

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780143

研究課題名（和文）微弱発光計測技術を応用した遅延発光にもとづく樹木の活力診断手法の開発

研究課題名（英文）Development of tree vigor diagnosis based on delayed fluorescence by applying technology of very-weak light measurement

研究代表者

今西 純一（IMANISHI JUNICHI）

京都大学・地球環境学堂・助教

研究者番号：80378851

研究成果の概要（和文）：樹木の活力診断は、健全な樹木の育成や、倒木防止の安全管理に欠かせない。本研究は、最新の微弱発光計測技術を応用して、葉の遅延発光を測定し、実用的で客観的な樹木の活力診断手法を開発することを目的とした。本研究の結果、樹木に渇水ストレスが負荷されると、測定開始から数秒までの遅延発光量が増加し、この発光量の増加を指標にして樹木の活力を診断できる可能性が新たに明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Tree vigor diagnosis is essential for growing healthy trees as well as safety management of preventing trees from falling. This research aimed at developing practical and objective tree vigor diagnosis based on delayed fluorescence measurement. As a result, it was newly found that amount of delayed fluorescence from initiation of measurement to several seconds increase when a tree is exposed to drought stress and that this increase of delayed fluorescence may be an effective indicator of tree vigor diagnosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：遅延蛍光、光合成、渇水ストレス、造園学、緑化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 活力診断手法の状況

街路樹や公園樹、庭園樹の管理において、樹木の活力を診断することは、樹木を健全に育成してその価値を高めたり、倒木を未然に防ぐ安全管理において欠かせない。しかし、植栽現場においては、活力度は樹木の外観等により経験的に判定されることが多い。また、調査研究においても科学技術庁資源調査会の「4ランク評価法」やその変法を用いることが多い。いずれも樹勢や樹形などを目視により判断するため、調査者の主観が入りやす

く個人差が生じやすいという問題がある。また、行政にとっても主観的判断基準しかない現状では、貴重な樹木や並木の保全の予算化を積極的に進めにくいという声がある。

これまで、森本ら（1991）はケヤキの樹液流速、光合成・蒸散速度、樹冠温度画像を調べ、活力度診断の可能性を検討している。また、活力度を知る手段として、横田ら（2005）は蒸散速度と関係のある葉温を、宮ヶ原ら（1998）はクロロフィル蛍光を提案している。Imanishiら（2004）は、樹冠の葉の反射微分スペクトルを測定して、コナラ属2種

の渇水ストレスを推定した。里村ら (2005) は、ヤマザクラの活力度評価指標開発の第1段階として、生育良好木と不良木の間で様々な指標について測定を行い、葉緑素計値、葉面積、光飽和時の純光合成速度などが、活力度の有効な指標となる可能性を示している。このように、さまざまな指標が提案されているが、先行研究において共通しているのは、葉の光合成に関わる特性は、樹木の活力診断の有効な指標となり得るという視点である。

(2) 遅延発光とは

遅延発光 (遅延蛍光とも呼ばれる) は、緑色植物や藻類、光合成細菌に光を照射した後、数十ナノ秒～分、あるいはそれ以上遅れて発せられる赤～近赤外域の光である。光照射後、5 ナノ秒よりも短い時間に発せられる光は、いわゆるクロロフィル蛍光として別に扱われる。遅延発光は、クロロフィル蛍光と異なって、光合成の異なるプロセスからの逆反応の結果、主に光化学系 II より微弱な発光が生じる現象である。そのため、遅延発光には、励起光下で観察されるクロロフィル蛍光とは異なった側面の、光合成に関わる情報が含まれているという特長がある。その発光の減衰曲線は、光合成のプロセスを反映するいくつかの成分からなり、それらを評価することにより光合成の変化を高感度に評価することができると言われている。

しかし、遅延発光の強度は、クロロフィル蛍光よりも少なくとも2桁ほど低いため、測定が難しく、クロロフィル蛍光に比べて研究の蓄積が少ない。また、光合成の基礎研究での利用は比較的多いが、農林分野において植物の活力診断に応用された例は極めて少ない。

(3) 遅延発光による樹木の活力診断の可能性

しかし、最近になって、微弱な光を計測する技術が進化したため、この技術を利用した応用的な研究が可能になってきた。本研究も、最新の微弱発光計測の技術によって、葉の遅延発光を測定し、樹木の活力診断を行おうとするものである。

遅延発光の利点である、光合成を介した環境への高い感受性は、ストレス下にある植物の反応を調べるのに有用である (Goltsev, 2009)。遅延発光は、例えば、高塩濃度 (Zhang and Xing, 2008) や除草剤 (Lambrev ら, 2001) 等が、光合成に与える影響を分析することに使われており、樹木の活力診断に応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

最新の微弱発光計測技術を応用して遅延発光を測定し、実用的な樹木の活力診断手法

を開発することを研究の目的とした。具体的には、クロロフィル濃度による遅延発光量のばらつきの軽減の検討と、遅延発光量にもとづく樹木活力指標の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 試験1：個葉レベルの渇水ストレス負荷試験 (2011年)

植物の生育不良の原因としてもっとも多い、渇水ストレスを負荷する試験を、個葉を対象に行った。

2011年9月7日、8日、19日、23日に、京都大学北部構内において健全に生育するヤマザクラ (*Cerasus jamasakura* var. *jamasakura*) 成木1個体から葉 (n=30) を採取し、直ちに実験室に輸送して、次のプロトコールに従って測定を行った。まず、葉をプレッシャーチャンバーに入れ、高圧窒素ガスにより自然状態の水ポテンシャル (木部圧ポテンシャル) を測定した。次に、葉を微弱発光測定装置 (浜松ホトニクス社製、TYPE-6100A 試作品) に入れ、300秒間の暗処理を施し、10秒間励起光 (680 nm, 10 μ mol/m²/s (うち400~700nmの光合成有効放射量は90.7%)) を照射した後、暗黒条件下で400秒間微弱発光を測定した。なお、微弱発光測定の条件は、2010年度の検討結果に基づいて設定した。また、微弱発光の測定は、25℃の定温条件で行った。微弱発光の測定後、分光反射率の測定等を順次行った。続いて、同サンプルをプレッシャーチャンバーで-3.0 MPaまで脱水して、上記のプロトコールに従って測定を繰り返した。葉のクロロフィル濃度は、Imanishi ら (2010) に基づいて分光反射率から推定した。

(2) 試験2：野外における成木測定試験

夏期の渇水ストレスが比較的大きくかかっていると考えられる時期に、野外に生育する成木を対象に測定を行った。

2011年8月6日~9日に、奈良県吉野山に生育するヤマザクラの成木102個体から樹頂部の頂枝を採取し、次のプロトコールに従って測定を行った。まず、頂枝に着いた葉を観察し、外見上もっとも代表的であると思われる葉を2枚を選定した。その後、直ちに2台の微弱発光測定装置 (浜松ホトニクス社製、TYPE-6100A 試作品) を用いて、微弱発光の測定を行った。微弱発光の測定は、測定時間を400秒から300秒とした点と、温度条件を28℃の定温とした点を除いて、試験1と同一条件とした。微弱発光測定の後、分光反射率の測定等を順次行った。葉のクロロフィル濃度は、Imanishi ら (2010) に基づいて分光反射率から推定した。また、微弱発光を測定した葉が着いていた枝の、芽鱗痕や枝への葉の着き方から、枝の当年伸長成長量を判断し、

測定した。枝の当年伸長成長量に基づいて、「生育不良群」(枝の当年伸長成長量 0~20 パーセントイルのサンプル)と、「生育良好群」(80~100 パーセントイル)に分けて解析を行った。

(3) 試験 3: 個葉レベルの渇水ストレス負荷試験 (2012 年)

試験 1 と同様に、生育良好な個体の葉を対象に、渇水ストレスを負荷する試験を行った。ただし本試験では、科の異なる複数の樹種を対象とし、各樹種の複数の個体から葉サンプルを採取した。

2012 年 6~8 月に、1 日 1 回十分な灌水を行っている個体の葉を採取し、湿潤暗黒条件下で直ちに実験室に輸送し、次のプロトコールに従って測定を行った。まず、葉をプレッシャーチャンバーに入れ、高圧窒素ガスにより自然状態の水ポテンシャル(木部圧ポテンシャル)を測定した。次に、葉を微弱発光測定装置(浜松ホトニクス社製、TYPE-6100A 試作品)に入れ、300 秒間の暗処理を施し、10 秒間励起光(680 nm、 $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)を照射した後、暗黒条件下で 400 秒間微弱発光を測定した。微弱発光の測定は、26°C の定温条件下で行った。その後、クロロフィル蛍光(Fv/Fm)、葉緑素計値(SPAD)等の測定を順次行った。続いて、同サンプルをプレッシャーチャンバーで-2.0 MPa まで脱水して、上記のプロトコールに従い測定を繰り返した。さらに、-3.0 MPa まで脱水して測定を繰り返した。対象とした樹木は、クスノキ(*Cinnamomum camphora* (L.) Presl. (クスノキ科))、ソメイヨシノ(*Cerasus × yedoensis* 'Somei-Yoshino' (バラ科))、ヤマザクラ(バラ科)、ヤマボウシ(*Benthamedia japonica* (Sieb. et Zucc.) Hara (ミズキ科))、ヤブツバキ(*Camellia japonica* L. (ツバキ科))である。ヤブツバキは野外植栽個体、クスノキ、ソメイヨシノ、ヤマザクラ、ヤマボウシは 2~3 年生の鉢植え個体から、各樹種とも、10 個体から 3 枚ずつの葉を採取し、1 樹種あたり 30 枚の葉サンプルデータを取得した。

(4) 試験 4: 個体レベルの渇水ストレス負荷試験

鉢植え苗を用い、それへの灌水を停止することによって、個体レベルで渇水ストレスを負荷する試験を行った。

2 年生のヤマザクラの鉢植え苗を 28 個体用意し、1 日 1 回灌水を続ける対照群 14 個体と、灌水を停止する処理群 14 個体を設けた。処理群については、2012 年 7 月 19 日から灌水を停止した(灌水停止 1 日目)。灌水停止から 0、2、5、9 日目に以下の測定を行った。対照群、処理群の各個体から葉を採取し、葉をプレッシャーチャンバーに入れ、高圧窒素

ガスにより自然状態の水ポテンシャル(木部圧ポテンシャル)を測定した。微弱発光測定装置(浜松ホトニクス社製、TYPE-6100A 試作品)に入れ、300 秒間の暗処理を施し、10 秒間励起光(680 nm、 $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)を照射した後、暗黒条件下で 400 秒間微弱発光を測定した。その後、クロロフィル蛍光(Fv/Fm)、葉緑素計値(SPAD)等の測定を順次行った。対照群のうち 1 個体は、測定時に葉にコナジラミ類の害が観察されたため、解析から除外したため、対照群 13 個体、処理群 14 個体の 27 個体を解析対象とした。

4. 研究成果

(1) クロロフィル濃度による補正

① 個葉レベルの渇水ストレス負荷試験(試験 1) データの解析結果

健全な生育状態を示すヤマザクラの葉に、水ポテンシャル-3.0 MPa の渇水ストレスを負荷することによって、微弱発光測定開始(励起光の照射終了直後)から数秒までの遅延発光量が増加し、数十秒以降の遅延発光量が低下する傾向が見られた。以降、渇水ストレス負荷によって増加が見られる時間領域の発光量を第一の遅延発光量と呼び、低下が見られる時間領域の発光量を第二の遅延発光量と呼ぶ。

試験 1 のヤマザクラの微弱発光測定データにおいて、0.5~1.5 秒の積算遅延発光量(第一の遅延発光量に対応)と、20~100 秒の積算遅延発光量(第二の遅延発光量に対応)を、散布図にして示した結果、対照群とストレス群の 2 群が明瞭に区分されることが明らかとなった。

また、0.5~1.5 秒の積算遅延発光量と 20~100 秒の積算遅延発光量のそれぞれを、分光反射率から推定された葉のクロロフィル濃度で除算すると、対照群およびストレス群のデータのばらつきが軽減されることが明らかとなった。これは、遅延発光が主に生じる光化学系 II の、反応中心やアンテナのクロロフィルの濃度の影響を、クロロフィル濃度で除算することによって、ある程度補正することができたためであると考えられる。

② 野外における成木測定試験データ(試験 2)の解析結果

奈良県吉野山に生育するヤマザクラ成木の葉の微弱発光測定データにおいて、0.5~1.5 秒の積算遅延発光量(第一の遅延発光量に対応)と、20~100 秒の積算遅延発光量(第二の遅延発光量に対応)を、散布図にして示した結果、枝の当年伸長成長量(春から測定日までに成長した枝の伸長量)から判断される生育良好群と生育不良群の 2 群のデータは、部分的に重なり合いながらも、分布が異なる傾向が見られた。

また、0.5~1.5 秒の積算遅延発光量と 20

～100 秒の積算遅延発光量のそれぞれを、分光反射率から推定された葉のクロロフィル濃度で除算すると、生育良好群および生育不良群のデータのばらつきが抑えられることが明らかとなった。しかし、試験 1 の個葉レベルの結果に比べて、試験 2 の野外生育個体の結果では、2 群のデータの分布の差異はそれほど明瞭でなかった。樹木活力指標として本試験で検討した枝の当年伸長成長量は、試験 1 で検討した葉の水ポテンシャルとは時間スケールが異なるため、試験 1 と本試験の結果がやや異なると考えられる。

(2) 樹木活力指標としての遅延発光量

①個葉レベルの渇水ストレス負荷試験 (試験 3) データの解析結果

いずれの樹種においても、葉に渇水ストレスを与えたストレス群は、渇水ストレスを与えていない対照群に対して、第一の遅延発光量が増加した。各樹種の各測定時刻における遅延発光量と水ポテンシャルの相関係数 (ピアソンの積率相関係数) を検討した結果、いずれの樹種においても、微弱発光測定開始 (励起光の照射終了直後) から概ね 0.1 秒後～2 秒後の相関係数の絶対値が大きくなり、この時間領域で遅延発光量と水ポテンシャルとの相関が強いことが明らかとなった。各樹種において、この相関係数の絶対値が極大となる時刻は、クスノキでは 0.4 秒、ソメイヨシノでは 1.4 秒、ヤマザクラでは 1.0 秒、ヤブツバキでは 0.2 秒、ヤマボウシでは 0.5 秒であった。本試験における 5 樹種の平均は約 0.7 秒であった。

クロロフィル蛍光 (Fv/Fm) あるいは葉緑素計値 (SPAD) と、水ポテンシャルとの相関係数は、Fv/Fm で 0.154～0.686、SPAD で -0.282～-0.099 であった。一方、微弱発光測定開始 (励起光の照射終了直後) から 0.7 秒後の遅延発光量と水ポテンシャルとの相関係数は、-0.806～-0.640 であり、同一樹種を対象に比較すると、遅延発光量の相関係数の絶対値は、Fv/Fm や SPAD よりも常に大きく、水ポテンシャルとの相関が比較的強いことが明らかとなった。

②個体レベルの渇水ストレス負荷試験 (試験 4) の解析結果

個体レベルの本試験でも、個葉レベルの試験 1 や試験 3 と同様に、渇水ストレスを与えたストレス群は、渇水ストレスを与えていない対照群に対して、第一の遅延発光量が増加した。各測定時刻における遅延発光量と水ポテンシャルの相関係数を検討した結果、相関係数の絶対値が極大となる時刻は、微弱発光測定開始 (励起光の照射終了直後) から 0.3 秒後であった。水ポテンシャルとの相関係数の絶対値が極大となる時間領域についても、個葉レベルの試験 3 と同様の結果が得られた。

クロロフィル蛍光 (Fv/Fm) あるいは葉緑素計値 (SPAD) と、水ポテンシャルとの相関係数は、Fv/Fm で 0.555、SPAD で -0.079 であった。一方、微弱発光測定開始 (励起光の照射終了直後) から 0.3 秒後の遅延発光量と水ポテンシャルとの相関係数は、-0.613 であり、遅延発光量の相関係数の絶対値は、Fv/Fm や SPAD よりも大きく、個葉レベルの試験 3 と同様に、遅延発光量は水ポテンシャルとの相関が比較的強いことが明らかとなった。光合成の活性状態を反映する指標として一般的に知られる、クロロフィル蛍光の Fv/Fm よりも相関が強かったことは、遅延発光量が樹木の活力診断に有効であることを示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

① 今西純一、小林祐子、勝又政和、樹木のストレス状態に応じた遅延発光曲線の変化、2012.3.16、第 53 回日本植物生理学会年会、京都産業大学

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 活力診断に基づく植物の選抜法、及びこれに用いられる計測システム

発明者: 今西純一、勝又政和、小林祐子

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2013-105085

出願年月日: 平成 25 年 5 月 17 日

国内外の別: 国内

名称: 植物の生育状態を診断する方法及びこれに用いられる装置

発明者: 勝又政和、小林祐子、今西純一

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-52089

出願年月日: 平成 24 年 3 月 8 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今西 純一 (IMANISHI JUNICHI)

京都大学・地球環境学堂・助教

研究者番号: 80378851