

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：52501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340054

研究課題名(和文) 葉表皮の非破壊分光透過率計測に基づく植物の有害紫外線に対する影響評価

研究課題名(英文) Impact evaluation of UV-B radiation toward plants based on the nondestructive epidermal optical transmittance measurement of leaves.

研究代表者

福地 健一 (FUKUCHI, Ken'ichi)

木更津工業高等専門学校・基礎学系・教授

研究者番号：00218942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：葉表面を多波長(330-440nm)で励起し蛍光スペクトルと蛍光画像を同時計測する装置を開発し、葉表皮の分光透過率と蛍光分布の変化を非破壊で解析することに成功した。ラッカセイ葉に紫外線(UV-B)を照射すると、葉表面に光学的欠損が生じ紫外領域の透過率が指数関数的に増大することから、透過率のモニタリングがUV-B影響の早期検出と定量的評価に極めて有効であることを示した。また、30種の樹木を対象とし、季節毎にクロロフィル濃度、アントシアニン濃度、表皮透過率などを調査した結果、樹木葉表皮の透過特性は樹種および季節により異なり、表内色素および葉の光合成活性と密接に関連していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We developed a device to measure fluorescence spectra and images simultaneously excited by multiple wavelength (300 - 400 nm), and were successful in analyzing epidermal optical transmittance and fluorescence distribution in leaves nondestructively. Ultraviolet-B irradiation to a peanut leaf caused optical holes on the leaf surface so that the transmittance in ultraviolet region increased exponentially. It's shown that the monitor of the transmittance is extremely effective for the early detection and the quantitative evaluation of the UV-B impact to the plant leaves. Besides, seasonal variation of chlorophyll contents, anthocyanin contents and the epidermal transmittance were investigated in 30 kinds of trees. The results are that the epidermal transmittance characteristics of tree leaves differ according to both the species and the season, and are closely related to the photosynthesis activity and the pigments of leaves.

研究分野：光応用計測，環境影響評価

 キーワード：ラッカセイ葉 樹木葉 表皮の分光透過率 UV-Bストレス 蛍光スペクトル 蛍光画像 クロロフィル
 蛍光 葉内色素変化

1. 研究開始当初の背景

(1) フロンガス規制等により成層圏のオゾン全量は緩やかに回復しているにも関わらず、我が国では地表に到達する有害紫外線 (UV-B) の量が依然増加傾向にある。過度の UV-B は農作物や森林樹木に深刻な生育障害をもたらすため、その影響評価手法の確立が急務となっている。

(2) 我々は紫外レーザー励起によって植物葉から放出されるクロロフィル蛍光 (F685) とリポフラビン等からの蛍光 (F530) の強度比 (F685/F530) が、UV-B 照射に伴い減少することを突き止め、葉に変色等の可視被害が現れる前に UV-B 影響を定量評価することに成功した。しかし、F685/F530 の減少は葉の活性低下に起因しているため、検出段階において葉に少なからずのダメージが発生している。もし、葉の活性低下が起こる前に、その予兆を早期検出できれば、植物被害を最小限度に抑えることが可能となる。

(3) 異なる波長でラッカセイ葉を励起し F685/F530 を測定した結果、375 nm 励起の場合、正常葉では約 60 であったが、UV-B 照射により半減した。一方、325 nm 励起の場合、正常葉でも 3 程度でしかなく、UV-B 照射により、375 nm 励起の場合とは逆に増加することが分かった。この現象は、「波長が短い 325 nm の光は、表皮の紫外線吸収色素で吸収され柵状組織内までほとんど到達しないため、クロロフィル蛍光 (F685) が極端に小さいが、過度の UV-B 照射により色素が損傷を受けると、葉の内部まで侵入可能となり、F685 が増加する」と考えると説明がつく。つまり、表皮の透過率はストレス負荷によって変化し、それを蛍光強度比の測定から容易に推測できると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、植物葉表皮の紫外領域における分光透過率 (以下、透過率と言う) を蛍光スペクトル計測に基づき非破壊・非接触で瞬時に評価する手法を新たに確立し、近年増加傾向にある有害紫外線 (UV-B) の植物影響を、葉の活性低下が起こる前に検出することを目的とする。

(2) さらに、農作物・樹木葉表皮の透過率測定より UV-B 被害に対する感受性・耐性の評価を行いデータベース化する。

3. 研究の方法

(1) 測定装置および手法の開発

キセノンランプを光源とし、透過特性の異なるバンドパスフィルターを回転式ホルダーに取付け、それらと ND フィルターをコンピュータ制御することで、波長 300 nm から 440 nm の範囲の励起光を 20 nm 間隔で一定強度で試料に照射できる装置を開発する。植物

葉表面から放出される蛍光を、マルチチャンネル分光器でスペクトル解析すると同時に、バンドパスフィルターを組み込んだ高感度デジタルカメラで画像化し、葉面の蛍光分布を解析する。また、各励起波長に対するクロロフィル蛍光強度を比較することで、葉表皮の分光透過特性を見積もる。

(2) UV-B 照射によるラッカセイ葉表皮の透過特性変化

ラッカセイ葉に放射照度 1.0 Wm^{-2} の UV-B を照射し、蛍光スペクトル変化を測定することで、表皮の透過率変化を調べる。併行して、320 nm の励起により蛍光画像を撮影し、葉表面における蛍光分布の変化を調べる。

(3) 樹木葉表皮の透過特性の季節変化

木更津高専敷地内 (千葉県木更津市) に生育する 30 種の樹木を対象とし、春季 (4~5 月)、夏季 (8 月)、秋季 (10 月)、冬季 (1 月) に各葉を採取し、クロロフィル濃度の目安となる SPAD 値、アントシアニン濃度指標 ACI、光化学反応系 の最大量子収率 F_v/F_m を測定した後、表皮の蛍光スペクトルおよび分光透過特性を測定し、各量の季節変化および相関について調査する。

4. 研究成果

(1) 測定装置および手法の開発

測定装置

測定装置は、光源部、蛍光スペクトル計測部、蛍光画像計測部で構成した。光源部は、100 W のキセノン光源ユニット (LAX-103、朝日分光製)、合成石英製の光ファイバー (5 × 1000L、朝日分光製)、標準ロッドレンズ (RLQL80-1、朝日分光製) およびテレセントリック均一照射ユニット (TOU-1、朝日分光製) で構成した。半値幅約 10 nm、中心波長 300 nm、320 nm、340 nm、360 nm、380 nm、400 nm、420 nm、440 nm の 8 枚のバンドパスフィルター (MX シリーズ、朝日分光製) を LAX-103 に内蔵された回転式自動フィルターチェンジャーに取付けた。RS-232C でパーソナルコンピュータ (PC) と LAX-103 を接続して、回転式自動フィルターチェンジャーおよび連続可変 ND フィルターを Visual Basic 6.0 (Microsoft 製) 上で自作したソフトウェアによって制御し、一定放射照度の励起光を波長毎に一定時間間隔で試料に照射できるようにした。放射照度は、波長感度校正済のフォトダイオードモジュール (C10439-08、浜松ホトニクス製) を用いて測定した。蛍光スペクトル計測部は、マルチチャンネル分光測光システム (PMA-50、浜松ホトニクス)、電子冷却裏面入射型冷却 CCD、PMA コントロールユニット、PC で構成した。尚、励起光自身の侵入を防ぐため、限界透過波長が 440 nm のロングパスフィルター (LPF) (Y44、OMG 製) を蛍光誘導用光ファイバー入射部の前段に設置した。また、Y44 自身も紫外励起でわずかに発光するため、さら

にその前段に限界透過波長が 410 nm の LPF(L41、OMG 製)を設置し、Y44 に紫外成分が入射しないようにした。蛍光画像計測部は、一眼レフカメラ(EOS KISS X7、Canon 製)、マクロレンズ(EF-S60mm F2.8 マクロ USM、Canon 製)で構成した。一眼レフカメラは、マクロフォーカス用の四方向スライダレール(NEEWER 製)に取り付け、位置調整が行えるようにした。

表皮の透過特性評価

葉内のクロロフィルから放出される蛍光強度は、葉に照射した励起光の強度および表皮における透過率、クロロフィルの吸光・発光効率で決定される。クロロフィルの吸光・発光効率は、励起光の波長に依存する他、UV-B 照射による光合成活性低下の影響も受けると考えられる。これらの要因に基づく、葉表面および葉断面から放出されるクロロフィル蛍光の強度の違いについて、図 1 で説明する。

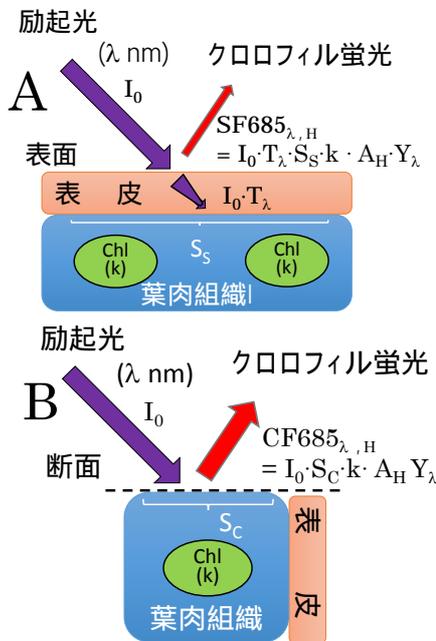


図 1 表皮透過率の測定原理

まず、図 1 の A に示すように、波長 λ 、放射照度 I_0 の励起光を、表面積 S_s の葉表面に照射した場合、励起光の表皮における透過率を T_λ とすると、葉肉組織中のクロロフィルに照射される励起光の強度は、 $I_0 \cdot T_\lambda \cdot S_s$ と表すことができる。クロロフィルの吸光および発光効率に係る要因のうち、積算照射量 H の UV-B 照射による光合成活性低下の影響を A_H 、励起光の波長依存性を Y_λ とすると、葉表面から放出される 685 nm のクロロフィル蛍光の強度 $SF685_{\lambda,H}$ は、次式で表すことができる。

$$SF685_{\lambda,H} = I_0 \cdot T_\lambda \cdot S_s \cdot k \cdot A_H \cdot Y_\lambda \cdots ()$$

ここで、 k は、クロロフィルの吸光・発光効率に関する比例定数である。一方、図 1 の B に示すように、葉断面においては、表皮による励起光の減衰(反射、吸収、散乱等)が無いため、葉の断面積を S_c とすると、放出される

クロロフィル蛍光の強度 $CF685_{\lambda,H}$ は、次式で表すことができる。

$$CF685_{\lambda,H} = I_0 \cdot S_c \cdot k \cdot A_H \cdot Y_\lambda \cdots ()$$

ここで、各波長で励起した際のクロロフィル蛍光強度を、440 nm で励起した時のクロロフィル蛍光強度で規格化し、波長毎の相対強度を求める。それらを葉表面では S_λ 、葉断面では C_λ と表すと、()、()式よりそれぞれ

$$S_\lambda = SF685_{\lambda,H} / SF685_{440,H} \\ = (T_\lambda \cdot Y_\lambda) / (T_{440} \cdot Y_{440}) \cdots ()$$

$$C_\lambda = CF685_{\lambda,H} / CF685_{440,H} \\ = Y_\lambda / Y_{440} \cdots ()$$

となり、 S_λ および C_λ は、 A_H に依存しない量となる。さらに、()を()で割り

$$S_\lambda / C_\lambda = T_\lambda / T_{440} = RT_\lambda \cdots ()$$

として、 Y_λ を消去すれば RT_λ として波長 440 nm の透過率を基準とした各波長の相対透過率を求めることが可能となる。

透過特性評価の検証

表皮が比較的厚く、削ぎやすい常緑低木のトベラを試料として、の方法で求めた相対透過率と、表皮をカミソリで薄く削いで分光光度計で測定した透過率を比較した。図 2 に示す通り、クロロフィル蛍光強度より求めた相対透過率 RT_λ と分光光度計により実測した表皮の透過率は、一致することが分かった。

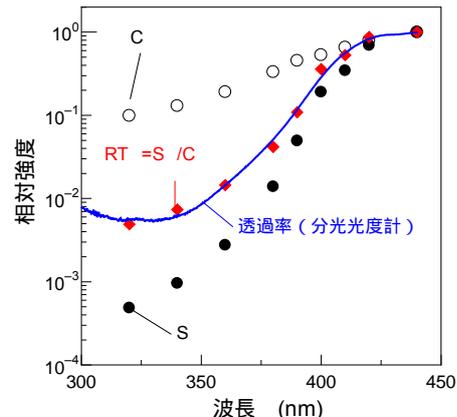


図 2 トベラ表皮の相対透過率

(2) UV-B 照射によるラッカセイ葉表皮の透過特性変化

蛍光スペクトル変化

図 3 に、UV-B 照射によるラッカセイ葉の蛍光スペクトル変化を示す。いずれも波長 450 nm 付近(F450)、530 nm 付近(F530)、685 nm 付近(F685)、740 nm 付近(F740)に、植物葉蛍光の特徴的なピークが観察された。F450 はフェルラ酸および nicotinamide adenine diphosphate(NADPH)、F530 は flavin adenine dinucleotide(FAD)を代表とするフラボノイド、F685 および F740 はクロロフィル a からの発光であると考えられている¹⁾。320 nm で

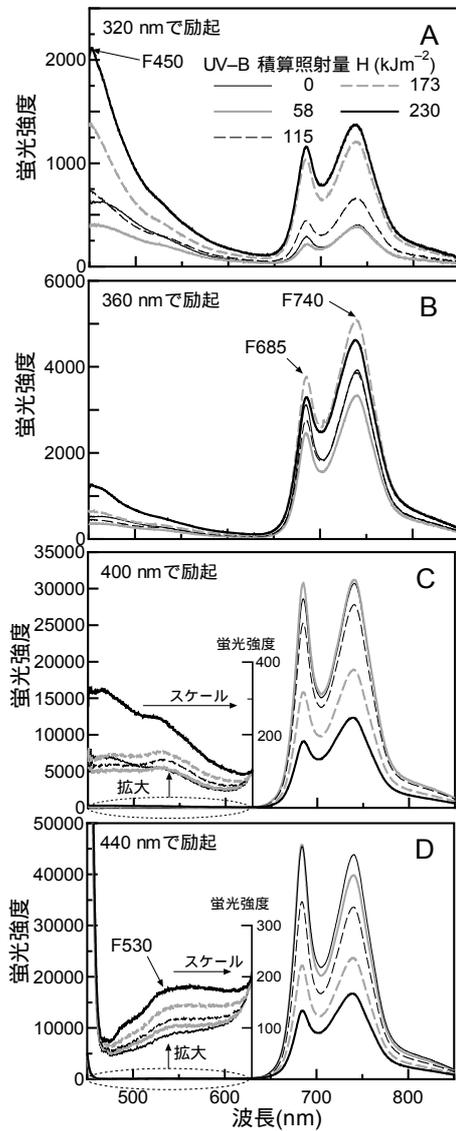


図3 UV-B照射によるラッカセイ葉の蛍光スペクトル変化

励起した場合の F450 および F530 の変化は、UV-B 積算照射量 (H) が 58 kJm^{-2} で未処理葉の約 0.7 倍まで減少したが、それ以降は増加に転じ、 $H=115 \text{ kJm}^{-2}$ で未処理葉とほぼ同程度まで戻り、 $H=230 \text{ kJm}^{-2}$ では未処理葉と比べ、F450 は約 3 倍、F530 は約 2 倍まで増加した。フェルラ酸は 320 nm 付近に励起スペクトルのピークがあり 350 nm ~ 550 nm にかけて発光することから、この青緑色蛍光の急激な増加は、フェルラ酸の増加に起因するものと考えられる。また、440 nm で励起した際の F530 の値は、他の波長で励起した場合と異なり H の増加に伴って単調に増加した。これは 440 nm 付近に励起スペクトルのピークがある FAD 等のフラボノイドの増加に起因すると考えられる。クロロフィル蛍光である F685 の変化については、320 nm の励起では、 $H=58 \text{ kJm}^{-2}$ で未処理葉の約 0.7 倍に減少したが、それ以降は増加に転じ、 $H=115 \text{ kJm}^{-2}$ で未処理葉の約 1.5 倍、 $H=230 \text{ kJm}^{-2}$ では約 4 倍となった。360 nm で励起した場合は、 $H=230 \text{ kJm}^{-2}$ において

も未処理葉とほぼ同じ値であり、他の励起波長と比較すると、大きな変化は見られなかった。400 nm および 440 nm で励起した場合は、 $H=58 \text{ kJm}^{-2}$ までは、ほぼ一定の値を保ち、それ以降は単調に減少し、 $H=172 \text{ kJm}^{-2}$ で未処理葉の約 0.5 倍、 $H=230 \text{ kJm}^{-2}$ では約 0.3 倍となった。アントシアンを含まない葉では、青緑色領域の励起光は、表皮でほとんど吸収されずクロロフィルまで到達することから、400 nm および 440 nm の励起で見られた F685 の減少は、主に UV-B 照射による葉の光合成活性低下が原因と考えられる。一方、320 nm および 360 nm で励起した場合、それに加え、次に述べる表皮における励起光の透過率変化も影響していると考えられる。

表皮の透過率変化

図 4 に、ラッカセイ葉表皮の相対透過率 RT_{λ} の変化を、UV-B 積算照射量 H をパラメータとして示す。UV-B 照射に伴って、 RT_{300} から RT_{340} が特に大きく変化した。 $H=29 \text{ kJm}^{-2}$ 、 $H=58 \text{ kJm}^{-2}$ では、約 20 % 減少したのち、 $H=101 \text{ kJm}^{-2}$ 以降は徐々に増加し、 $H=230 \text{ kJm}^{-2}$ では、未処理葉と比較して、 RT_{300} が 18.9 倍、 RT_{320} が 19.7 倍、 RT_{340} が 17.8 倍となった。UV-B 照射初期における相対透過率の僅かな減少については、図 3 の D で F530 が一定の割合で増加していることから、UV-B 照射によって FAD 等の紫外線吸収色素が表皮内で増加し、クロロフィルに到達する励起光が減少したと考えると説明できる。しかし、 $H=101 \text{ kJm}^{-2}$ 以降での相対透過率の増加は、紫外線吸収色素の増加とは矛盾する現象である。

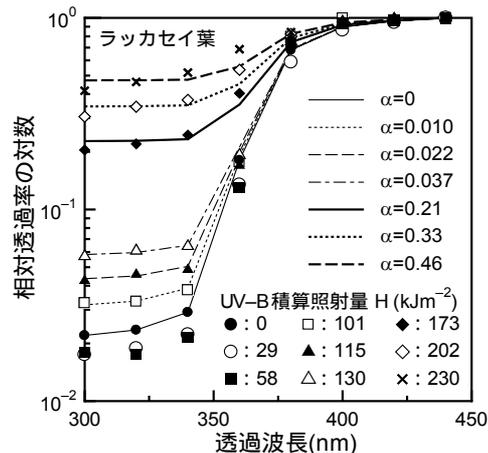
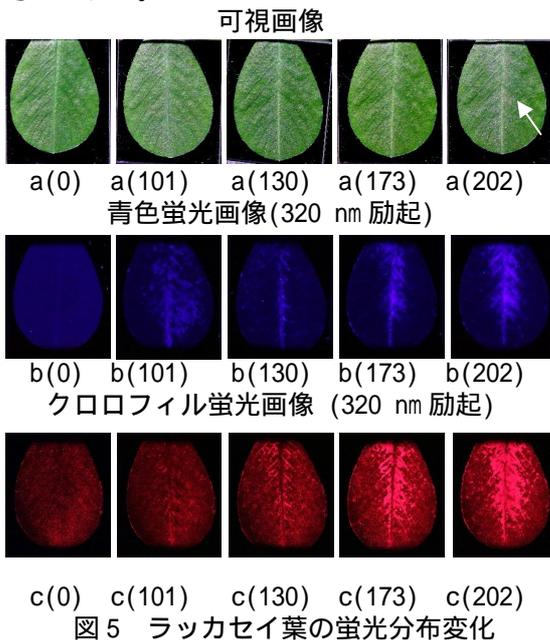


図4 UV-B照射によるラッカセイ葉表皮の透過率変化

蛍光分布変化

320 nm で励起した際の葉表面における青色蛍光分布およびクロロフィル蛍光分布の変化を図 5 に示す。図中括弧内の数値は UV-B 積算照射線量 (kJm^{-2}) を表す。葉の可視画像 (図上段) では、 $H=173 \text{ kJm}^{-2}$ までは変化は見られず、 $H=202 \text{ kJm}^{-2}$ 以上で、主葉脈付近 (図中の矢印で示した部位) に茶褐色の可視被害が認められた。青色蛍光画像 (図中段) では、可

視被害が発生した UV-B 積算照射量の半分にあたる、 $H=101 \text{ kJm}^{-2}$ において、主葉脈付近に周囲より輝度が大きい青斑点が出現した。青斑点の量は $H=130 \text{ kJm}^{-2}$ にかけてやや減少したが、 $H=173 \text{ kJm}^{-2}$ 以降は再び増加をはじめ、輝度も徐々に高くなった。この青斑点の出現は、「蛍光スペクトル変化」で述べた通り、フェルラ酸の増加によるものと考えられる。 $H=130 \text{ kJm}^{-2}$ 付近で見られた青斑点の一時的な減少は、UV-B 照射によって過剰に生成された活性酸素により、抗酸化作用のあるフェルラ酸が変質または消滅したためではないかと考えられる。



クロロフィル蛍光画像(図下段)で、 $H=101 \text{ kJm}^{-2}$ で青色蛍光画像において青斑点が観察された部位とほぼ同じ部位に、高輝度の紅斑点が出現し、さらなる UV-B 照射によって紅斑点が主葉脈から葉の周辺部にも広がった。また、紅斑点が現れた部位以外では、未処理葉と比較して輝度に大きな変化は見られなかった。この赤斑点の出現は、 $H=101 \text{ kJm}^{-2}$ 以降に観察された表皮の相対透過率の増加と密接に関連しているものと推測できる。つまり、表皮の一部が、UV-B 照射により物理的損傷を受け、その部分では励起光が減衰されず、葉の内部にまで侵入できるようになり、クロロフィル蛍光が増大したものと考えられる。

表皮の透過率変化に関するモデルの結果に基づき、UV-B 照射による物理的損傷により紫外線が減衰しない光学的な隙間(以下、隙間という)が表皮の一部で形成され、短波長域の相対透過率が増加するというモデルを考える。ここでは、単純に

- 1)隙間では全波長の透過率が 440 nm の透過率に等しくなる(相対透過率は全波長で 1 となる)
- 2)隙間以外の部位の相対透過率は未処理葉

と同じである
と仮定する。未処理葉における波長毎の相対透過率を RT_0 とし、隙間が全体に占める割合を α とすると、全体の相対透過率 RT は、

$$RT = \alpha \cdot RT_0 + (1 - \alpha) \cdot RT_0$$

と表すことができる。図4に示した相対透過率(RT)のうち、 $H=101 \text{ kJm}^{-2}$ 以降のデータに対して、()式を用いて近似値(RT_{approx})を求め、それらを折れ線で結び同図中に RT と重ねて示す。尚、 α の値は、実測値との相対誤差が最小となるように定めた。 340 nm 以下の領域では、 RT と RT_{approx} がよい一致を示しており、UV-B 照射に伴う短波長領域の相対透過率の増加は、本モデルによって説明可能であると考えられる。

(3) 樹木葉表皮の透過特性の季節変化 SPAD 値と ACI

SPAD 値について、落葉樹、常緑樹毎に平均を求め、季節変化を図6に示す。落葉樹は春から夏にかけて増加するが、秋には減少した。常緑樹は、春から秋にかけて増加、冬には若干減少するものの、夏季と同程度の値を保った。ACI の変化も SPAD 値と同様の傾向が見られた。尚、紅葉を除くと SPAD 値と ACI の対数には強い相関 ($R^2=0.85$) が見られた。これは、紅葉以外の葉にはアントシアニンがほとんど含まれず、ACI 計測時の 530 nm の透過率データにクロロフィルによる吸収が影響したものと考えられる。また、図7に示す通り、各落葉樹葉の SPAD 値と蛍光強度比 $F740/F685$ (400 nm 励起) の間に良い相関 ($R^2=0.72$) が見られた。

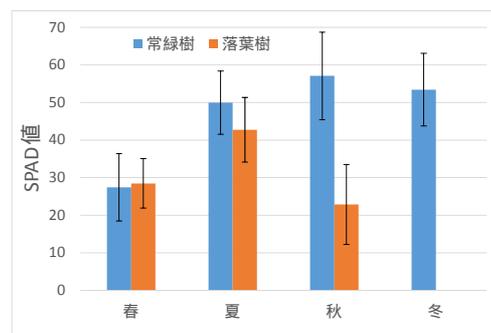


図6 樹木葉にける SPAD 値の季節変化

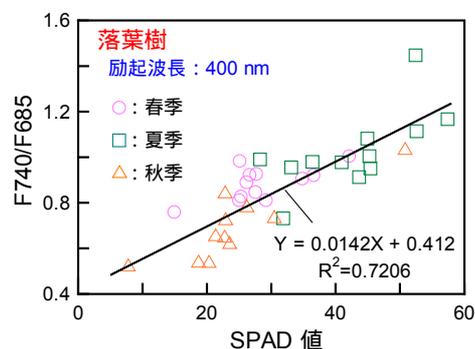


図7 落葉樹の SPAD 値と蛍光強度比 $F740/F685$ の関係

Fv/Fm

図8にFv/Fmの季節変化を示す。秋季は常緑樹葉の平均が0.82であったのに対し、落葉樹葉は0.61であった。また、冬季の常緑樹はSPAD値に変化が見られなかったにもかかわらず、Fv/Fmは平均0.59と低下した。また、図9に示す通り、秋から冬にかけて、Fv/FmとF685/F530との関係に相関($R^2=0.50$)が見られた。

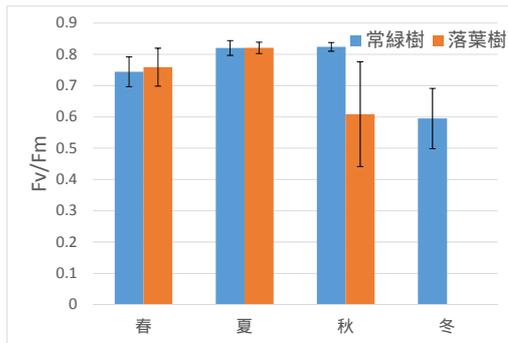


図8 樹木葉にけるFv/Fmの季節変化

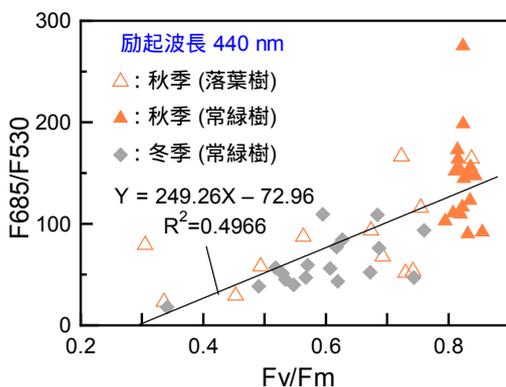


図9 Fv/Fmと蛍光強度比F685/F530の関係

分光透過特性及び蛍光スペクトル変化
波長300nm(UV-B領域)の相対透過率RT300と360nm(UV-A領域)の相対透過率RT360の落葉樹、常緑樹毎の平均値の変化を図10に示す。

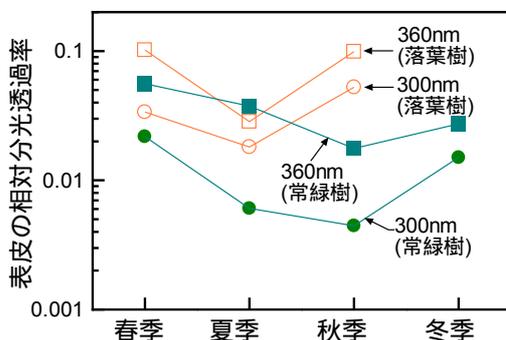


図10 表皮の紫外領域における透過率変化

RT300、RT360ともに季節を通して落葉樹より常緑樹の方が低く、常緑樹の方がUV-Bに

対する耐性が高いと予想される。常緑樹冬季のRT300は0.01以上に増加した。常緑樹全体のRT300と420nm励起におけるF530(FAD起源)に良い相関があることから、表皮中の紫外線吸収色素が、UV-B照射量の少ない冬季に分解され減少したものと考えられる。

<引用文献>

福地健一、高橋邦夫、立本英機：オゾン暴露および紫外線照射によるラッカセイ本葉のLIFスペクトル変化、大気環境学会誌、第39巻、2004、89-96

嘉数(大野)祐子、福地健一、高橋邦夫、2種のUV励起光によるラッカセイ生葉のLIFスペクトル変化及び蛍光葉内分布、植物環境工学、第22巻、2010、101-106

Cerovic ZG、Samson G、Morales F、Tremblay N、Moya I. Ultraviolet induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. Agronomie. 19: 543-578. 1999.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

福地健一、嘉数(大野)祐子、UV-B照射がラッカセイ葉の蛍光スペクトルおよび表皮の分光透過特性に及ぼす影響、植物環境工学、査読有、第28巻、2016、18-28
DOI: 10.2525/shita.28.18

〔学会発表〕(計2件)

福地健一、嘉数(大野)祐子、樹木葉表皮における分光透過特性の季節変化、日本生物環境工学会、2016年9月13日、金沢大学、石川県野々市市

福地健一、嘉数(大野)祐子、蛍光スペクトル測定に基づく植物葉表皮の分光透過率評価、日本生物環境工学会、2014年9月11日、明治大学駿河台キャンパス、東京都千代田区

6. 研究組織

(1)研究代表者

福地健一(FUKUCHI Ken'ichi)
木更津工業高等専門学校・基礎学系・教授
研究者番号: 00218942

(2)研究分担者

嘉数祐子(KAKAZU Yuko)
木更津工業高等専門学校・基礎学系・准教授
研究者番号: 30455117