986) が飽和パルス光と PAM の組み合わせる新しい方法を開発し、蛍光誘導現象や光化学消光 (Photochemical quenching) と非光化学消光 (Non-photochemical quenching) の測定を行った。消光とは蛍光強度を低下させる要因の総称である。消光が大きいことは、光化学反応や熱放散に使われるエネルギーの割合が大きいことを示す (Krause and Weis 1991)。クロロフィル蛍光測定による光合成に関する情報を得るには、これらも二つの消光成分を分離する必要がある。飽和パルス法とは、一時的に非常に強い光を照射し、光化学反応系へ流れるエネルギーを停止させる (PS II の初期電子受容体をすべて還元し、新たな電子を受け取れない状態にする) ことによって、非光化学消光の情報を得る方法である (Krause and Weis 1991)。

飽和パルス法を用い、蛍光パラメータを抽出する式を Baker (2008) によって説明する。明期光下での定状のクロロフィル蛍光収率 (Φ_{Fs}) を以下の式で表す：

$$\Phi_{Fs} = \frac{k_f}{k_f + k_h + k_p}$$

ここで、 k_f は蛍光の反応定数、 k_h は熱放散経路の反応定数、 k_p は光化学反応系の反応定数である。この明期光の定状、飽和パルス照射すると、瞬間的に全ての電子受容体が還元された状態になり (飽和状態)、光化学反応系の反応定数がゼロ ($k_p=0$) になる。こと時の明期最大蛍光収率 ($\Phi_{Fm'}$) は次式になる：

$$\Phi_{Fm'} = \frac{k_f}{k_f + k_h}$$

また、暗期条件下で飽和パルス照射し (熱放散係数がゼロになる)、暗期最

大蛍光収率(ΦF_m)を次式により求められる：

$$\Phi F_m = \frac{k_f}{k_f + k_p}$$

以上の三式により、様々な光合成機能に関する情報を得ることができる (Genty et al. 1989, Bilger and Björkman 1990, Maxwell and Johnson 2000)。

ここで、本研究で使用した蛍光パラメータである光化学系Ⅱの量子収率($\Phi PS II$)、化学消光(NPQ)と電子伝達率(ETR)の計算は以下の式によった計算した：

$$\Phi PS II = \frac{\Phi F_m' - \Phi F_s}{\Phi F_m'}$$

$$NPQ = \frac{\Phi F_m - \Phi F_m'}{\Phi F_m'}$$

二つの測定方法で、 ΦF_s 、 $\Phi F_m'$ と ΦF_m の求め方が異なるので、第3章と第4章で詳しく説明する。

$\Phi PS II$ から電子伝達率を推定することができる。光化学系Ⅱと光化学系Ⅰのクロロフィルが吸収する光は1:1であると仮定すると、吸収された光の半分が系Ⅱに吸収することになる。2.2.2章に示したように、光の80-90%が光葉に吸収される。葉の吸収係数には経験値として0.84が使われる(PAMもこの値を使用)。電子伝達率ETRは以下の式から推定できる：

$$ETR = 0.5 \times 0.84 \times PPFD \times \Phi PS II$$

第3章 定常クロロフィル蛍光の測定

3.1 本研究の目的

クロロフィル蛍光測定は能動方式と受動方式に分かれる。能動方式の蛍光測定は、近距離から励起光あるいは測定光を葉に照射し、蛍光を直接測定する。一方、受動方式の蛍光測定は、太陽光励起の下でフラウンホーファー線を用いて、測定された分光放射輝度から蛍光を求める方法で、

能動方式の蛍光測定は方法的に確立されており、高精度での蛍光測定が可能であるのに対して、受動方式の蛍光測定は、非常に弱い蛍光信号を分光放射輝度から推定するため、測定法としての検証が必要である。

そこで本研究では、太陽光励起下でフラウンホーファー線（酸素吸収帯： O_2B と O_2A ）を用いたクロロフィル蛍光測定法を従来法である人工光励起の測定法と比較し、クロロフィル含有量の推定を検証することを目的とした。

3.2 植物材料及び生育環境

供試植物材料として、パプリカ (*Capsicum annuum* cv. ‘Sven’) を用いた。パプリカはナス科の多年草であるトウガラシ属トウガラシの一栽培品種である。パプリカは研究室の植物育成チャンバー内で、水耕栽培法により育成した。植物育成用蛍光灯とハロゲン灯を用い、一日の照射時間を 12 時間とした。植物上部における光強度は約 $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。昼間温度を $25.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、夜間温度を $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、湿度を 70% に設定した。灌水は毎日行い、溶液として HYPONeX 1000 倍希釈溶液を用いた。測定には、10-18 週間生育させた完全に展開した、異なる部位の成熟葉を使用した。

3.3 人工光励起の定常クロロフィル蛍光の測定

3.3.1 測定システムの概要

人工光励起の定常クロロフィル蛍光測定概念図を図 3-1 に示す。本測定システムは実験室に設置され、外部の光がカットされた状態で実験を行った。葉に大きな葉脈がない、クロロフィル含有量の分布が比較的均一な部分において、一連の測定を行った。ハロゲンランプ (Sumita Optical Glass, Inc. LS-100F) を励起光源として用い、ショートパスフィルタ (Optical Coatings Japan) で長波長側の励起光をカットした。葉は水平に置き、励起光を 45° で照射させた。光ファイバを葉表面から 5 cm の位置に設置し、ロングパスフィルタ (Optical Coatings Japan) で反射を除去し、蛍光のみを透過させた。そして、測定を USB4000 分光計 (Ocean Optics) で行い、その際、積分時間を 500 ms に設定した。USB4000 は 350-850 nm の範囲で 3648 チャンネルを持ち、600lines/mm の格子、50 μm のスリットで設定された。装置の半値幅 (FWHM) は 1.5-2.3 nm であった。光源 LS-1-CAL (Ocean Optics) で USB4000 分光計の校正を行った。葉の測定ヶ所を $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光で 20 分間照射し、定常クロロフィル蛍光を測定した。葉を透過した光の反射を取り除くために、黒ウール紙を葉の裏側にセットした。クロロフィル蛍光分光特性は、SpectraSuite ソフトウェアを用いて、USB ポートを介してコンピュータに保存された。

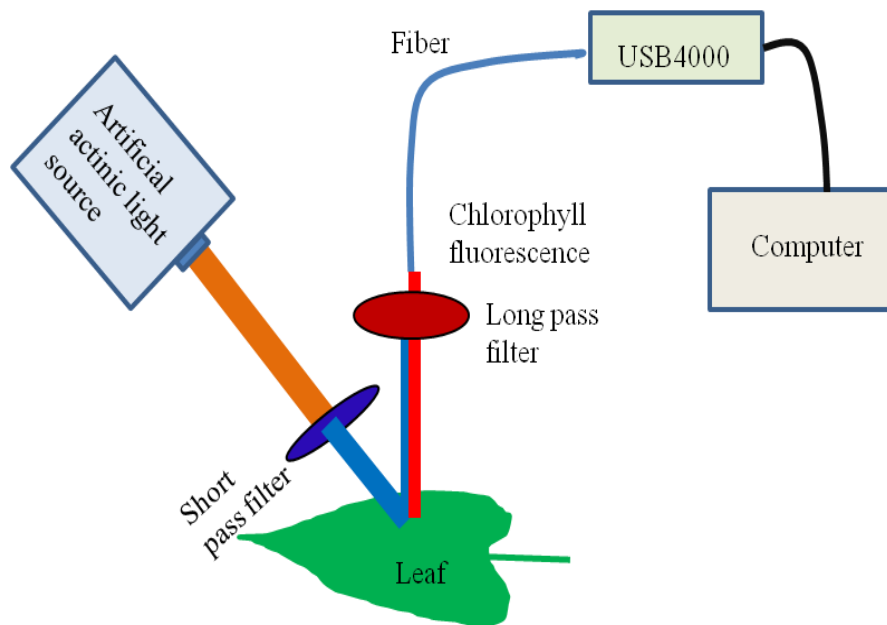


図3-1 人工光下での定常クロロフィル蛍光測定概念図。

3.3.2 励起光源とフィルター特性

励起光源の波長特性を図 3-2A のオレンジ線で示す。励起光源は、400–800nm の広い波長範囲に分布し、600nm 付近にピークがあった。クロロフィル蛍光測定の際に、励起光の影響を除去するため使われたショートパスフィルター (Optical Coatings Japan) は 610nm より長波長の励起光をカットし、最大透過率は 80% (青い線) 弱であった。また、ファイバに使われたロングパスフィルター (Optical Coatings Japan) は 640nm 以下の葉の直接反射をカットし、最大透過率は 90% (赤い線) 弱であった (図 3-2B)。図 3-2 の青線と赤線は、それぞれ、上記のフィルターを通して測定した励起光源の分光特性である。

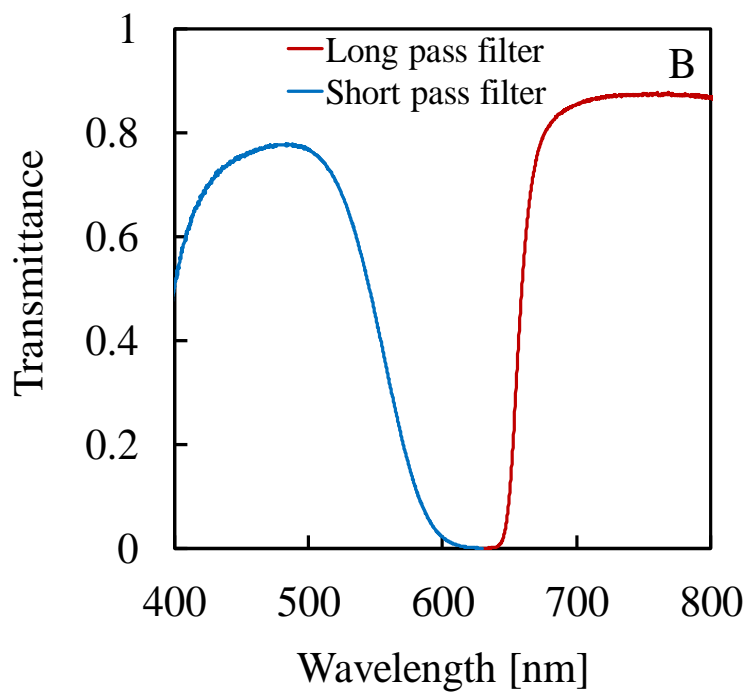
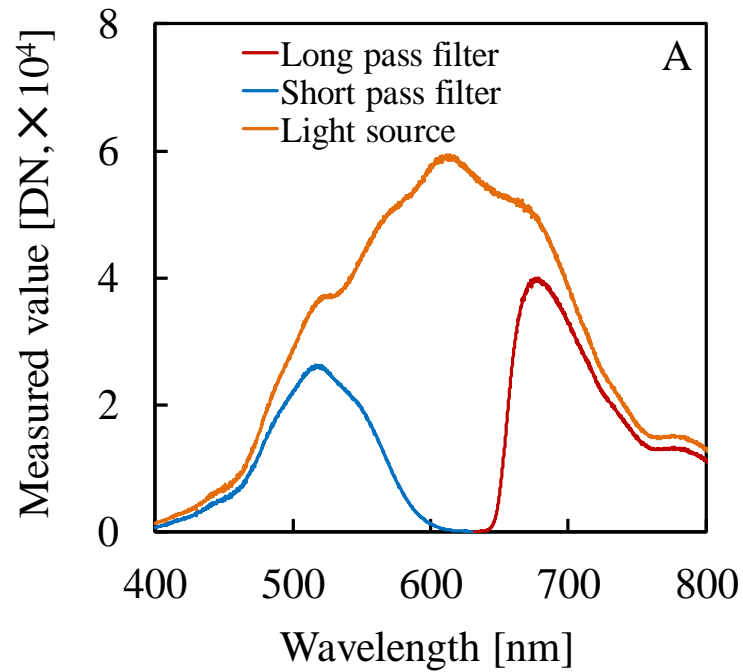


図3-2 A : 励起光源波長特性 (Sumita Optical Glass, Inc., LS-100F) とフィルター特性 (Optical Coatings Japan)。B : フィルターの透過波長特性。

3.3.3 クロロフィル蛍光の分光特性

対象葉を $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の励起光で20分間照射し、定常クロロフィル蛍光を測定した。クロロフィル蛍光の波長特性を調べるには、葉の吸収特性との関係を明らかにする必要がある。図3-3に示す3枚の葉において測定ヶ所を特定し、葉の吸収と蛍光の分光特性とクロロフィル含有量を測定した。

図3-4A はクロロフィル含有量が異なる葉のクロロフィル蛍光の分光特性である。約650nm-800nmの範囲で蛍光が測定された。実線、破線、点線のクロロフィル含有量は、それぞれ、502.3、160.8、62.9 (単位： mg m^{-2})であった。何れも686nmと740nm付近で蛍光ピークを示した。686nm付近では、クロロフィル含有量が高いほど、蛍光ピークが著しく減少した。一方、740nm付近では逆転し、クロロフィル含有量が高いほど蛍光ピークも増加した。

図 3-4B は上記の蛍光測定に使われた葉の吸収特性である。測定方法は、2.2.1と同様である。クロロフィル含有量が多くなると、686nm 付近の吸収も著しく増大した。これと対照的に、740nm では吸収の差が小さくなり、760nm 付近ではこの差がなくなった。

図 3-5 はクロロフィル含有量(502.3 mg m^{-2})が大きい葉の再吸収の蛍光への影響を示す。686nm 付近では90%以上が再吸収され、760nm 付近では4%未満であった。また、全蛍光強度(オレンジ点線)は、684nm 付近で最大値を示したが、これが実測蛍光値(赤線)では689nm までシフトした(stock shift)。



図3-3 蛍光と吸収の分光特性の測定に使われた葉の写真(クロロフィル含有量：左から 502.3 mg m^{-2} 、 160.8 mg m^{-2} 、 62.9 mg m^{-2})。

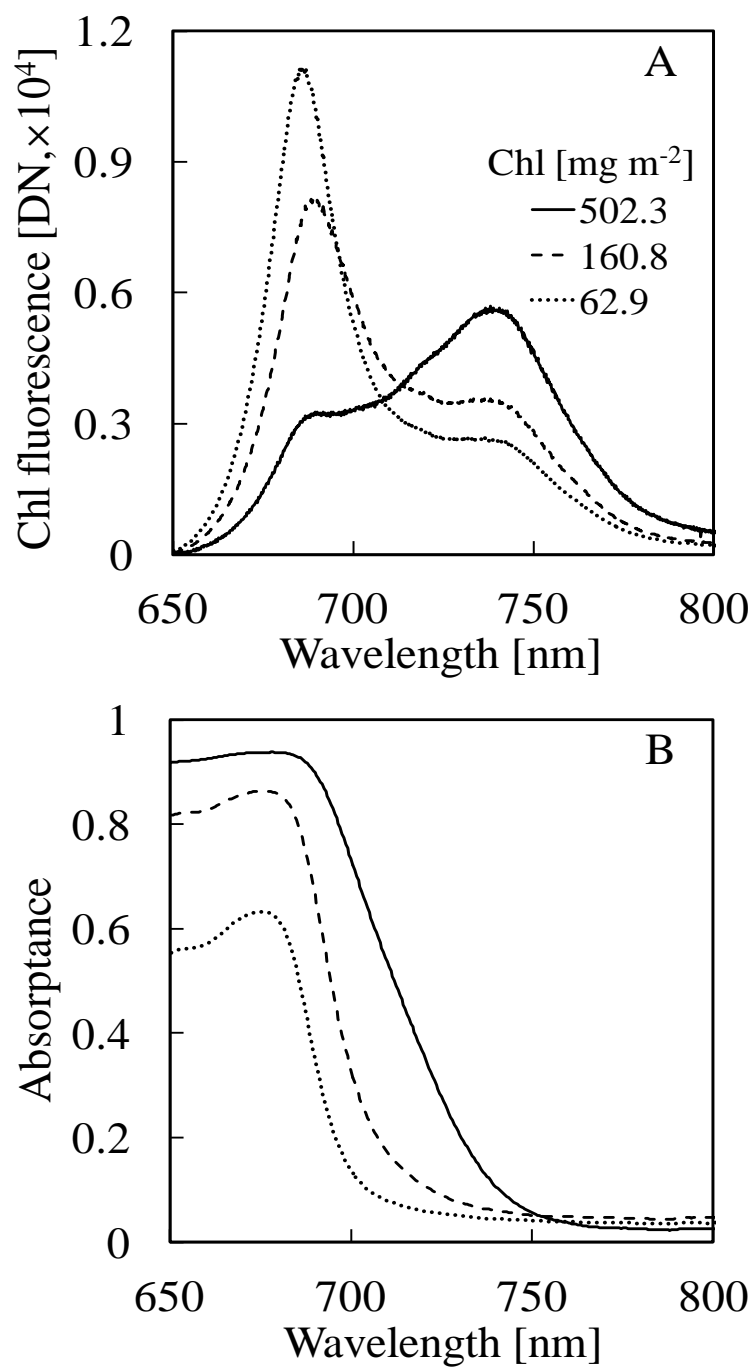


図3-4 異なるクロロフィル含有量葉の蛍光(A)と吸収の分光特性(B)。

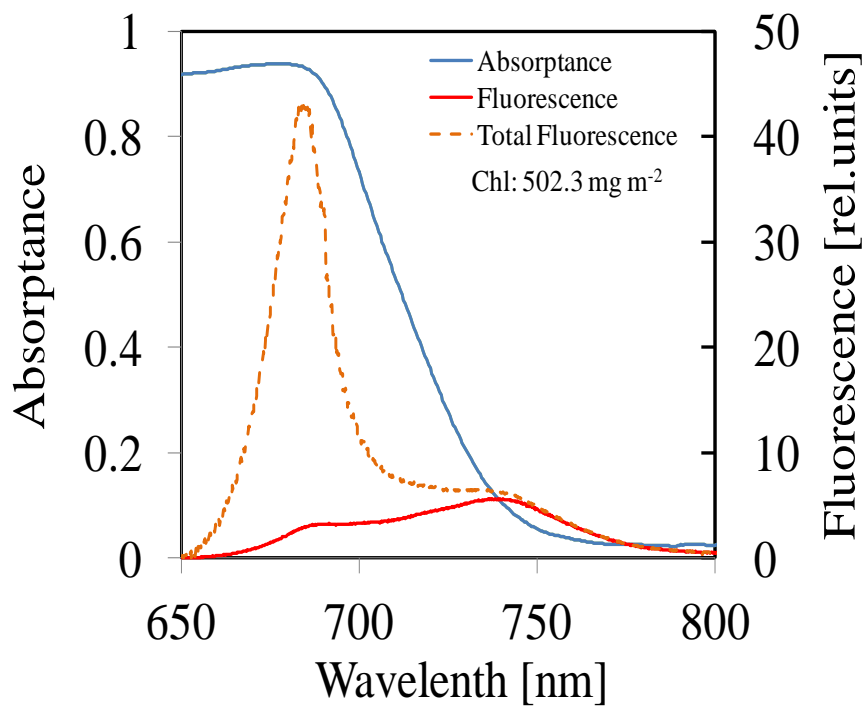


図3-5 葉内色素に再吸収されたクロロフィル蛍光。全蛍光（オレンジ点線）から蛍光（赤実線）を引いた部分が再吸収された蛍光量を表す。青線は葉の吸収特性を示す。

3.4 太陽光励起の定常クロロフィル蛍光の測定

3.4.1 蛍光の受動的測定の現状

定常クロロフィル蛍光の収率は非常に低く、通常吸収された光の3%以下である (Krause and Weis 1991, Govindjee 1995)。太陽光下では、蛍光強度が葉の放射に比べると非常に弱く、区別できない。しかし、 O_2B (686 nm)と O_2A (760 nm)付近の酸素吸収帯であるフラウンホーファー線内では他の波長に比べると、反射光に対する蛍光強度の割合が大きくなり、この領域でFraunhofer Line Depth (FLD)法を用いることで蛍光の定量化が可能になる (Lichtenthaler et al. 1992; Moya et al. 2004)。

太陽光励起のクロロフィル蛍光の受動的測定法—FLD法はPlasczyk (1975)によって提案され、Plasczyk と Gabriel (1975)によって航空機からの測定が行われた。葉のレベルではMeroni ら (2006, 2008a)やRascher ら (2009)、群落レベルではMoya ら (2004)やMeroni ら (2008b)、Daumard ら (2012)によって研究がなされている。近年、衛星リモートセンシングによる太陽光励起クロロフィル蛍光の測定が非常に注目され、群落光合成、正規化植生指標 (Normalized Difference Vegetation Index: NDVI)、総一次生産 (Gross Primary Production: GPP)、ストレスの推定などに使用されている (Frankenberg et al. 2011, Joiner et al. 2011, Guanter et al. 2012, Damm et al. 2015)。

3.4.2 FLD法による蛍光推定

人工光励起の定常クロロフィル蛍光の分光特性は 686nm と 740nm 付近でピークになり、760nm 付近でもかなり強い蛍光強度を表す (図. 3-4A)。これは酸素吸収帯 686nm (O₂B) と 760nm (O₂A) 付近の放射輝度が著しく減少する領域と重なる。FLD 法による太陽光定常クロロフィル蛍光推定にはこの 2 つの酸素吸収帯が通常使われる。

図 3-6A が FLD 法の概念図である (Moya et al. 2004)。太陽光の下で放射輝度を測定し、蛍光を推定する方法である。この方法により、定常クロロフィル蛍光の推定は可能であるが、蛍光消光解析 (蛍光パラメータの解析) には向いていない (Jones and Vaughan 2010)。

正常な葉が生育に適した環境下であれば、光合成を行い、葉の放射輝度が反射板の放射輝度よりもクロロフィル蛍光 (Fs: steady-state chlorophyll fluorescence) を放出する分だけ強くなる (図. 3-6B)。蛍光がない基準表面からの放射輝度の棚 (a) と溝の底 (b) の部分、対象物の放射輝度の棚 (c) と溝の底 (d) の部分が蛍光推定に使われる。一定の波長範囲内で、反射板放射輝度に対する対象物の放射輝度の反射係数を R とし、この領域内で R と Fs が一定であると仮定する (Moya et al. 2004) と、c と d を以下のように表すことができる：

$$c = Ra + Fs$$

$$d = Rb + Fs$$

この二つの式を解くと

$$R = (c - d)/(a - b)$$

$$Fs = d - Rb$$

この式を用い太陽光励起の定常クロロフィル蛍光強度が推定できる。

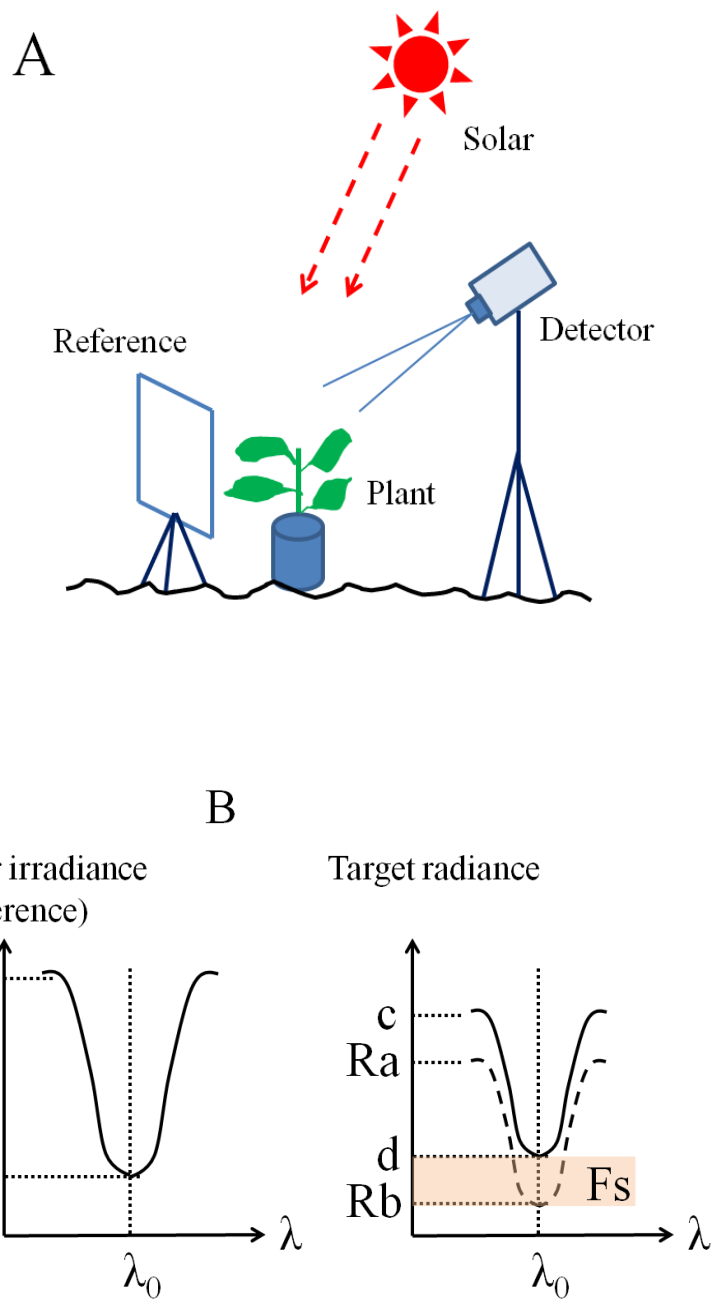


図 3-6 フラウンホーファー線を用いた蛍光測定概念図 (A) と反射と蛍光の概略図 (B) (Moya et al. 2004)。

3.4.3 測定システムの概要

人工光励起の定常クロロフィル蛍光測定が終了後、同一サンプルのマークされたヶ所で太陽光励起の定常クロロフィル蛍光の測定を行った。測定概念図を図 3-7 に示す。本測定システムは実験室に設置され、窓から入る太陽光照射の下で行った。風の影響もなく、安定した天気を選択し測定を行ったため、比較的安定した分光特性の測定ができた。

放射輝度の分光特性の測定は HR2000+分光計(Ocean Optics)によって行った。太陽光下で20分間順応させた葉を1分間測定した。分光計の半値幅(FWHM)は0.035nm、680-770nm 範囲内で2048チャンネルを持ち、積分時間を200msに設定した。また、この分光計は、1800lines/mmの格子H11、5 μ mのスリット、L2検出集光レンズ、OF1-OG590ロングパスフィルター、SAG+UPGD-HR高反射率のAgPlus鏡で構成される。葉を太陽の入射光に垂直に設置し、光ファイバを葉表面から5cm、表面の鏡面反射を減らすため光と45°になるよう固定した。葉の測定後、18%の反射板(Kodak)が葉と同じ角度と位置に設置され、放射輝度の基準として測定した。測定データはOPwave+ソフト(Ocean Optics)でUSBポート経由パソコンに記録された。葉を透過した光の反射を取り除くため、黒ウール紙を葉の裏側に設置した。測定中、LI-COR LI-250光度計で光合成有効放射強度を測定した(800-1800 μ mol m⁻² s⁻¹)。

図. 3-8に示すように、HR2000+分光計の光強度に対する感度を検証した。光強度が約8000 μ mol m⁻² s⁻¹以下であれば、線形相関を示した。一連の実験では、励起光強度が8000 μ mol m⁻² s⁻¹を超えなかった。

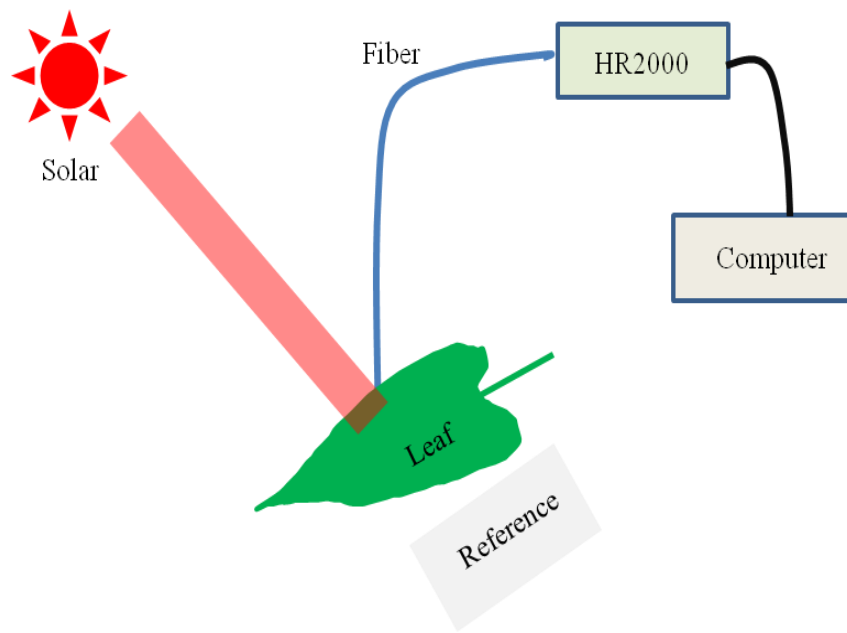


図 3-7 太陽光下での定常クロロフィル蛍光測定概念図。

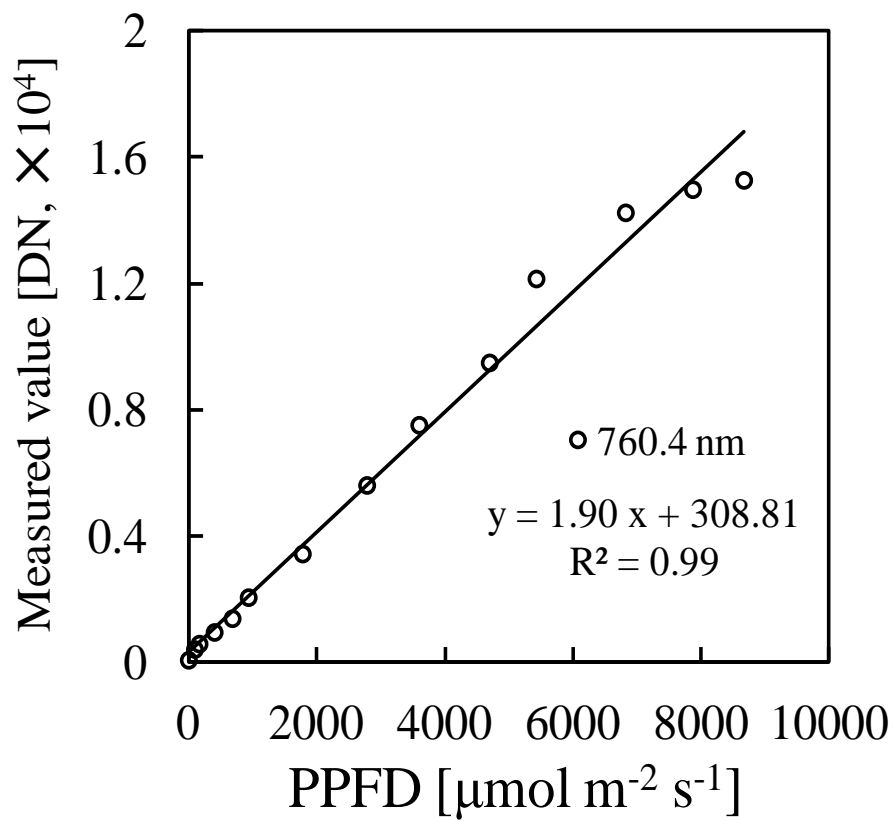


図 3-8 760.4nm 付近における分光計 HR2000+の光強度とする測定値の関係。

3.4.4 FLD法の応用

ここでは、FLD法の太陽光励起の定常クロロフィル蛍光推定について具体的に説明する。図3-9に、太陽光(実線)と葉(点線)の放射輝度分光特性を示す。酸素吸収帯686nm(O₂B)と760nm(O₂A)付近で非常に深い溝が測定された。

図.3-10AとBは、酸素吸収帯686nm(O₂B)と760nm(O₂A)付近の放射輝度の分光特性の拡大図である。クロロフィル蛍光推定の絶対誤差を小さくするための波長幅(W)は、0.4nmにした。棚のaとc(A:685.93-686.32nm、B:758.76-759.17nm)、溝の底bとd(A:686.54-686.93nm、B:760.24-760.64nm)はそれぞれ0.4nm波長幅の平均値である。平均した測定値M_a、M_b、M_c、M_dを用い、反射率(R)と太陽光励起の定常蛍光強度(F_s)を算出した：

$$R = (M_c - M_d) / (M_a - M_b)$$

$$F_s = M_d - R \times M_b$$

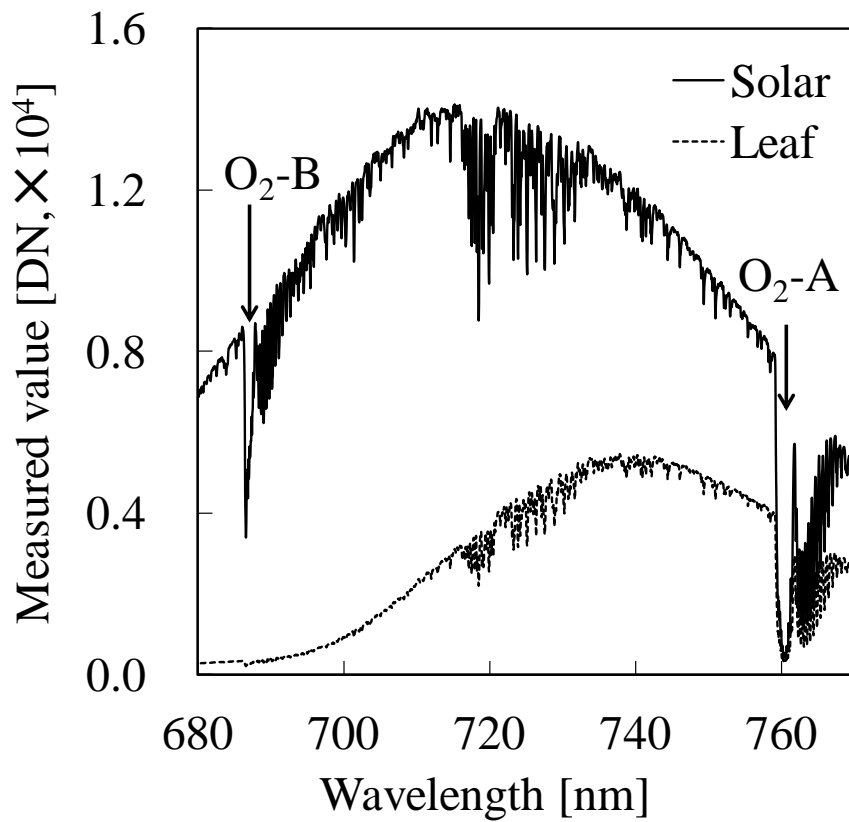


図 3-9 太陽光と葉の放射輝度の分光特性。O₂B と O₂A は酸素吸収帯を示す。

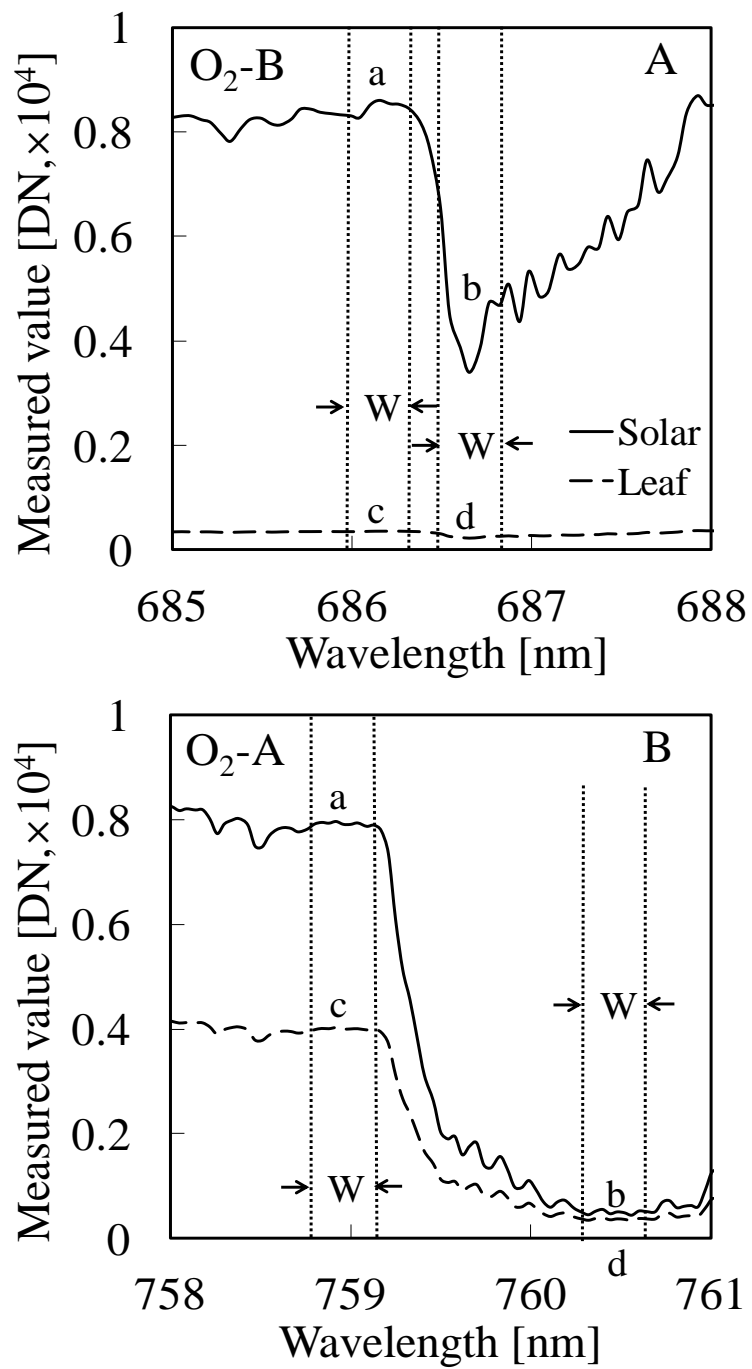


図 3-10 二つの酸素吸収帯 $O_2B(A)$ と $O_2A(B)$ における分光特性の拡大図。波長幅 W は 0.4nm 。

3.5 結果

酸素吸収帯 686nm(O₂B) と 760nm(O₂A) 付近の人工光 (ΦF_a) と太陽光 (ΦF_s) 励起の定常クロロフィル蛍光の収率とその比 (それぞれ $\Phi F_a 686.4 / \Phi F_a 760.5$ と $\Phi F_s 686.7 / \Phi F_s 760.4$) を算出し、クロロフィル含有量との相関について検討した。

図 3-11 はクロロフィル含有量と人工光励起の定常クロロフィル蛍光収率の関係を示す。クロロフィル蛍光収率 $\Phi F_a 686.4$ は、クロロフィル含有量の増加に伴い減少し (図 3-11A)、 $\Phi F_a 760.5$ は増加傾向を示した (図 3-11B)。両方で、クロロフィル含有量が 200 mg m⁻² を下回ると変化が大きく、クロロフィル含有量が 400 mg m⁻² より大きくなるとともに変化が少なくなった。

図 3-12 はクロロフィル含有量と太陽光励起の定常クロロフィル蛍光収率の関係を示す。クロロフィル蛍光収率 $\Phi F_s 686.7$ はクロロフィル含有量の増加に伴い著しく減少し (図. 3-12A)、 $\Phi F_s 760.4$ は増加傾向を示したもののばらつきが大きかった (図. 3-12B)。

図. 3-11 と図. 3-12 を比較すると、太陽光励起の定常クロロフィル蛍光収率のばらつきは人工光励起より大きかった。これは太陽光下での測定で、太陽の変動や分光器の感不足、反射板による放射輝度の対象基準の選択の不適切などの原因でクロロフィル蛍光シグナルが若干変化したからであると考えられる。しかしながら、クロロフィル含有量との関係は、人工光励起、太陽光励起に関わらず、同じ傾向を示した。

図 3-13 はクロロフィル含有量と定常クロロフィル蛍光収率比の相関を示す。人工光下で、 $\Phi F_a 686.4 / \Phi F_a 760.5$ はクロロフィル含有量と非常に明確な逆の曲線関係を示した (図 3-13A、 $R^2=0.94$)。太陽光下でも $\Phi F_s 686.7 / \Phi F_s 760.4$ はクロロフィル含有量とよい逆の曲線関係を示した (図 3-13B、 $R^2=0.73$)。但し、太陽光下ではクロロフィル含有量が 400 mg m⁻² より多い時、ばらつきが大きくなった。X 軸における二乗平均平方根 (RMSE) 誤差も太陽光下の法がはるかに大きかった。

図 3-14 はクロロフィル含有量と定常クロロフィル蛍光の収率比との対数相関を示。これは図 3-12 の両軸に対数を取った図になる。人工光下では非常によい負の直線関係を示したが、太陽光下ではクロロフィル含有量が大きい時ばらつきが目立った。

図 3-15 は二つの方法の定常蛍光収率比の平均絶対誤差 (Mean absolute error, MAE) を示す。信号のばらつきやノイズを減らすため、最適な波長幅を選ぶ必要がある。波長幅が 0.4nm の時 MAE が一番小さかったため、今回の実験では、太陽光下で放射輝度から蛍光を抽出する際 0.4nm の波長幅を使用し

た。

図3-16は人工光励起の定常クロロフィル蛍光収率比と太陽光励起の定常クロロフィル蛍光収率比との相関である。人工光励起の定常クロロフィル蛍光の収率比($\Phi F_a 686.4 / \Phi F_a 760.5$)が太陽光($\Phi F_s 686.7 / \Phi F_s 760.4$)のと直線的な相関関係を示した。

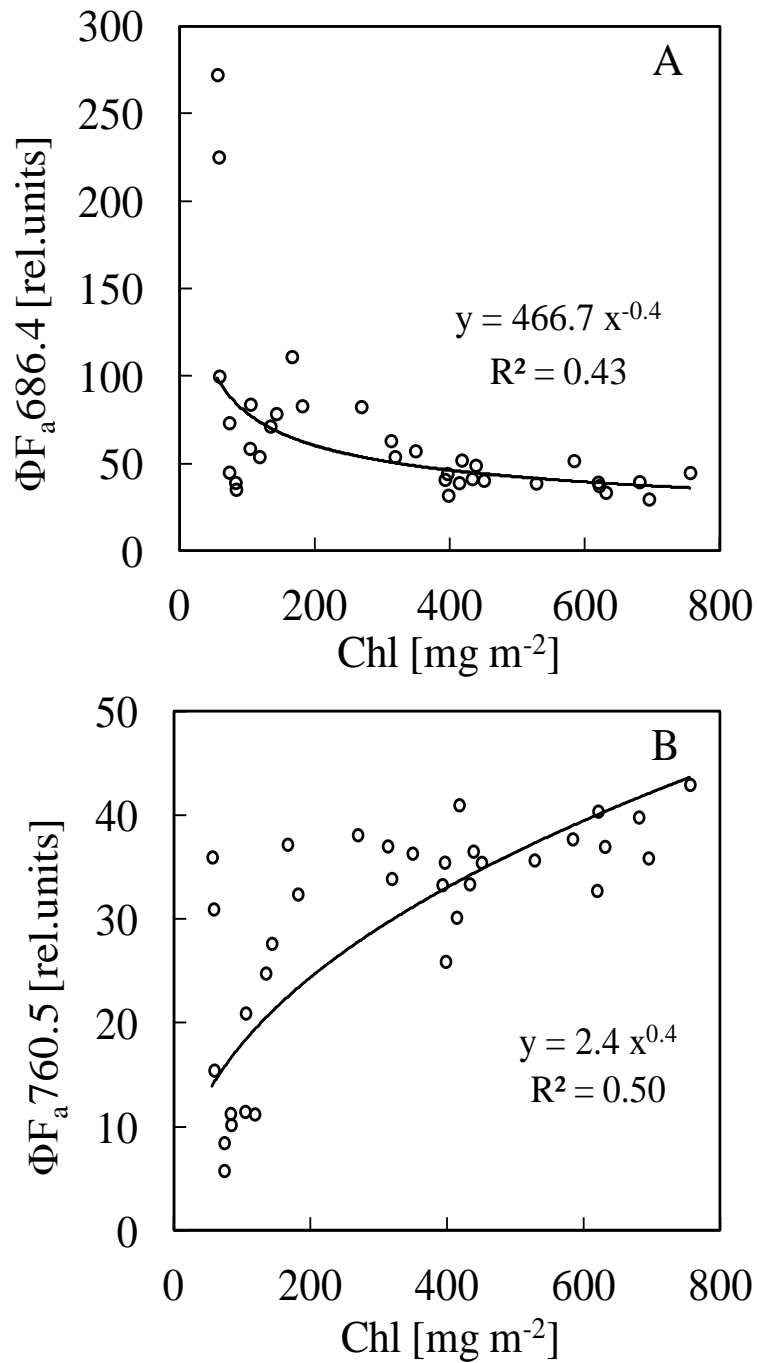


図 3-11 クロロフィル含有量と人工光励起による定常クロロフィル蛍光の収率の関係。A: $\Phi F_a 686.4$ 。 B: $\Phi F_a 760.5$ 。

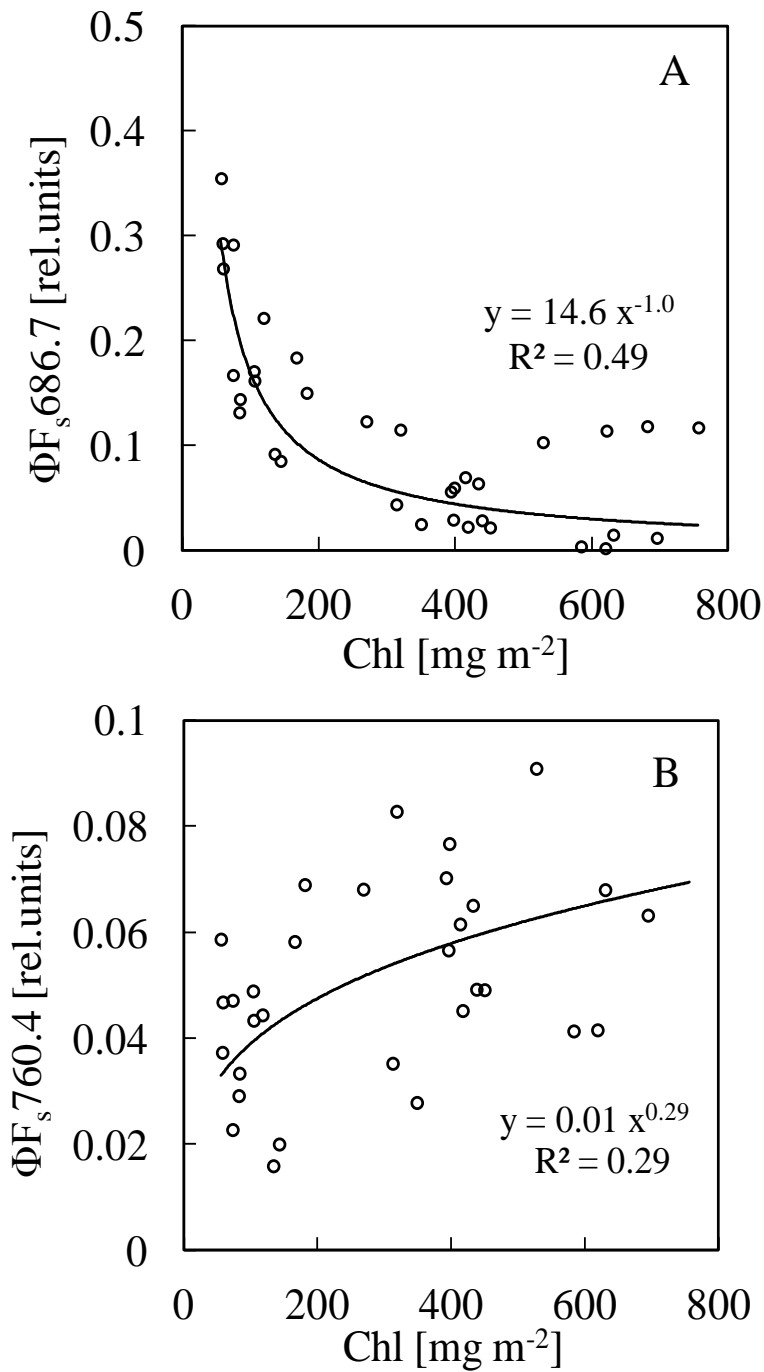


図 3-12 クロロフィル含有量と太陽光励起による定常クロロフィル蛍光の収率の関係、A: $\Phi F_s 686.7$. B: $\Phi F_s 760.4$ 。

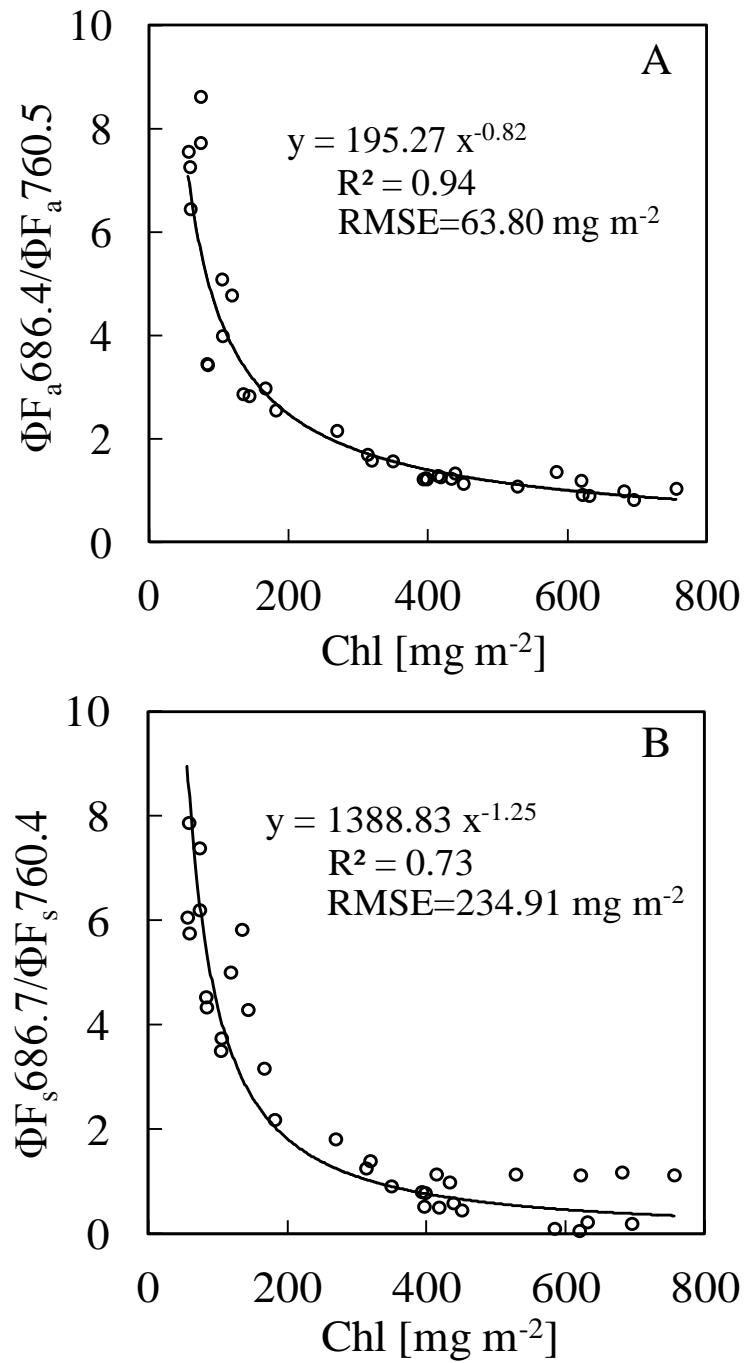


図 3-13 クロロフィル含有量と定常クロロフィル蛍光の収率比との相関、A:人工光励起、B:太陽光励起。

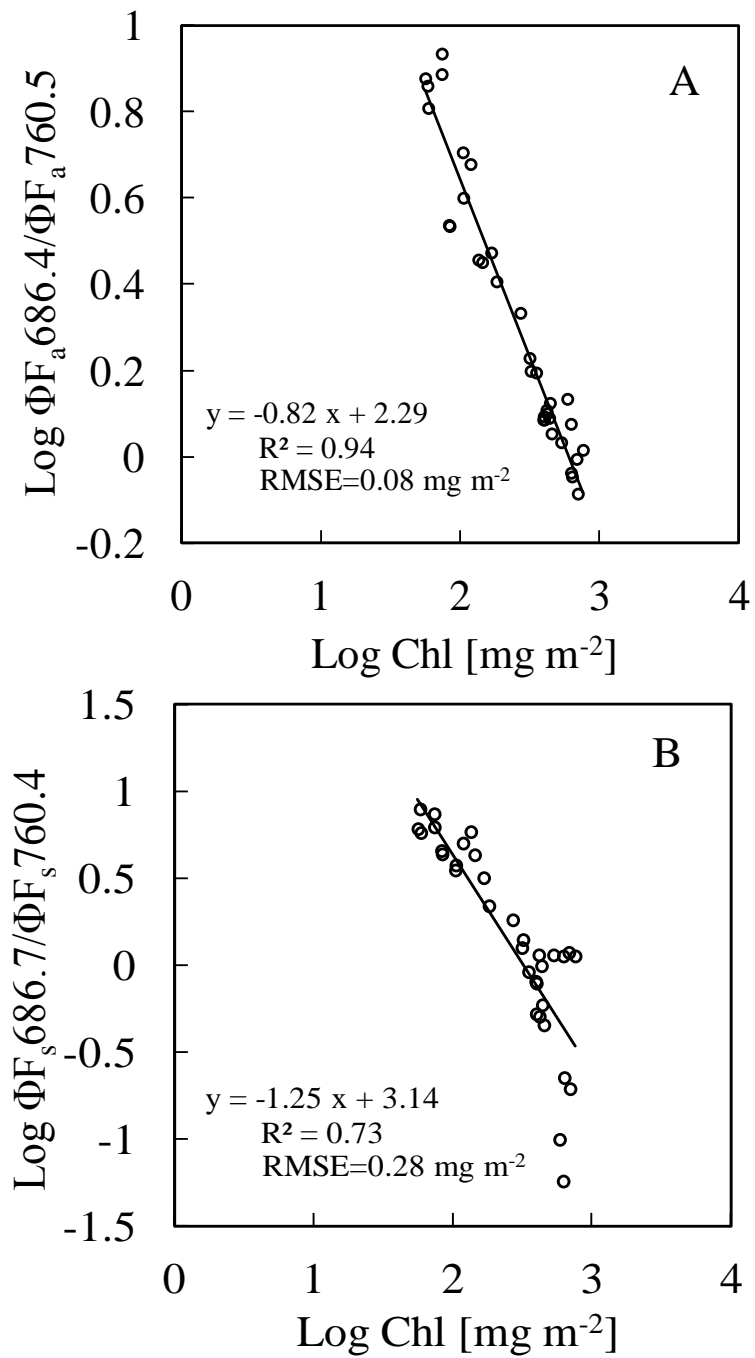


図 3-14 クロロフィル含有量と定常クロロフィル蛍光の収率比との対数相関、A:人工光励起、B:太陽光励起。

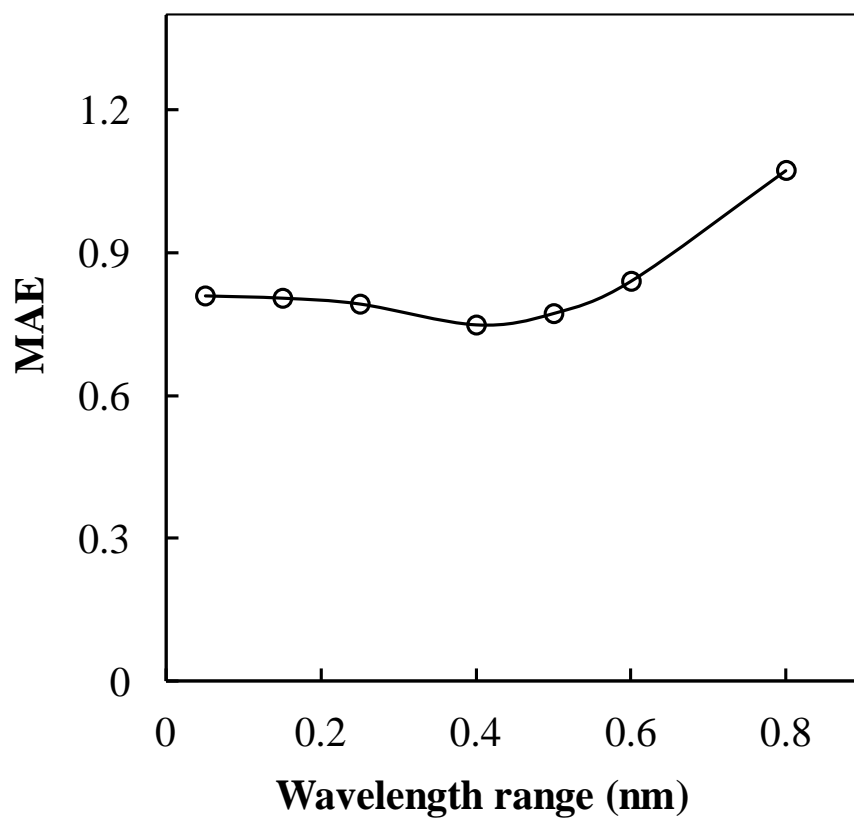


図 3-15 二つの方法の定常蛍光収率比の平均絶対誤差 (Mean absolute error)、波長幅が 0.4nm の時 MAE が一番小さかった。

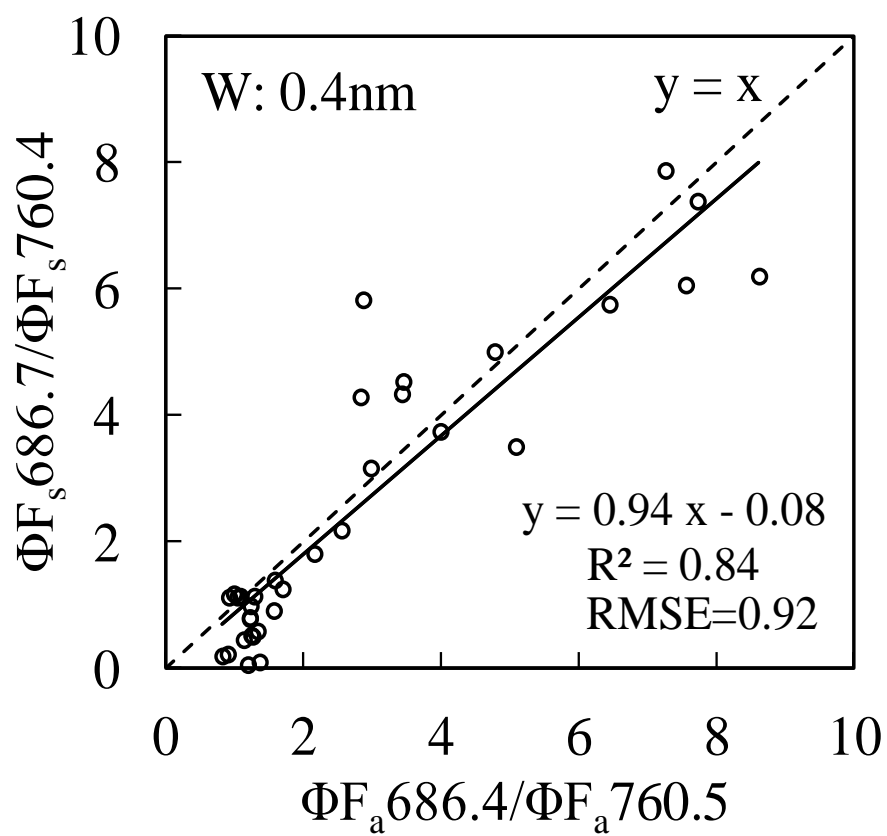


図 3-16 人工光励起による定常クロロフィル蛍光収率比と太陽光励起定常クロロフィル蛍光収率比との関係。

3.6 考察

図 3-4 に示したように、定常クロロフィル蛍光強度は 686nm と 740nm 付近でピークになる。686nm 付近の蛍光は葉の吸収と重なり、クロロフィル含有量が高い葉 ($\text{Chl}: 502.3 \text{ mg m}^{-2}$) では 90%以上も再吸収される。クロロフィル含有量が低い葉 ($\text{Chl}: 62.9 \text{ mg m}^{-2}$) でも 60%ぐらいは再吸収される。一方、760nm 付近では、葉の再吸収がクロロフィル含有量と関係なく低いため(4%程度)、定常状態クロロフィル蛍光への再吸収効果は低い(図. 3-5)。葉の再吸収効果で、686nm 付近ではクロロフィル含有量が高いほど蛍光強度が低くなり、760nm 付近では逆の現象を示す。これは過去の研究でも報告され、葉の色素の再吸収現象として知られている(Lichtenthaler et al. 1986, Gitelson et al. 1998, Buschmann 2007)。

太陽光下では、686nm と 760nm の酸素吸収帯 O_2B と O_2A が存在し、特に O_2A では放射輝度の 90%が吸収され、クロロフィル蛍光に対して、太陽光の葉による反射の強度差がほかの波長領域より小さくなる(図. 3-9)。この現象を用いた野外定常クロロフィル蛍光の推定が Plascyk (1975) と Plascyk and Gabriel(1975)によって初めて提案され、Moya ら(2004)によって葉と群落レベルで応用された。

自然光下では、クロロフィル蛍光波長が、葉の吸収帯と重なり、測定装置の感度や励起光の強度、測定角度の影響を受け易い。また、 O_2B と O_2A の酸素吸収帯深度が変わりやすいため、FLD法による蛍光推定は非常に難しく、特に、葉と反射基準板に同一強度の光を照射することに注意すべきである(Zarco-Tejada et al. 2003; Moya et al. 2004; Meroni et al. 2006; Campbell et al. 2008)。本研究では、安定した晴天の時間帯を選び、サンプルの測定直後に反射板の測定を速やかに行なうことにより測定精度の向上を図ったが、太陽光の変動に伴う酸素吸収帯の変化による測定誤差への影響は避けられない。また、不安定な太陽光強度は、光合成反応の不安定性をもたらし、クロロフィル蛍光放出割合と色素再吸収の変化を引き起こす(Buschmann 2007)。

経験上、F685/F730やF690/735、F690/740などの蛍光強度比は、室内で定常クロロフィル蛍光の評価や、クロロフィル含有量を非破壊で推定する研究に利用される(Agati et al. 1995; Buschmann 2007; Campbell et al. 2008)。Gitelsonら(1998)は、F690/F735蛍光比の変化の90%以上はクロロフィル含有量に依存すると指摘した。一方、自然光下では、クロロフィル蛍光強度のピークに近い686nmと760nmの2つの酸素吸収帯が定常状態クロロフィル蛍光推定に使われる(Moya et al. 2004; Meroni et al. 2009)。本研究によって、酸素吸収帯 O_2A と O_2B のクロロフィル蛍光収率比がクロロフィル含有量に伴う

定常クロロフィル蛍光の変化を推定する、または定常クロロフィル蛍光と照射光の関係をよりよく表す指標であることが明らかになった。

人工光励起の定常クロロフィル蛍光収率比 $\Phi F_a 686.4 / \Phi F_a 760.5$ と太陽光励起の定常クロロフィル蛍光収率比 $\Phi F_s 686.7 / \Phi F_s 760.4$ は、クロロフィル含有量と非常に明確な逆の曲線関係を示し、 R^2 はそれぞれ 0.94 と 0.73 であった。Moya ら (1992) は蛍光量子収率とクロロフィル含有量の高い逆相関性があると提言した。686nm 付近で、色素の強い再吸収効果により、 $\Phi F_a 686.4 / \Phi F_a 760.5$ と $\Phi F_s 686.7 / \Phi F_s 760.4$ 収率比はクロロフィル含有量の増加に伴い著しい減少した (図. 3-13)。クロロフィル含有量が 400 mg m^{-2} より低い時、 $\Phi F_a 686.4 / \Phi F_a 760.5$ と $\Phi F_s 686.7 / \Phi F_s 760.4$ がクロロフィル含有量と非常に似た相関を示した (図. 3-17、 $R^2: 0.91$ と 0.89)。クロロフィル含有量が 400 mg m^{-2} より大きい時、 $\Phi F_s 686.7 / \Phi F_s 760.4$ のばらつきが大きくなるのは色素の再吸収の影響を受け易く、精度が落ちるためと考えられる。これは、クロロフィル含有量が大きい時、色素の再吸収により蛍光強度が基準放射輝度に比べ非常に弱くなり、場合によって蛍光推定ができなくなり、測定失敗に繋がることも考えられる。

酸素吸収帯 O_2B と O_2A の溝の底の波長幅が 0.4nm の時、太陽光励起の定常クロロフィル蛍光収率比 $\Phi F_s 686.7 / \Phi F_s 760.4$ の MAE が一番小さく、人工光と太陽光励起の 2 つの方法の定常クロロフィル蛍光収率比は良い相関 ($R^2=0.84$) を示した (図. 3-16)。Moya ら (2004) による研究では、能動的と受動的蛍光測定法の高い相関 ($R^2=0.99$) が報告されたが、これは再吸収の影響を除去したクロロフィル含有量の非常に限られた範囲から得られたものである。しかしながら、本研究においては、クロロフィル含有量が大きく異なる場合においても、自然光下で、太陽光励起のクロロフィル蛍光収率比から植物のクロロフィル含有量を良い精度で推定できることが明らかになった。

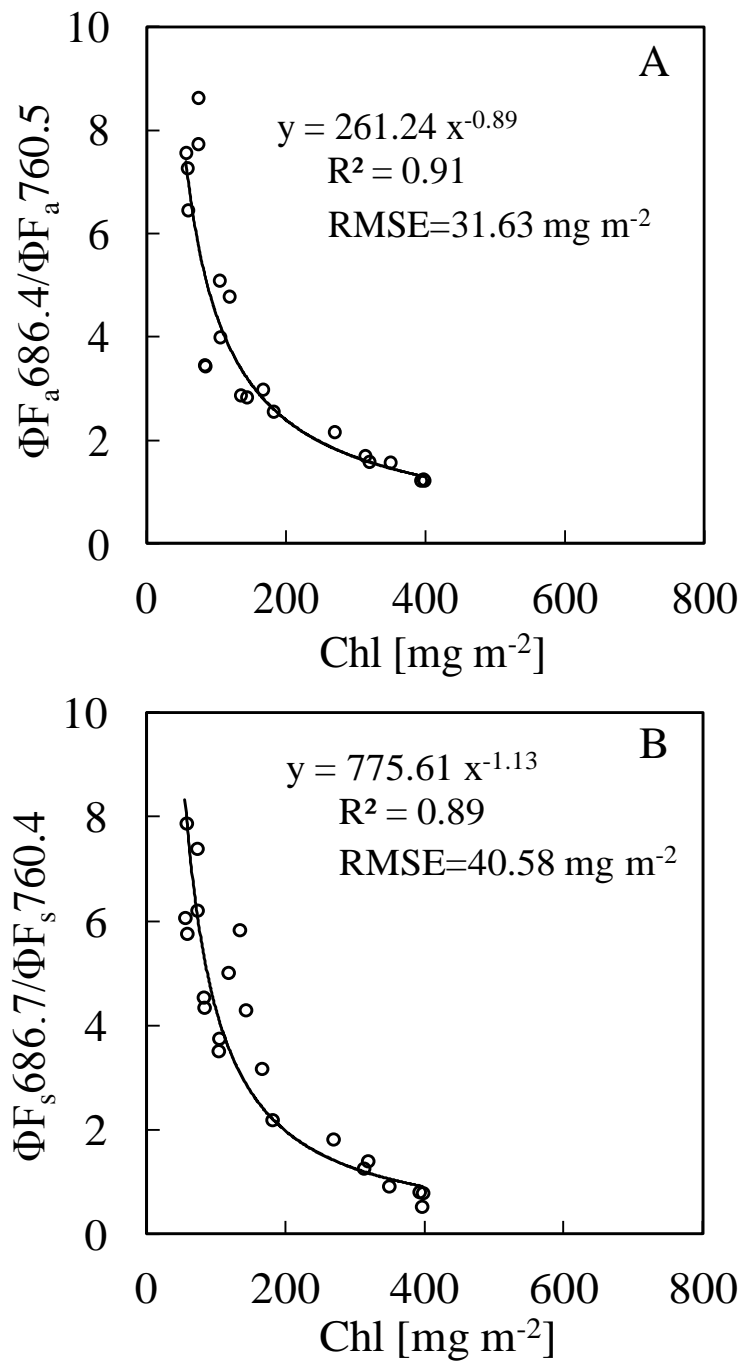


図 3-17 クロロフィル含有量が 400 mg m^{-2} 以下におけるクロロフィル含有量と定常クロロフィル蛍光の収率比との相関、A:人工光励起、B:太陽光励起。

3.7 本章のまとめ

本研究では、人工光励起と太陽光励起の定常クロロフィル蛍光を測定し、686nm と 760nm の酸素吸収帯 O_2B と O_2A 付近で蛍光収率を求め、クロロフィル含有量との相関を明らかにした。更に、太陽光励起の定常クロロフィル蛍光率比と人工光励起の定常クロロフィル蛍光率比の相関を求め、FLD 法による定常クロロフィル蛍光の推定の有効性を確かめた。そこで、太陽光励起のクロロフィル蛍光収率比から植物のクロロフィル含有量を良い精度で推定できることが初めて明らかになった。

第 4 章 飽和パルス法によるクロロフィル蛍光の測定

4.1 本研究の目的

光合成色素で吸収された光エネルギーは光合成反応に利用されるが、その一部は、686nm と 740nm 付近にピークを持つクロロフィル蛍光として放出される。しかしながら、686nm 付近のピークは葉の強い吸収帯と重なっており、かなりの割合が再吸収されるに対し、760nm 付近ではほとんど再吸収の影響がないことが第3章で確認された。また、太陽光励起下でフラウンホーファー線（酸素吸収帯： O_2B と O_2A ）を用いたクロロフィル蛍光測定法について検討され、クロロフィル含有量の推定について従来法と比較し検証された。

近年、航空機や衛星リモートセンシングによる太陽光励起の定常クロロフィル蛍光の測定が行われるようになってきており、群落レベルの光合成速度や植物ストレスの評価に応用されている。しかし、衛星リモートセンシングなどの遠距離からこの非常に弱い蛍光信号をどれぐらい正確に測れているかは課題である。

そこで本研究では、酸素吸収帯 O_2A であるフラウンホーファー線を用い、光化学系 II の量子収率 (Φ_{PSII})、化学消光 (NPQ) と電子伝達率 (ETR) を推定する新しい方法を提案し、従来の PAM 法と検証を行い、フラウンホーファー線法によるクロロフィル蛍光パラメータの推定について議論することを目的とした。

4.2 植物材料及び生育環境

本実験では、パプリカとトウモロコシ、パキラを実験材料として使用した(図 4-1)。パプリカ (*Capsicum annuum* cv. 'Sven') は定常クロロフィル蛍光の実験と同一品種を用いた。トウモロコシ (*Zea mays* L.) はイネ科の一年草で、世界三大穀物の一つである。パキラ (*Pachira Aubl.*) はアオイ科属の木本植物で、観賞植物である。

パプリカとトウモロコシは、園芸培養土(赤玉土、ピートモス、バーミキュライト)に播種し、植物育成チャンバー内で育成した。植物育成用蛍光灯とLEDライトを用い、一日の照射時間を12時間とした。植物上部における光強度は約 $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。昼間温度を $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 、夜間温度を $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 、湿度を70%に設定した。灌水は毎日行い、HYPONeX 1000 倍希釈溶液を用いた。実験には、8-15 週間生育させた完全に展開した、異なる部位の成熟葉を使用した。

パキラは、観賞用として販売されているポット植えの個体を購入し、室内の蛍光灯下で順化させた。このため、光強度は植物育成用チャンバーよりはるかに低かった。



図4-1 飽和パルス光下での蛍光測定に使われた三種類の植物、左から：パプリカ、トウモロコシ、パキラである。

4.3 飽和パルス光によるクロロフィル蛍光の測定

4.3.1 測定システムの概要

測定システムは定常クロロフィル蛍光の実験と同様、実験室に設置し、窓から入る太陽光照射の下で行った。風の影響もなく、安定した天気の間帯を選択して行ったため、比較的安定した分光特性の測定ができた。

図 4-2 のように、定常クロロフィル蛍光測定の場合と同じ装置を用い、これに、JUNIOR PAM(Walz) 装置と飽和パルス照射のためのレーザー (KaLaser:660nm, 200mW) を加えた。HR2000+高波長分解能分光計 (Ocean Optics) のパラメータや設定条件は章 3.4.3 とほぼ同じで、ここでは異なるところのみについて説明する。

葉を JUNIOR PAM 装置付属の JUNIOR-B クリップで挟み、太陽の入射光に垂直になるよう設置した。クロロフィル蛍光パラメータの検証のために使用した PAM 装置の光ファイバを葉の表面から 1mm、また、温度センサを葉の裏面から 1mm の距離に設置した。PAM 装置の周波数を 5Hz、飽和パルス強度を $10000 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、照射時間を 0.8s にそれぞれ設定した。

HR2000+分光計の光ファイバは、葉表面から 5mm の位置に設置し、PAM 装置の光ファイバと 45° なるよう固定した。PAM 装置の飽和パルス光の影響を避けるため、分光計の光ファイバを PAM 装置の光ファイバより 2mm 離れた。HR2000+分光計での測定の際に飽和パルス光として用いた赤色レーザーの強度を約 $6000 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とし、葉と 60° の角度から 0.8 秒間照射した (図 4-3)。レーザー光の葉表面での直径は約 30mm で、レーザー強度分布が均一であるところを測定した。放射輝度基準として、90%の反射板 (Kodak) を用いた。測定したデータはそれぞれの装置のソフトウェア経由でコンピュータに保存された。

図 4-4 は PAM 装置付属の光量子計と LI-COR 光量子計の相関である。測定の際、PAM 装置付属の光量子計で光合成有効放射強度 (PPFD) を記録し、この相関式で LI-COR の値に換算し使用した。

本研究では、FLD 法による光化学系 II の量子収率 (Φ_{PSII})、化学消光 (NPQ) 及び電子伝達速度 (ETR) の測定結果を PAM 法で検証する。また、HR2000+分光計による測定値は、酸素吸収帯 O_2A (760.4nm) 付近の 0.4nm 波長幅での値とした。

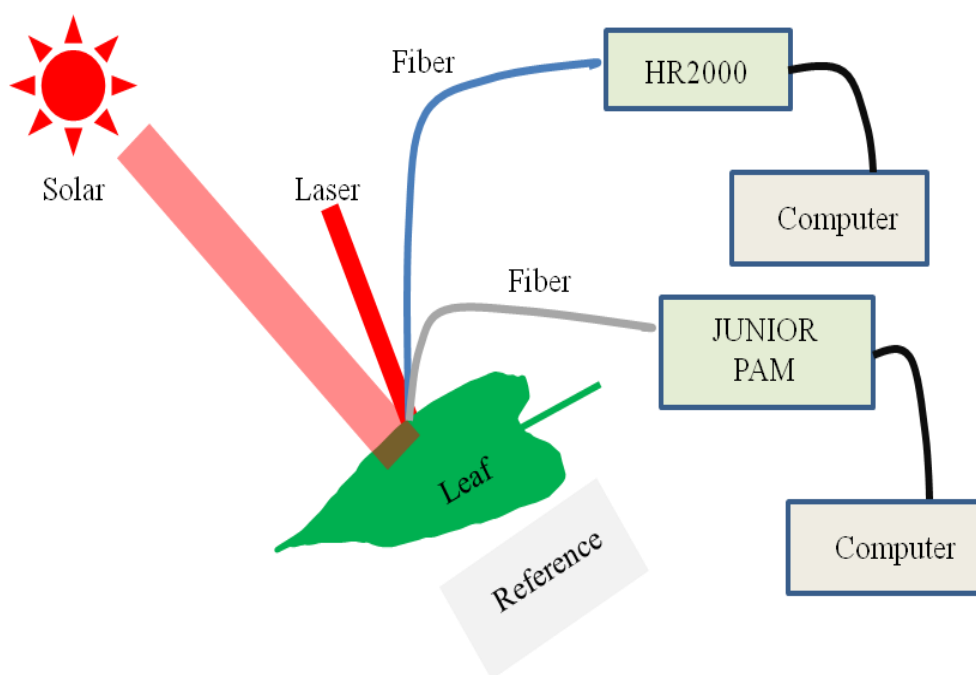


図4-2 飽和パルス光によるクロロフィル蛍光測定概念図。



図4-3 飽和パルス光下での蛍光測定の例。

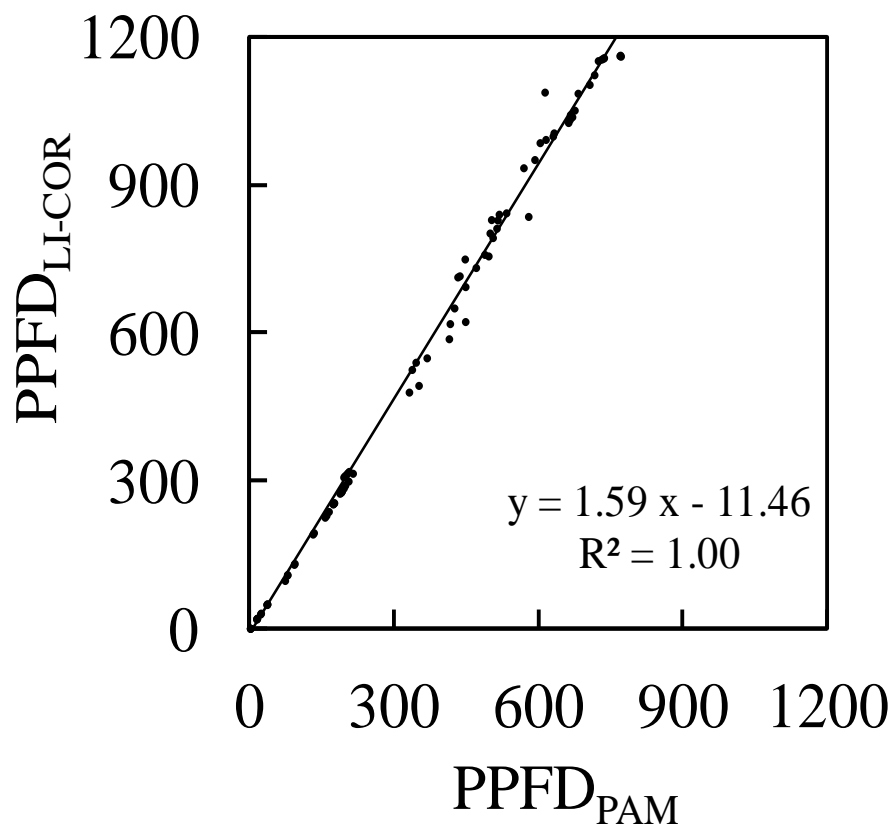


図4-4 PAM装置付属の光量子計とLI-COR光量子計の比較。

4.3.2 飽和パルス光の波長と強度

PAM装置の飽和パルス光(青色LED)と分光計のための飽和パルス光(赤色レーザー)の波長特性を図4-5に示す。それぞれ460nmと660nm付近にピークがあった。

飽和パルス光の強度を決定するため、蛍光収率と光強度の関係を調べる必要がある。図4-6にはパプリカにおける光強度と蛍光収率の関係を示す。これは、PAM装置の励起光の強度を調整し、HR2000+分光計で測定した結果である。実験の際、分光計用ファイバをPAM装置の励起光で励起された蛍光を最大限に検知できるように設置した。PAM装置の励起光強度は1から12段まで調整でき、値は $25\text{--}1500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ であり、LI-COR光量子計の強度に換算すると $28\text{--}2370\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ であった。20分間暗処理したパプリカの葉では、光強度が $1000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ を超えると蛍光収率がほぼ一定になった(図A)。一方、太陽光下で順化させた実験材料で同様な実験を行ったところ、光強度が $2000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ を超えると、蛍光収率が飽和した(図B)。これらの実験において、太陽光が約 $700\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ の時に2回(丸と四角マーク)、約 $1300\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 時に4回測定した。なお、励起光強度が低い時は、葉の放射輝度の影響で蛍光信号を検出できなかった。Omasaら(2009)のタマシダ(Boston fern)葉における飽和パルス決定実験では、暗処理で約 $800\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 、 $300\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ の光の下で約 $1300\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ の強度で飽和したことが示されている。以上の結果から、レーザーの飽和パルス強度をパプリカ、トウモロコシ、パキラの葉を十分に飽和させると考えられる $6000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ に設定することにより、飽和パルスとして十分な光強度が得られると判断した。

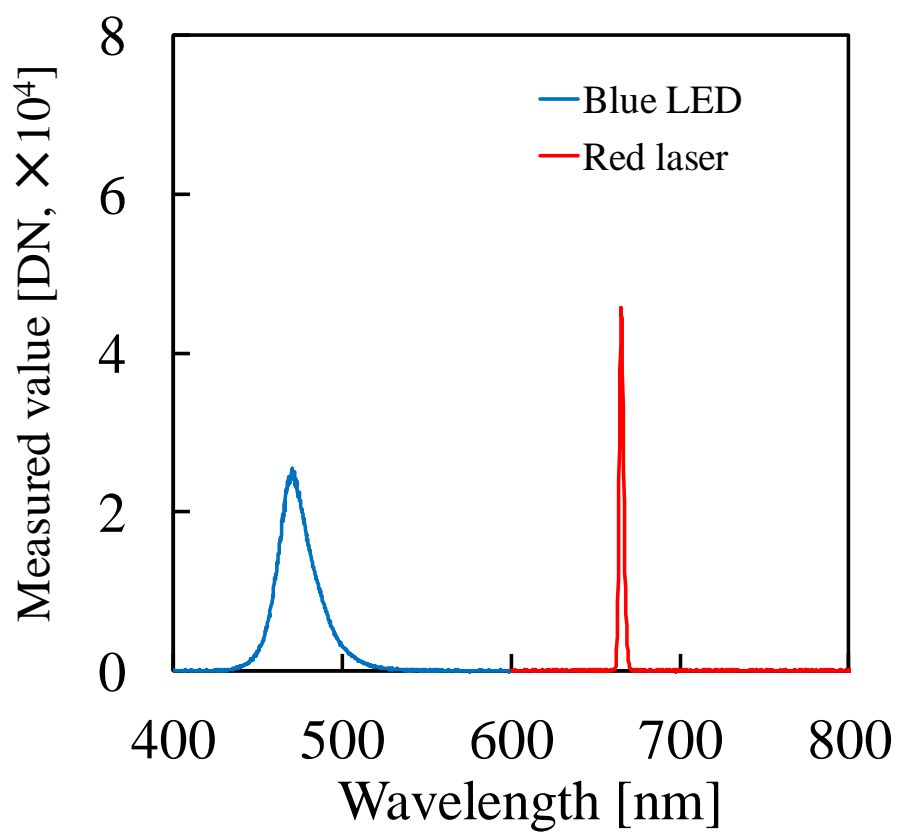


図4-5 PAM装置の飽和パルス光と高波長分解能分光計用レーザ光の波長特性。

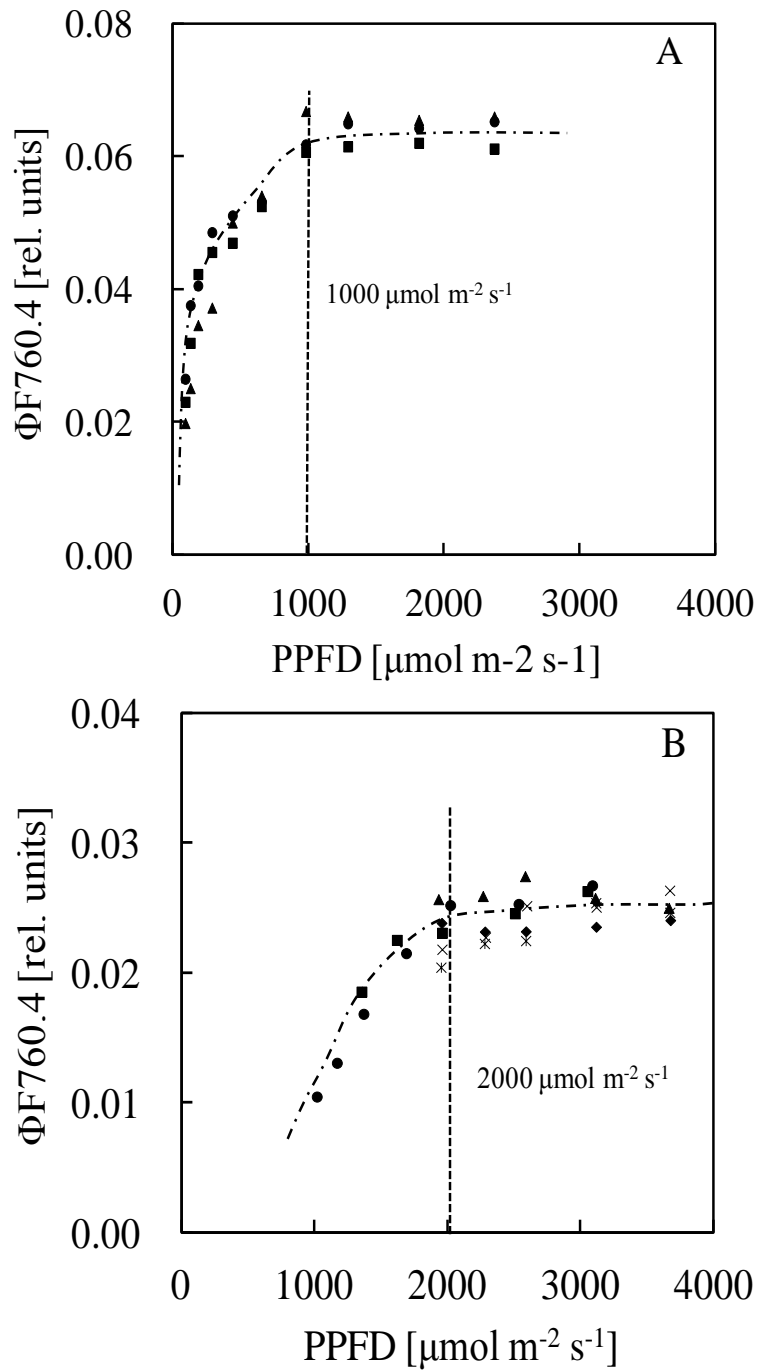


図4-6 パプリカにおける光強度と蛍光収率の関係。A:暗処理下、B:太陽光下。

4.3.3 飽和パルス光による蛍光測定

ここでは、飽和パルス光を用いた蛍光測定の手順について説明する(図 4-7)。測定は、下記の順番で行った。

- ① 最大蛍光収率(ΦF_m)を求めるために、4.3.1で紹介した測定装置(図 4-3)を自作の暗箱に入れ、材料植物を 20 分間暗処理した。
- ② 暗処理の状態において、HR2000+分光計(積分時間:200ms)で葉の測定を行い、測定された 10 秒間のデータの中央値を暗値とした。
- ③ ②の測定後、直ちに PAM 装置で最大蛍光収率 ΦF_m を測定した。
- ④ PAM 装置で ΦF_m を測定した約 1 分後、赤色レーザの飽和パルス光(約 0.8s)を照射し、分光測定を行った。
- ⑤ その後、暗箱を取り除き、太陽光下で材料植物を順応させた(図 4-7A)。5 分間以上太陽光に順化させた後、PAM 装置で太陽光下での蛍光収率(ΦF_s)と最大蛍光収率($\Phi F_m'$)を測定した。さらに、PAM 装置での測定の後 20 秒経過した時点で、赤色レーザの飽和パルス光を照射し、同様に、分光計測定を行った。この測定を 40 秒間の周期で 2-4 回繰り返し、太陽光強度が安定した時の測定値を求めた。なお、レーザ光を照射する前の 10 秒間の測定値の中央値を太陽光下での測定値とした(図 4-7B)。上記の測定後、速やかに白板を葉用クリップで挟み、太陽光放射輝度を測定した。白板をセットした時、葉における光強度やファイバの距離と角度が一致するように実験を行った。また、測定値の 10 秒間の中央値を計算に使用した。
- ⑥ 上記で測定された分光測定値から、FLD 法を用いて、暗所での最大蛍光収率 ΦF_m 、太陽光下での蛍光収率 ΦF_s 及び太陽光下での最大蛍光収率 $\Phi F_m'$ を計算した。これらの計算の際には、測定値から暗値を引いた 0.6s 間の値を使用した。さらに、 ΦF_m 、 $\Phi F_m'$ 、 ΦF_s から、光化学系 II の量子収率($\Phi PS II$)、非光化学消光(NPQ)及び電子伝達速度(ETR)などのクロロフィル蛍光パラメータを算出した。

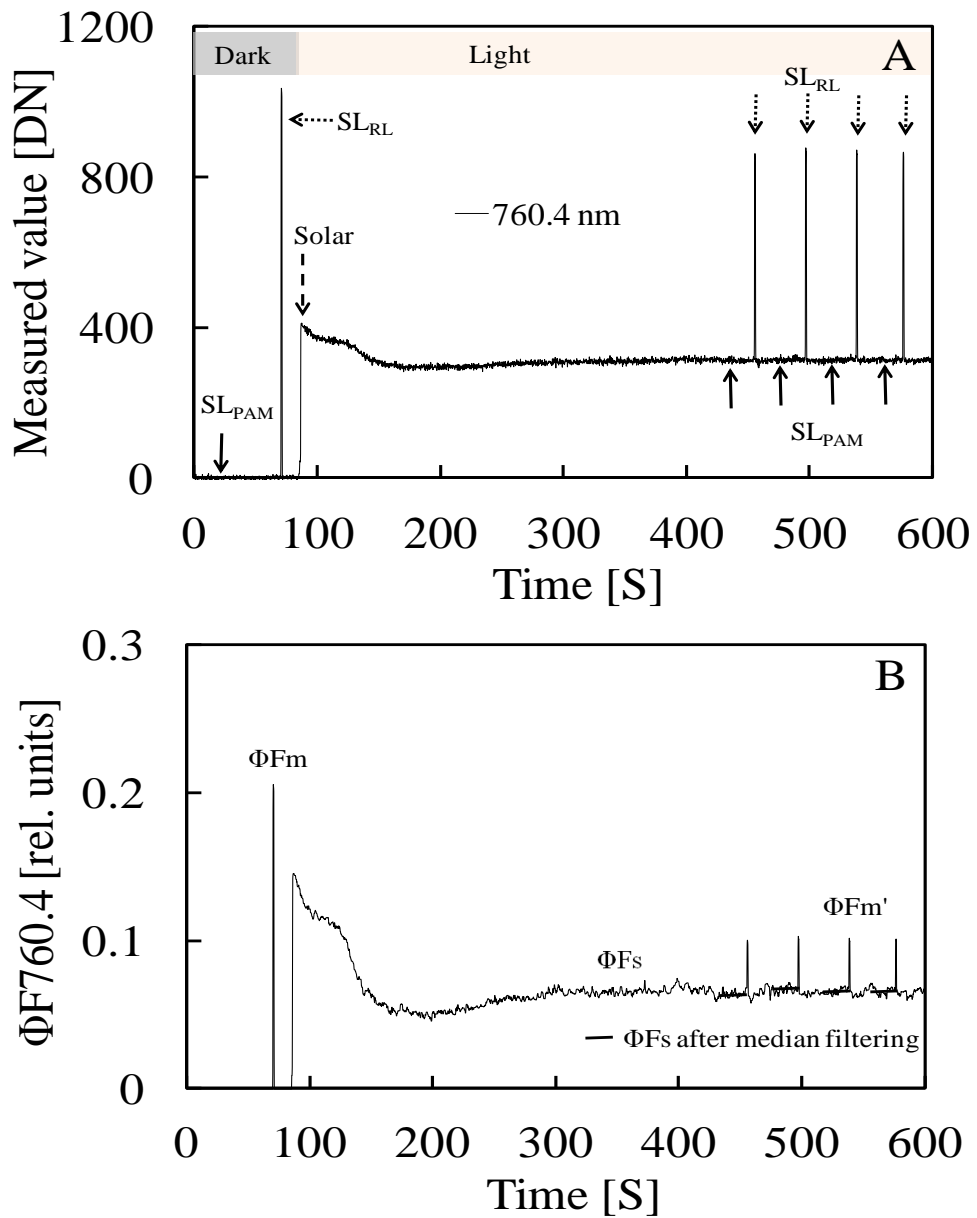


図4-7 太陽光下で、飽和パルス法によるクロロフィル蛍光測定。A:暗処理と明処理下におけるPAM飽和光 (SL_{PAM}) とレーザー飽和光 (SL_{RL}) 照射、B:暗処理と明処理下における蛍光収率の時間変化。

4.4 結果

4.4.1 パプリカ

パプリカにおける実験について、太陽光強度が比較的安定していた 39 回のデータを解析に用いた。一連の実験中、レーザ強度は $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、太陽光放射強度 (PPFD) は $11\text{--}1726 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、葉緑素計の SPAD 値は 37.5–52.9、葉面温度は 20.8–35.2°C であった。

図4-8はパプリカの光化学系 II の量子収率 ($\Phi_{\text{PS II}}$) と光合成有効放射強度の相関を示す。 $\Phi_{\text{PS II}}$ は PAM 法 (A) と FLD 法 (B) 両方において光合成有効放射強度の増加に伴い減少し、ばらつきあるものの非常に似た分布を示した。

図4-9はパプリカの非光化学消光 (NPQ) と光合成有効放射強度の関係を示す。NPQ は PAM 法 (A) と FLD 法 (B) 両方において光合成有効放射強度の増加と共に増加した。PAM 法、FLD 法共にばらつきがやや大きかったが、決定係数は同じ値であった。

図4-10はパプリカの電子伝達速度 (ETR) と光合成有効放射強度の関係である。PPFD が大きい時、PAM 法 (A) と FLD 法 (B) 両方においてばらつきが大きかった。また、PPFD が $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を超えると平均値的には ETR が小さくなる傾向がみられた。

図4-11はパプリカの Φ_{PSII} と NPQ の相関である。PAM 法 (A)、FLD 法 (B) 共に負の相関を示したが、FLD 法の方が決定係数は小さかった。

図 4-12 はパプリカの $\Phi_{\text{PS II}}$ における PAM 法と FLD 法の相関である。決定係数が $R^2=0.90$ と高く、近似線も $y=x$ にほぼ重なった。

図 4-13 はパプリカの NPQ における PAM 法と FLD 法の相関である。 $\Phi_{\text{PS II}}$ の場合と同様、近似線が $y=x$ にほぼ重なったが、決定係数が $R^2=0.85$ とやや悪かった。

図 4-14 はパプリカの ETR における PAM 法と FLD 法の相関である。光強度が高い時、ばらつきが大きかった。

これら実験において、同じ強度の太陽光を照射しても、 $\Phi_{\text{PS II}}$ 、NPQ、ETR の値が必ずしも一致しなかった。特に光強度が高い時、ばらつきが大きい傾向がみられた。この傾向は、葉緑素計の値がほぼ一定の葉においても見られた。

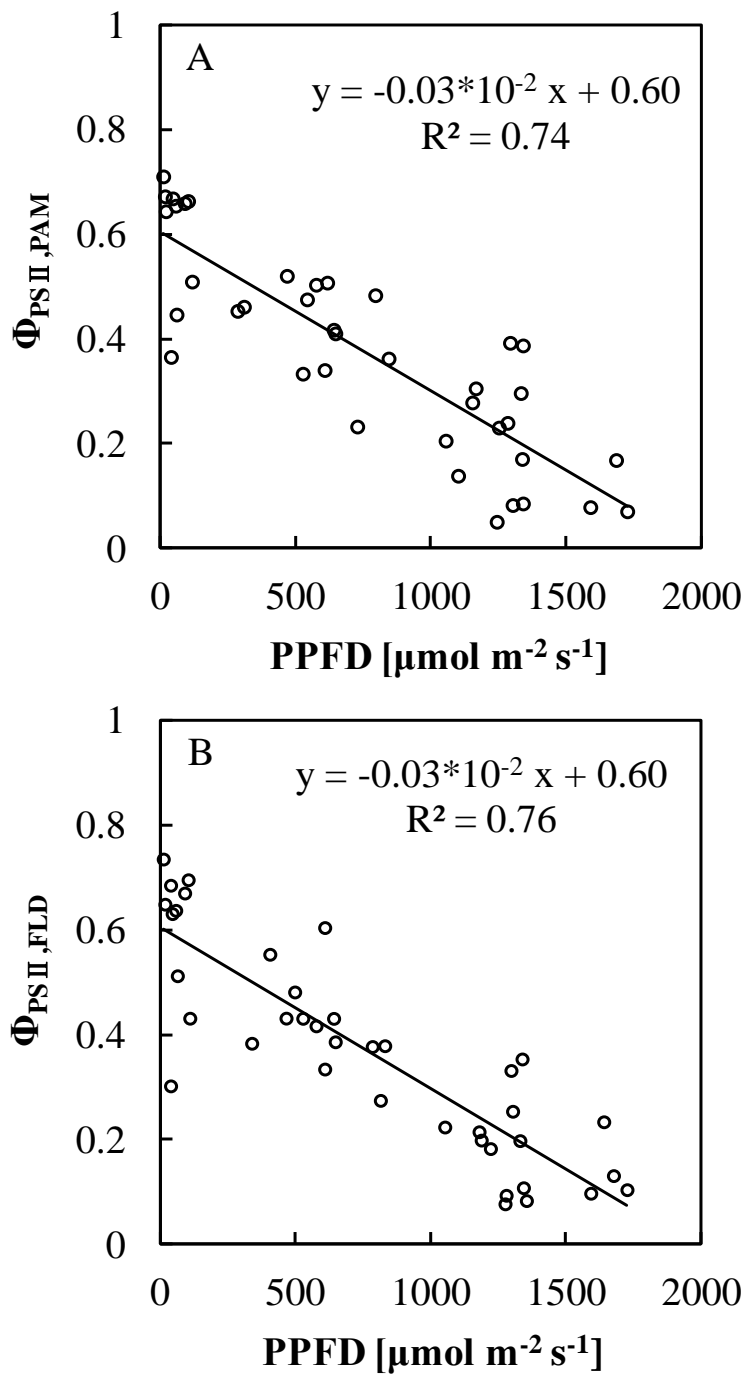


図4-8 パプリカの Φ_{PSII} と光合成有効放射強度の関係。AとBはそれぞれPAM法とFLD法の結果である。

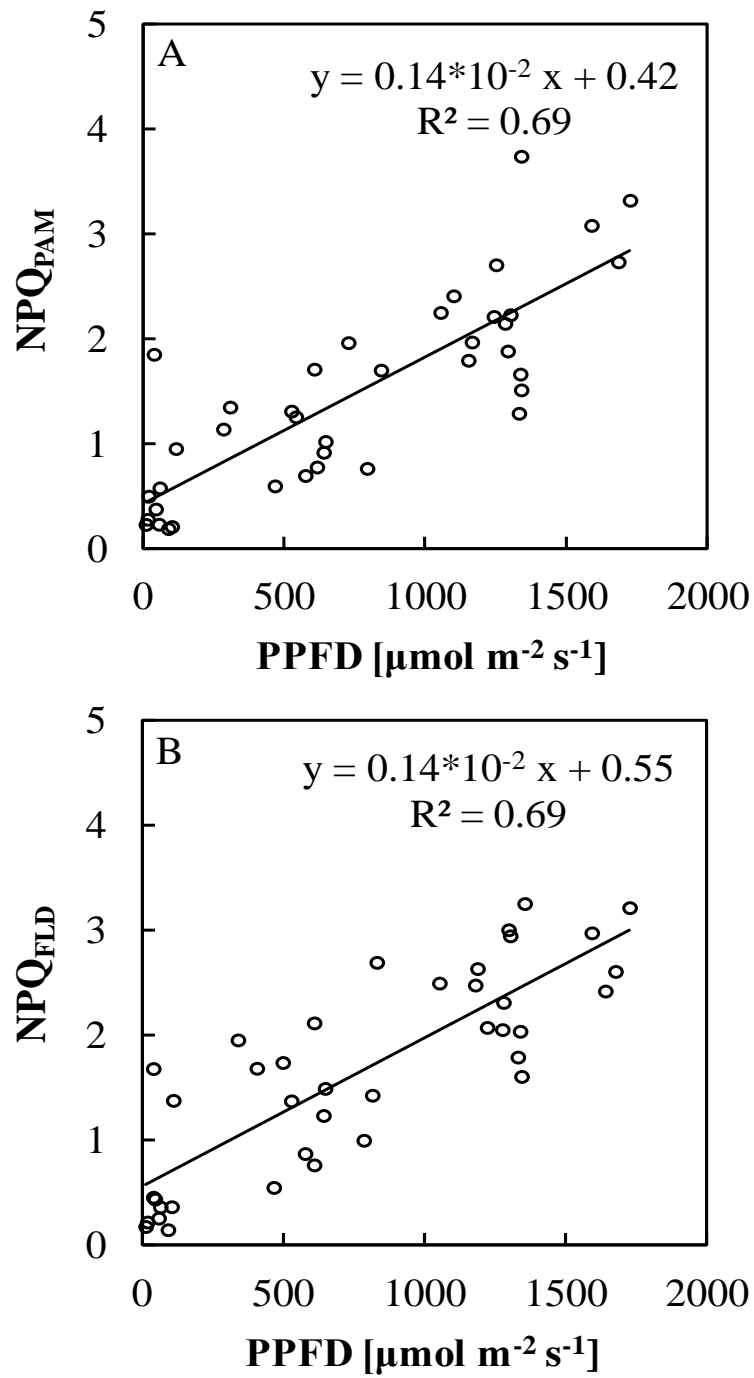


図4-9 パプリカのNPQと光合成有効放射強度の関係。
AとBはそれぞれPAM法とFLD法の結果である。

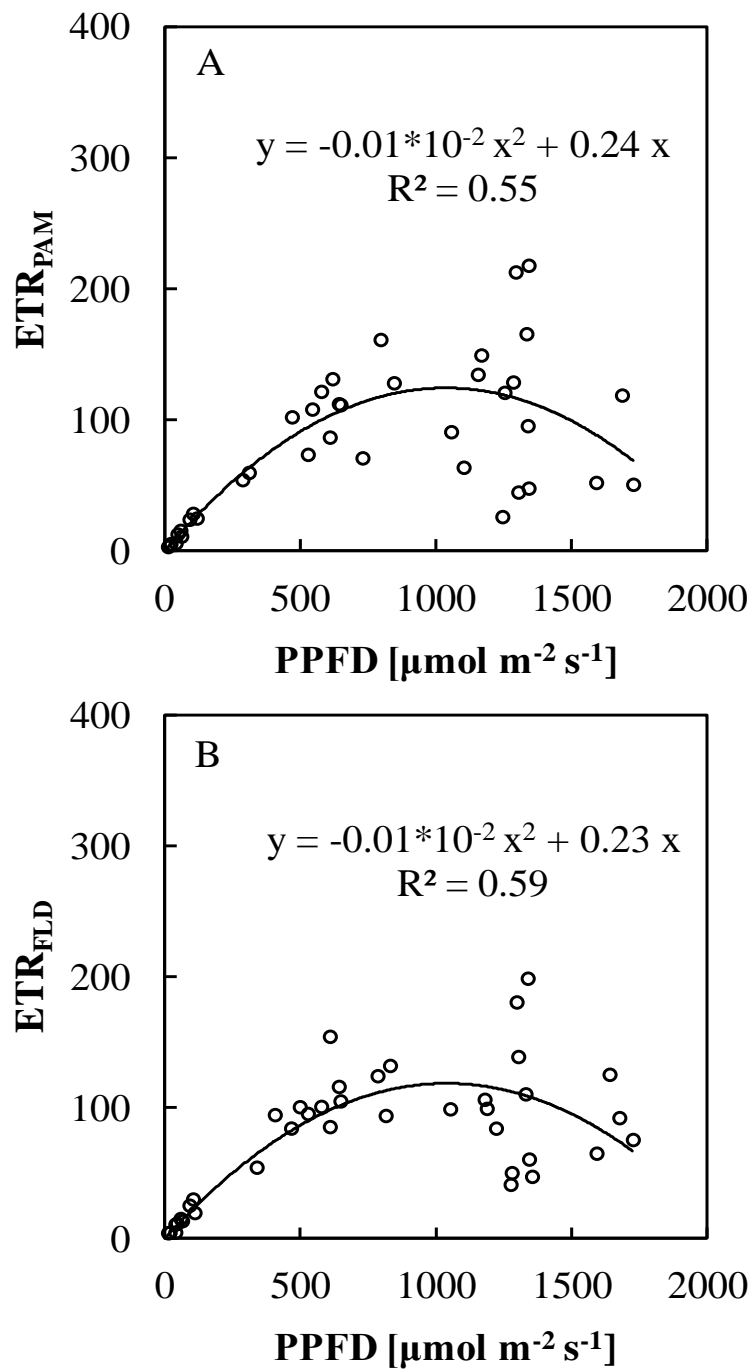


図4-10 パプリカのETRと光合成有効放射強度の関係。AとBはそれぞれPAM法とFLD法の結果である。

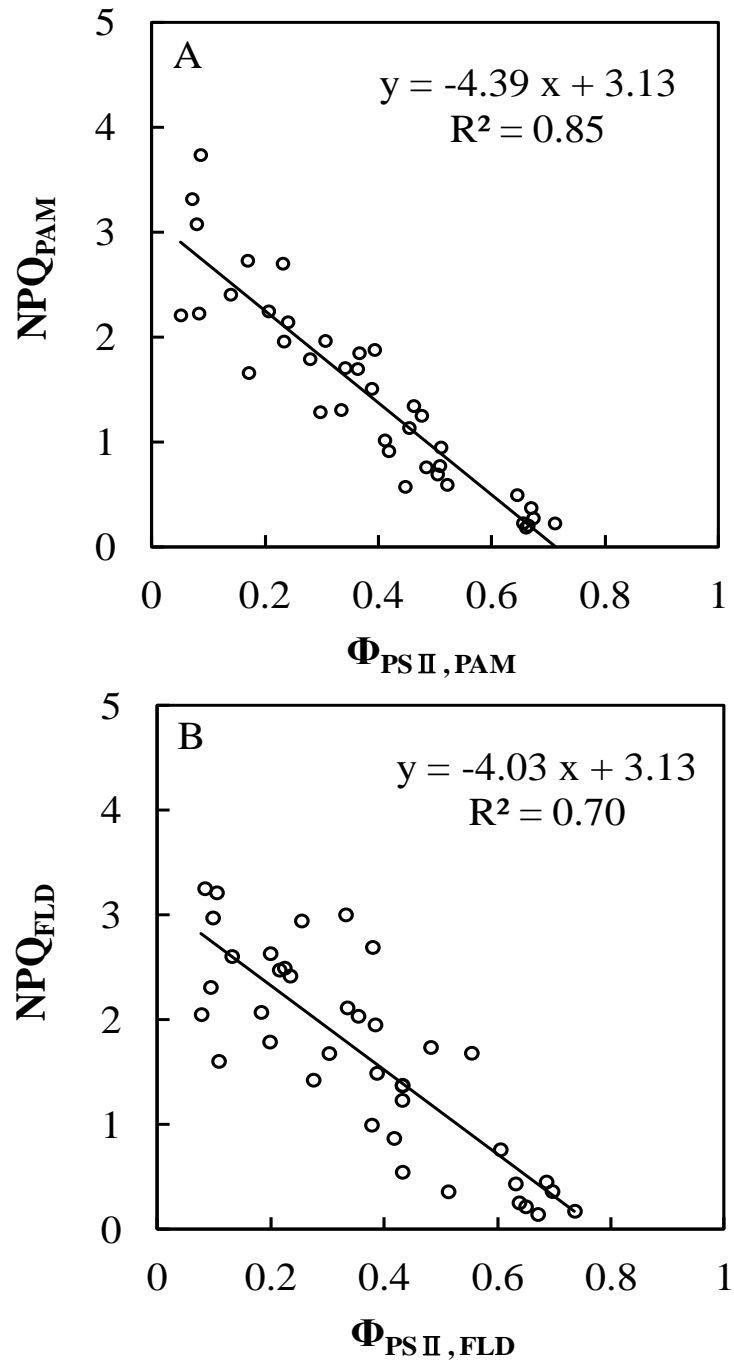


図4-11 パプリカの Φ_{PSII} とNPQの相関。AとBはそれぞれPAM法とFLD法の結果である。

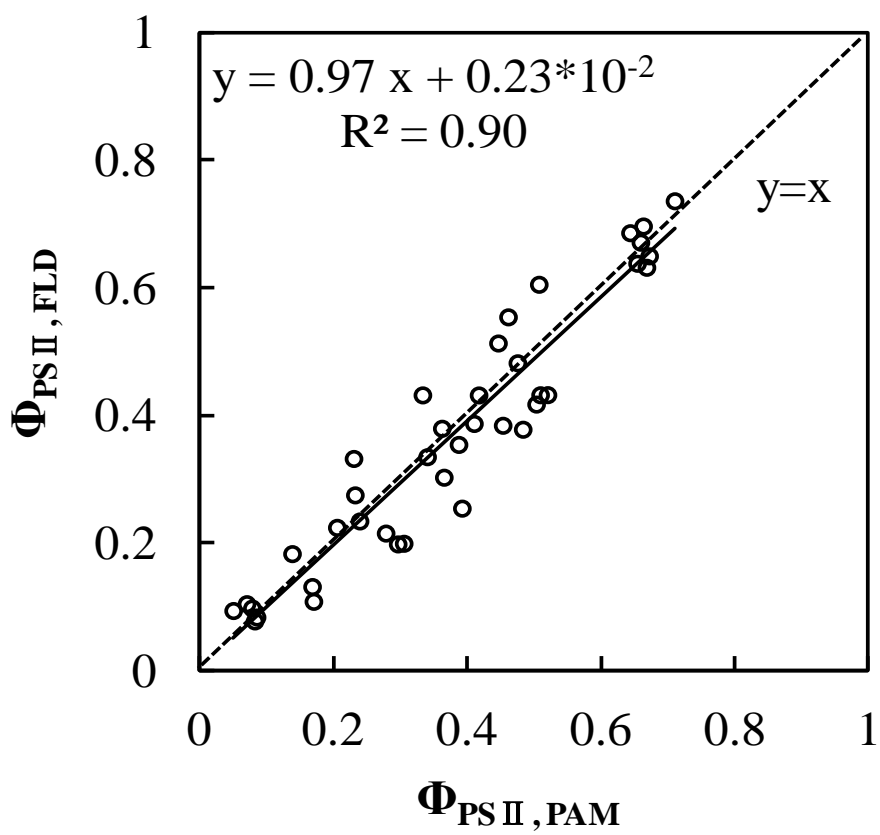


図 4-12 パブリカにおける $\Phi_{\text{PSII, PAM}}$ と $\Phi_{\text{PSII, FLD}}$ の関係。

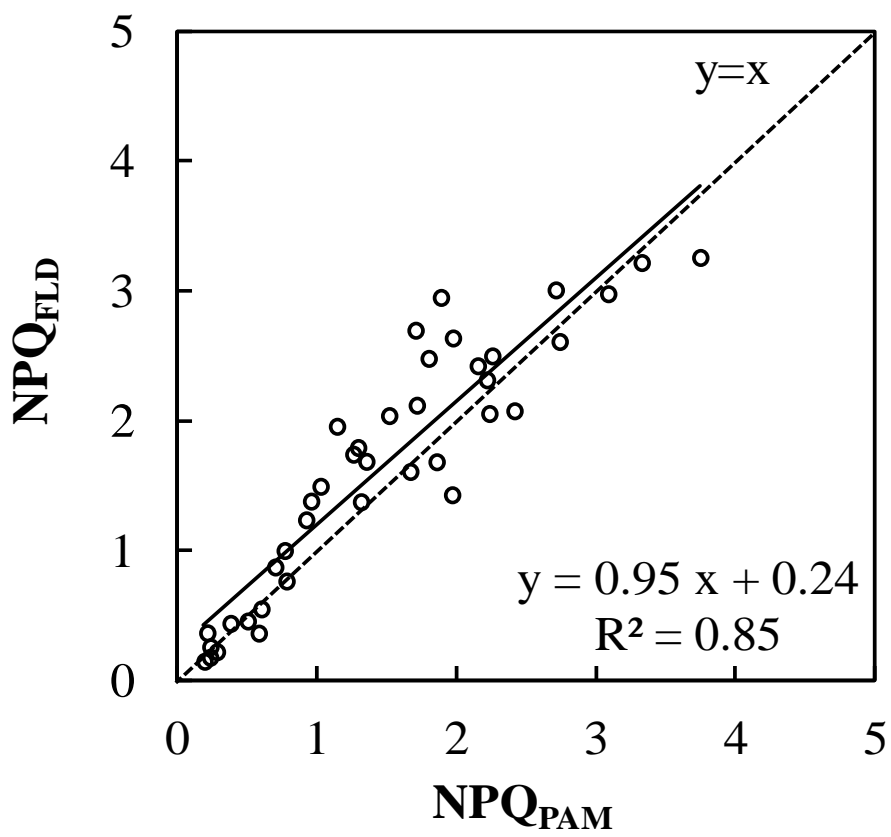


図 4-13 パプリカにおける NPQ_{PAM} と NPQ_{FLD} の関係。

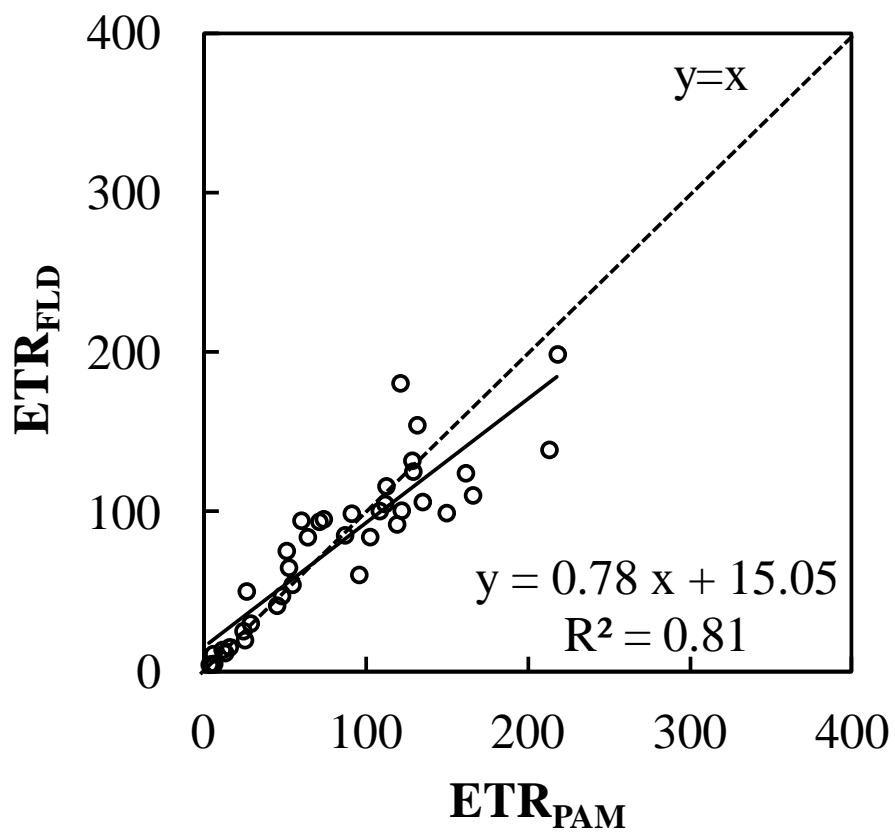


図 4-14 パブリカにおける ETR_{PAM} と ETR_{FLD} の関係。

4.4.2 トウモロコシ

トウモロコシにおける実験においては、40回のデータを解析に用いた。一連の実験中、レーザ強度は $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、太陽光放射強度 (PPFD) は $9\text{--}1860 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、葉緑素計の SPAD 値は 22.7–36.6、葉面温度は 21.1–32.7°C であった。

図4-15はトウモロコシの光化学系 II の量子収率 ($\Phi_{\text{PS II}}$) と光合成有効放射強度の相関を示す。 $\Phi_{\text{PS II}}$ は PAM法 (A) と FLD法 (B) 両方において光合成有効放射強度の増加に伴い減少し、ばらつきあるものの非常に似た分布を示した。決定係数は、パプリカよりも悪かった。また、決定係数が FLD法よりも PAM法の方が悪かったが、その原因については光強度が高いとき、PAM法でばらつきが大きくなったことが上げられる。

図4-16はトウモロコシの非光化学消光 (NPQ) と光合成有効放射強度の関係を示す。NPQは PAM法 (A) と FLD法 (B) 両方において光合成有効放射強度の増加と共に増加した。決定係数については、PAM法で $\Phi_{\text{PS II}}$ よりも悪かったが、その原因は $\Phi_{\text{PS II}}$ と同様、光強度が高いときのばらつきが大きいたことが原因している。

図4-17はトウモロコシの電子伝達速度 (ETR) と光合成有効放射強度の関係である。光強度が高い時、PAM法 (A) と FLD法 (B) 両方においてばらつきが大きかった。特に PAM法ではよりばらつきが大きく、決定係数も悪かった。パプリカよりも光強度が高いときの低下が小さかった。

図4-18はトウモロコシの Φ_{PSII} と NPQ の相関である。二つの方法ではほぼ同じ傾向を示し、PAM法 (A) のほうが FLD法 (B) より相関係数が若干高かった。

図4-19はトウモロコシの $\Phi_{\text{PS II}}$ における PAM法と FLD法の相関である。パプリカに比べると決定係数はやや悪いが、 R^2 は 0.84 と高い相関を示し、近似線も $y=x$ にほぼ重なった。

図4-20はトウモロコシの NPQ における PAM法と FLD法の相関である。FLD法では、NPQ がやや高く推定される傾向があった。

図4-21はトウモロコシの ETR における PAM法と FLD法の相関である。光強度が高い時、ばらつきが大きくなったが、 R^2 は 0.87 とパプリカの場合よりもよかった。

この実験で、パプリカの結果と同様に、 $\Phi_{\text{PS II}}$ 、NPQ、ETR がその時の環境状況や光合成反応速度に依存し、葉緑素濃度と関連性が低かった。光強度が高い時、FLD法の $\Phi_{\text{PS II}}$ 、NPQ、ETR は PAM法よりばらつきが低く、決定係数も高かった。この原因については明確ではない。PAM法と FLD法で測定された $\Phi_{\text{PS II}}$ 、NPQ、ETR もいい相関を示した。 $\Phi_{\text{PS II}}$ の値は、光強度が高いとき、

トウモロコシではほぼ 0.2 以上であったに対し、パプリカでは 0.1 を下回る値もあり、全体的に低い傾向を示した。一方、トウモロコシの NPQ はパプリカより低い傾向を示した。この傾向は、特に、光強度が強いとき、C 4 植物であるトウモロコシは C 3 植物のパプリカより光合成速度が高く、熱放散力が低いことを示している。

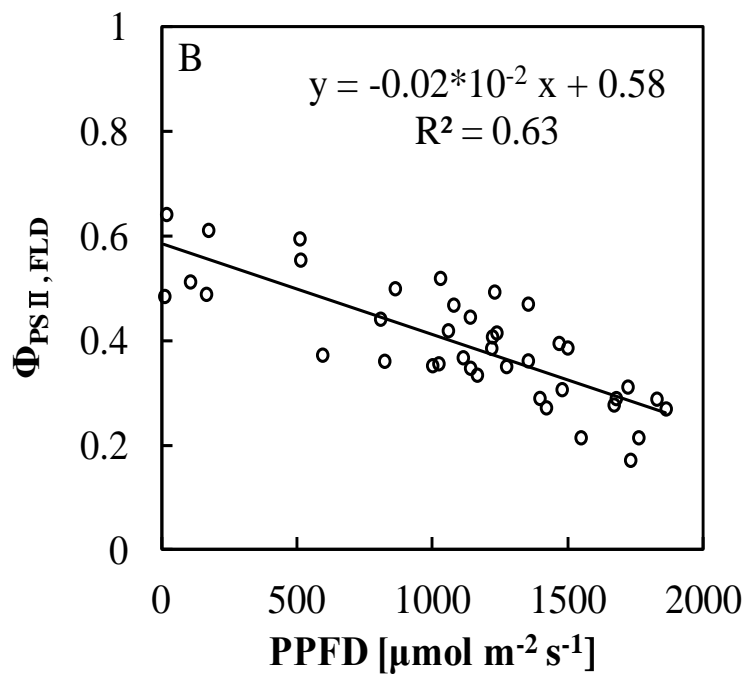
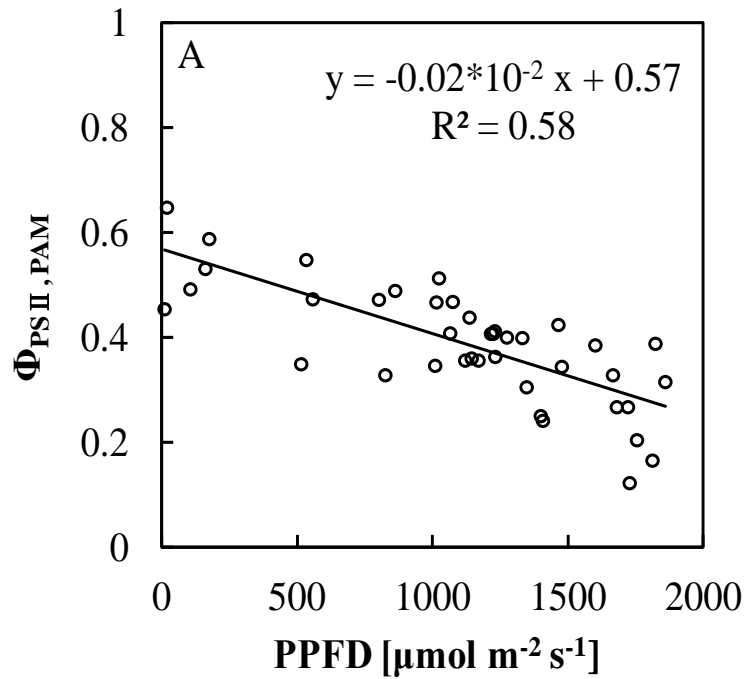


図4-15 トウモロコシの Φ_{PSII} と光合成有効放射強度の関係。AとBはそれぞれPAM法とFLD法の結果である。

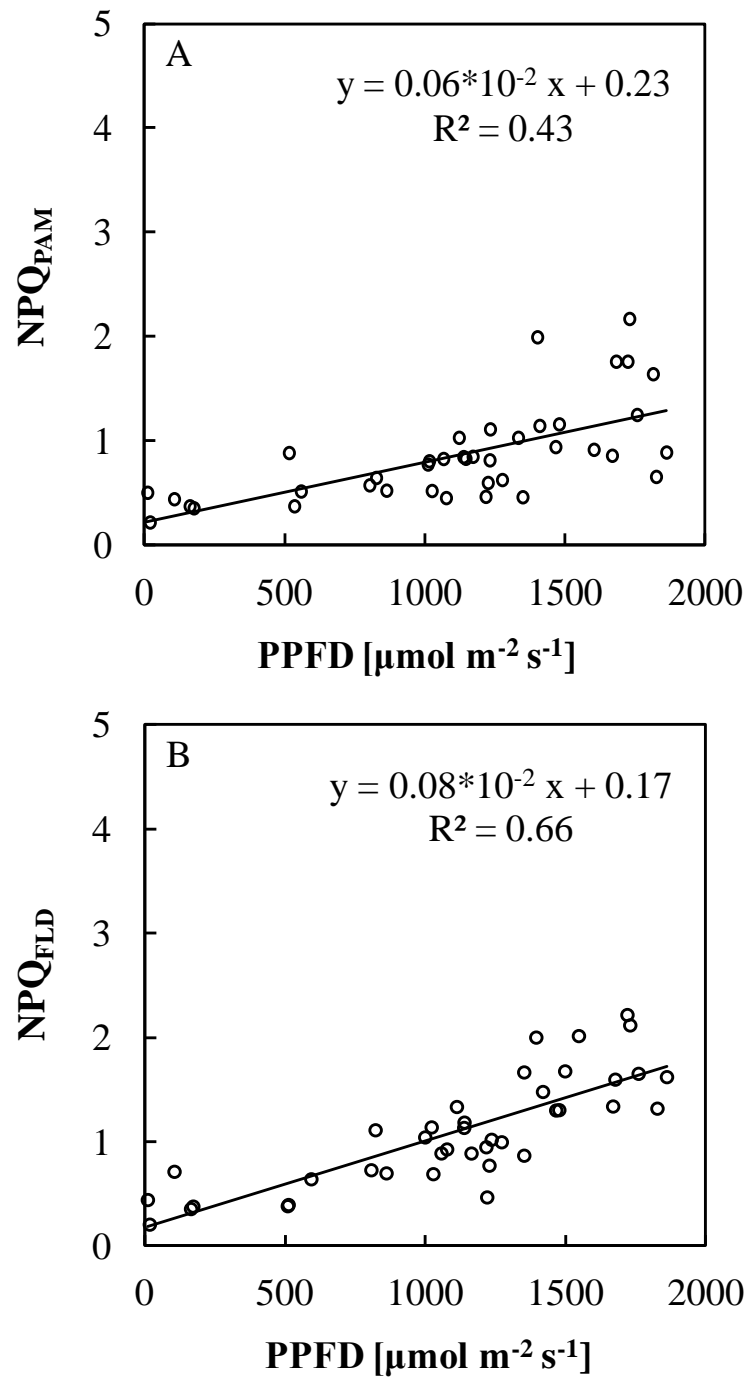


図4-16 トウモロコシのNPQと光合成有効放射強度の関係。AとBはそれぞれPAM法とFLD法の結果である。

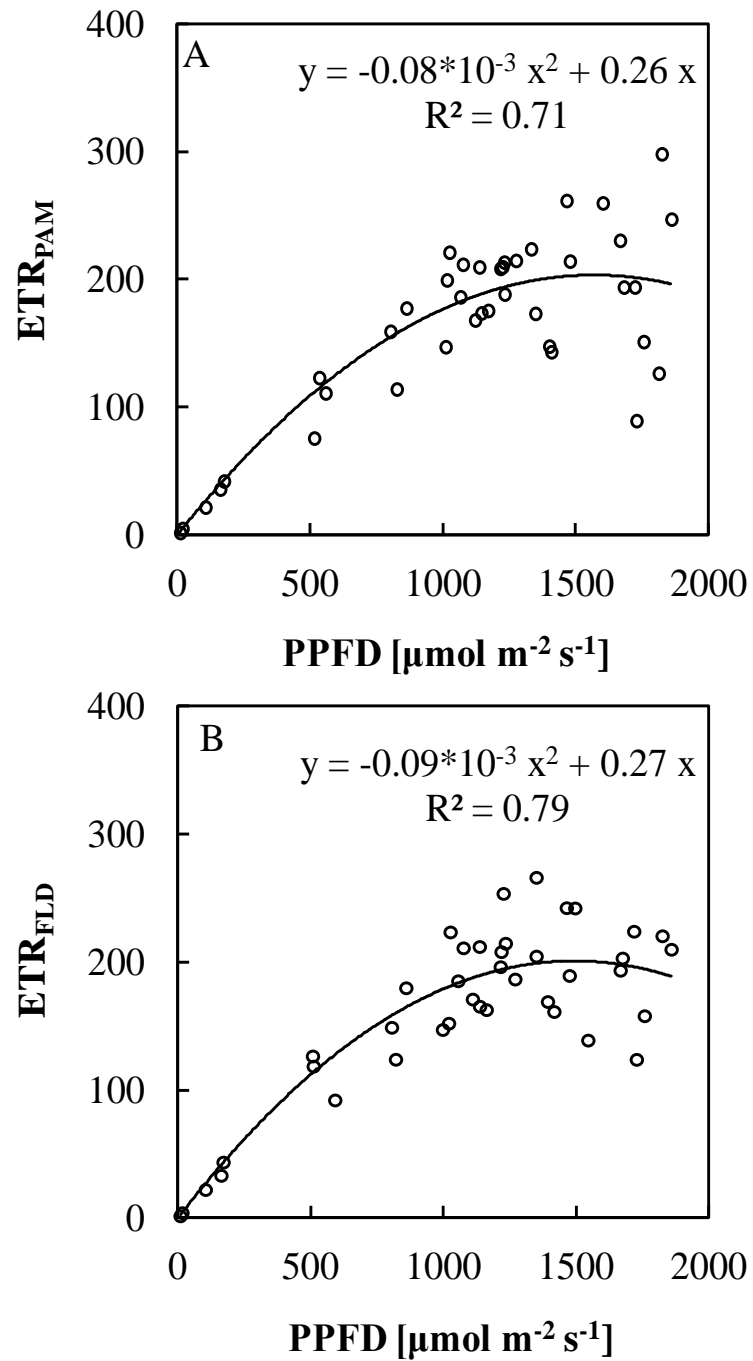


図4-17 トウモロコシのETRと光合成有効放射強度の関係。AとBはそれぞれPAM法とFLD法の結果である。

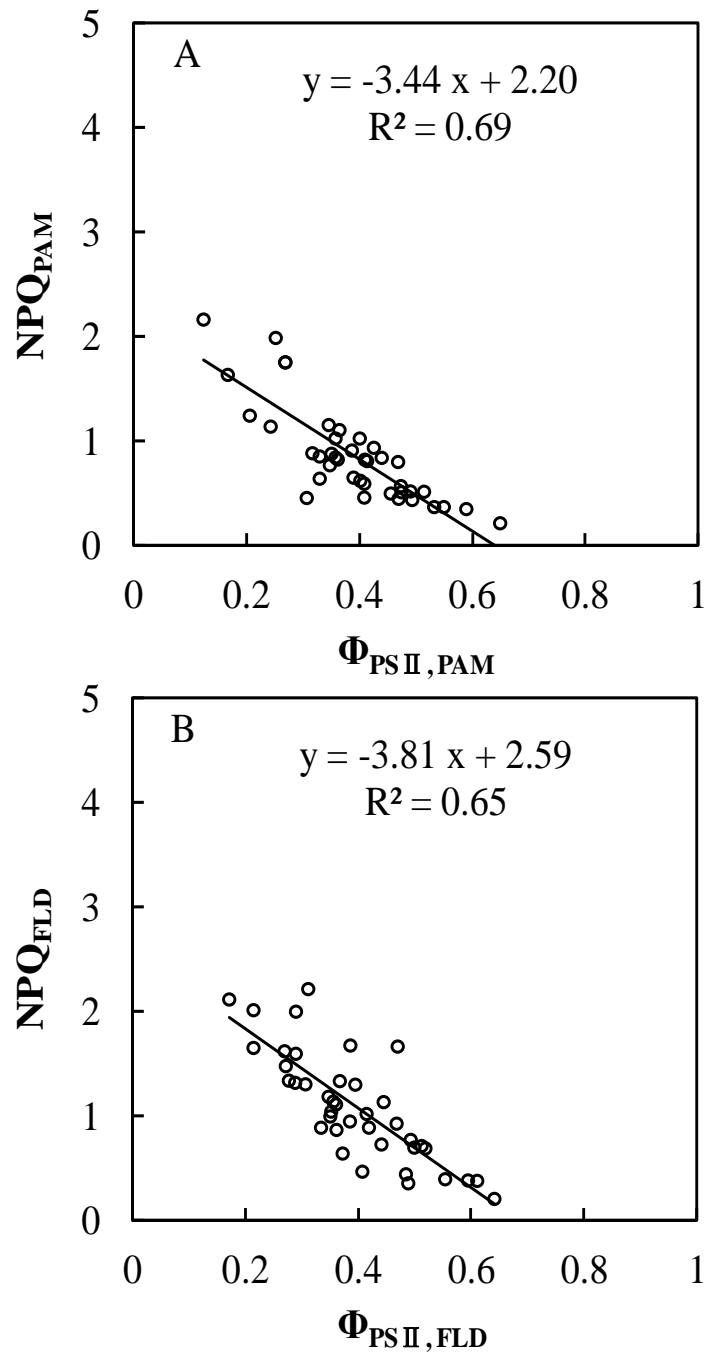


図4-18 トウモロコシの Φ_{PSII} とNPQの関係。
AとBはそれぞれPAM法とFLD法の結果である。

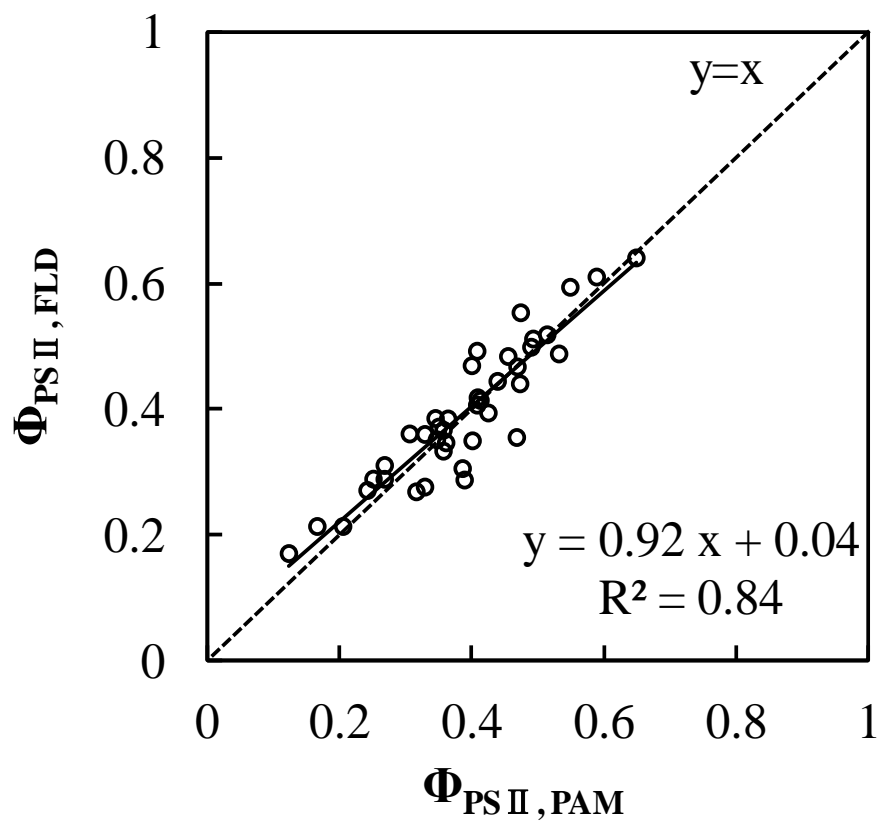


図 4-19 トウモロコシにおける $\Phi_{\text{PSII, PAM}}$ と $\Phi_{\text{PSII, FLD}}$ の関係。

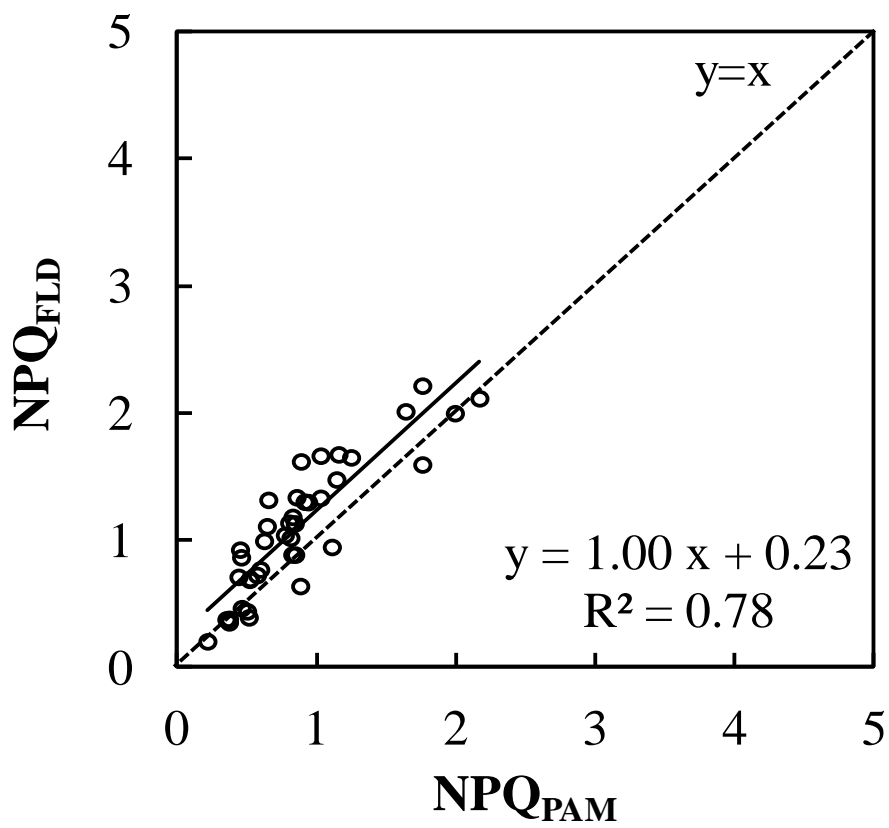


図 4-20 トウモロコシにおける NPQ_{PAM} と NPQ_{FLD} の関係。

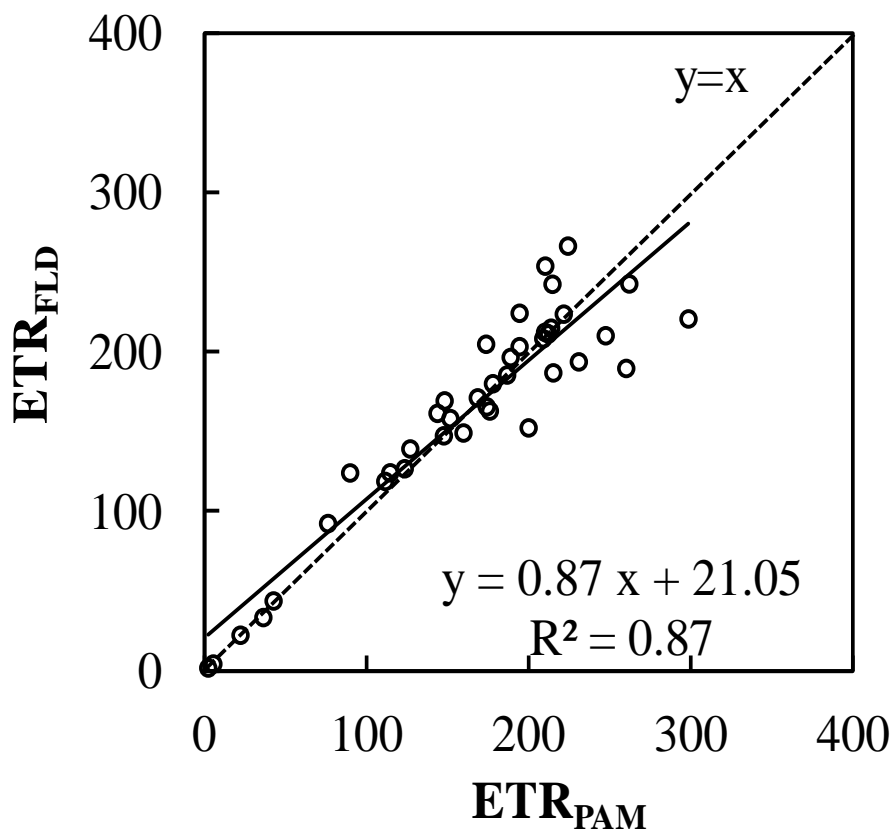


図 4-21 トウモロコシにおける ETR_{PAM} と ETR_{FLD} の関係。

4.4.3 パキラ

パキラにおける実験においては、40回のデータを解析に用いた。一連の実験中、レーザ強度は $6000 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、太陽光放射強度 (PPFD) は $17\text{--}1537 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、葉緑素計の SPAD 値は 23.2–56.1、葉面温度は $20.1\text{--}27.6^\circ\text{C}$ であった。

図4-22はパキラの光化学系 II の量子収率 ($\Phi_{\text{PS II}}$) と光合成有効放射強度の相関を示す。 $\Phi_{\text{PS II}}$ は PAM 法 (A) と FLD 法 (B) 両方において光合成有効放射強度の増加に伴い減少し、ばらつきあるものの似た分布を示した。決定係数は、トウモロコシよりもよく、パプリカと同程度であった。

図4-23はパキラの非光化学消光 (NPQ) と光合成有効放射強度の関係を示す。NPQはPAM法(A)とFLD法(B)両方において光合成有効放射強度の増加と共に増加した。特に、光強度が $1000 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ より高い時、増加が著しくなり、同じ光強度でも2倍以上の差が生じた。このため、線形回帰式の決定係数は悪かった。

図4-24はパキラの電子伝達速度 (ETR) と光合成有効放射強度の関係である。光強度が高い時、PAM法(A)とFLD法(B)両方においてばらつきが大きかった。光強度が高いときの低下はパプリカと同程度であった。 $1500 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上のデータがあると、より著しい低下が生じる可能性はある。

図4-25はパキラの Φ_{PSII} と NPQ の相関である。PAM法(A)とFLD法(B)ではほぼ同じ傾向を示し、線形相関はなかった。 Φ_{PSII} が 0.3 より低い時 NPQ の変化が非常に激しく、一方、 Φ_{PSII} が 0.4 より高い時 NPQ の変化が少なかった。

図4-26はパキラの $\Phi_{\text{PS II}}$ における PAM 法と FLD 法の相関である。パプリカと同様、 R^2 は 0.90 と高い係数を示し、ばらつきも少なかった。

図4-27はパキラの NPQ における PAM 法と FLD 法の相関である。FLD 法では、NPQ が高く推定される傾向があるが、 R^2 は 0.88 とパプリカ以上に高い相関を示した。

図4-28はパキラの ETR における PAM 法と FLD 法の相関である。光強度が高い時、ばらつきは大きくなったが、 R^2 は 0.79 でありパプリカと同程度の相関があった。

パキラでは、パプリカやトウモロコシの結果とかなり異なる傾向が得られた。光合成有効放射強度が高い時、 $\Phi_{\text{PS II}}$ と ETR の変化がより少なかったに対し、NPQ が非常に大きな増加を示し、線形相関にはならなかった。これは光強度が高い時パキラの熱放散がパプリカやトウモロコシよりもより大きいことを示している。

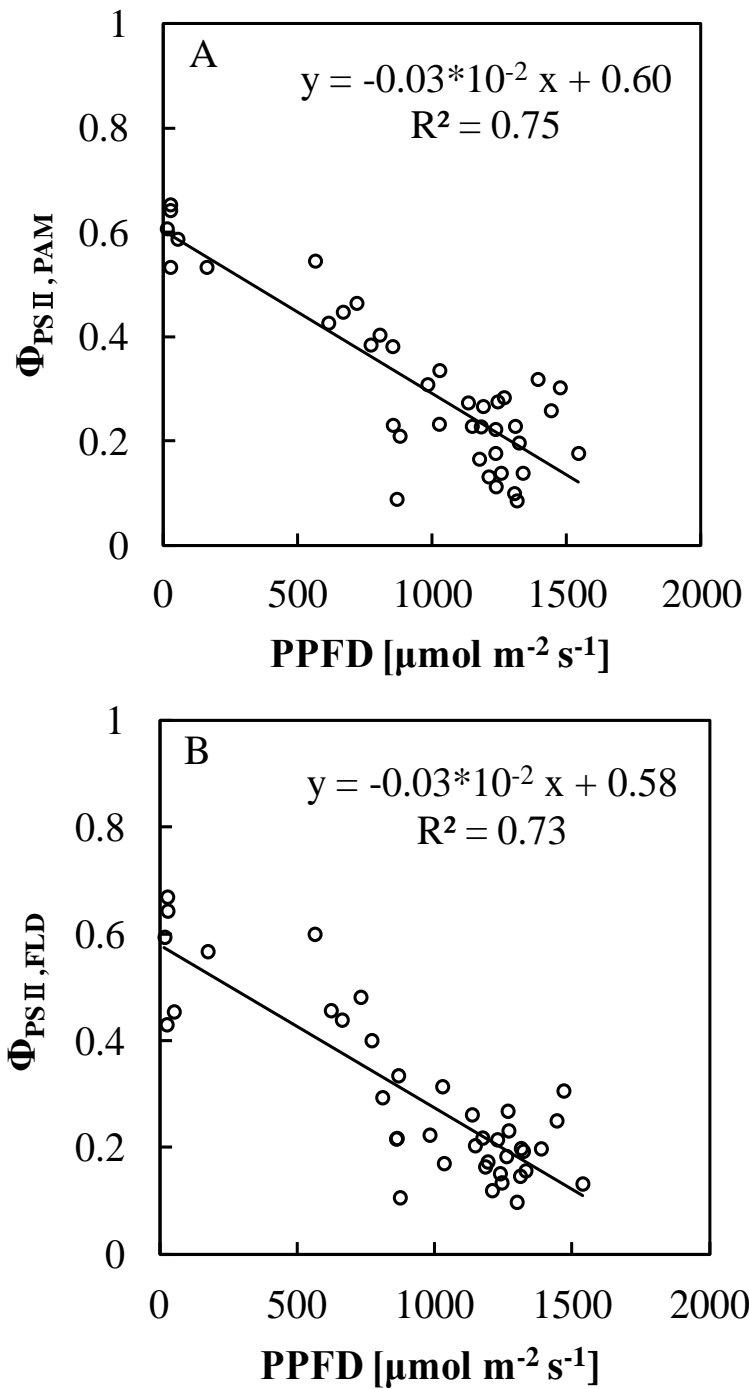


図 4-22 パキラの Φ_{PSII} と光合成有効放射強度の関係。A と B はそれぞれ PAM 法と FLD 法の結果である。

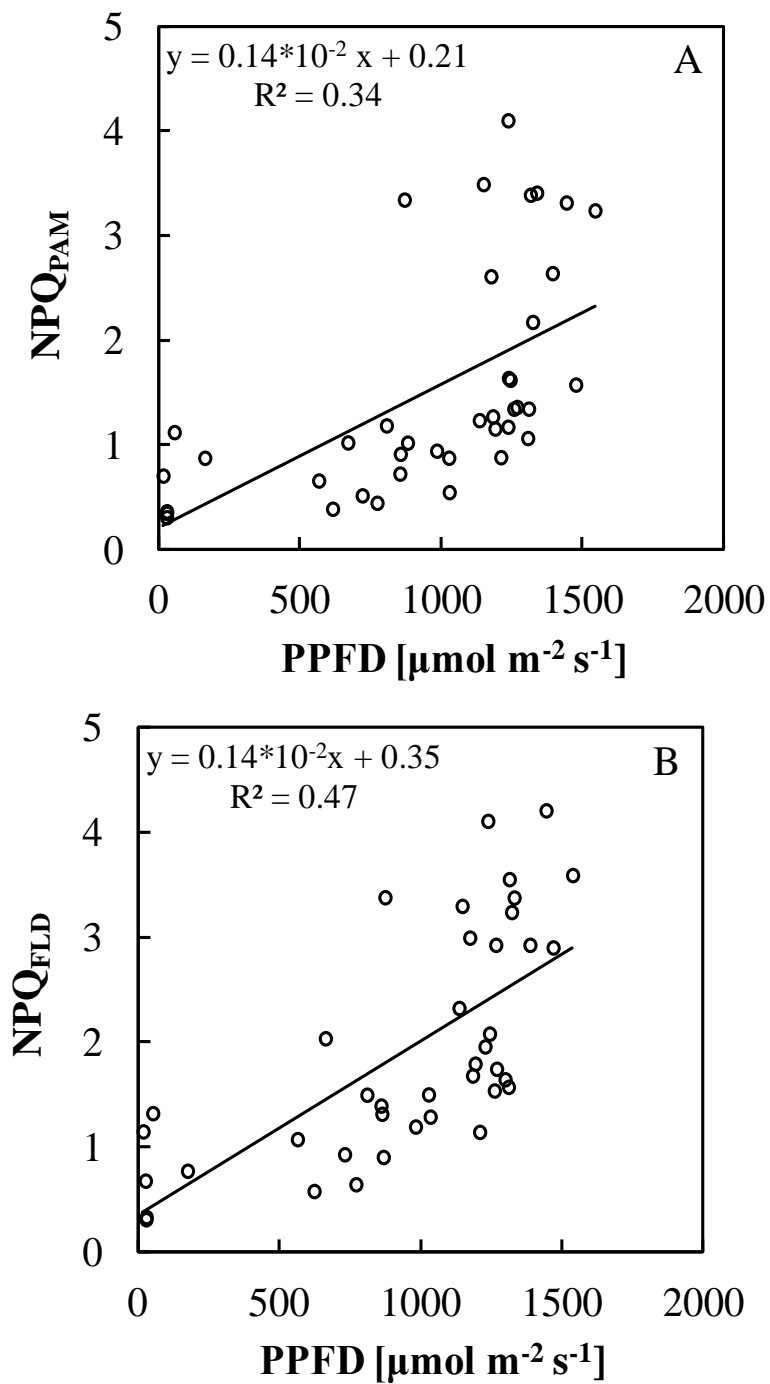


図 4-23 パキラの NPQ と光合成有効放射強度の関係。A と B はそれぞれ PAM 法と FLD 法の結果である。

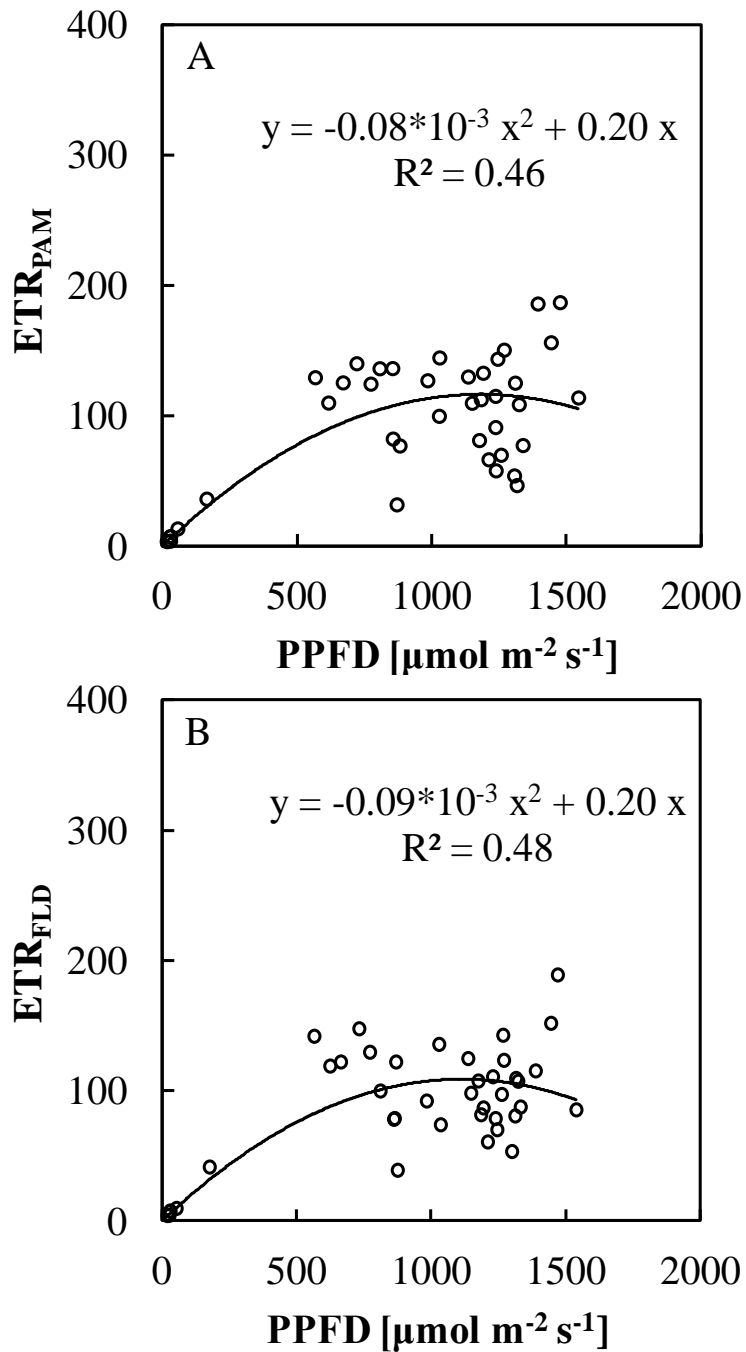


図 4-24 パキラの ETR と光合成有効放射強度の関係。A と B はそれぞれ PAM 法と FLD 法の結果である。

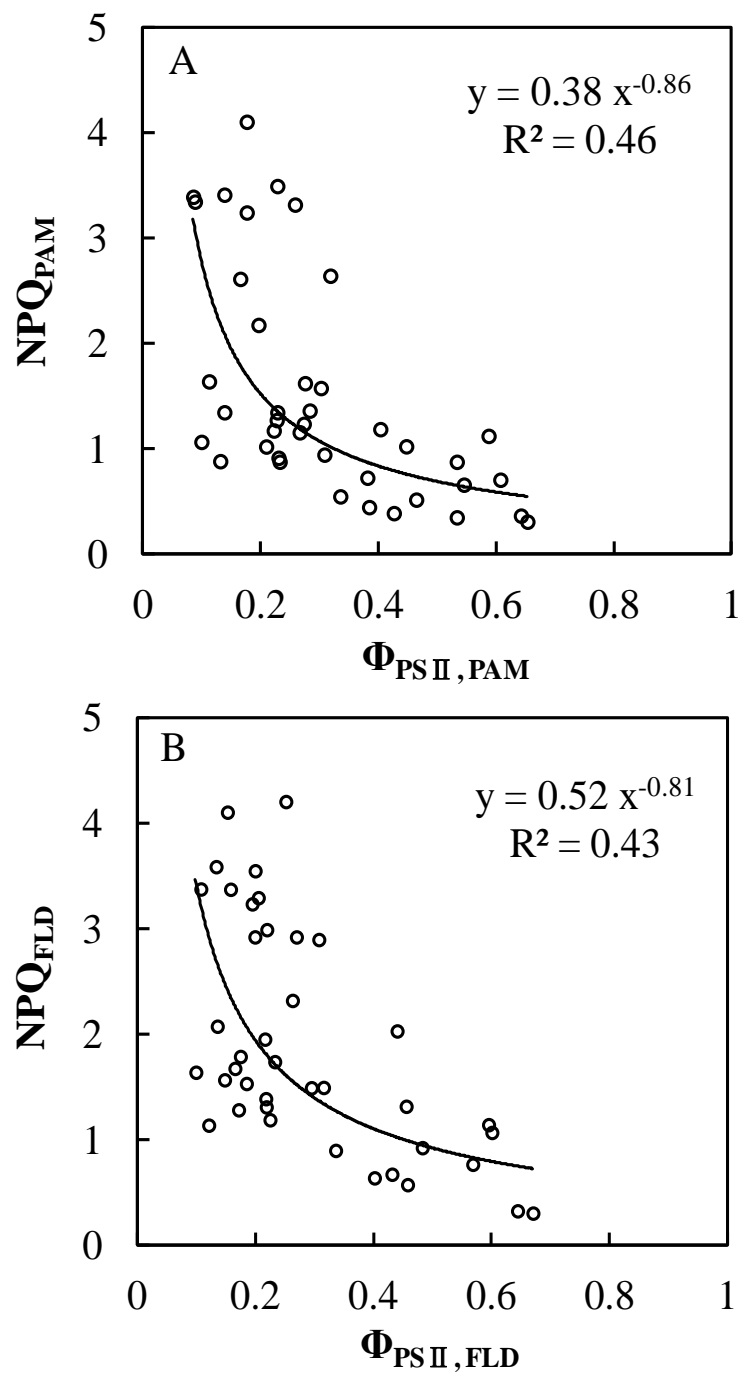


図4-25 パキラの Φ_{PSII} と NPQ の関係。A と B はそれぞれ PAM 法と FLD 法の結果である。

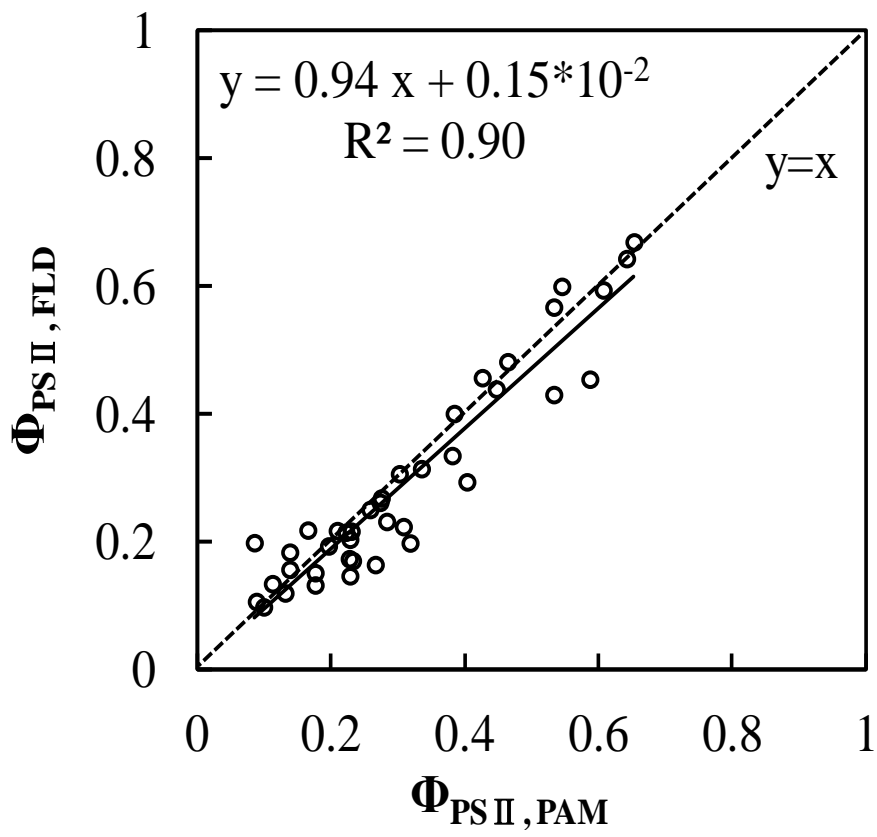


図 4-26 パキラにおける $\Phi_{\text{PSII, PAM}}$ と $\Phi_{\text{PSII, FLD}}$ の関係。

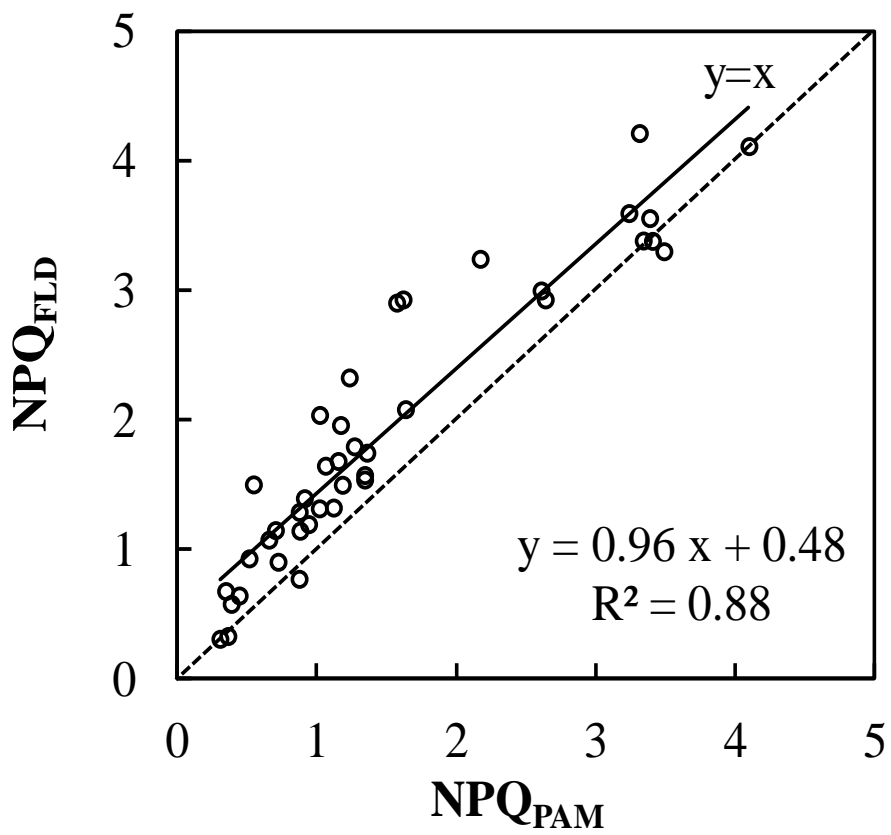


図 4-27 パキラにおける NPQ_{PAM} と NPQ_{FLD} の関係。

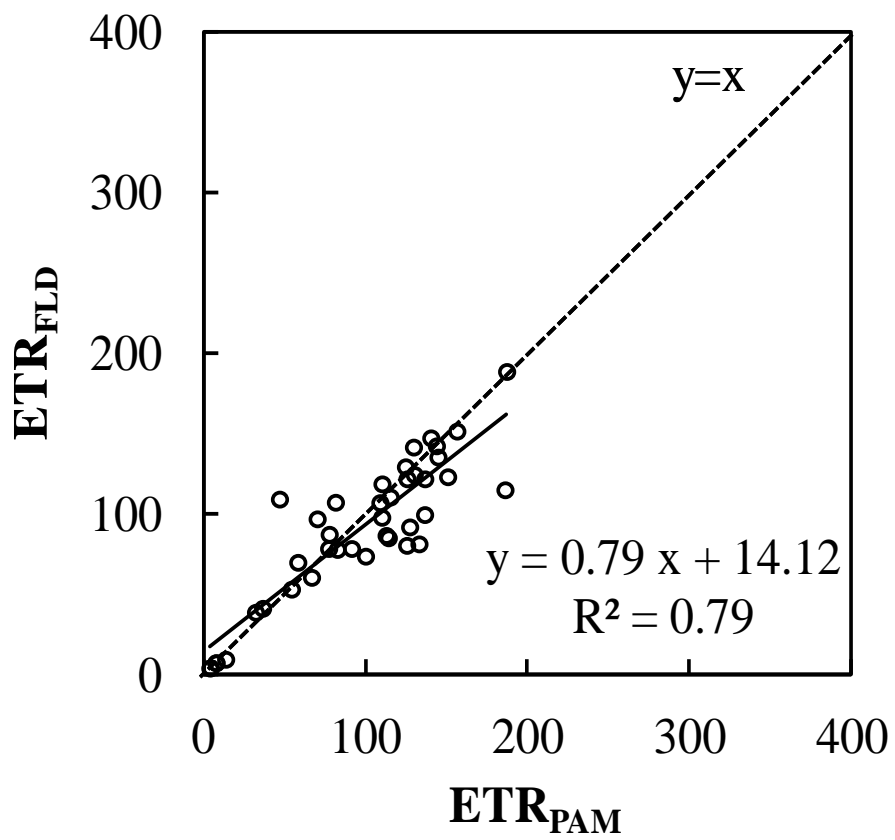


図 4-28 パキラにおける ETR_{PAM} と ETR_{FLD} の関係。

4.5 考察

4.5.1 光化学系Ⅱの量子収率

上述した実験で、PAM法とFLD法を用い、パプリカ、トウモロコシとパキラの異なる太陽光強度下で光化学系Ⅱの量子収率(Φ_{PSII})を推定した。三種類の植物の Φ_{PSII} は、共に光強度と負の相関があった。光強度が非常に低い時、三種類の植物の Φ_{PSII} はほぼ0.6付近の値を示し、有意差はなかった(図4-8、図4-15、図4-22)。光強度が高い時(約 $1500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、パプリカとパキラの Φ_{PSII} は0.2付近であったに対し、トウモロコシでは0.4付近であった。また、トウモロコシの近似直線の傾きも小さかった。これは、光強度が高い時、トウモロコシの光合成速度がパプリカとパキラのそれよりも高いことを意味する。

パプリカとパキラはC3植物で、トウモロコシはC4植物である。C3とC4植物は、光合成におけるCO₂固定反応の最初の産物が炭素原子3個か4個によって分けられる。地球上の植物の約90%がC3植物であると言われている。Nievaら(1999)によると、一定の温度($31 \pm 0.3^\circ\text{C}$)と光強度($1370 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)下で、C4植物葉はC3植物より純光合成速度がはるかに大きかった。また、環境温度が約 20°C より高い時、温度の上昇に伴いC4植物の光合成速度がC3植物より高くなったという研究もある(Pearcy et al. 1984, Yamori et al. 2014)。ここで得られた結果は、これらのことを支持する。

4.5.2 非光化学消光

PAM法とFLD法を用い、パプリカ、トウモロコシとパキラの異なる太陽光強度下で非光化学消光(NPQ)を推定した。三種類の植物のNPQは共に光強度と正の相関があった(図4-9、図4-16、図4-23)。光強度の増加に伴いNPQは増加したが、ばらつきも大きく、 Φ_{PSII} に比べて、決定係数も低かった。トウモロコシの近似直線の傾きがパプリカの約半分、切片も半分以下で、ばらつきもより少なかった。パキラでは、光強度が高い時NPQの上昇が著しくなった。既往の細胞内の葉緑体レベルの研究で、明期光強度が強くなるにつれて、NPQが増加し、熱放散に伴う Φ_{PSII} が低下した(Omasa and Takayama 2003)。

これらの実験結果から、トウモロコシはC4植物で、熱放散がC3植物より低いと言える。特に、弱光下で生育させた室内観賞植物であるパキラは強光下において熱放散が激しく上昇した。

4.5.3 電子伝達率

異なる太陽光強度下でパプリカ、トウモロコシとパキラの電子伝達速度 (ETR) を推定した。三種類の植物の ETR が共に光の強度に伴い増加したが、光強度が高い時ばらつきが大きくなり、減少の傾向に転じた (図 4-10、図 4-17、図 4-24)。光強度 (約 $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) が高い時、トウモロコシの ETR がパプリカとパキラの二倍近くなり、光合成速度がより高いことを示した。

4.5.4 蛍光パラメータ間の関係と FLD 法の有効性の検証

ここでは、上記の実験結果から、蛍光パラメータ間の関係と FLD 法による蛍光パラメータの推定の有効性について検証する。

Φ_{PSII} と NPQ の関係についてみると、パプリカでは、 Φ_{PSII} と NPQ が逆直線相関を示し、 Φ_{PSII} が低い時 NPQ のばらつきがやや大きかった(図 4-11)。これは、光強度が高い時、光合成反応の状態によって、熱放散がかなり異なることに原因している。一方、 Φ_{PSII} が高い時、NPQ は低い値を示し、熱放散が少なかった。

トウモロコシにおいても、パプリカと同様、 Φ_{PSII} と NPQ が逆直線相関を示したが、NPQ のばらつきは小さかった(図 4-18)。光強度が高い時にも Φ_{PSII} は高く保たれ、NPQ が低く、熱放散が少なかった。

パキラでは、 Φ_{PSII} と NPQ が逆曲線相関を示し、全体的に NPQ のばらつきが大きかった(図 4-25)。特に、 Φ_{PSII} が低い時、NPQ に 2 倍以上もの差も出た。これは、比較的 low 照度での生育に適した観葉植物であるので、特に、光強度が高い時、熱放散がかなり変化することに原因している。

一方、PAM 法と FLD 法による $\Phi_{PSII, PAM}$ と $\Phi_{PSII, FLD}$ の比較では、三種類の植物共に非常によい相関を示し、 R^2 はそれぞれパプリカで 0.90、トウモロコシで 0.84、パキラで 0.90 であった(図 4-12、図 4-19、図 4-26)。そして、ほぼ $y=x$ 線に近似した(傾きはそれぞれ: 0.97、0.92、0.94)。また、 NPQ_{PAM} と NPQ_{FLD} の比較では、 R^2 はそれぞれパプリカで 0.85、トウモロコシで 0.78、パキラで 0.88 であり、よい相関関係があった(傾きはそれぞれ: 0.95、1.00、0.96)(図 4-13、図 4-20、図 4-27)。しかし、全体的に NPQ_{FLD} が、 NPQ_{PAM} より若干高く推定される傾向があった。そして、概して、光強度が高い時、ばらつくも目立った。この原因については、測定法による原因が考えられる。FLD の Φ_{Fm} は Φ_{Fm}' の推定方法と異なる。 Φ_{Fm}' は FLD 法に基づき求めたのに対し、 Φ_{Fm} は測定した放射輝度の値を用いた。太陽光下で、対照基準である反射板の放射輝度の選択により Φ_{Fm}' が若干変わるので、場合によって Φ_{Fm}' がより小さく推定された可能性がある。また、PAM 装置の値を基準として比較したが、装置そのもののもつ誤差がないわけではない。加えて、飽和パルスの影響も誤差の一つの原因としては考えられる。今後、これらの問題の検証が必要であろう。

ETR_{PAM} と ETR_{FLD} の比較では、 R^2 はそれぞれパプリカで 0.81、トウモロコシで 0.87、パキラで 0.79 であり、よい相関関係を示した。近似直線の傾きはやや低く(それぞれ: 0.78、0.87、0.79)、ばらつきがあった。

4.6 本章のまとめ

本研究では、太陽光励起下でフラウンホーファー線（酸素吸収帯： O_2A ）によるクロロフィル蛍光測定法を用い、クロロフィル蛍光パラメータ（ $\Phi PS II$ 、NPQ と ETR）を推定し、従来法である PAM 法と比較し検討した。その結果、PAM 法と FLD 法による $\Phi PS II$ 、NPQ と ETR の推定値は高い相関を示し、FLD 法による $\Phi PS II$ 、NPQ と ETR の推定が可能であることが検証された。そして、本研究で開発した、FLD 法による蛍光パラメータの解析の有効性が確かめられた。

第 5 章、総括

5.1 本研究の要約

クロロフィル蛍光測定は能動方式と受動方式に分かれる。能動方式の蛍光測定は、近距離から励起光あるいは測定光を葉に照射し、蛍光を直接測定する。一方、受動方式の蛍光測定は、太陽光励起の下でフラウンホーファー線を用いて、測定された分光放射輝度から蛍光を求める方法で、遠距離からの測定にも用いることができ、飛行機や衛星リモートセンシングにも応用されている。

能動方式の蛍光測定は方法的に確立されており、高精度での蛍光測定が可能であるのに対して、受動方式の蛍光測定は、非常に弱い蛍光信号を分光放射輝度から推定するため、測定法としての検証が必要である。そこで本研究では、能動方式の蛍光測定を基準とし、受動方式の蛍光測定で得られた値と比較することにより、クロロフィル含有量との関係や蛍光パラメータの精度の検証を行った。特に、受動方式では、レーザ励起による飽和パルス光を用いて、光化学系Ⅱの量子収率(Φ_{PSII})、非光化学消光(NPQ)、電子伝達率(ETR)などを測定する新しい方法を開発し、その精度検証を行った。

本論文は5章で構成される。第1章の序論では、本研究の背景及びクロロフィル蛍光の既往の研究を纏めた。植物は太陽光エネルギーを吸収し光合成を行い、水と二酸化炭素から炭水化物を合成するとともに酸素を放出する。光合成色素により吸収された光エネルギーは全て光合成に使われるのではなく、熱として多くのエネルギーを放出する。また、数%程度以下のエネルギーが蛍光として放出される。これらの光合成、熱放散、蛍光によるエネルギーは、何れかの収率が変化すると残りの二つの収率も変化する関係にある。

クロロフィル蛍光は植物が光合成を行う反応過程で主にクロロフィル a から放出される。蛍光に含まれる光合成の反応に関する情報は豊富である。このため、クロロフィル蛍光の測定は、光合成研究のために広く使用されている方法の1つである。クロロフィル蛍光の能動的な蛍光測定は、近距離での測定に限定されるが、市販の変調パルス光(PAM)装置を用いれば、 Φ_{PSII} やNPQ、ETRなどを測定できる。また、フィルターで励起光と蛍光を分離する方法もあるが、太陽光下での測定には適さない。

受動方式の蛍光測定は、太陽光の下で、酸素吸収帯 O_2B (686 nm)と O_2A (760 nm)付近のフラウンホーファー線深度(Fraunhofer line depth:FLD)を測定し、放射輝度から蛍光を推定する方法である。近年、航空機や衛星リモートセンシングによる太陽光励起の定常クロロフィル蛍光の測定が行われるようになってきており、群落レベルの正規化植生指標(NDVI)や総一次生産量(GPP)などとの関係や植物ストレスの評価に応用されている。

第 2 章では、クロロフィル蛍光の基礎知識について述べた。高等植物は光合成色素であるクロロフィルとカロテノイドを含有している。これらの光合成色素で吸収された光エネルギーは光合成反応に利用されるが、その一部は、686nm と 740nm 付近にピークを持つクロロフィル蛍光として放出される。しかしながら、686nm 付近のピークは葉の強い吸収帯と重なっており、かなりの割合が再吸収される。740nm 付近では再吸収の影響が小さくなり、760nm 付近ではほとんど再吸収の影響がない。

第 3 章では、定常クロロフィル蛍光について、能動方式と受動方式で測定された蛍光収率とクロロフィル含有量との関係を検討した。この章の実験では、植物育成チャンバー内で生育させたパプリカ (*Capsicum annuum cv. 'Sven'*) を供試植物材料とした。測定には、10-18 週間生育させた完全に展開した、異なる部位の成熟葉を使用した。測定前に葉を定常光下で十分に順応させた。測定は、能動的方法と受動的方法を用いて行った。人工光下で、フィルターを用い励起光と蛍光を分離し、分光器で蛍光の分光特性を測定し、参照基準とした。一方、太陽光下で、高波長分解能分光計を用い、20 分順応させた葉の分光放射輝度を測定し、酸素吸収帯 (O_2B (686 nm) と O_2A (760 nm)) を用いクロロフィル蛍光を算出した (FLD 法)。測定中、人工光強度は $150 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の一定値で、太陽光強度が $800-1800 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。また、蛍光強度が励起光強度に依存して変化するため、蛍光収率 (ΦF) を求めた。また、葉面上の特定のカ所の人工光励起と太陽光励起の定常クロロフィル蛍光を測定後、クロロフィル含有量を定量化した。686nm 付近で、上記の二つの方法で測定されたクロロフィル蛍光収率 $\Phi F_a 686.4$ と $\Phi F_s 686.7$ は、クロロフィル含有量の増加に伴い、急激に減少した。一方、760nm 付近では、 $\Phi F_a 760.5$ と $\Phi F_s 760.4$ は、ばらつきはあるが増加した。しかし、二つの方法でのクロロフィル蛍光収率比、 $\Phi F_a 686.4 / \Phi F_a 760.5$ と $\Phi F_s 686.7 / \Phi F_s 760.4$ は、クロロフィル含有量と明確な逆の相関を示し、相関係数がそれぞれ 0.94 と 0.73 であった。この相関は、クロロフィル含有量が多い時ややばらつきがあったものの、クロロフィル含有量が 400 mg m^{-2} より低い時非常に似た分布を示し、相関係数がそれぞれ 0.91 と 0.89 になった。クロロフィル含有量が 400 mg m^{-2} より多い時の太陽光下でばらつきが大きかった原因については、以下の二つが考えられる：一つ目は強い太陽光強度下で光合成速度と熱放散が著しく異なり蛍光に割り当てられるエネルギーの量が大きく変化した。二つ目はクロロフィル含有量が多い時、686nm 付近の葉の再吸収が著しく大きくなり、蛍光の放射輝度に対する値が相対的に小さくなるため、蛍光を抽出することが難しくなった。

人工光励起の定常クロロフィル蛍光収率比 ($\Phi F_a 686.4 / \Phi F_a 760.5$) と太陽光

励起の定常クロロフィル蛍光収率比 ($\Phi F_{686.7} / \Phi F_{760.4}$) の関係を求めたところ、 $y=x$ 線に近似した。また、人工光励起の蛍光収率比が低い時(約 2 以下)、太陽光励起の蛍光収率比がより低くなり、精度が低下した。しかしながら、クロロフィル含有量の違いにかかわらず、全体では、0.84 の良い相関を示し、太陽光下で FLD 法によるクロロフィル蛍光収率の測定の有効性を確かめることができ、また、クロロフィル含有量の推定が可能であることが示された。

第 4 章では、飽和パルス光によるクロロフィル蛍光の測定において、能動方式と受動方式で測定された蛍光パラメータ ($\Phi PS II$ 、NPQ、ETR) を比較し、精度検証を行った。この章の実験では、植物育成チャンバー内で生育させたパプリカ (*Capsicum annuum* cv. 'Sven') とトウモロコシ (*Zea mays* L.)、観賞植物であるパキラ (*Pachira Aubl.*) を供試植物材料として使用した。実験には、十分に展開した、葉緑素濃度の分布が比較的均一で、大きな葉脈のないカ所を選び、植物を 20 分間暗処理した後、太陽光下で高分解能分光計を用いて約 10 分間、分光放射輝度を測定した。測定 FLD 法によるクロロフィル蛍光の推定は、葉の吸収がほとんどない O_2A (760 nm) 付近で行った。また、酸素吸収帯 O_2A (760.4nm) の 0.4nm 波長幅の分光特性データを解析した。FLD 法では、最大蛍光収率を求めるため、赤色レーザを使用した。同時に PAM(パルス変調蛍光測定)装置で蛍光パラメータを測定し、参照基準とした。そして、三種類の材料における PAM 法と FLD 法による蛍光パラメータ (光化学系 II の量子収率 ($\Phi PS II$)、非光化学消光 (NPQ) と電子伝達率 (ETR)) の比較を行った。実験では、パプリカで 39 個、トウモロコシとパキラは 40 個の測定データを解析した。測定の際の環境条件はそれぞれ異なり、パプリカ (PPFD(光合成有効放射束密度): 11-1726 $\mu mol m^{-2}s^{-1}$ 、SPAD: 37.5-52.9、葉面温度: 20.8-35.2°C)、トウモロコシ (PPFD: 9-1860 $\mu mol m^{-2}s^{-1}$ 、SPAD: 22.7-36.6、葉面温度: 21.1-32.7°C)、パキラ (PPFD: 17-1537 $\mu mol m^{-2}s^{-1}$ 、SPAD: 23.2-56.1、葉面温度: 20.1-27.6°C) であった。三種類の植物とも、光合成有効放射輝度 (PPFD) の強度の増加に伴い $\Phi PS II$ は減少し、NPQ は増加した。また、ETR は増加したが、PPFD が大きくなるとやや減少傾向を示した。そして、そのばらつきは大きかった。植物種の比較では、トウモロコシの $\Phi PS II$ の減少幅が一番小さく、大きな PPFD 下でも高い値を示し、NPQ の増加幅も小さかった。パキラは大きな PPFD の時、 $\Phi PS II$ と NPQ の増減幅が他の 2 種に比べて激しく大きかった。これらの結果は、光強度が強い時、トウモロコシの光合成速度がパプリカより大きく、一方、暗いところでの生育に順化している観葉植物のパキラは、強い光環境下では著しく光合成速度が低下し、熱放散が増大することを示している。なお、パプリカとパキラは C3 植物で、トウモロコシは C4 植物である。PAM 法と FLD 法による $\Phi PS II$ 、NPQ と ETR の相関を三種類の植物で比較す

ると、共に非常に高い相関を示した、 $\Phi PS II$ については、 R^2 はそれぞれパプリカで0.90、トウモロコシで0.84、パキラで0.90であった。また、NPQでは、 R^2 はそれぞれパプリカで0.85、トウモロコシで0.78、パキラで0.88であった。さらに、ETRでは、 R^2 はそれぞれパプリカで0.81、トウモロコシで0.87、パキラで0.79であった。これらの結果から、本研究で開発した、FLD法による蛍光パラメータの解析の有効性が確かめられた。

第5章は、本論文の総括である。本論文では、太陽光励起下でフラウンホーファー線（酸素吸収帯： O_2B と O_2A ）を用いたクロロフィル蛍光測定法について検討し、クロロフィル含有量の影響やクロロフィル蛍光パラメータ（ $\Phi PS II$ 、NPQとETR）の推定精度の検討を、従来法との比較で行った。その結果、太陽光励起の定常クロロフィル蛍光は、クロロフィル含有量と高い相関を示した。また、PAM法とFLD法による $\Phi PS II$ 、NPQとETRの推定値は高い相関を示し、FLD法による $\Phi PS II$ 、NPQとETRの推定が可能であることが検証された。

5.2 今後の課題

本研究では、能動方式の蛍光測定を基準とし、受動方式の蛍光測定で得られた値と比較することにより、クロロフィル含有量との関係や蛍光パラメータの精度の検証を行った。具体的に、(1) 人工光励起と太陽光励起の定常クロロフィル蛍光を測定し、686nm と 760nm の酸素吸収帯 O_2B と O_2A 付近で蛍光収率を求め、クロロフィル含有量との相関を明らかにした。更に、太陽光励起の定常クロロフィル蛍光率比と人工光励起の定常クロロフィル蛍光率比の相関を求め、FLD 法による定常クロロフィル蛍光の推定の有効性を確かめた。(2) 太陽光励起下でFLD法を用い、 O_2A 付近でクロロフィル蛍光パラメータ (Φ_{PSII} 、NPQ と ETR) を推定し、従来法である PAM 法と比較し検討した。その結果、PAM 法と FLD 法による化学系 II の量子収率 (Φ_{PSII})、非光化学消光 (NPQ)、電子伝達率 (ETR) の推定値は高い相関を示し、新しい開発された方法による Φ_{PSII} 、NPQ と ETR の推定が可能であることが検証された。

しかし、(1)クロロフィル含有量の推定では、クロロフィル含有量が 400 mg m^{-2} より大きい時、 $\Phi_{F_686.7} / \Phi_{F_760.4}$ のばらつきが大きくなり、精度が落ちた。これは、色素の再吸収により蛍光強度が放射輝度基準に比べ非常に弱くなったか、または放射輝度基準の選択が不適切だったと考えられる。(2) 蛍光パラメータの推定では、光強度が高い時の蛍光パラメータのばらつきは、放射輝度基準の選択に若干左右される。また、PAM 装置の誤差や飽和パルスの影響も誤差の一つの原因として考えられる。

今後の実験で、FLD 法によるクロロフィル蛍光の測定の際、葉と放射輝度基準の分光特性を同時に測定し、放射輝度基準による影響を少なくする必要がある。また、葉と反射板の設定条件を一致し、測定過程で起きる誤差を無くすべきである。また、分光計の精度を上げることも期待される。

近年、人工励起光下でのクロロフィル蛍光画像計測が二次元の葉レベルから三次元の植物個体まで報告されている。クロロフィル蛍光画像計測は植物個体全体の蛍光パラメータを立体的に反映し、成長やストレスなどの生体情報を三次元で得ることから重要視されている。しかし、この実験は実験室内で限られ、太陽光の自然光下での研究はまだなされていない。FLD 法を用いクロロフィル蛍光画像計測を行うのが理論的に可能であり、今後の課題の一つである。

最近、衛星リモートセンシングによるクロロフィル蛍光計測が行われ、群落レベルでの光合成速度や炭素固定などを推定する研究が多く報告されている。しかし、地上面での測定の検証により、その精度を確かめることが課題として残されている。

謝辞

本研究を進めるにあたり、大政謙次先生(生物環境情報工学研究室教授)には、指導教官及び本論文の主査として多大なご指導を頂いた。最初に深い感謝の意を表す。先生には、研究生の時勉強の指導から博士課程における研究計画の策定、実験の遂行、論文の作成といった一連の過程全てにおいて、的確なご指導とご助言を頂いた。学生研究生活だけでなく、日常生活面でも親切丁寧なご相談を頂いた。改めて、これまでのご指導に深甚の謝意を表す。

また、本学位論文の審査員を担当して頂いた副査の先生方には、心より感謝申し上げます。大下誠一先生(生物プロセス工学研究室教授)、安永円理子先生(生体調和農学機構準教授)、沖一雄先生(生産技術研究所準教授)には適切なご指導を頂いた。

本研究を進めるにあたり、細井文樹先生(生物環境情報工学研究室準教授)は本研究の副査でもあり、研究生生活や勉強上数多くご指導を頂いた。清水庸先生(生物環境情報工学研究室助教)には、ゼミや日常研究生生活、論文作成やデータ解析に的確なご指導を頂いた。

投稿論文の作成上、Parinaz Rahimzadeh-Bajgiran さんに英語や書き方などに大変ご指導とご協力を頂いた。本研究の一部の実験に银杏悠作さんのご協力を頂いた。生物環境情報工学研究室の技術補佐員の林正雄さんに、植物栽培方法や管理、実験用測定器械の操作方法などをたくさん教えて頂いた。

また、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。内藤裕貴さんには、研究生生活から日常生活までいろいろ相談頂いた。

研究生生活において、有形無形の支えを頂いた家族を初め、多くの方々に、ご協力ご教示を頂き、全ての方々のお名前を挙げてお礼を申し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

Agati G, Mazzinghi P, Fusi F, Ambrosini I. 1995. The F685/F730 chlorophyll fluorescence ratio as a tool in plant physiology: response to physiological and environmental factors. *Journal of Plant Physiology* 145, 228–238.

Baker NR. 2008. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*. 59, 89–113.

Baker NR, Oxborough K. 2004. Chlorophyll fluorescence as probe of photosynthetic productivity. In: Papageorgiou GC and Govindjee, eds. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol. 19. Dordrecht; Springer, 65-82.

Barber BJ, Malkin S, Telfer A. 1989. The origin of chlorophyll fluorescence in vivo and its quenching by the photosystem II reaction centre. *Phil. Trans. R. Lond. B.* 323, 227-239.

Bilger W and Björkman O. 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbency changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25, 173–185.

Bilger W, Björkman O. 1991. Temperature dependence of violaxanthin de-epoxidation and non-photochemical fluorescence quenching in intact leaves of *Gossypium hirsutum* L. and *Malva parviflora* L. *Planta*. 184, 226–234.

Buschmann C, Nagel E, Szabo K, Kocsanyi L. 1994. Spectrometer for fast measurements of in vivo reflection, absorption and fluorescence in the visible and near infrared. *Remote Sensing of Environment*. 48, 18–24.

Buschmann C. 2007. Variability and application of chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynth Research*. 92, 261–271.

Campbell D, Hurry V, Clarke AK, Gustafsson P, Öquist G. 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62, 667–683.

Cambell PKE, Middleton EM, Corp LA, Kim MS. 2008. Contribution of chlorophyll fluorescence to the apparent vegetation reflectance. *Science of the Total Environment*. 404, 433–439.

Corp LA, Middleton EM, McMurtrey JE, Campbell PKE, Butcher LM. 2006. Fluorescence sensing techniques for vegetation Assessment. *Applied Optics*. 45, 1023–1033.

Damm A, Guanter L, Verhoef W, Schläpfer D, Garbari S, Schaepman ME. 2015. Impact of varying irradiance on vegetation indices and chlorophyll fluorescence derived from spectroscopy data. *Remote Sensing of Environment*. 156, 202–215.

Daumard F, Goulas Y, Champagne S, Fournier A, Ounis A, Oliosio A, Moya I. 2012. Continuous monitoring of canopy level sun-induced chlorophyll fluorescence during the growth of a sorghum field. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* 50, 4292–4300.

Franck F, Juneau P, Popovich R. 2002. Resolution of the photosystem I and photosystem II contributions to chlorophyll fluorescence of intact laves at room temperature. *Biochim Biophys Acta*. 1556, 239–246.

Frankenberg C, Fisher JB, Worden J, Badgley G, Saatchi SS, Lee J-E, Toon GC, Butz A, Jung M, Kuze A, Yokota T. 2011. New global observations of the terrestrial carbon cycle from GOSAT: patterns of plant fluorescence with gross primary productivity. *Geophysical Research Letters* 38, L17706.

Gamon JA, Field CB, Bilger W, Bjorkman O, Fredeen AL, Penuelas J. 1990. Remote-sensing of the xanthophyll cycle and chlorophyll fluorescence in sunflower leaves and canopies. *Oecologia* 85,1-7.

Genty B, Briantais JM and Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* 990, 87-92.

Gillbro T. Cogdell RJ. 1989. Carotenoid fluorescence. *Chemical physics letters.* 158, 312-316.

Gitelson AA, Merzylak MN. 1997. Remote estimation of chlorophyll concentration in higher plant leaves. *Int.J. Remote Sens.* 18, 2691-2697.

Gitelson AA, Buschmann C, Lichtenthaler HK. 1998. Leaf chlorophyll fluorescence corrected for re-absorption by means of absorption and reflectance measurements. *Journal of Plant Physiology* 152, 283-296.

Gitelson AA, Gritz Y, Merzlyak MN. 2003. Relationships between leaf chlorophyll content

and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *Journal of Plant Physiology* 160, 271–282.

Gorbe E, Calatayud A. 2012. Applications of chlorophyll fluorescence imaging technique in horticultural research: a review. *Sci Hortic.* 138, 24–35.

Govindjee. 1995. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 131–160.

Guanter L, Zhang Y, Jung M et al. 2014. Global and time-resolved monitoring of crop photosynthesis with chlorophyll fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 111, E1327–E1333.

Hak R, Lichtenthaler HK, Rinderle U. 1990. Decrease of the chlorophyll fluorescence ratio F690/F730 during greening and development of leaves. *Radiat. Environ. Biophys.* 29, 329–336.

Joiner J, Yoshida Y, Vasilkov A P, Yoshida Y, Corp LA, Middleton EM. 2011. First observations of global and seasonal terrestrial chlorophyll fluorescence from space. *Biogeosciences* 8, 637–651.

Jones HG, Vaughan RA. 2010. Remote sensing of vegetation: principles, techniques, and applications. Oxford.

Kalaji HM, Goltsev V, Bosa K, Allakhverdiev SI, Strasser RJ. 2012. Experimental in vivo measurements of light emission in plants: a perspective dedicated to David Walker. *Photosynthesis Research* 114, 69–96.

Kalaji HM, Schansker G, Ladle RJ et al. 2014. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynth Res.* 122, 121–158.

Kim MS, McMurtrey JE, Mulchi CL, Daughtry CST, Chappelle EW, Chen YR. 2001. Steady-state multispectral fluorescence imaging system for plant leaves. *Applied Optics* 40, 157–166.

Kolber ZS, Prasil O and Falkowski PG. 1998. Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols. *Biochimica et Biophysica Acta* 1367, 88–106.

Kolber ZS, Klimov D, Ananyev G, Rascher U, Berry J, Osmond B. 2005. Measuring photosynthetic parameters at a distance: laser induced fluorescence transient (LIFT) method for remote measurements of photosynthesis in terrestrial vegetation. *Photosynthesis Research.* 84, 121-129.

Konishi A, Eguchi A, Hosoi F and Omasa K. 2009. 3D monitoring spatio-temporal effects of herbicide on a whole plant using combined range and chlorophyll *a* fluorescence imaging. *Functional Plant Biology* 36, 874–879.

Krause GH, Weiss E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42, 313-349.

Lang M, Stober F, Lichenthaler HK. 1991. Fluorescence emission spectra of plant leaves and plant constituents. *Radiat Environ Biophys.* 30, 333-347.

Lichtenthaler HK, Buschmann C, Rinderle U, Schmuck G. 1986. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiation and Environmental Biophysics* 25, 297–308.

Lichtenthaler HK, Rinderle U. 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* 19, S29–S85.

Lichtenthaler HK, Stober F, Lang M. 1992. The nature of the different laser-induced fluorescence signatures of plants. *EARSeL Advances in Remote Sensing* 1, 20–32.

Liu LY, Zhang YJ, Wang JH, Zhao CJ. 2005. Detecting solar-induced chlorophyll fluorescence from field radiance spectra based on the Fraunhofer Line principle. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* 43, 827–832.

Liu LY, Cheng ZH. 2010. Detection of vegetation light-use efficiency based on solar-induced chlorophyll fluorescence separated from canopy radiance spectrum. *IEEE J-STARS* 3, 306–312.

Logan BA, Adams WW, Demmig-Adams B. 2007. Avoiding common pitfalls of chlorophyll fluorescence analysis under field conditions. *Funct Plant Biol.* 34, 853–859.

Malenovský Z, Mishra KB, Zemek F, Rascher U, Nedbal L. 2009. Scientific and technical challenges in remote sensing of plant canopy reflectance and fluorescence. *Journal of Experimental Botany* 60, 2987–3004.

Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot.* 51,

659–668.

Meroni M, Colombo, R. 2006. Leaf level detection of solar induced chlorophyll fluorescence by means of a subnanometer resolution spectroradiometer. *Remote Sensing of Environment* 103, 438–448.

Meroni M, Picchi V, Rossini M, Cogliati S, Panigada C, Nali C, Lorenzini G, Colombo R. 2008a. Leaf level early assessment of ozone injuries by passive fluorescence and PRI. *International Journal of Remote Sensing* 29, 5409–5422.

Meroni M, Rossini M, Picchi V, Panigada C, Cogliati S, Nali C, Colombo R. 2008b. Assessing steady-state fluorescence and PRI from hyperspectral proximal sensing as early indicators of plant stress: The case of ozone exposure. *Sensors* 8, 1740–1754.

Meroni M, Rossini M, Guanter L, Alonso L, Rascher U, Colombo R, and Moreno J. 2009. Remote sensing of solar-induced chlorophyll fluorescence: review of methods and applications. *Remote Sensing of Environment* 113, 2037–2051.

Moya I, Guyot G, Goulas Y. 1992. Remotely sensed blue and red fluorescence emission for monitoring vegetation. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing* 47, 205–231.

Moya I, Camenenb L, Evain S, Goulas Y, Cerovic ZG, Latouche G, Flexas J, Ounis A. 2004. A new instrument for passive remote sensing: 1. Measurements of sunlight-induced chlorophyll fluorescence. *Remote Sensing of Environment* 91, 186–197.

Murchie EH, Lawson T. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* 64, 3983–3998.

Nieva FJJ, Castellanos EM, Figueroa ME, Gil F. 1999. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of C3 and C4 saltmarsh species. *Photosynthetica*. 36, 397-406.

Omasa K, and Aiga I. 1987. Environmental measurements: image instrumentation for evaluating pollution effects on plants. In *Systems and Control Encyclopedia*. Edited by Singh, M.G. pp. 1516–1522. Pergamon, Oxford.

Omasa, K. 1998. Image instrumentation of chlorophyll a fluorescence. *SPIE* 3382, 91-99.

Omasa K, Hosoi F, Konishi A. 2007. 3D lidar imaging for detecting and understanding plant responses and canopy structure. *Journal of Experimental Botany* 58, 881–898.

Omasa K, Konishi A, Tamura H, Hosoi F. 2009. 3D Confocal laser scanning microscopy for the analysis of chlorophyll fluorescence parameters of chloroplasts in intact leaf tissues. *Plant and Cell Physiology* 50, 90–105.

Omasa K, Takayama K. 2003. 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.

Omasa K, Shimazaki K, Aiga I, Larcher W, Onoe M. 1987. Image analysis of chlorophyll fluorescence transients for diagnosing the photosynthetic system of attached leaves. *Plant Physiology* 84, 748–752.

Papageorgiou GC, Govindjee eds. 2004. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration* Vol. 19, Dordrecht:Springer.

Pearcy RW, Enleringer J. 1984. Comparative ecophysiology of C3 and C4 plants. *Plant, Cell and Environment*. 7, 1-13.

Plascyk, J.A., 1975. The MK II Fraunhofer line discriminator (FLD-II) for airborne and orbital remote sensing of solar simulated luminescence. *Opt. Eng.* 14, 39-346.

Plascyk JA, Gabriel FC. 1975. The Fraunhofer Line Discriminator MK II- and airborne instrument for precise and standardized ecological luminescence measurements. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* 24, 306–313.

Pieruschka R, Klimov D, Berry JA, Osmond CB, Rascher U, Kolber ZS 2012. Remote chlorophyll fluorescence measurements with the laser-induced fluorescence transient approach. *Methods in Molecular Biology*. 918:51-59.

Pieruschka R, Albrecht H, Muller O, Berry JA, Klimov D, Kolber ZS, Malenovský Z, Rascher U. 2014. Daily and seasonal dynamics of remotely sensed photosynthetic efficiency in tree canopies. *Tree Physiology* 34, 674–685.

Porcar-Castell A, Tyystjarvi E, Atherton J, van der Tol C, Flexas J, Pfundel EE, Moreno J, Frankenberg C, Berry JA. 2014. Linking chlorophyll a fluorescence to photosynthesis for remote sensing applications: mechanisms and challenges. *Journal of Experimental Botany* 65,

4065–4095.

Pfu'ndel EE, Ghozlen NB, Meyer S, Cerovic ZG. 2007. Investigating UV screening in leaves by two different types of portable UV fluorimeters reveals in vivo screening by anthocyanins and carotenoids. *Photosynth Res.* 93, 205–221.

Rahimzadeh-Bajgiran P, Munehiro M, Omasa K. 2012. Relationships between the photochemical reflectance index (PRI) and chlorophyll fluorescence parameters and plant pigment indices at different leaf growth stages. *Photosynthesis Research* 113, 261–271.

Rascher U, Gioli B, Miglietta F. 2008. FLEX–fluorescence explorer: a remote sensing approach to quantify spatio–temporal variations of photosynthetic efficiency from space. *14th International Congress on Photosynthesis*, 1387–1390.

Rascher U, Agati G, Alonso L, et al. 2009. CEFLES2: the remote sensing component to quantify photosynthetic efficiency from the leaf to the region by measuring sun-induced fluorescence in the oxygen absorption bands. *Biogeosciences Discussions* 6, 2217–2266.

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

Schreiber U. 2004. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: Papageorgiou GC and Govindjee, eds. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol. 19. Dordrecht; Springer, 279–319.

Strasser RJ, Butler WL 1977. Fluorescence emission spectra of photosystem I, photosystem II and the light-harvesting chlorophyll a/b complex of higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 462, 307-313

Stirbet A, Govindjee R. 2012. Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynth Res.* 113, 15–61.

van der Tol C, Verhoef W, Rosema A. 2009. A model for chlorophyll fluorescence and photosynthesis at leaf scale. *Agricultural and Forest Meteorology* 149, 96-105.

van der Tol C, Berry JA, Campbell PKE, Rascher U. 2014. Models of fluorescence and photosynthesis for interpreting measurements of solar-induced chlorophyll fluorescence, *Journal of Geophysical Research: Biogeoscience* 119, 2312–2327.

Vermaas WFJ, Timlin JA, Jones HDT, Sinclair MB, Nieman LT, Hamad SW, Melgaard DK, Haaland DM. 2008. In vivo hyperspectral confocal fluorescence imaging to determine pigment localization and distribution in cyanobacterial cells. *PNAS* 105, 4050-4055.

Wintermans JFGM, De Mots A. 1965. Spectrophotometric characteristics of Chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta* 109, 448–453.

Yamori W and Hikosaka K. 2014. Temperature response of photosynthesis in C3, C4 and CAM Plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynth Res.* 119, 101-117.

Zarco-Tejada PJ, Pushnik JC, Dobrowski S, Ustin SL. 2003. Steady-state chlorophyll a fluorescence detection from canopy derivative reflectance and double-peak red-edge effects.

Remote Sensing of Environment 84, 283-294.

Zarco-Tejada PJ, González-Dugo V, Berni JAJ. 2012. Fluorescence, temperature and narrow-band indices acquired from a UAV platform for water stress detection using a micro-hyperspectral imager and a thermal camera. *Remote Sensing of Environment* 117, 322-337.

佐々木治人 2009 クロロフィル蛍光を用いた光化学系の解析 日本作物学会記事 78 (2) : 284-288.

佐藤公行 2002 光合成 朝倉書店

塩井祐三 2012 植物生理学 Ohmsha

園池公毅 オンライン教科書 <http://www.photosynthesis.jp/>

テイツ L, ザイガー E. 2002 植物生理学 培風館

三室守 2011 クロロフィル 裳華房