

信州大学審査学位論文

紫外励起レーザー蛍光分析法を用いたソバの植物栄養診断

平成26年3月

関 沼 幹 夫

## 目次

第 1 章	序論 植物栄養診断手法の問題 .....	3
第 1 節	歴史 .....	3
第 2 節	背景 .....	5
第 3 節	目的と意義 .....	7
第 4 節	論文の構成 .....	7
第 2 章	励起蛍光法による植物栄養診断法のメカニズム .....	9
第 1 節	蛍光 .....	9
第 2 節	葉の蛍光センシング .....	14
第 3 章	普通ソバの紫外励起蛍光スペクトル .....	22
第 1 節	材料および方法 .....	23
第 2 節	結果 .....	26
第 3 節	考察 .....	29
第 4 章	NDSI を用いたホットスポットの推定 .....	31
第 1 節	材料および方法 .....	34
第 2 節	結果 .....	39
第 3 節	考察 .....	43
第 5 章	ケモメトリクスによる RuBisCO 含量の推定 .....	46
第 1 節	材料および方法 .....	47
第 2 節	結果 .....	51
第 3 節	考察 .....	56
第 6 章	レーザーとキセノン光源による紫外励起蛍光スペクトルの比較 .....	58
第 1 節	材料および方法 .....	59
第 2 節	結果 .....	62
第 3 節	考察 .....	65

## 目次

第 7 章	窒素施用が普通ソバの初期光合成に及ぼす影響 .....	66
第 1 節	材料および方法 .....	67
第 2 節	結果 .....	69
第 3 節	考察 .....	73
第 8 章	紫外レーザー励起蛍光による窒素栄養の情報取得 .....	75
第 1 節	材料および方法 .....	77
第 2 節	結果 .....	81
第 3 節	考察 .....	86
第 9 章	普通ソバとイネの紫外レーザー励起蛍光スペクトル .....	89
第 1 節	材料および方法 .....	91
第 2 節	結果 .....	93
第 3 節	考察 .....	98
第 10 章	総合考察 .....	99
第 11 章	謝辞 .....	102
第 12 章	引用文献 .....	103
第 13 章	省略用語 .....	121
第 14 章	和文要旨 .....	123

## 第1章 序論 植物栄養診断手法の問題

### 第1章 序論 植物栄養診断手法の問題

#### 第1節 歴史

植物の栄養診断は，栽培における施肥や病理診断，収量の予測や品質の管理のために欠かせない技術であり重要である．

遠隔・遠距離センシング技術は，歴史上においても第二次世界大戦中の米露対立における敵国の収量を把握し食糧や国力の推定として重要な役割を担ってきた．戦時中の技術は，戦後の冷戦構造の中で軍事技術の平和利用の流れにより，目覚ましい発展を遂げた．技術の平和利用は，農業生産分野への応用が盛んに行われ，予測や栄養診断にわたって使われるようになった．中でも窒素栄養は，作物にとって物質生産性を大きく作用する栄養素であることから，センシングにおける最重要課題として盛んに研究され，衛星からのセンシングによって地上部の現存量の推定が可能な栄養素の一つとなった．リモートセンシング技術は，このような成果に伴って，近接センシングにも応用され幅広い活用がされるようになった．

近接センシング技術は，精密農業・集約農法・大規模栽培の広がりと共に進歩した．特に，植物の栄養状態の診断は，非破壊・非侵襲・非接触の利点がある反射測定や蛍光測定などの技術を用いることで発展した．診断手法における新しい課題は，これまで化学分析に伴う労働力や分析時間が多大で環境負荷の大きい項目が，迅速かつ多項目を同時に推定できるようになることである．

さらに近年では，非破壊計測法であることに加えて簡易に新しい評価項目を診断できることが求められている．植物の栄養診断は，作物学に焦点を当てると，省資源栽培による持続的な栽培のために重要であり，簡単かつ精密に測定できる方法であることが求められる．代表的な診断方法は，葉色の判定を行うために葉色板を使用する方法である．葉色板は，多収と安定性のた

## 第1章 序論 植物栄養診断手法の問題

め考案された施肥調整法であるイネのV字稲作のような栽培管理法の基準にされてきた(松島ら, 1970; 松崎ら, 1974)。これまで葉色の診断は, 葉色板の基準を用いて肉眼により判断し栽培管理に活用されてきたが, SPAD 計の開発(渡邊ら, 1980)により数値によるイネの葉における窒素含量の推定(北川ら, 1987)が行われるようになった。近年の遠隔センシングにおいて, 反射計測の発達は, リモートセンシングの分野において葉の表面の反射情報による可視-近赤外の反射率( $mND705$ )を用いてクロロフィル濃度の推定(Smis and Gammon, 2002)が可能となり, ハイパースペクトルデータによる米粒のタンパク含量, クロロフィル濃度やバイオマスが波長選択型 PLS を用いた評価(Inoue *et al.*, 2002)も可能となった。さらに, 量子収率や光阻害などの生理情報は, 自然光下での測定が可能なパルス変調 (Pulse amplitude modulation: PAM) 法によるクロロフィル蛍光測定機の開発(Schreiber *et al.*, 1986)により簡易に計測されるようになった。次の課題は, このように光合成の電子伝達系における効率までが簡単に計測できることをうけ, これまで未利用の暗反応に関する情報取得であると考えられる。暗反応の中でも重要なのは, 窒素栄養と関係が深く, 窒素含量の約半分が分配されるリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase; RuBisCO)である。この RuBisCO は, 光合成速度の律速因子でもあり,  $CO_2$  同化反応を直接作用しているため, 非破壊計測でモニタリングすることにより継続的に光合成が高効率で行われているかを確認でき、物質生産性の向上に効果があると考えられる。

こうした診断技術の遷移の中で, 今後の診断技術は, 近年の進歩を受けて発展した蛍光計測技術をもちいた紫外励起蛍光計測(Ultra violet-induced fluorescence; UV-IF)が期待される。さらに, UV-IF は, 励起光源により汎用性と拡張性のあるレーザーを用いた紫外レーザー励起蛍光計測(Ultra violet-laser induced fluorescence; UV-LIF)があり, 計測方法の開発により応用

## 第1章 序論 植物栄養診断手法の問題

が可能な手段と考えられる。

### 第2節 背景

現在の農業における課題の一つは、資源の適正利用である。特に日本の農業は、肥料や資材などの農業に用いる資源を海外から輸入しており、海外依存による不安定さや脆弱な側面が特徴である。地域資源の活用は、農業の基盤強化において、資源の少ない日本農業を国内に存在する資源を活用することにより、農業多様性が高く、農業資材の自給率が高い、頑強な農業基盤をつくる上で効果的なことである。そのため、資源の適正利用は、強い農業への解決策として注目され、研究も盛んに行われている。しかし、これらの取り組みの問題は、生産性を落とさずに地域資源を活用することと、有効利用した資源が効率よく利用できているか評価することが困難なことである。つまり、作物生産における診断技術の向上は、食料の生産性を落とさずに資源活用を促進するための核になる技術である。

また、近年の気候変動は、品種の育成とその選定や利用法の向上を農業における重要な課題の一つとした。激しい環境変動は、変化に対応した新しい品種を必要とし、変動した気象下において高位安定生産が可能な品種の育成が求められている。育種は、試験材料を数千～数万オーダーという多数の系統・個体の特性を評価し判断する必要がある(日向, 1993)。簡易で迅速な栄養診断技術の向上は、品種育成における評価する時間の短縮を可能にし、多項目の形質の選抜を可能にし、総合的な判断を助けるため、効果的である。

さらに、気候変動は、高温や高 CO<sub>2</sub> 濃度や高 UV 環境を招くとされている。環境破壊の一つであるオゾンホール拡大による太陽からの中波長紫外線 (Ultraviolet light-B; UV-B) 放射の増加が挙げられる。太陽 UV-B は、生命にとって重要な遺伝子である DNA に損傷を与えるため、数十億年単位に及ぶ長期間にわたりオゾン層形成とともに様々な退避・耐性を獲得してきており、

短期間での急激な UV-B の増加に対応することは難しく大きな驚異である (佐々木, 2000) . 特に, 植物は, 自ら動いて日隠することができないので他の生物に比べ個体の寿命までの期間の紫外線受光量が多い . 耐 UV 特性の解析は, オゾンホール拡大による太陽 UV-B 放射の増加する高山地帯やオーストラリアにおける食料の量と質に及ぼす影響を明らかにし, 安定した食料生産にとって欠かせない . 太陽 UV-B 放射の増加は, 南極だけでなく日本が位置する北緯 60~30 度の地帯においても長期的に起こりうる (佐々木 1998) . 太陽 UV-B の増加は, 障害を与える紫外線から細胞を守りながら, 光を利用し光合成を行っている植物にとって, トレードオフの関係が成立している複雑な問題である .

本研究で扱う普通ソバ (*Fagopyrum esculentum* M.) は, 紫外線環境に適応した植物群に含まれ, 相反する光に対する防御と利用を行い複雑な問題をうまく回避している植物種である . ソバを扱う理由は, 紫外線耐性が強い作物の物質生産性を評価することにより作物の耐 UV 特性を解析し理解するのに適した材料であるからである . この紫外線への回避と退避性は, 普通ソバが高標高地帯・冷涼な気象下で栽培が可能である理由の一つである . 普通ソバは, 他の植物種に比べて, 光合成の明反応における光化学系 II の太陽 UV-B 照射による損傷作用に対して破壊されないと報告 (Marjana, 2012) されている . また, 普通ソバの太陽 UV-B に対する防御は, 他の植物が紫外線を吸収する化合物を葉の表側の表皮細胞に蓄え, 葉肉細胞への紫外線を抑制して葉緑体を保護する (Bornman *et al.*, 1997) 機構に加え, ルチンによる日傘作用 (Kreft, 2003) や, 光酸化に強いなどの特徴がある . 日本における普通ソバの生産は, 長野県が高品質な普通ソバ種子の生産地帯として知られているが, 栽培が北海道から沖縄までの幅広い緯度に渡って異なる品種が用いられている . 多くの品種が栽培されていることは, 気候変動に対する対策を画一的に行えない困難な一面でもある . 気候変動に対する対策は, イネにおける FACE 実験

## 第1章 序論 植物栄養診断手法の問題

(Allen, 1992; 小林, 2001; Hasegawa *et al.*, 2013)に代表されるように温暖化や高 CO<sub>2</sub>による影響が検討されてきており，太陽 UV-B の増加への対策は取り組まれているものの，さらなる気候変動に備える対策が必要である．

### 第3節 目的と意義

本研究の目的は，省資源条件での物質生産性の向上，耐 UV 特性を解明する為に効果的な手法である紫外励起蛍光分析法を用いて，新しい診断項目として RuBisCO を簡易推定する方法の開発である．化学分析値や形態に着目した栄養診断技術は，時間や労働力がかかることや，精密な測定のために即時性が損なわれ，実用性が劣ることが多い．新しい非破壊の診断技術は，省資源型の栽培方法の模索や育種におけるスクリーニング目標の設定とその評価の迅速化に寄与するものと期待できる．また，その方法は、光合成色素量の現存量だけでなく，実際の働きを表す効率や，モデル化による正確な光合成速度の測定を可能にする一端を担うことも期待できる．

この目的が達成された際の意義は，農家が農作業の体系の中に診断を簡単に取り入れられるようになることで，即時に施肥管理ができる精密農業が可能となり，不安定な農業生産環境下での安定生産が可能になることである．また，施肥量の抑制は，資材費のコスト削減につながり経営の観点からも望ましいことである．

### 第4節 論文の構成

著者は，植物栄養状態の診断技術の向上のために紫外レーザー励起蛍光の測定デバイスを開発し，その評価に取り組んだ．第1章は，なぜ紫外励起蛍光による新しい診断法が必要であるかを説明し，続く第2章では，植物の蛍光センシングの歴史とメカニズムについて概説し，紫外励起蛍光計測の有用性を指摘した．そして，第3章は，紫外励起蛍光計測によって得られる普通



## 第1章 序論 植物栄養診断手法の問題

ソバの蛍光スペクトルがどのような特徴をもつのかを把握した。そして、第4章は、実用性のあるクロロフィルおよび RuBisCO 含量の推定法を開発するために、紫外励起蛍光測定におけるクロロフィルの定量と RuBisCO の定量に関与する波長帯の選択を試みた。さらに、第5章は、前章で選択した波長帯の蛍光情報を用いて、ケモメトリクスを用いた含量の推定を試みた。第6章において新しい紫外レーザー励起蛍光システムの構築を行い、励起光源としてキセノン光源とレーザー光源を用い光源の違いが蛍光スペクトルに及ぼす影響を把握した。さらに、第7章は、材料として扱った普通ソバの初期光合成に窒素が及ぼす影響を、既に実績のある PAM クロロフィル蛍光計測法を用いて調べた。加えて、第8章では紫外レーザー励起蛍光分析方法による窒素栄養状態の把握の可能性を蛍光スペクトルの蛍光強度に着目して検討し、紫外レーザー励起蛍光スペクトルから蛍光指標を算出し検出できるか検討した。さらに、第9章では、紫外励起蛍光計測の汎用性が、作物種を超えても同様なのか検証するため、イネの紫外励起蛍光スペクトルの施肥と品種による変異の比較を行った。最後に、第10章は、総合考察として本研究の成果を評価し、非破壊計測の今後の展望を記述した。研究を通して、光合成や診断技術の知見が少なかった普通ソバにおいて、紫外レーザー励起蛍光を用いた植物栄養診断法が可能となった。

## 第2章 励起蛍光法による植物栄養診断法のメカニズム

### 第2章 励起蛍光法による植物栄養診断法のメカニズム

#### 第1節 蛍光

蛍光は、物質に吸収された光エネルギーの一部が利用されることなく再放射される現象である(第 2.1 図)。エネルギーが与えられた物質は、一時的にエネルギーの高い励起状態になり、物質が安定するためにエネルギー順位の低い状態へシフトする際に光を放出する性質をもつ。

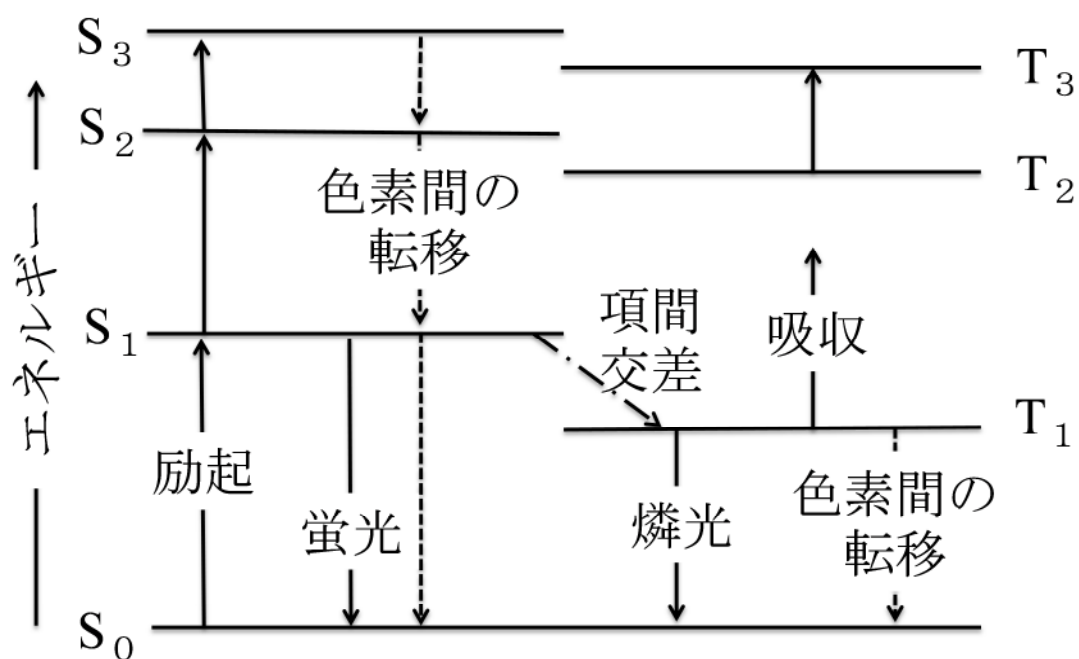
蛍光は、植物の光合成にとって最も重要な色素であるクロロフィルからも放出される。クロロフィルへ照射された強い光は、光化学系 II の色素が光量子を吸収し励起状態を作りだした後に、主に 3 つの反応に用いられる。1 つ目の経路は、クロロフィルから光化学系に流れ、初期光化学反応によって光合成のエネルギー生産が行われ、吸収した光量子のほとんどが使用される。2 つ目の経路は、過剰なエネルギーとして熱放散に回され、光合成の回路の防御機構である。3 つ目の経路は、光化学系と熱放散で消費できなかったエネルギーが蛍光として再放出される。明反応が正常に機能した回路では、光化学系 II から光化学系 I へと電子の伝達が行われ、炭酸同化に必要なエネルギーを産出している(第 2.2 図)。クロロフィル蛍光は、光化学系の状態や、熱放散からなる非光化学系消光の反応の影響を受けて放出されるため、これらの情報を反映している。

植物からの蛍光は、光合成の研究の歴史において、古くから研究されてきた。初期の研究では、植物色素を抽出した状態での蛍光を測定し、クロロフィルを中心とした光エネルギーの利用のされ方の理解のために研究が行われてきた。特に、暗順応させた緑葉は、光照射することにより葉緑体からクロロフィル a の蛍光が生じて、特有の蛍光強度の時間変化が起こる(第 2.3 図)。これは、カウツキー効果とよばれ光合成機能の解析に用いられている(Kautsky and Hirsch, 1931; Havaux and Lannoye, 1983)。カウツキー効果は、植

## 第2章 励起蛍光法による植物栄養診断法のメカニズム

物に対する各種のストレスである強光，低温，高温，高塩類濃度，水ストレス，大気汚染ガス，紫外線などの影響を調べた多くの研究例が存在する．この生葉に光照射することで観察できるクロロフィル蛍光は，植物の光合成の機能の情報の中でも，葉緑体の電子伝達系で特に光科学系 II の電子受容体の酸化還元状態を反映することが明らかになっている(Papageorgiou, 1975)．これらの情報を解析するクロロフィル蛍光法について島崎(1988)は，葉緑体の単離や，アデニレートの抽出など面倒な操作なしに光合成活性を非破壊で計測できるところに大きな特徴があり，種々の環境ストレスが植物に及ぼす影響やその作用機序を調べるために非常によく用いられると述べている．

蛍光計測において重要なのは，励起光である．励起光は，波長とその強度の違いにより，検出できる蛍光情報が異なる．蛍光スペクトルは，励起波長により励起される色素や物質が異なるため，目的に応じた励起光源の選択を行なったうえで取得する必要がある．クロロフィル蛍光の取得が主目的の場合は，クロロフィルの最大吸収波長を励起波長として，効率よくクロロフィル由来の蛍光を取得する．また，クロロフィル以外の物質の情報取得を目的とする場合は，その物質の吸収波長帯を考慮し，励起波長の選定が行われる．明反応の評価は，主にクロロフィルによって反応が支配されているためクロロフィル蛍光を用いて行われている．これらの蛍光の性質は，植物のセンシングに有効な方法として発展してきた概要を記述する．



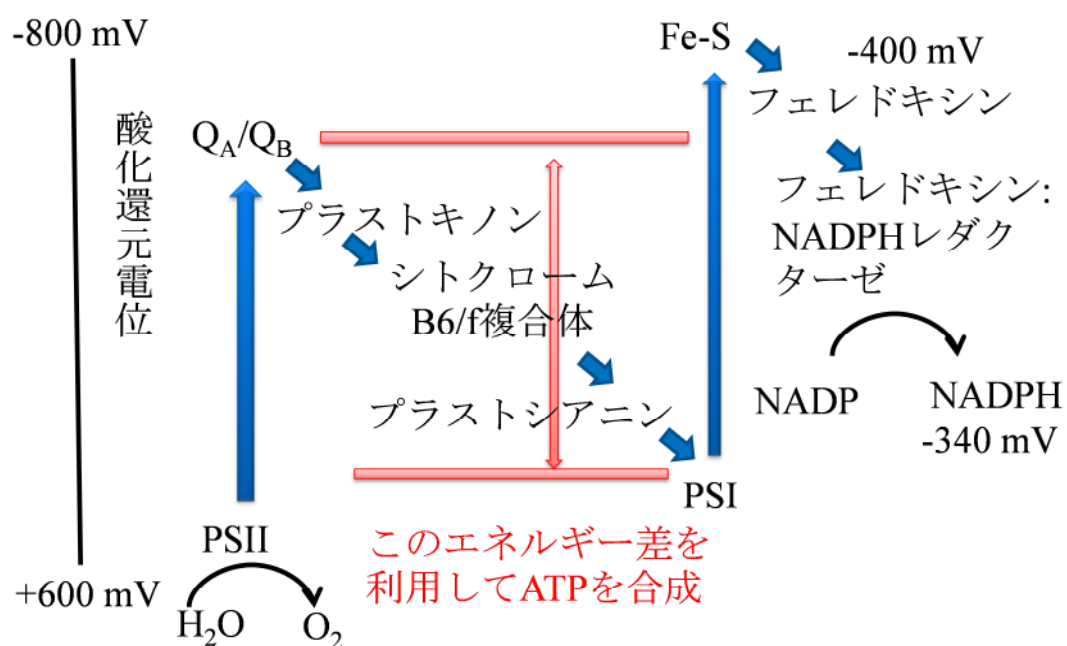
第 2.1 図 蛍光を放出する際のエネルギー準位。

$S_0$  : 基底状態 ,  $S_1$  : 励起一重項状態 ,  $S_2$  : 励起二重項状態 ,

$S_3$  : 励起三重項状態

$T_3$  : 励起三重項状態

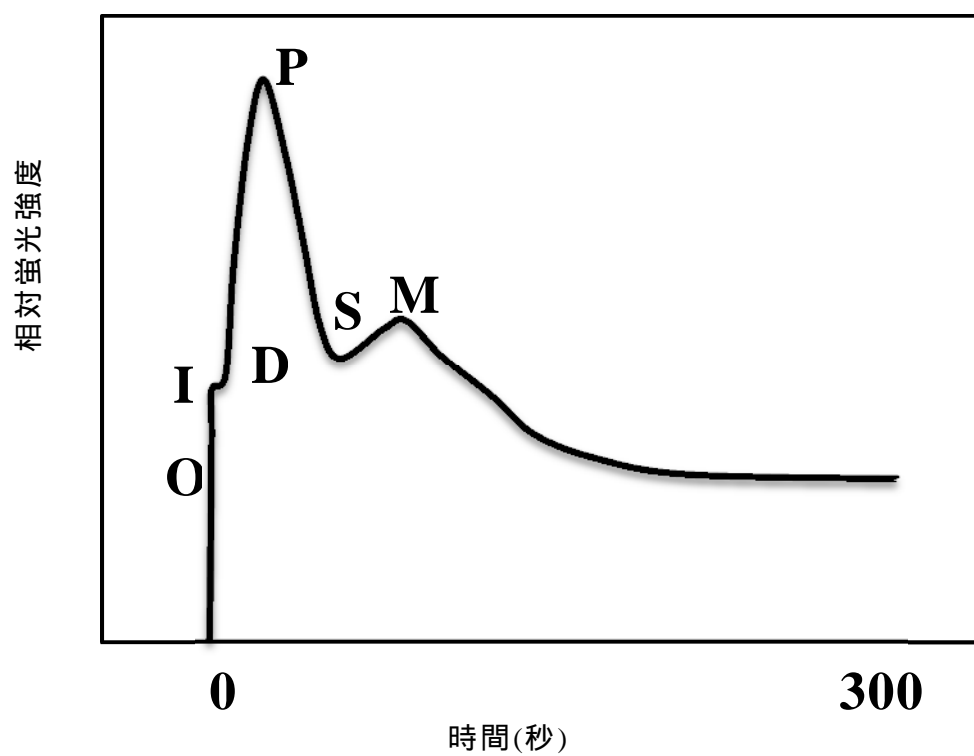
## 第2章 励起蛍光法による植物栄養診断法のメカニズム



第 2.2 図 入射された光が蛍光へ変化する概略図。

光合成電子伝達系の酸化還元電位(z スキーム)と光化学反応。

(Blankenship and Prince, 1985)



第 2.3 図 カウツキー効果 .

O : 起点 , I : 中間点 , D : 谷 , P : 頂点 , S : 一次 Steady-state , M : 最高点 ,  
T : 終末状態 . (Kautsy and Hirsch, 1931)

## 第2章 励起蛍光法による植物栄養診断法のメカニズム

### 第2節 葉の蛍光センシング

植物の栄養診断は、葉色診断に代表されるように葉の緑色の変化を捉えて行ってきた。これは、広義の意味での反射スペクトル分析である。葉が緑色であることは、太陽光の中から緑色や黄色の波長帯の光の反射と透過の結果であり、光合成を効率よく行えていることを表している。植物葉の反射スペクトルは、葉が緑色であることを科学的に説明できる(第2.4図)。反射スペクトルは、550-600 nm のピークと、700-1300 nm における反射率が高くなるレッドエッジ(Knipling, 1970)という特徴があり、センシングに用いられている。

このレッドエッジという性質は、人工衛星からの植生モニタリングや地上クロロフィル量の把握のために用いられてきた。マルチスペクトル画像の取得は、基本的に反射スペクトルの可視化である。反射計測における課題は、変化が生じた後の状態が顕在化した状態の観察であり、予測や機能の状態を評価することができない事である。また、根本的な課題は、太陽光を利用して計測するため、晴天や曇りなどの気象要因を考慮しないと診断に使えない欠点があることである。つまり、励起蛍光スペクトル分析は、外部からエネルギーを与えてその状態の情報を取得するため、反射スペクトル測定の欠点を補える手法である。蛍光計測は、葉の成分を内在蛍光プローブとして利用することで、生体情報を取得する。内在プローブとして働く物質は、クロロフィルやカロテノイド、フラビンなどの色素、細胞膜のフェノール類、液胞内の色素や各種有機酸等の代謝物質である。

葉の蛍光センシングは、光源や検出器などの光学機器の発展にともなって進歩した。特に、Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (LASER:以下レーザーと称する)の開発は、出力の高さと直進性、単色性、繰り返し安定性など、センシングにおける優れた特徴をもつ光源をもたらした。しかし、1980年代以前は、レーザー装置が大型で高価であることにより

## 第2章 励起蛍光法による植物栄養診断法のメカニズム

汎用性が乏しく、植物の蛍光センシングには利用されていなかった。しかし、レーザーなどの光学機器の発達、レーザーや検出機器の低価格化を促し、植物生体情報のリモートセンシングの発展をもたらした。

レーザーの種類は、発振方法の違いから連続発振(Continuous wave: CW)レーザーとパルス発振させるパルスレーザーの二つの方法がある。センシングにおける励起光源は、CW レーザーでも構わないが、将来のリモートセンシングにおける適応を考慮すると、対象物までの距離の測定やナノ秒単位での蛍光スペクトルの時間分解をすることも可能であるパルス光源を用いることに利点がある(斎藤, 1995)。

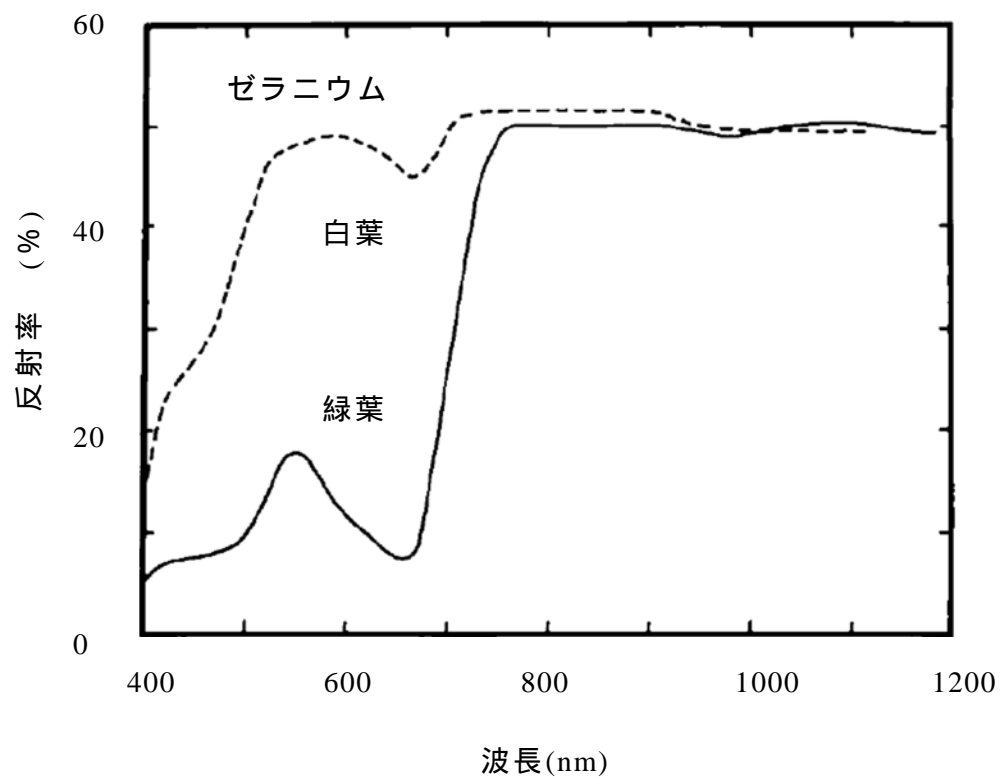
もうひとつの励起光源の性質で重要なのは、波長の選択である(第 2.1 表)。クロロフィル蛍光は、検出器が低感度であることと励起光源が低出力であったことから、弱い励起力でも効率的に赤色付近の蛍光を取得するために、クロロフィルの最大吸収波長帯を中心波長にもつ光源を用いてきた。しかし、短単波長帯を励起光に用いたセンシングは、クロロフィル以外の情報取得を目的とし、400 nm 付近の蛍光情報の取得が試みられるようになった(第 2.2 表)。中でも、紫外励起蛍光計測における最大の利点は、クロロフィルだけでなくカロテノイドやフェノール類の葉内化合物も同時に励起することができることである(Cerovic *et al.*, 1999)(第 2.5 図)。紫外励起蛍光スペクトルは、第 2.6 図に示すように主として、青色蛍光、緑色蛍光、赤色蛍光、近赤色蛍光の4つのピークを検出することができる。紫外励起蛍光計測に特有の青色蛍光や緑色蛍光は、主に細胞壁の主成分であるセルロースや、液胞やフラビン色素から発する蛍光(Lang *et al.*, 1994; Lang *et al.*, 1996)との報告がある。一方で、赤色蛍光と遠赤色蛍光は、主にクロロフィル a が励起されたことにより放出される蛍光と考えられている。このように紫外励起蛍光測定は、クロロフィル蛍光にも着目できることからレタスにおける植物栄養診断(石澤ら, 2002)、また、樹木におけるクロロフィル濃度の画像化(Saito *et al.*, 2002)など



## 第2章 励起蛍光法による植物栄養診断法のメカニズム

も報告されている。

また、新しい動向としては、近接センシングにおいてデバイスの低価格化のために代替光源として light emitting diode (LED)光源の利用が進んでいる。デバイスの小型化と低価格化は、LED の活用により加速化しており、また、LED の制御性を活かした多面的な装置の普及を促している。これまでのセンシング技術の向上は、工学の視点からのアプローチが中心であり、対象となる植物や農業を中心とした農学視点からのアプローチが少ない。デバイスとして汎用性や利便性は、ますます高くなる一方なので、農学視点から新しい診断項目の探索が重要な課題である。



第 2.4 図 植物葉の反射スペクトル .

(Billings and Morris, 1951)より改変 .

## 第2章 励起蛍光法による植物栄養診断法のメカニズム

第2.1表 励起光の波長と励起対象の物質や組織．

励起波長	励起対象の物質や組織
紫外励起	タンパク質，表皮，代謝物質，二次励起
青色励起	カルテノイドとクロロフィル吸収
緑色励起	葉の深部組織励起
赤色励起	クロロフィルのみ吸収

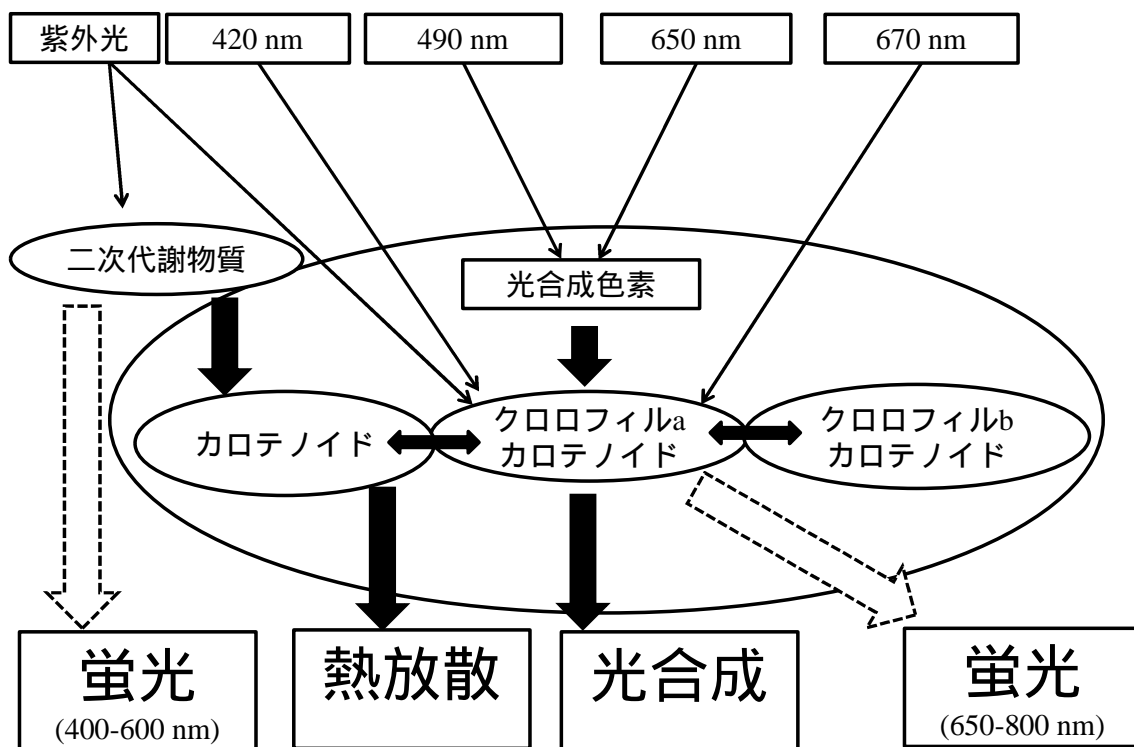
## 第2章 励起蛍光法による植物栄養診断法のメカニズム

第2.2表 紫外励起蛍光分析の既往研究 .

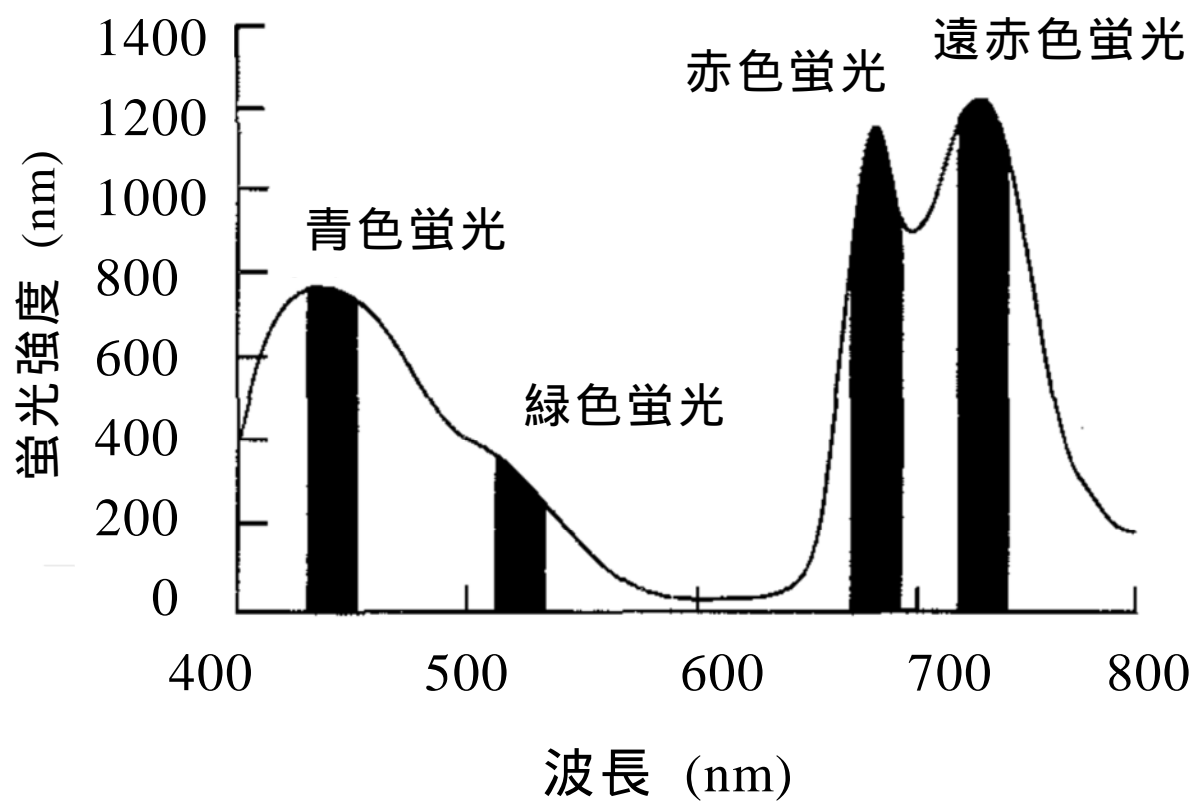
技術区分	概要	文献
分光分析	葉における蛍光スペクトルの基礎研究	Cerovic <i>et al.</i> 1998, Corp <i>et al.</i> 1997, Lang and Lichtenthaler 1991, Lang <i>et al.</i> 1992, Lang <i>et al.</i> 1991, Lüdeker <i>et al.</i> 1996
	励起光に関する研究	Bongi <i>et al.</i> 1994, Cerovic <i>et al.</i> 1998, Corp <i>et al.</i> 1997, Middleton <i>et al.</i> 1995, Middleton <i>et al.</i> 1996, Schweiger <i>et al.</i> 1996, Stober and Lichtenthaler 1993a
	励起・蛍光マトリクス解析	Philpot <i>et al.</i> 1996, Theisen 1988
	時間分解スペクトル解析	Cerovic <i>et al.</i> 1994, Goulas <i>et al.</i> 1990, Morales <i>et al.</i> 1994, Morales <i>et al.</i> 1996, Morales <i>et al.</i> 1998
紫外レーザー励起蛍光	室内レーザー励起蛍光計測	Bongi <i>et al.</i> 1991, Bongi <i>et al.</i> 1994, Broglia <i>et al.</i> 1993, Cerovic <i>et al.</i> 1993, Chappelle <i>et al.</i> 1984, Chappelle <i>et al.</i> 1991, Chappelle <i>et al.</i> 1987, Chappelle <i>et al.</i> 1984, Chappelle <i>et al.</i> 1985, Heisel <i>et al.</i> 1996, Kim and Brown 1986, Lang <i>et al.</i> 1991, Lichtenthaler and Schweiger 1998, Saito <i>et al.</i> 1998a, Saito <i>et al.</i> 1998b, Stober <i>et al.</i> 1994, Stober and Lichtenthaler 1992, Stober and Lichtenthaler 1993b, Subhash <i>et al.</i> 1995, Takahashi <i>et al.</i> 1993, Takahashi <i>et al.</i> 1988
ライダー計測	野外計測	Lüdeker <i>et al.</i> 1995
	エキシマレーザー励起計測 (397 nm)	Cecchi <i>et al.</i> 1992, Edner <i>et al.</i> 1994
	色素レーザー励起計測 (480 nm)	Cecchi <i>et al.</i> 1994,
	Nd-YAGレーザー励起計測 (355nm)	Dahn <i>et al.</i> 1992, Edner <i>et al.</i> 1994, Edner <i>et al.</i> 1992, Günther <i>et al.</i> 1994, Günther <i>et al.</i> 1991, Lüdeker <i>et al.</i> 1996, Svanberg 1995
	Nd-YAGレーザーによるクロロフィル蛍光寿命分析	Cerovic <i>et al.</i> 1996, Goulas <i>et al.</i> 1997, Morales <i>et al.</i> 1999, Moya <i>et al.</i> 1995,
画像計測	顕微画像計測	Lichtenthaler <i>et al.</i> 1996, Saito <i>et al.</i> 1997, Stober and Lichtenthaler 1993c
	屋内画像計測	Heisel <i>et al.</i> 1996, Kim <i>et al.</i> 1996, Kim <i>et al.</i> 1998, Lang <i>et al.</i> 1996, Lang <i>et al.</i> 1994, Lichtenthaler <i>et al.</i> 1996, Lichtenthaler <i>et al.</i> 1997,
	ライダー画像計測	Edner <i>et al.</i> 1995, Edner <i>et al.</i> 1994, Johansson <i>et al.</i> 1996
	532 nm の画像計測	Saito <i>et al.</i> 1997

(Cerovic *et al.* 1999)より改変 .

## 第2章 励起蛍光法による植物栄養診断法のメカニズム



第 2.5 図 葉における光エネルギー伝達 .



第 2.6 図 紫外レーザー励起蛍光スペクトルの典型的なパターン。

(Lichtenthaler and Miehe, 1997.より改変)

#### 第3章 普通ソバの紫外励起蛍光スペクトル

作物は、限られた資源による生産能力の向上が期待されていることから、光合成能力と植物の窒素分配に注目する必要がある。筆者らは、光合成の鍵酵素である RuBisCO の紫外励起蛍光計測を試みている。光計測による診断手法は、従来の農家の経験に基づく目視による診断や葉の成分分析といった化学的な手法と比較すると客観性と簡便性において有利である。しかし、光計測は、非破壊、非接触、微量検出が可能な半面、様々な栽培条件の違いによる影響を受けるため、診断に用いるためにどのような影響が紫外励起蛍光計測に生じるか把握する必要がある。

材料である普通ソバは、マイナークロップであるため研究自体が盛んでなく、他の作物に比べて解明されていない事が多く、特に光合成に係る知見が乏しい。また、普通ソバは、粗放栽培が可能なため救荒作物として扱われるようになったことにより、精密な施肥管理が行われなくなった。それでも収量は確保できるため、高度な診断が行われてこなかった。しかし、ソバの収益性の向上や高品質栽培は、昨今の競争力の求められる農業環境において重要な研究課題である。

本章の目的は、普通ソバの紫外励起蛍光スペクトルを計測する測定系を開発し、栽培する上で重要な窒素施用量や品種といった違いによる差が、蛍光スペクトルより検出できるか検討した。

### 第3章 普通ソバの紫外励起蛍光スペクトル

#### 第1節 材料および方法

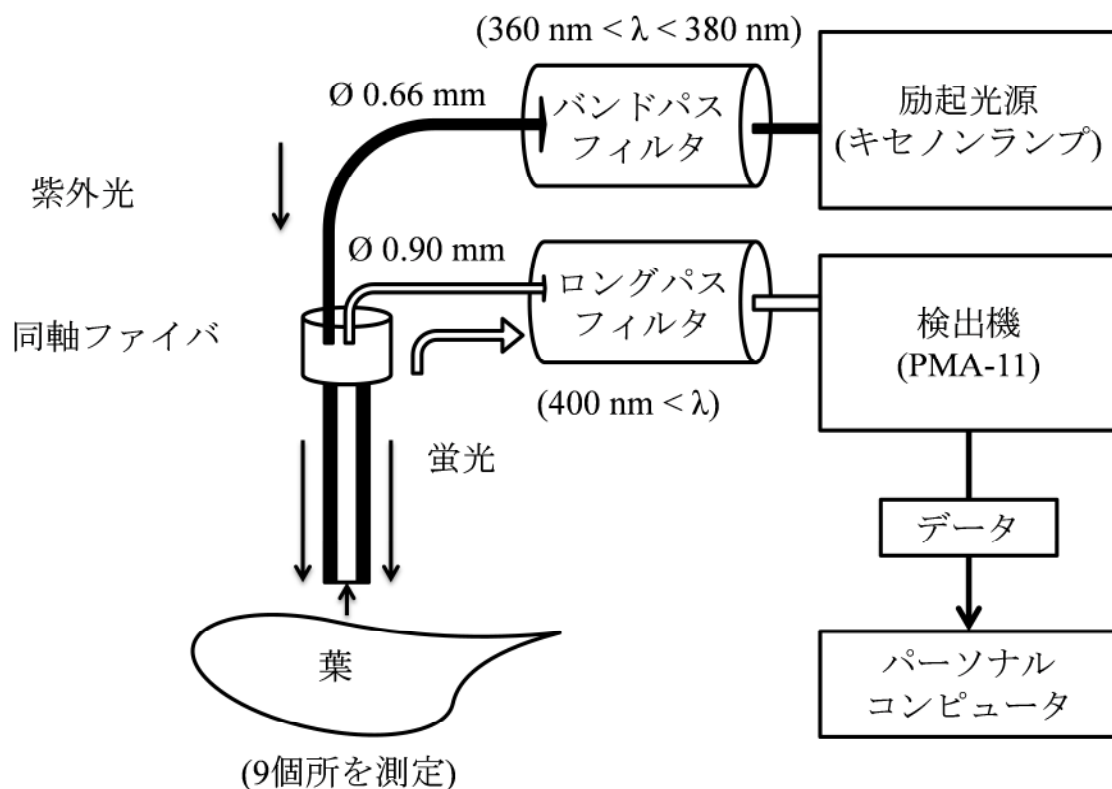
供試した普通ソバの品種は，白花系統の「信濃1号」と赤花系統の「高嶺ルビー」である．播種は10月11日にワグネルポットに3粒ずつ行ない，ガラスハウス内で適宜灌水して栽培した．窒素施肥は，硫酸を用い0, 1, 2, 4, 8 g m<sup>-2</sup>の5水準に設定した．この試験配置は3反復乱塊法で行った．普通ソバの開花期に，上位節の完全展開葉を用い，30分の暗順応処理を行ってから蛍光を測定した．

蛍光スペクトルの計測は，紫外励起蛍光計測システムを作成し行なった．測定システムは，キセノン光源の光にバンドパスフィルタを用いて紫外波長の光を作成し，同軸ファイバーを用いて蛍光を取得し分光測定を行うシステムである．励起光は，キセノン光源(perfect 光源 LAX-101，朝日分光)から発せられた光を370 nmのバンドパスフィルタ(MBXL-370，朝日分光)を使用して分光した後に二分岐同軸ファイバーケーブルの励起光側に導入した．ファイバに導入した紫外光は，同軸ファイバーケーブルを経由し，ファイバー先端部とサンプル間の距離が約4 mmになるように調整された先端部から，サンプルに照射された．検出部は，励起光の影響を防ぐため，400 nm以上を透過させるロングパスフィルター(XUL400，朝日分光)を介してから光ファイバーで高速分光測定機(PMA-11(C7473-36)，浜松ホトニクス)に取り込み，400-900 nmの光を分光した(第3.1図)．

計測条件は，励起光照射後に露光時間0.5秒を30回繰返した．一枚の葉につき異なる9箇所の蛍光を測定した．スペクトルの前処理は，検出機付属の基本ソフトウェア(U6039-01，浜松ホトニクス)を使用して行った．取得蛍光スペクトルは，690 nmの蛍光強度が最大となる瞬間の蛍光スペクトルとした(第3.2図)．検出した蛍光スペクトルは，1 nm間隔で取得されたスペクトル原データの5点の移動平均を算出した．さらに原スペクトルは，600 nmの蛍光強度を基準として相対蛍光強度を算出した．



### 第3章 普通ソバの紫外励起蛍光スペクトル



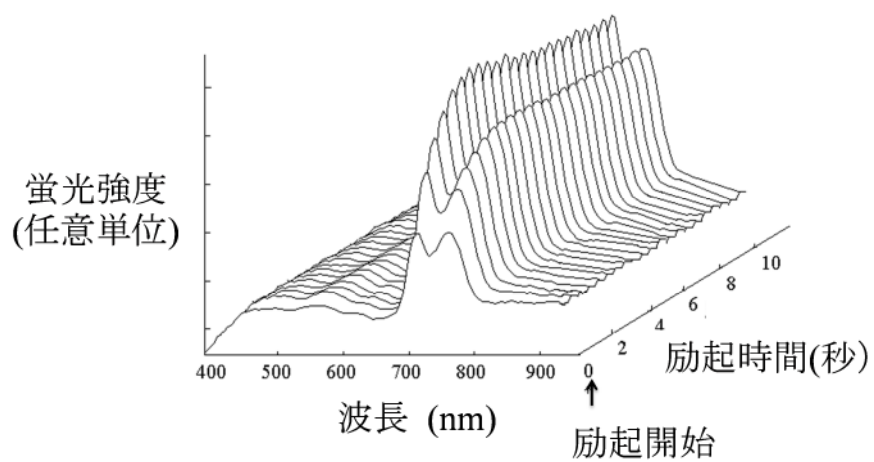
第 3.1 図 紫外励起蛍光の測定システム .

キセノンランプの仕様 出力 : 100 w . 照度  $21.0\text{ mw/cm}^2$  .

バンドパスフィルタ 半値幅 : 10 nm .

同軸ファイバーのコア数 照射口数 : 1 . 検出口数 : 12 .

### 第3章 普通ソバの紫外励起蛍光スペクトル



第 3.2 図 蛍光スペクトルの時間変化 .

励起波長 : 370 nm . 測定波長 : 400-900 nm .

露光時間 : 500 ミリ秒 . 繰り返し回数 : 30 回 .

測定時間 : 12.5 秒 .

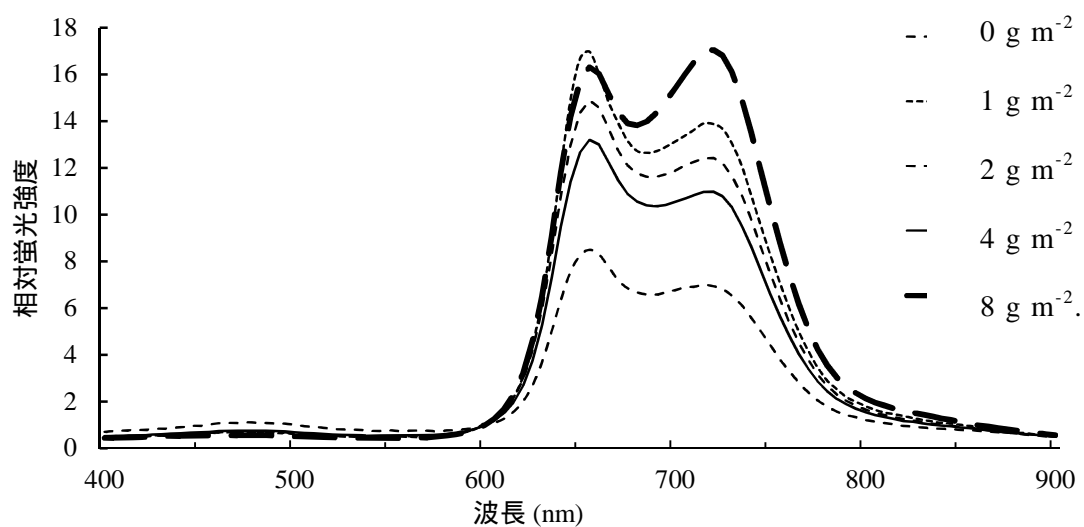
### 第3章 普通ソバの紫外励起蛍光スペクトル

#### 第2節 結果

第 3.3 図は、普通ソバの信濃 1 号における窒素施肥による蛍光スペクトルの変化を示す。窒素施用による影響は、青緑色蛍光ではみられず、主に赤色蛍光と遠赤色蛍光で示す。青緑色蛍光は、0.55-1.09 の範囲で相対強度を示し、赤色蛍光が 6.67-13.8、遠赤色蛍光が 5.58-13.48 の範囲で蛍光強度を示した。

第 3.4 図は、白花系統である信濃 1 号と赤花系統である高嶺ルビーの紫外励起蛍光スペクトルを示す。青緑色蛍光は、信濃 1 号が 0.75 に対して、高嶺ルビーが 0.99 の相対蛍光強度を示した。一方で赤色蛍光は、信濃 1 号が 13.21 と高嶺ルビーが 7.04 を示し、遠赤色蛍光も信濃 1 号が 10.98、高嶺ルビーが 7.07 となった。

### 第3章 普通ソバの紫外励起蛍光スペクトル



第 3.3 図 普通ソバ(信濃 1 号)の施肥量による蛍光スペクトルの違い .

励起波長 : 370 nm . 検出波長 : 400-900 nm .

スペクトル処理 : 600 nm の蛍光強度を基準に相対化 .

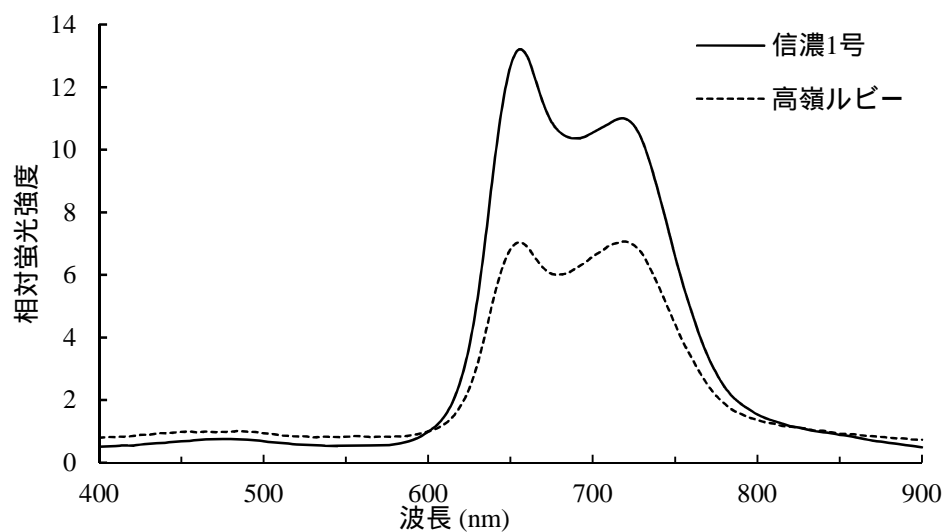
作物種 : 普通ソバ . 品種 : 信濃 1 号 .

栽培条件 : 1/2000 a ワグネルポット . 土壌 : 黒ボク土

窒素施用量 : 0, 1, 2, 4, 8 g m<sup>-2</sup> .

暗順応時間 : 30 分 .

### 第3章 普通ソバの紫外励起蛍光スペクトル



第 3.4 図 普通ソバの品種による紫外励起蛍光スペクトル .

励起波長 : 370 nm . 検出波長 : 400-900 nm .

スペクトル処理 : 600 nm の蛍光強度を基準に相対化 .

作物種 : 普通ソバ . 品種 : 信濃 1 号と高嶺ルビー .

栽培条件 : 1/2000 a ワグネルポット . 土壌 : 黒ボク土 .

窒素施用量 :  $4 \text{ g m}^{-2}$  .

暗順応時間 : 30 分 .

### 第3章 普通ソバの紫外励起蛍光スペクトル

#### 第3節 考察

普通ソバの蛍光スペクトルは、第 3.4 図で示したように 400-500 nm における青緑色蛍光にピークが検出されなかった。紫外励起蛍光スペクトルの多くの例は、青色蛍光、緑色蛍光、赤色蛍光、遠赤色蛍光のピークを持つ特徴が報告されている (Cerovic, 1994)。これらの報告との相違点は、青色蛍光と緑色蛍光が検出されないことである。青緑蛍光帯にピークが検出されないことは、品種と窒素施肥量を変化させても同様に観察されたことから普通ソバの紫外蛍光スペクトルにおける典型的な特徴と考えられた。普通ソバの蛍光スペクトルの特徴は、400-550 nm の青緑色蛍光の相対蛍光強度が得られにくいことである。

普通ソバの青緑色蛍光が検出されない理由は、励起光が葉の表皮に反射されたことにより減衰し、励起力が弱くなる場合、二次代謝物質によって励起光が吸収されて励起エネルギーが弱くなる場合、青緑色蛍光が放出されているが、クロロフィルに吸収されてしまう場合の 3 つの理由が考えられる。1 つ目の反射による減衰は、普通ソバの葉は表面のクチクラ層にポリフェノール類が多く含まれており (Suzuki *et al.*, 2005)、表皮組織が発達しているほど反射率が高いと考えられる。しかし、励起光の反射による減衰は、赤色蛍光が検出されていることからチラコイド膜の光化学系 II と光化学系 I が十分に励起されていると考えられ、主な理由とは考えにくい。2 つ目の励起光が吸収される場合は、普通ソバが紫外線放射に対して強い抵抗性を持つことから、作用していると考えられる。3 つ目の蛍光の再吸収は、複数の化合物があるサンプルにおいてよく知られている現象である。再吸収は、葉の構成成分であるクロロフィルと二次代謝物質であるカロテノイドが担っていると考えられる。クロロフィルによる再吸収は、赤色蛍光の相対蛍光強度が強いことから

### 第3章 普通ソバの紫外励起蛍光スペクトル

クロロフィルの励起が効率よく行われており、主に 400-480 nm の吸収に関与していると考えられる。二次代謝物質による再吸収は、主にアントシアニンによって行われていると考えられ、主に 500-550 nm の吸収に関与していると考えられる。青緑色蛍光が再吸収されることは、反射率や透過率の詳細な検証が必要ではあるが、吸収帯が一致することや、青緑色蛍光もクロロフィルを励起し赤色蛍光が強く検出されることに影響を及ぼすと考えられるため、妥当性が高いと考えられた。以上の3つの理由を検討したが、普通ソバの葉の蛍光スペクトルの青緑色蛍光が弱い理由は、主に代謝物質による励起光の減衰と蛍光の二次吸収が原因と考えられる。

また、青緑色蛍光は、樹木葉の蛍光スペクトルの研究例において、上皮組織から放出されやすく、表皮組織が発達している落葉樹より常緑葉樹において、強く観察される(Cerovic *et al.*, 1999)。青緑色蛍光についての他の研究報告は、エンドウマメ(*Pisum sativum* L.)の葉がエステル化されたフェルラ酸を含有するため、細胞壁からの蛍光がほとんど観察されないとしている(Hartley and Harris, 1981)。これらの報告は、励起波長が異なるため、本研究における結果と同様の結果になるか検証の必要があるが、青緑色蛍光が検出しにくい理由として、組織構造と含有物質の影響も示唆される。

以上より、普通ソバにおける蛍光スペクトルの特徴は、青緑色蛍光の強度が低くなるタイプの作物であることが明らかになった。

### 第4章 NDSIを用いたホットスポットの推定

植物の栄養診断システムは、省資源のために重要であり、持続的な食料生産のためにも必要である。作物の栄養診断は、その情報を基に適切な量の施肥を行うことが資源の有効活用と経営上のコスト削減、土壌の富栄養化の抑制に有効な手段である。

診断技術は、近年の進歩により、暗反応に関する情報を取得し活用することが次なる課題である。C<sub>3</sub>植物の光合成速度は、暗反応で重要な働きであるO<sub>2</sub>の取り込みを触媒するRuBisCO酵素により律速される(Farquhar *et al.*, 1980)。RuBisCOは、オキシゲナーゼによる反応効率の低さを多量に合成することで補い、また、光合成全体の効率を減少させる光呼吸の初段階をも触媒する(Buchanan *et al.*, 2000)。このためRuBisCOの簡易推定は、作物の生産性に多くの影響を与える因子のモニタリングであり、定量に手間と労力がかかるため栽培管理に反映できなかったCO<sub>2</sub>固定の潜在能力の評価を可能にする。

作物の生産性は、周囲環境から求める日射利用効率により評価されてきた(Sinclair and Muchow, 1999)。また、植物の栄養状態を理解するために欠かせない、クロロフィルaとクロロフィルbの分析は、アルコール抽出したものの吸光度測定による定量(Smith and Bentiez, 1995)や原子吸光分析(Porra *et al.*, 1989)によって行われてきた。フィールドで用いる簡易診断法は、分光特性に基づいて評価するSPAD(Soil & plant analyzer development)計を用いて簡易に測定できるようになった(渡邊ら, 1980)。リモートセンシングにおいて、反射計測は、葉の反射情報を取得しクロロフィル含量の推定が可能である(Sims and Gamon, 2002)。さらに、近年は、パルス変調(Pulse amplitude modulation: PAM)クロロフィル蛍光測定により非破壊で圃場でのクロロフィル蛍光の量子収率やストレス指標を評価できるように進歩した(Klughammer and Schreiber, 2008)。さらに、レーザー励起蛍光計測は、光合成による炭酸固



#### 第4章 NDSIを用いたホットスポットの推定

定量の推定に用いられている(Moya *et al.*, 1992) . Saito *et al.* (2005) は , 紫外レーザーを用いた蛍光測定を用いて , 680 nm と 740 nm の比率よりクロロフィル量の非破壊モニタリングを可能にした . しかし , 普通ソバにおける紫外励起蛍光分析は , 行われていない .

普通ソバにおける光合成は , あまり研究が行われてこなかった . 数少ない研究例は , 個葉の純光合成速度の最適温度(杉本・佐藤, 1999)や UV-B の照射に対して光化学系 II のポテンシャルが変わらないこと(Gaberšček *et al.*, 2002)が報告されている . 普通ソバの光合成における次の課題は , 限伸育性や受精率の向上(Inoue *et al.*, 2002)にともない , ソース能力の強化が必要である .

そこで、本章は、普通ソバの葉における紫外励起蛍光計測による RuBisCO の非破壊計測を試みる . 得られた蛍光スペクトルは , 正規化分光指数 (Normalized difference spectra index: NDSI)を用いて RuBisCO の推定に寄与する波長を探索する . NDSI は , 任意の 2 波長から算出する指標であり  $-1 < \text{NDSI} < 1$  の範囲で正規化する (Qui *et al.*, 1994) . NDSI は , NDVI(正規化分光植生指数)という衛星からの植生を把握する為に考案されたものであり (Rouse, 1974) , 衛星からのセンシングで生じるノイズや異常値の除去ができる利点があり用いられてきた . NDSI は , 衛星からのセンシングが特定の波長情報に限られるマルチバンドセンシングから連続波長データの利用が可能なハイパースペクトルセンシングの取得が可能になったため , NDVI よりもより推定に寄与する波長帯の探索の為に考案された (Inoue *et al.*, 2008) . NDSI の特徴は , 新規の推定項目と波長探索に効果的なことである . 近年 , センシングのハードウェアは , 衛星・飛行機・ヘリコプタと多様に拡大することによりデータ取得が簡易になってきている . しかし , 取得データは , 膨大に増えたことにより , そのデータにおける重要な情報のみを選択・選抜することが求められる . 以上のことから , NDSI は , 紫外励起蛍光計測により取得した蛍光スペクトルデータから , 推定したい化学分析推定値を推定できる波長帯の

## 第4章 NDSIを用いたホットスポットの推定

選択に用いた。

以上のような背景から，この章では，RuBisCO が紫外領域の光により蛍光を放つ性質に基づき (Ceroovic *et al.*, 1999)，紫外励起蛍光の取得による RuBisCO の簡易推定を試みた。クロロフィルと RuBisCO 量の推定に有効な波長は，切断葉を暗順応させた後に紫外励起蛍光を測定し，NDSI を用いて紫外励起蛍光スペクトルを指数に置き換えて，その NDSI と化学分析値との相関関係を調べることにより求めた。

## 第4章 NDSIを用いたホットスポットの推定

### 第1節 材料および方法

材料は、普通ソバ(信濃1号)を信州大学農学部内圃場にて2009年の8月～11月まで栽培した。サンプリングは、開花期の10:00～15:00の間に行った。主茎の第4葉にあたる葉をランダムに選び、計測とした。蛍光の測定は、それぞれの葉の中央部の葉脈を避けた部位で行い、前処理として25℃条件下での暗順応を行なった。

SPAD値は、蛍光を測定する前にSPAD計(SPAD-502, コニカミノルタ, 大阪)を用いて計測した。測定葉は、蛍光を測定した後にリーフディスクとして直径7 mmのサイズにした6枚を取り出し、液体窒素の中で微粉碎した。クロロフィル測定用に、同様にリーフディスクにして3枚を採集し、96%エタノールを用いて暗黒下で2日間色素を抽出した。色素を抽出した後、クロロフィルaとクロロフィルbの濃度を測る為に、抽出液の649 nmと665 nmの吸光度を吸光度計(AE-350, 株式会社エルマ, 東京)を用いて計測した。クロロフィル濃度の測定は、Wintermans and de Mots (1965)の方法で行なった。

可溶性タンパク質の測定は、6枚のリーフディスクを液体窒素と抽出用のバッファー [i.e. 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM phenyl methanesulfonyl fluoride, 1% (v/v) 2-mercaptoethanol, and 1% (w/v) insoluble polyvinyl polypyrrolidone] の中で磨碎した(Kumagai *et al.*, 2007)。

粉碎後の抽出液は、1.5 mlサイズのエッペンドルフチューブの中に移して冷却遠心分離機の中で12000 G, 4℃, で5分間の遠心分離を行なった。可溶性タンパク質の量は、遠心分離後の上澄み液にブラッドフォード液(Bio-Rad, USA)を用いて、595 nmの吸光度を測定して求めた(Bradford, 1976)。RuBisCO濃度は、Makino *et al.* (1985)らの方法に従いSDS-PAGEによって求めた。

蛍光の測定は、普通ソバの開花期の上位にある完全展開葉を用い、30分の暗順応処理を行ってから測定した。紫外蛍光の測定システムは、紫外光を用

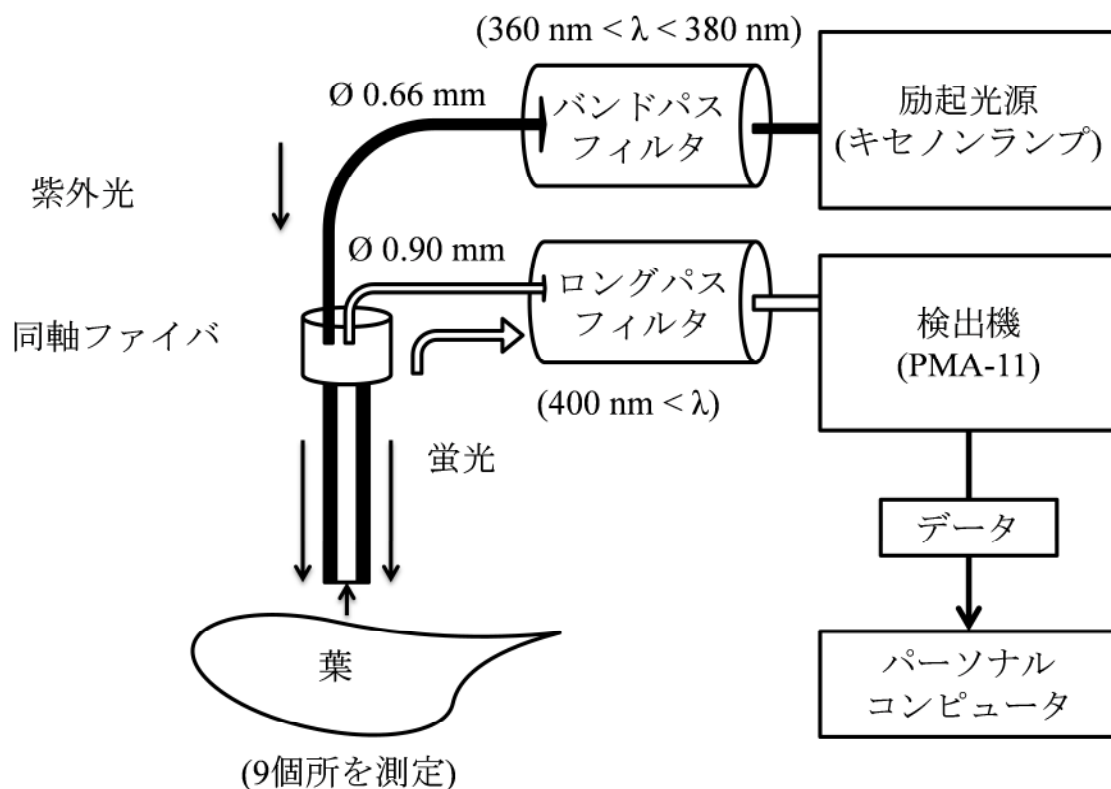
## 第 4 章 NDSI を用いたホットスポットの推定

いて励起し，検出側に励起光の影響を防ぐため，400 nm 以上を透過させるロングパスフィルタ(XUL400, 朝日分光)を介して光ファイバーで分光器に取り込むシステムである(第 4.1 図)．励起光は，キセノンランプ光源(Perfect 光源 LAX-101, 朝日分光)，と 370 nm のバンドパスフィルタ(MBXL-370, 朝日分光)を用いて紫外光を調光した．検出器は，高速分光測定機(PMA-11 (C7473-36), 浜松ホトニクス)を用いて，400-900 nm の蛍光を分光した．

1 回の蛍光の測定は，500 ミリ秒の計測を繰返し 25 回行った．一枚の葉につき 9 箇所を測定し，それぞれ異なる場所の蛍光を測定した．スペクトルの前処理は，検出機付属の基本ソフトウェア(U6039-01, 浜松ホトニクス)を使用して行った．取得スペクトルは，第 4.2 図に示す変化をするので 685 nm の蛍光強度が最大値を示した時のスペクトルをデータ解析に用いた．解析に用いるスペクトルは，1 nm 間隔で取得された原スペクトルに対して 5 移動平均値を算出した．

第 4.3 図は，蛍光スペクトルの波長間の関係をあらわす正規化指数(Normalized Difference Spectral Index =NDSI)の算出過程とその後の解析の過程を示した．NDSI は，任意の 2 波長の和と差により正規化し，検出した波長における全ての組み合わせにおいて算出した(Yao *et al.*, 2010)．計算された NDSI 行列は，各化学物質の定量値との相関行列を求め，その決定係数( $R^2$ )の算出に使用した．定量値の推定に寄与している任意の波長の組み合わせを探索した．その際の RuBisCO の定量値は，重量あたり RuBisCO 量( $\text{g g}^{-1}$ )と，葉面積あたり RuBisCO 量( $\text{g m}^{-2}$ )を用いた． $R^2$  値は， $R^2$  行列と NDSI の算出に用いた任意の 2 波長との関係を表すために，推定力  $R^2$  マトリクスを作成し，推定に有効な情報のホットスポット(定量値の推定に有効と考えられる波長帯)の視覚化に用いた．推定力  $R^2$  マトリクスは， $R^2$  の値に応じて色分けされる．推定力の高い値は黄色，中間の色は赤，低いものを青で塗り分けた．推定力  $R^2$  マトリクスは，Microsoft Excel 2007 を用いて作成した．

#### 第4章 NDSI を用いたホットスポットの推定



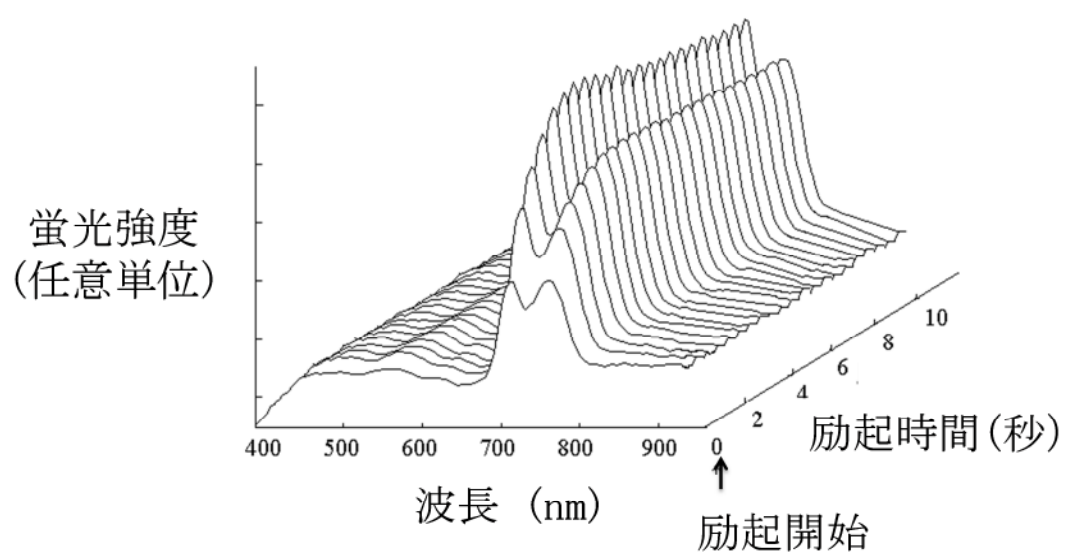
第 4.1 図 紫外励起蛍光におけるシステム図 .

キセノンランプの仕様 出力 : 100 w . 照度  $20.0\text{ mw cm}^{-2}$  .

バンドパスフィルター 半値幅 : 10 nm .

同軸ファイバーのコア数 照射口数 : 1 . 検出口数 : 12 .

## 第4章 NDSIを用いたホットスポットの推定



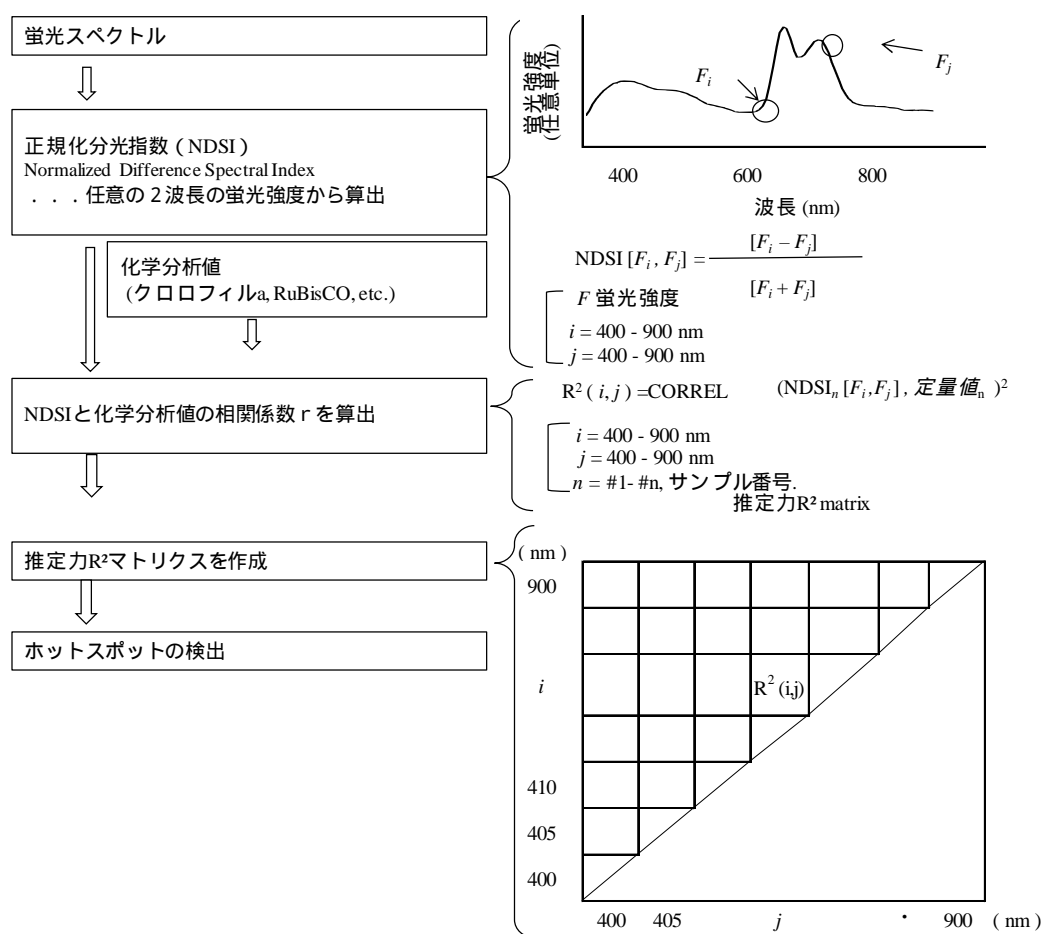
第 4.2 図 スペクトルの時間変化 .

励起波長 : 370 nm . 測定波長 : 400-900 nm .

露光時間 : 500 ミリ秒 . 繰り返し回数 : 30 回 .

測定時間 : 12.5 秒 .

## 第 4 章 NDSI を用いたホットスポットの推定



第 4.3 図 NDSI の算出過程

## 第4章 NDSIを用いたホットスポットの推定

### 第2節 結果

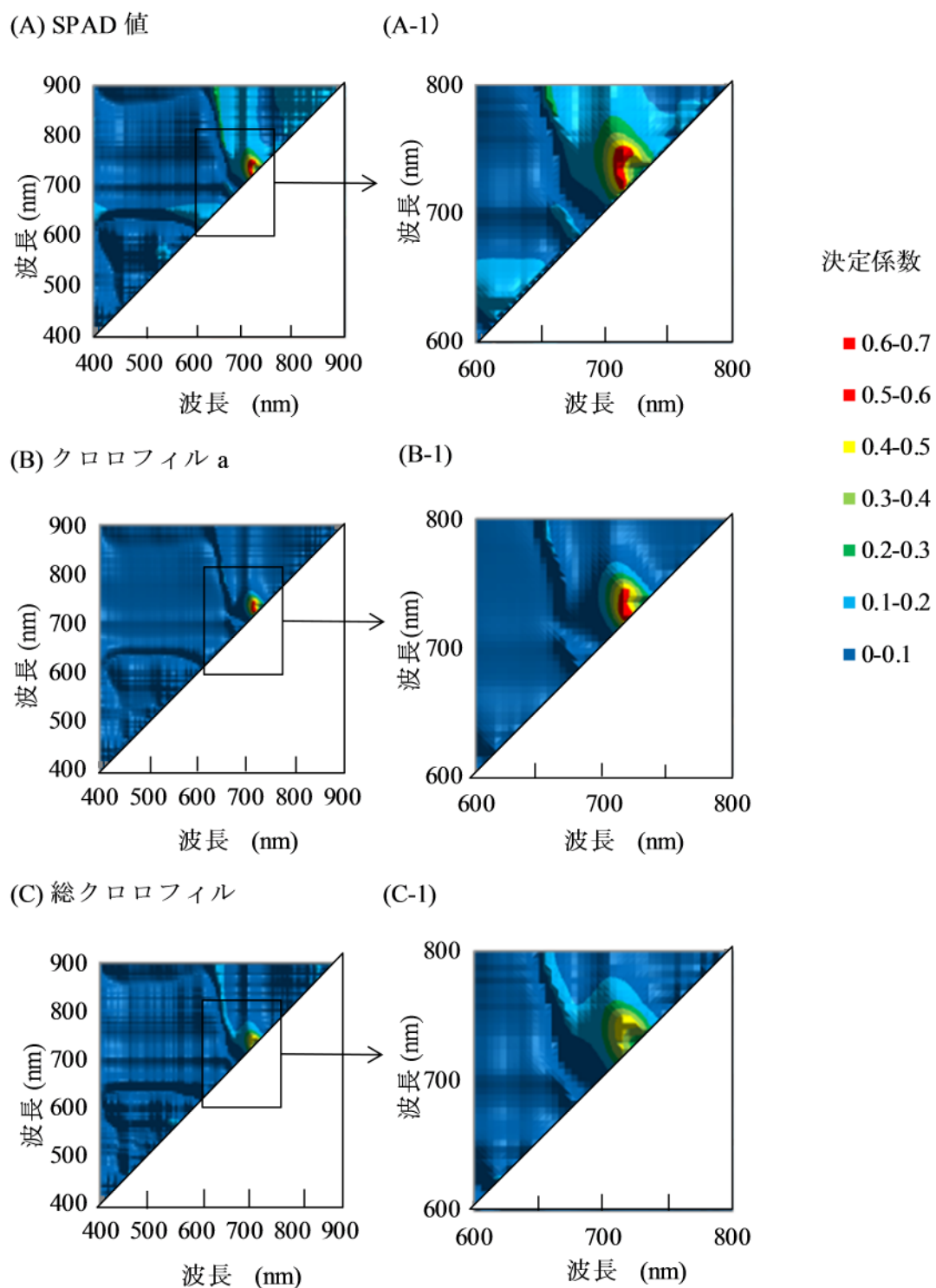
第4.4図は、クロロフィルの関連物質である SPAD 値、クロロフィル a、総クロロフィル量と NDSI 値との推定力  $R^2$  マトリクスを示した。ホットスポットは、SPAD 値が 705-735 nm と 720-755 nm、クロロフィル a が 710-725 nm と 720-750 nm に、総クロロフィル量が 705-725 nm と 725-750 nm に、0.4 以上の推定力を示した。推定力の高い波長の組合せは、SPAD 値が NDSI (715, 745)の時に  $R^2 = 0.58$ 、クロロフィル a が NDSI (715, 725)の時に  $R^2 = 0.60$ 、総クロロフィル量が NDSI (715, 745) の時に  $R^2 = 0.48$  を示した。クロロフィルに関連する項目のホットスポットは、705-755 nm の範囲で分布した。

第4.5図は、RuBisCO に関連する物質である可溶性タンパク、RuBisCO 量と NDSI 値との推定力  $R^2$  マトリクスを示した。RuBisCO のホットスポットは、決定係数が 0.2 以上となる波長帯が 670-690 nm と 695-705 nm で現れた。最も推定力がある蛍光波長の組み合わせは、NDSI (675, 700)で  $R^2 = 0.25$  であった。一方、可溶性タンパク質では、ホットスポットは、形成されなかった。

第4.6図は、クロロフィル量と RuBisCO の推定力の高かった波長帯を示した。ここで注目されるのは、相対比較すると RuBisCO の推定力が低い、クロロフィルと RuBisCO のホットスポットが異なる波長帯に検出されたことである。



## 第4章 NDSI を用いたホットスポットの推定



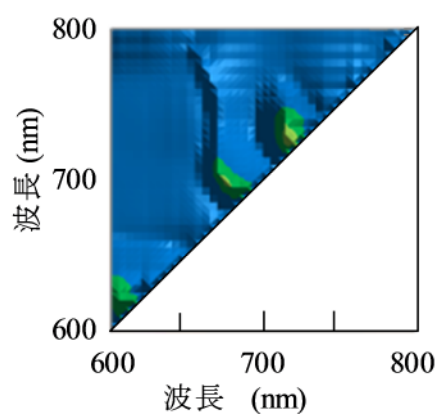
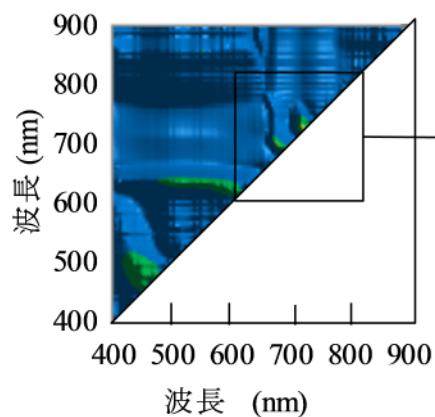
第 4.4 図 クロロフィルに関連する NDSI マップ .

(A)-(C) : 400-900 nm , (A-1)-(C-1) : 600-800 nm の決定係数 .

## 第4章 NDSI を用いたホットスポットの推定

(A) 可溶性タンパク質

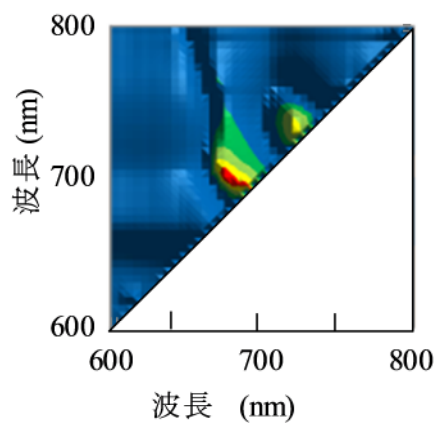
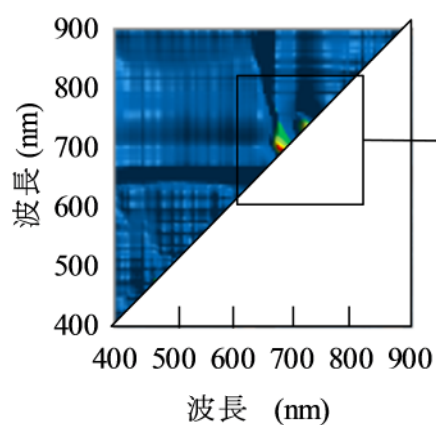
(A-1)



決定係数

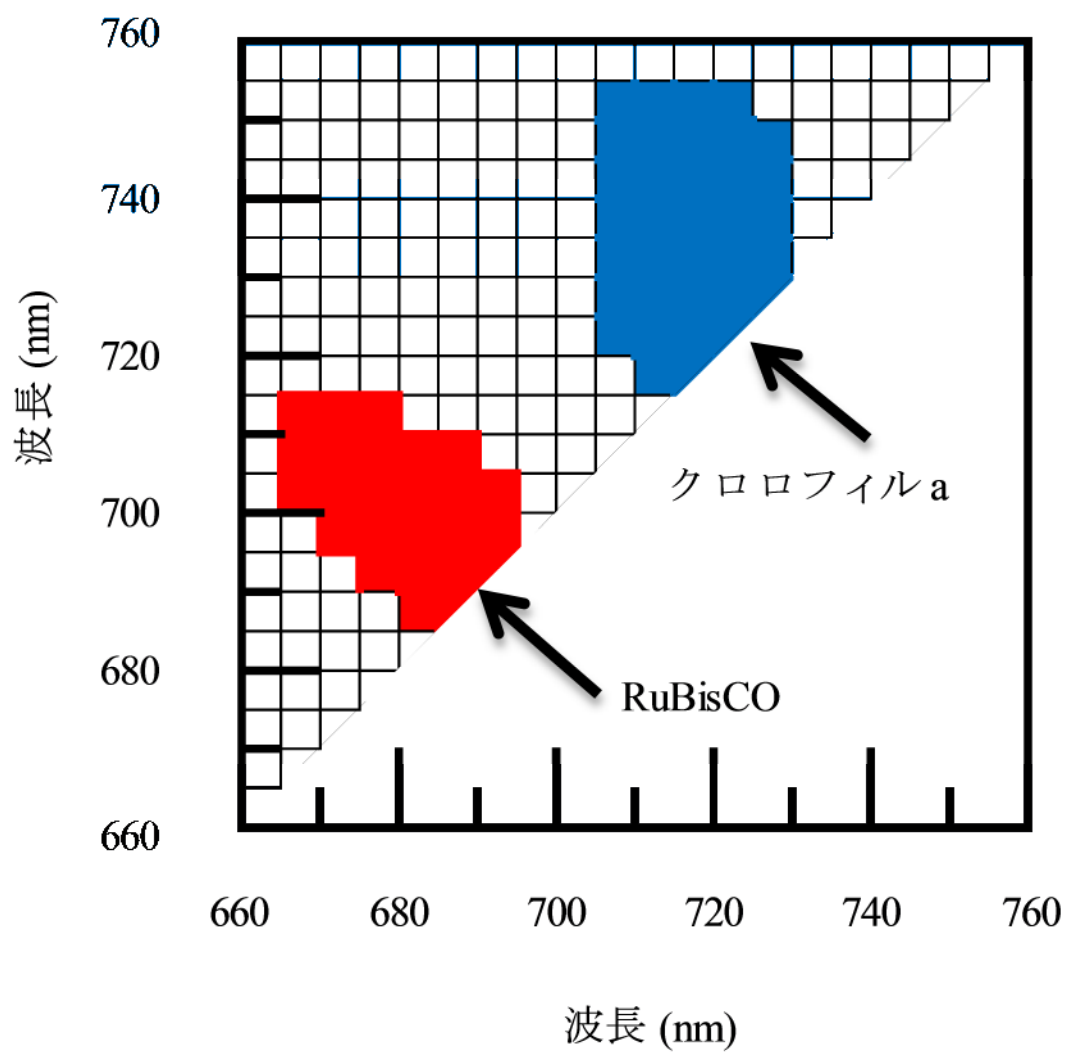
(B) RuBisCO

(B-1)



第 4.5 図 RuBisCO に関する NDSI マトリクス .

(A)-(B) : 400-900 nm , (A-1)-(B-1) : 600-800 nm の決定係数 .



第 4.6 図 ホットスポットの分布 .

クロロフィル a :  $R^2 > 0.5$  , RuBisCO :  $R^2 > 0.25$  , を示す波長帯  
を図示 .

## 第4章 NDSIを用いたホットスポットの推定

### 第3節 考察

紫外励起計測方法は、第4.6図で示すように決定係数が劣るもののRuBisCOの情報とクロロフィルの情報を異なる波長帯を用いて区別することができた。クロロフィルの推定に寄与する波長帯は、715-740 nmの蛍光強度からなるNDSI群である。またRuBisCOの推定に寄与する波長帯は、665-680 nmのクロロフィルと異なる波長帯に形成した。この結果は、新しい知見であり、解析や分析の方法の向上によりRuBisCO量の簡易推定を可能にすると考えられた。それぞれの波長帯が関与する生理的な構成物質は、これまでの研究結果から赤色蛍光(670-680 nm)がチラコイド膜上にある光化学系IIであり、遠赤色蛍光(730-750 nm)がチラコイド膜にある光化学系Iである。これらの知見を基にして考えられる因果関係は、クロロフィルが光化学系Iの蛍光情報に反映され、RuBisCOが光化学系IIの蛍光情報に影響されている関係である。このような関係になった理由は、いくつかの要因が考えられた。

1つ目は、RuBisCOと光化学系IIの因果関係について、明反応と暗反応の状態のバランスによって光化学系IIの蛍光に影響されることである。暗反応は、電子伝達系で合成されたNADPHとATPを消費してカルビンベンソン回路を駆動している。電子伝達系は、カルビンベンソン回路のエネルギー要求量にともない、発達すると考えられる。電子伝達系の発達は、特に起点となる光化学系IIの発達を促し、RuBisCO量を反映する蛍光へ寄与する度合いが大きくなったと考えられた。

2つ目の理由は、暗反応の速度を制御するリン酸やpHの変化が、チラコイド膜上の光化学系Iへの影響し、クロロフィル量を推定する蛍光へ反映されたことが考えられる。葉緑素内のリン酸は、暗反応のカルビンベンソン回路が単独で過剰に働き過ぎないようにフィードバック制御が行われているのだが、その際の情報物質として働く。さらに葉緑素内のpHは、ATP合成酵素

#### 第4章 NDSIを用いたホットスポットの推定

が働くことによりストロマ内に水素イオンが放出されており，ATPの生産量とpHの変動に関与している．電子伝達系の働きは，pHによっても左右される．光化学系Iは，NADPHを産生していることから，NADPHの消費量に応じて光化学系Iの量の調整が行われている．クロロフィルの量は，光化学系Iが励起されやすい状態か光化学系Iが多い状態の時に増加することが考えられる．このメカニズムは，今後詳細に確認する必要があると同時に，因果関係が分かることにより新たなセンシングの方法の開発につながると考えられる．

RuBisCOは，現在の大気環境下における二酸化炭素条件下での律速要因 (Farquhar *et al.*, 1980)であり，ソース能力の向上における改善項目と考えられている．これまで行われてきた葉色の診断やクロロフィルの簡易評価は，明反応の評価であり光環境に依存した評価である．明反応の評価は，重要であるが，光呼吸などの生理反応のために最終的な炭酸固定量と一致しないため，光合成速度の推定としての限界がある．RuBisCO量の簡易推定は，これまで知りえなかった窒素栄養のモニタリングを可能とし，栽培・育種への利用が可能になることにより窒素利用効率の向上に役立てることができる．

一方で，普通ソバの葉の青緑色蛍光は，赤色や遠赤色蛍光に比べて弱く検出されるため，NDSIによる化学分析値の推定に寄与しなかったと考えられた．この青色蛍光が弱く検出される要因は，普通ソバの葉がUV吸収に優れているとクレフトらの報告があり (Kreft *et al.*, 2003)，励起光を弱める働きによりクロロフィル蛍光が弱くなったことが一つの要因と考えられた．また，普通ソバの葉では，表皮にポリフェノールやタンパク質を多く形成する性質を持つと報告されている (Suzuki *et al.*, 2005)．これらの物質は，青緑色蛍光の波長帯の蛍光の二次吸収に関与している (Moya *et al.*, 1992) と報告されている．NDSIを用いた分析では，二次吸収の影響が反映されることはなかった．NDSIと可溶性タンパク質含量には高い相関関係が認められなかったが，推

## 第4章 NDSIを用いたホットスポットの推定

定力  $R^2$  マトリクスにおいては青緑色蛍光の波長帯に蛍光指紋が観察できたことから、何らかの因果関係があるように考えられた。

紫外励起蛍光計測は、既存の蛍光パラメータと RuBisCO 量の同時推定の可能性が示唆された。現在の光合成速度の測定方法では、ガス交換速度の測定や、成分分析に用いる化学物質が大量に消費される問題がある。紫外励起蛍光計測は、グリーンケミストリの観点からも、環境負荷の少ない光による多項目・同時計測という意義のある手法である。

今後の展望は、光計測の利点を活かし、衛星を利用した遠隔センシングから生態学・栽培管理、本実験の様な近接センシングによる生理生態機構の解明に期待できる。これまでの診断技術は、関連する光計測技術の進歩とともに、簡便化や深化が進んできた。紫外励起蛍光法による RuBisCO の推定は、今後の光学や分光光学の発展により、複数の波長の情報を同時に利用する技術・解析手法を用いて推定力の向上が期待できるだろう。

本章は、紫外励起蛍光スペクトルと化学分析項目と関連の深い波長帯の選抜を行なった。次章では、ホットスポットの情報をを用いて定量性の検証を行う。

### 第5章 ケモメトリクスによる RuBisCO 含量の推定

前章では，NDSI により蛍光スペクトルを指数化することで，クロロフィルと RuBisCO の含量と関係のある波長帯が明らかになった(Sekinuma and Inoue, 2013b)．本章は，その波長帯の蛍光情報を用いて光合成関連物質含量の推定を試みる．非破壊計測による定量推定は，圃場レベルでの継続的な評価を可能にし，新しい栽培方法の模索や，育種の特性評価などの時間や労力の節約ができ，様々な発展に寄与できると考えられる．推定の方法は，NDSI による関連性の波長帯を用いて統計解析により検討した．

統計解析は，ケモメトリクス(Chemometrics:計量化学)において開発・利用が行われている Partial least squares (PLS)回帰法(Wold, 2001)というモデル化の手法を用いた．PLS 回帰分析は，スペクトル定量分析法の中で PCR 法と並んで最も有名で，利用される頻度の高いものであり，スペクトルと濃度の誤差を別々にモデル化すべきものという考え方に基づくモデル化手法である(長谷川, 2005)．つまり，PLS 回帰分析は，スペクトルから濃度の推定に用いるのに優れた手法である．

本章では，紫外励起蛍光スペクトルの原スペクトル，一次微分スペクトル，原スペクトルを NDSI へ変換したデータ群を用いて，光合成に関連する化学分析項目 5 項目とそれらの値から算出した 5 項目の比率の計 10 項目の定量的な推定を試みた．

## 第 5 章 ケモメトリクスによる RuBisCO 含量の推定

### 第 1 節 材料および方法

材料と蛍光計測の測定項目およびその方法は，第 4 章と同様である．

蛍光スペクトルの前処理や解析の方法は，第 5.1 図に示した．まず，原スペクトルは，検出器の付属ソフトウェア(U6039-01)を用いて，計測スペクトルに対して，波長間隔を 5 nm 間隔，移動平均を 5 m 間隔で算出し，400-900 nm にわたって 5 nm 間隔に蛍光強度値を持つスペクトルを作成した．さらに，一次微分スペクトルは，ソフトウェア上における微分処理機能を用いて算出した．

情報圧縮のために，原スペクトルは，NDSI の算出にも用いられた．NDSI は，全ての任意の波長の 2 組の比率を計算したものである(Inoue *et al.*, 2008)．また，化学分析値と関係のある蛍光波長帯であるホットスポットを探すために有効である．定義は，以下の式のとおりである．

$$\text{NDSI} [F_i, F_j] = \frac{F_i - F_j}{F_i + F_j}$$

それぞれ  $F_i$  と  $F_j$  は，波長  $i$  と  $j$  における蛍光強度を表す．

NDSI は，全ての 2 組の波長の組み合わせにおいて算出され，その範囲は，400-900 nm の範囲の全ての組み合わせで算出される．NDSI を構成する 2 波長に対応する NDSI 値を総当り表のように表現したものを NDSI マトリクスと呼ぶ．NDSI マトリクスは，推定力を示す決定係数を，NDSI を構成する波長に対応したマトリクス状に配置することにより視覚的に有益な情報網を探索する際に有効(Yao *et al.*, 2010)と報告されている．本章では，第 4 章で明らかにしたホットスポット群のデータを今後の解析に用いることとした．第 5.1 表表は，本章の解析に用いる NDSI と化学分析値との間の決定係数( $R^2$ )を表した推定力  $R^2$  マトリクスで明らかにな

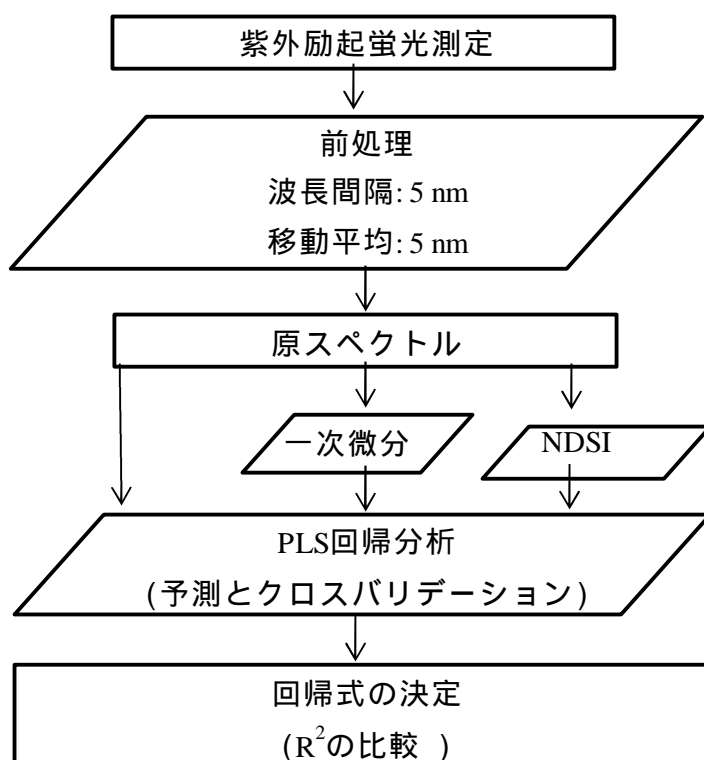


## 第5章 ケモメトリクスによる RuBisCO 含量の推定

った化学分析項目とホットスポットを構成する波長情報を示した。ホットスポットは、総クロロフィル量が 29 個の NDSI から構成され、可溶性タンパク質が 141 個の NDSI で構成され、RuBisCO 量と関連の高いホットスポットが 78 個の NDSI から構成されている。これらの NDSI の情報を用いて PLS 回帰分析をおこなった。

PLS 回帰分析は、パソコンの表計算ソフトのエクセル(Microsoft Excel 2010, Co. USA)上で解析を行うプログラム・エクセル多変量解析(Excel 多変量解析 Ver. 6.0, 株式会社エスミ, 東京)を用いた。

PLS 回帰分析は、説明変量と目的変量の両方で変数の圧縮を行い、この両者のスコアを用いて重回帰分析を行う(尾崎ら, 2002)。全波長のスペクトルデータを用いて解析を行う。PLS 回帰分析の特徴は、説明変量と目的変量の双方に主成分分析による直行分解を適用することである。PLS 回帰では、重回帰分析で生じる選択した波長以外での情報の欠落を防いだり、選択した情報がオーバーラップしたりする問題に対処することができる。潜在変数の決定は、データ数が十分でないことから、得られたデータ内でトレーニングサンプルとテストサンプルを交互に変えて計算を行う内部バリデーション法(クロスバリデーション: Cross validation)を用いた。具体的な手順は、説明変数のデータセットを蛍光スペクトル群としてスコア(潜在変数)を算出し、そのスコアへの回帰を行う。回帰モデルに含まれるスコアの数決定は、クロスバリデーションによって行われる。最適なモデルは、予測誤差が最小となる時であり、その時の潜在変数の数が最小になるように選択した。PLS のモデルの選択は、モデルの当てはまり度を判断する基準になる赤池情報量基準(AIC)も用いた(Akaike, 1973)。



第 5.1 図 スペクトルの前処理と解析までの流れ .

PLS 回帰 : Partial least squares 回帰分析法 .

NDSI : 正規化分光指数を算出後 , 化学分析項目との相関関係を求め , 相関の高いホットスポット群を解析に用いた .

## 第 5 章 ケモメトリクスによる RuBisCO 含量の推定

第 5.1 表 化学分析値におけるホットスポットの情報 .

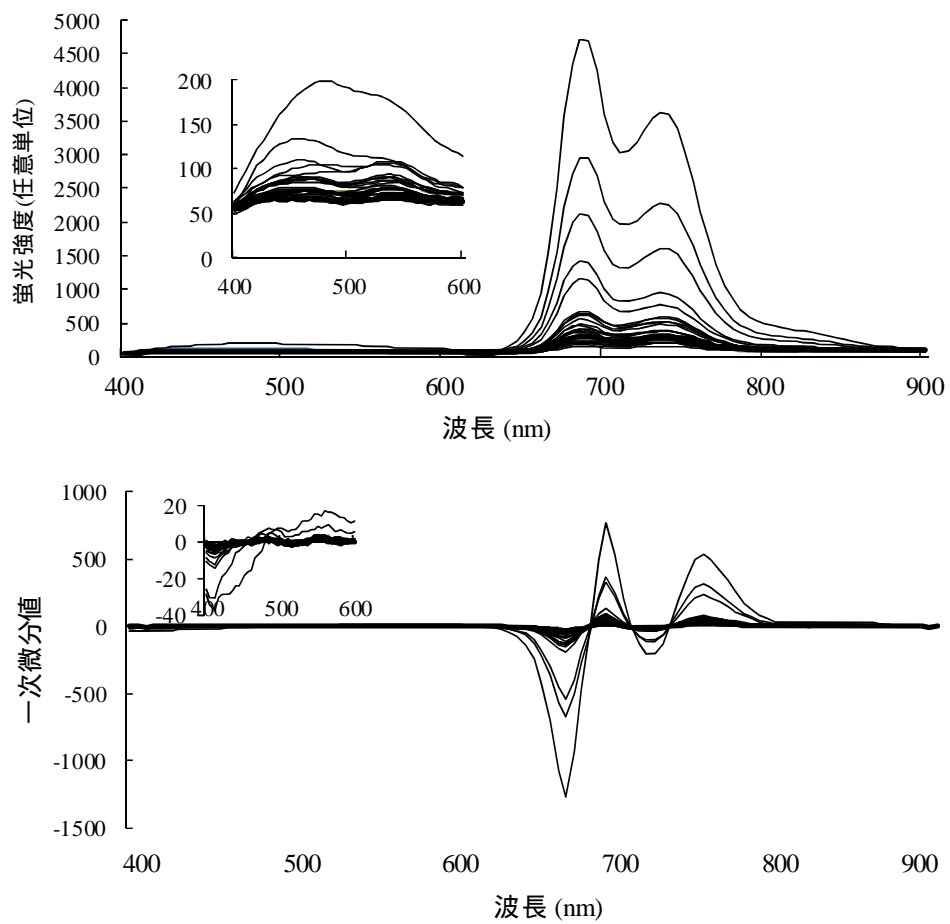
項目	NDSIマトリクスにおけるホットスポットの分布	
	X 軸 (nm)	Y 軸 (nm)
総クロロフィル	705–725	725–750
可溶性タンパク (SP)	600–635, 670–690, 715–720	600–650, 695–705, 720–740
RuBisCO	660–720	670–710

## 第5章 ケモメトリクスによる RuBisCO 含量の推定

### 第2節 結果

第 5.2 表は , PLS 回帰分析に用いる化学分析結果を示した .

紫外励起蛍光スペクトルは , 650-800 nm にかけてサンプル間差があつて最低値と最高値では 30 倍の違いがあり , 一次微分したスペクトルでは 680 nm において最低値と最高値の 3 倍の違いがある(第 5.2 図) . PLS 回帰のデータセットは , いずれも NDSI のホットスポットを用いることで高い推定力を示した(第 5.3 表) . 可溶性タンパク質の推定は , 決定係数が最大でも  $R^2=0.364$  と低く , 精度が低い(第 5.3 表) . 可溶性タンパク質あたりの総クロロフィル量の推定は ,  $R^2=0.820$  と可溶性タンパク質よりも高い推定力を示した(第 5.3 表(A)) . 個別の物質の推定は , クロロフィル a では  $R^2=0.876$  を示した(第 5.3 表 B) . 明反応に関連する物質の推定は , クロロフィル b とクロロフィル ab 比では低い推定力となった(第 5.3 表) . 暗反応に関連する RuBisCO 量の推定精度は , クロロフィル a に比べると低くクロロフィル b よりも高い  $R^2=0.494$  を示した(第 5.3 図.(C)) . RuBisCO / 可溶性タンパク質の推定精度は , RuBisCO 量よりも高い  $R^2=0.739$  を示した(第 5.3 図. (D)) , RuBisCO/総クロロフィルや RuBisCO/総クロロフィルの推定精度は , RuBisCO/可溶性タンパク質には劣るが ,  $R^2=0.460$  , 0.445 を示した(第 5.3 図 (F)) .



第 5.2 図 普通ソバにおける紫外励起蛍光スペクトル .

上段：原スペクトル .

下段：一次微分スペクトル .

## 第5章 ケモメトリクスによる RuBisCO 含量の推定

表 5.2 表 普通ソバの化学分析値 .

項目	単位	平均値	標準偏差	範囲		変動係数
				最小	最大	
可溶性タンパク質	$\text{g m}^{-2}$	1.62	0.59	0.50	2.84	36.5
総クロロフィル	$\text{g m}^{-2}$	0.33	0.04	0.25	0.45	13.3
総クロロフィル/可溶性タンパク質	-	0.24	0.12	0.16	0.50	48.8
クロロフィル a	$\text{g m}^{-2}$	0.23	0.03	0.19	0.28	11.7
クロロフィル b	$\text{g m}^{-2}$	0.10	0.03	0.06	0.24	30.6
クロロフィル a/クロロフィル b	-	2.40	0.41	1.16	2.89	16.9
RuBisCO	$\text{g m}^{-2}$	0.22	0.11	0.08	0.47	48.3
RuBisCO/可溶性タンパク質	-	0.14	0.07	0.10	0.18	45.2
RuBisCO/総クロロフィル	-	0.67	0.30	0.30	1.06	45.2
RuBisCO/クロロフィル a	-	0.94	0.41	0.41	1.67	43.5

サンプル数：n=30

## 第5章 ケモメトリクスによる RuBisCO 含量の推定

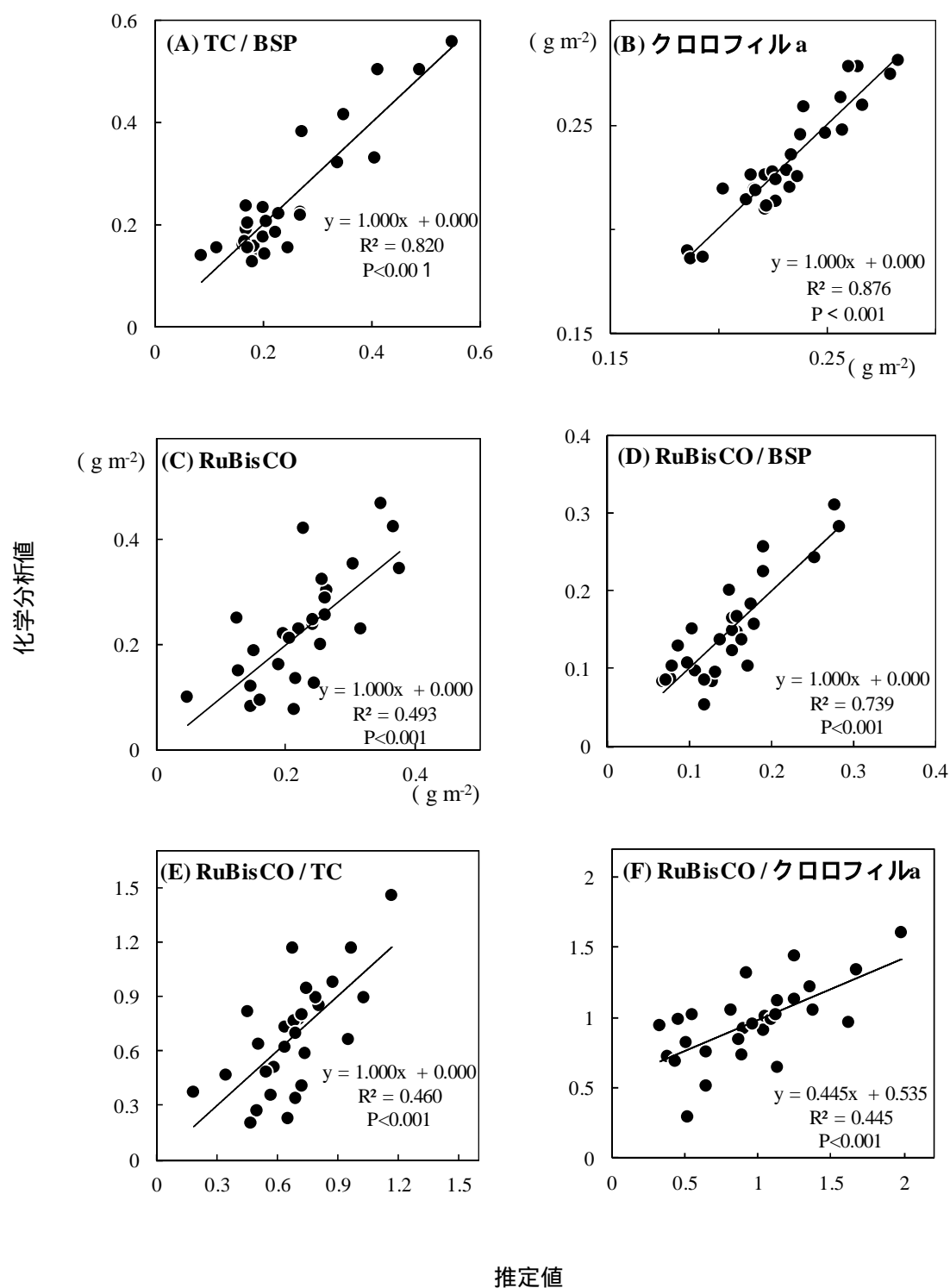
第 5.3 表 化学分析値の PLS 分析による推定力一覧 .

光合成に関連する項目	データ処理	PLS回帰分析の結果				推定力の 高い結果
		潜在変数	クロスバリデーション 後の標準誤差	R <sup>2</sup>	AIC*	
可溶性タンパク質(BSP) (g m <sup>-2</sup> )	原スペクトル	4	10.48	0.364	50.2	
	一次微分	1	10.59	0.055	56.1	
	NDSI(TC)	1	10.84	0.046	56.4	
	NDSI(BSP)	4	10.94	0.329	51.8	
	NDSI(RuBisCO)	4	10.78	0.262	54.7	
総クロロフィル(TC) (g m <sup>-2</sup> )	原スペクトル	4	0.06	0.420	-108.6	
	一次微分	4	0.05	0.366	-106.0	
	NDSI(TC)	4	0.03	0.561	-117.0	
	NDSI(BSP)	8	0.03	0.738	-124.5	+
	NDSI(RuBisCO)	5	0.03	0.563	-115.1	
TC / BSP (Rate)	原スペクトル	4	0.39	0.276	-42.1	
	一次微分	2	0.39	0.230	-44.3	
	NDSI(TC)	3	0.47	0.173	-40.1	
	NDSI(BSP)	2	0.49	0.098	-39.5	
	NDSI(RuBisCO)	9	0.35	0.820	-73.9	+ A
クロロフィル a (g m <sup>-2</sup> )	原スペクトル	1	0.02	0.046	-129.7	
	一次微分	2	0.02	0.198	-136.9	
	NDSI(TC)	6	0.01	0.876	-192.8	+ B
	NDSI(BSP)	8	0.01	0.856	-188.5	
	NDSI(RuBisCO)	6	0.01	0.771	-174.5	
クロロフィル b (g m <sup>-2</sup> )	原スペクトル	4	0.03	0.083	-118.4	
	一次微分	4	0.03	0.188	-119.1	
	NDSI(TC)	1	0.03	0.122	-122.7	
	NDSI(BSP)	6	0.03	0.287	-130.9	
	NDSI(RuBisCO)	1	0.03	0.054	-122.5	
クロロフィル a/クロロフィル b (Rate)	原スペクトル	2	5.14	0.104	33.8	
	一次微分	1	5.19	0.043	33.7	
	NDSI(TC)	2	4.80	0.152	32.1	
	NDSI(BSP)	1	4.74	0.082	32.5	
	NDSI(RuBisCO)	1	4.79	0.084	32.4	
RuBisCO (g m <sup>-2</sup> )	原スペクトル	2	0.33	0.163	-48.9	
	一次微分	1	0.34	0.002	-45.7	
	NDSI(TC)	2	0.32	0.205	-50.4	
	NDSI(BSP)	4	0.25	0.462	-58.2	
	NDSI(RuBisCO)	4	0.26	0.494	-60.0	+ C
RuBisCO/BSP (Rate)	原スペクトル	1	0.12	0.092	-78.0	
	一次微分	1	0.12	0.087	-77.8	
	NDSI(TC)	1	0.13	0.016	-75.6	
	NDSI(BSP)	1	0.12	0.063	-77.1	
	NDSI(RuBisCO)	8	0.09	0.739	-101.4	+ D
RuBisCO/TC (Rate)	原スペクトル	2	2.30	0.262	9.7	
	一次微分	2	2.79	0.177	13.0	
	NDSI(TC)	2	2.81	0.136	14.4	
	NDSI(BSP)	4	2.10	0.433	5.8	
	NDSI(RuBisCO)	4	2.13	0.460	4.3	+ E
RuBisCO/クロロフィル a (Rate)	原スペクトル	2	4.37	0.243	28.9	
	一次微分	2	5.06	0.192	30.9	
	NDSI(TC)	2	5.24	0.126	33.2	
	NDSI(BSP)	4	3.98	0.421	24.9	
	NDSI(RuBisCO)	4	4.20	0.445	15.6	+ F

R<sup>2</sup> : 決定係数 . AIC : 赤池情報量基準 .

NDSI ( ) : 第 5.1 表参照 . NDSI に続く ( )内は , 関連する化学分析項目 .

## 第 5 章 ケモメトリクスによる RuBisCO 含量の推定



第 5.3 図 測定値と PLS 回帰分析による計算値の相関関係。

(A)-(F)の記号は,第 5.3 表に対応する。



### 第3節 考察

葉の栄養診断技術は、第1章で述べたように、色彩の評価、反射分光、蛍光計測と進歩してきた。紫外励起蛍光計測は、従来から行われているクロロフィル量の測定と RuBisCO 量の推定が初めて非破壊かつ簡易・同時測定が可能と考えられた。この結果における、クロロフィル量の推定は、これまでのリモートセンシング(Saito *et al.*, 2005)と同様に当てはまりがよく実用的と考えられた。他方、クロロフィル b の推定は、クロロフィル b が紫外領域に吸収帯を持たないため(Mimuro *et al.*, 2011)、蛍光の二次吸収による蛍光情報のみであるため推定できなかったと考えられた。RuBisCO 量の推定は、光化学系 II 由来の波長帯を含む、[660-720, 670-710]の 60-40 nm 幅の蛍光値から算出される NDSI 群に絞ることによって、相対的に推定できたと考えられた。

RuBisCO は、葉身窒素量に応じて RuBisCO のカルボキシラーゼ活性と光合成速度が上昇すると報告されている(Evans, 1983)。光化学系 II の波長帯の NDSI 群が高い推定力を示した理由は、窒素資源量が増加することで RuBisCO 活性をあげ、光化学系 II の構成物質であるクロロフィル量も増加したことが一因と考えられる。

さらに前処理において、NDSI のデータセットは、微分処理よりも推定力が高く、多くの項目で最も当てはまりがよい結果となった。NDSI のような簡単な演算によって高い推定力が得られたことは、計測機器の開発の観点から見れば利点と考えられた。

作物における生産性は、クロロフィル量と RuBisCO 量の比率を光合成速度と比較することにより、葉の特徴や品種の特性を明らかにし評価してきた(Kumagai *et al.*, 2009)。RuBisCO 量の簡易推定は、光呼吸や CO<sub>2</sub>を固定する暗反応の生理情報を簡易に取得することを意味する。RuBisCO/総クロロフィルなどの指標は、構成物質の量的な働きと関連が深いと考えられ、光呼吸を反映

## 第5章 ケモメトリクスによる RuBisCO 含量の推定

した作物の生産性のモデルを作って診断することに用いることが可能なパラメータと考えられた。

光合成速度は、 $\text{CO}_2$  濃度や温度により変化する。また、光合成は、水欠乏の条件において光合成速度が低下する (Ortiz-Lopez *et al.*, 1991)。これまで、 $\text{C}_3$  植物は、葉気温差などの気孔開度の評価により水ポテンシャルの評価が行われてきた (Kuraishi *et al.*, 1981)。これらの結果を踏まえると、RuBisCO 量という生理要因の簡易推定は、これまで利用することができなかったパラメータが増加することにより、光合成の動的モデルの作成が期待できると考えられた。

紫外励起蛍光による診断は、従来の育種方法に新しい評価項目を加えることと育種期間の短縮に有効であると考えられた。これまでの育種は、緑の革命に代表される、形態に着目した評価が行われてきた (Peng and Kush, 2003)。現在は、 $\text{C}_3$  回路に  $\text{C}_4$  回路の導入を試みる研究が行われている。紫外励起蛍光による非破壊計測は、育種した新系統の評価 (特性検査) 項目として有効に活用できると考えられた。

本章は、紫外励起蛍光計測による暗反応の鍵物質の栄養診断へ活用する可能性を示した。タンパク質の蛍光情報は、レーザー励起のように強力な励起光源を用いることで検出が容易になるので、推定精度の向上が期待される。また、紫外励起蛍光計測は、光計測の利点を活かした二次元分布の測定により、局在性を明らかにしていくなどの応用の可能性も考えられる。

## 第6章 レーザーとキセノン光源による紫外励起蛍光スペクトルの比較

植物の栄養診断技術は、従来の化学分析から分光測光技術を用いた非接触・非破壊・即時診断へと高度化し、継続的に取得することが可能になってきた。中でも、蛍光を用いた非破壊計測法は、PAM方式による自然光下での測定(Schreiber *et al.*, 1986.)や、リモートセンシング分野のレーザー励起蛍光(Laser induced fluorescence: LIF)法によるクロロフィル濃度の推定(Saito *et al.*, 2005)と活用されている。

蛍光計測は、励起光源のエネルギーや波長により得られる蛍光情報が異なる(Lenk *et al.*, 2006)。そのため、クロロフィル蛍光は、クロロフィルの最大吸光度を示す波長を用いて励起するのが一般的である。また、蛍光測定システムは、優れた診断技術である一方でコストが高いことが問題であり、光源とフィルタを用いて励起ユニットを安価にしたシステムから、レーザー光源を用いた高価なシステムまで様々なものが存在する。これらの光源と光質の違いは、蛍光スペクトルにどのような影響を与えるかはっきりはしていない。

これまで、著者らはキセノン光源による紫外励起蛍光分析を試みて、普通ソバの葉におけるクロロフィルや RuBisCO 量が推定可能なことを報告してきた(Sekinuma and Inoue, 2013a)。ここでは、励起力の向上と単波長光による精密な情報の取得が期待される紫外レーザー励起蛍光による栄養診断法を確立するため、励起光源の違いが普通ソバの葉における蛍光スペクトルに及ぼす影響を検討した。

## 第6章 レーザーとキセノン光源による紫外励起蛍光スペクトルの比較

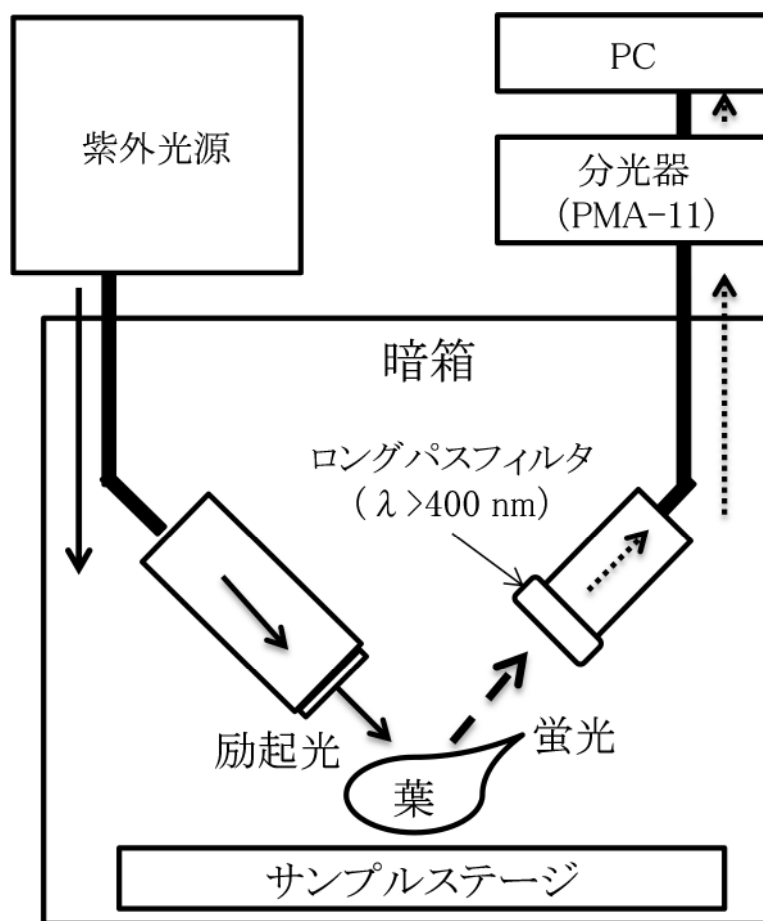
### 第1節 材料および方法

供試した普通ソバの品種は、信濃1号である。播種は、8月5日にワグネルポットに行い、ガラスハウス内で適宜灌水し栽培した。ワグネルポット内に3個体を生育させ、硫酸を用いて窒素水準を  $4 \text{ g m}^{-2}$  として、3反復で試験を行った。

蛍光の測定は、普通ソバの開花期の上位にある完全展開葉を用い、30分の暗順応処理を行ってから測定した。紫外蛍光の測定システムは、紫外光を用いて励起し、検出側に励起光の影響を防ぐため、400 nm 以上を透過させるロングパスフィルター(XUL400, 朝日分光)を介してから光ファイバーで分光器に取り込むシステムである(第6.1図)。紫外励起蛍光システムは、励起光源としキセノンランプ光源(perfect光源, LAX-101, 朝日分光)、と370 nmのバンドパスフィルタ(MBXL-370, 朝日分光)からなる。

紫外レーザー励起蛍光システムは、励起光源を中心波長が375 nmの紫外パルスレーザー(ピコ秒ライトパルサ PLP-10-038, 浜松ホトニクス)、検出器に高速分光測定機(PMA-11, C7473-36, 浜松ホトニクス)を用いて、400-900 nmの光を分光した。また、励起光の影響を防ぐため、400 nm 以上を透過させるロングパスフィルター(XUL400, 朝日分光)を介して蛍光のみを光ファイバーで分光器に取り込んだ。また、励起光は、レーザー光の出力が減衰しないようにファイバーを介さずに、斜めから照射する射入射型励起により照射した。2つのシステムの励起光源の違いは、第6.1表、第6.2図に示した。

測定条件は、500ミリ秒の計測を繰返し25回行った。スペクトルの前処理は、検出機付属の基本ソフトウェア(U6039-01, 浜松ホトニクス)を使用して行った。蛍光スペクトルの前処理は、685 nmの蛍光強度が最大値を示した時の1 nm 間隔のスペクトルに対して、5点の移動平均を算出した。また、結果では、蛍光スペクトルにおける最高強度を示す685 nmと最低強度を示す600 nmを基準に、相対蛍光強度を算出しスペクトルを示した。



第 6.1 図 紫外励起蛍光測定システムの概略図。

紫外レーザー励起蛍光計測の場合の紫外光源：

ピコ秒ライトパルサ PLP-10。

レーザーダイオードヘッド：PLP-10-038(窓出力)。

コントローラ：C10196，100 MHz 動作。

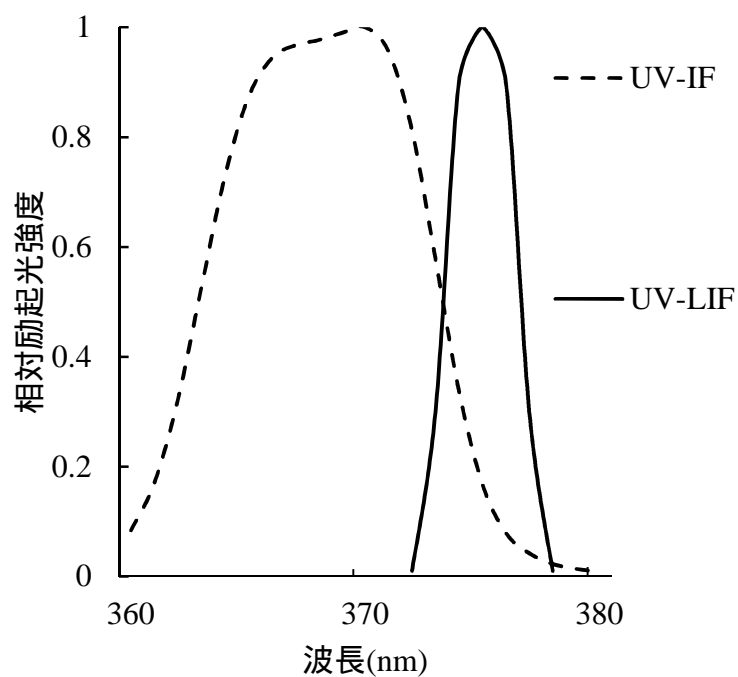
紫外励起蛍光計測の場合の紫外光源：

キセノン光源(perfect 光源，LAX-101)。

## 第6章 レーザーとキセノン光源による紫外励起蛍光スペクトルの比較

第 6.1 表 励起光の特性 .

	励起光源	中心波長	半値幅	出力	
紫外励起蛍光分析 (UV-IF)	キセノン光源	370 nm	$\pm 10$ nm	140 $\mu$ w	連続光
紫外レーザー励起分析 (UV-LIF)	半導体レーザー	375 nm	$\pm 3$ nm	5 mw	パルス光



第 6.2 図 励起光源の波長特性 .

UV-IF：キセノン光源の光をバンドパスフィルタにより調光 .

中心波長は , 370 nm .

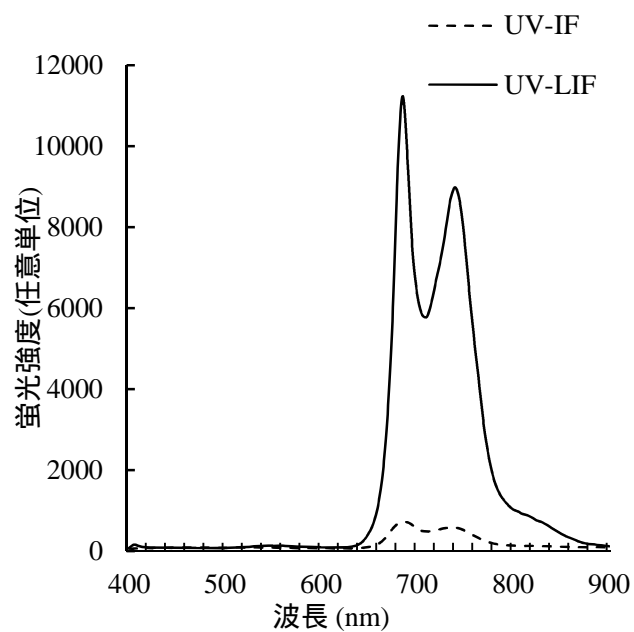
UV-LIF:中心波長は , 375 nm .

## 第6章 レーザーとキセノン光源による紫外励起蛍光スペクトルの比較

### 第2節 結果

第 6.3 図は，紫外励起蛍光スペクトルと紫外レーザー励起スペクトルの原スペクトルを示した．原スペクトルは，レーザー励起することで 685 nm の蛍光強度が強く検出できた．

第 6.4 図は，波形特性の比較のために，普通ソバの葉における紫外励起蛍光スペクトルと紫外レーザー励起蛍光スペクトルの違いを，蛍光強度の最大値を示す 685 nm と最低値を示す 600 nm を基準に 2 つの相対値を算出して示した．600 nm を基準にした際の比較では，紫外レーザー励起蛍光により 680 nm の蛍光を強く検出できた．一方で，400-500 nm における蛍光スペクトルのピークは，相対的に低いため，紫外励起蛍光計測の 685 nm に対する相対値を算出した際にのみピークと認識できた(第 6.4 図 A)．685 nm と 740 nm の蛍光強度は，紫外レーザー励起蛍光計測により強い蛍光強度で検出できた(第 6.4 図 B)．



第 6.3 図 普通ソバの紫外励起蛍光スペクトル .

植物種(品種) : 普通ソバ(信濃 1 号) .

栽培環境 : ガラスハウス内ワグネルポット(1/2000 a) .

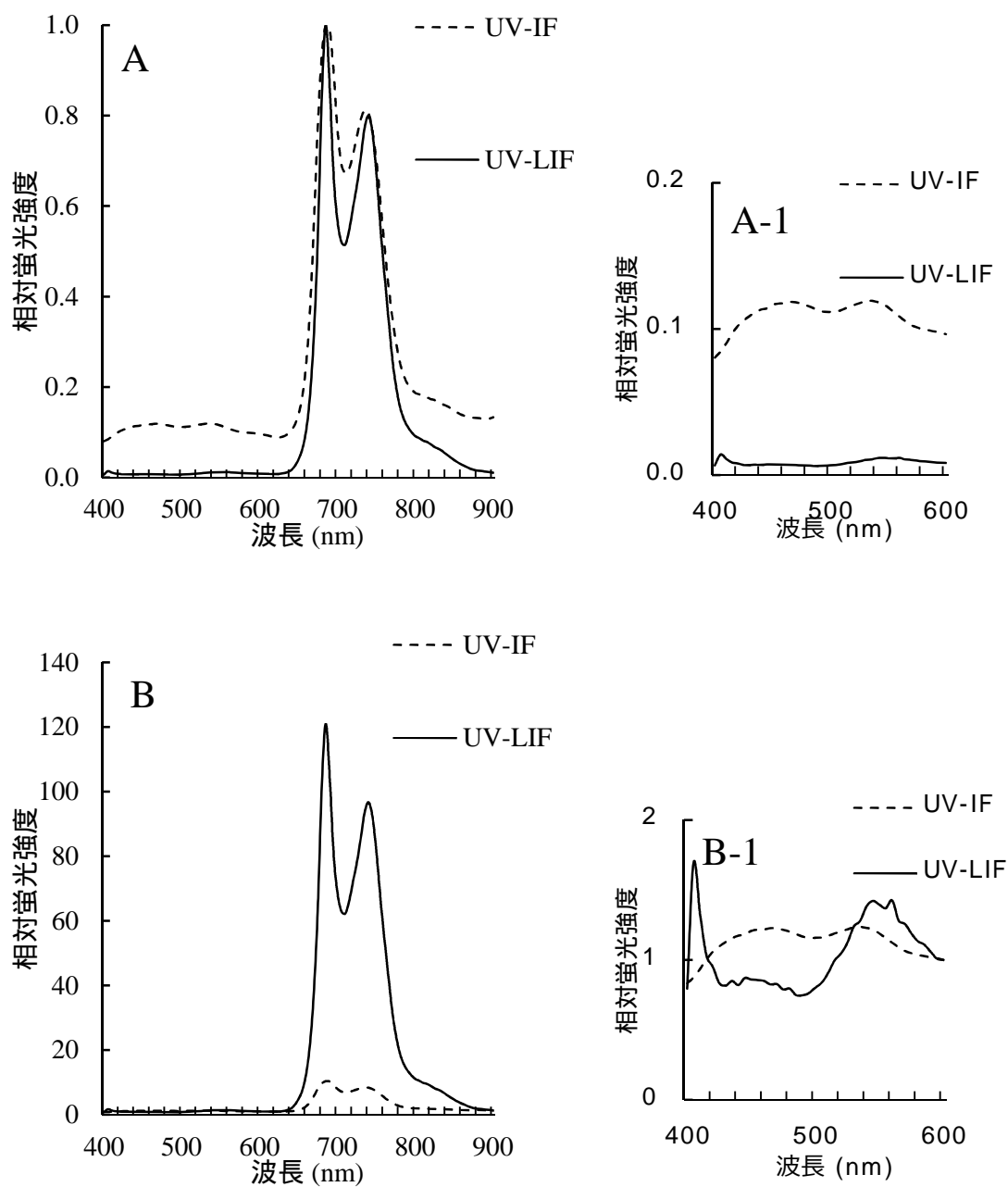
窒素施用量 :  $4 \text{ g m}^{-2}$  .

計測時期 : 開花期 . 測定部位 : 完全展開葉 .

暗順応時間 : 30 分 .

スペクトル処理 : 原スペクトル .





第 6.4 図 普通ソバの葉の励起光源の違いによる蛍光スペクトルの例 .

A : 685 nm の蛍光強度を 1 として相対蛍光強度を算出 .

B : 600 nm の蛍光強度を 1 として相対蛍光強度を算出 .

A-1 , B-1 はそれぞれ , 400-600 nm のデータを表示 .

### 第3節 考察

紫外レーザー励起蛍光計測は、光合成の明反応と関係の深い情報と結びつく685 nmと740 nmの蛍光強度が取得でき、その蛍光強度も比較的強かった。このように蛍光強度の高い検出性は、検出能力の低い機器による計測が可能となり、測定システムの低価格化が容易であること、バックグラウンドの様々なノイズの除去がしやすく、情報取得や前後のスペクトル処理上の利点が多いことを意味する。特に、赤色と遠赤色蛍光は、クロロフィルや二次代謝物質が励起された際の光化学系 II、光化学系 I や電子伝達系などの過剰エネルギーへの反応を敏感に検出でき、早期検出や予測などの診断精度を高められると考えられた。また、紫外レーザー励起蛍光計測は、普通ソバの400-550 nmの蛍光が得にくい、この波長帯における青色と緑色のピークを識別することができており(第6.4図B-1)、取得情報の多さの点から優れた方法であるといえる。紫外レーザー励起蛍光計測は、光化学系 II と光化学系 I に関連する蛍光を高効率で取得でき、二次代謝物質の情報を含む400-550 nmの蛍光の分解能を高くする有益な方法である。

以上から、紫外励起蛍光と紫外レーザー励起蛍光は、それぞれの利点があると考えられたので、利用場面による選択や併用により、前章で述べた光合成関連物質の推定に加え、新規の植物栄養状態の診断方法の開発の可能性が示唆された。

### 第7章 窒素施用が普通ソバの初期光合成に及ぼす影響

蕎麦の「蕎」の字は、「しげり盛んな様」という意味をもち、普通ソバの茎がすくすくと盛んに伸びる様を表し、早い生長と短い栽培期間を実現しうる様を漢語でよく捉えている(中林, 2008)と指摘されている。「蕎」の意味は、普通ソバの作物学的な特徴が言語として反映されている。雑草を抑えて低投入栽培が可能な普通ソバの特徴は、作物生理生態学的にも解明すべき大きな課題である。これまでの研究は、普通ソバが初期生育において特に湿害に弱いと言う報告(佐藤・杉本, 2008)があるが、普通ソバの初期生育の良さに注目した報告は少ない。そこで、普通ソバの初期生育が早い理由を普通ソバの光合成の視点から解明しようと考えた。

光合成の研究は、CO<sub>2</sub>収支を計測する光合成速度の測定に加え、クロロフィル蛍光計測によりこれまで計測できなかったストレス反応や明反応に関係する光化学系 II の評価が可能となった。特に、パルス変調 (Pulse Amplitude Modulation; PAM) クロロフィル蛍光計測(Schreiber *et al.*, 1986)は、光化学系の反応中心の大きさを推定し、ポテンシャルとしての電子伝達能力を評価できる(Schreiber *et al.*, 1998)。つまり、PAM クロロフィル蛍光は、これまで簡単に測定できなかった普通ソバの葉におけるエネルギー状況を直接把握することが可能である。

本研究では、PAM クロロフィル蛍光計測により光化学系 II の量子収率、さらに電子伝達速度を計測し、窒素施用が子葉と本葉の光合成機能、特に明反応に関する光化学系にどのように関与しているかを検討し、初期生育が早い理由の解明を試みた。

## 第7章 窒素施用が普通ソバの初期光合成に及ぼす影響

### 第1節 材料および方法

供試した品種は、「信濃1号」である。播種は10月11日にワグネルポットに3粒ずつ行ない、ガラスハウス内で適宜灌水して栽培した。窒素施肥は、硫酸を用い  $2 \text{ g m}^{-2}$  と  $4 \text{ g m}^{-2}$  の2水準に設定した。なお、試験配置は3反復乱塊法である。

葉色(SAPD値)は、蛍光を測定する際に葉緑素計(SPAD 502, コニカミノルタ)を用いて計測した。クロロフィル蛍光の測定は、本葉3枚目が展開し始めた播種後16日目における生育の中庸な個体の子葉と本葉2枚目で発育ステージに差がないとみなせる葉に対して行った。測定部位は、葉の葉脈を避けるように選んだ。子葉と本葉の蛍光は30分の暗処理を行ってから測定した。実効量子収率(Yield(II)),最大量子収率( $F_v/F_m$ )および電子伝達速度は、PAMクロロフィル蛍光測定装置(MINI-PAM, Heinz Waltz GmbH, Germany)で測定した。また、実効量子収率を用い、以下の式から電子伝達速度を算出した。

$$\text{ETR} = \text{Yield} \times 0.84 \times \text{PAR} \times 0.5$$

ETR; 電子伝達速度( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )

Yield; 実効量子収率

PAR; 光合成有効放射量( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )

MIM PAM は葉による吸収率を 0.84 とし、光化学系 II と光化学系 I によるエネルギー利用率を 1:1 として仮定して計算を行っている。

電子伝達速度の光飽和曲線は、以下の非線型モデル式に当てはめ、各パラメータを算出した。

$$y = a \cdot (1 - \text{EXP}[-bx])$$

ここで、

y; 電子伝達速度( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ),

## 第7章 窒素施用が普通ソバの初期光合成に及ぼす影響

- a ; モデル式におけるパラメータであり電子伝達速度の上限を示す係数 ,
- b ; モデル式におけるパラメータであり光合成有効放射に対する反応速度  
の変化を示す係数 ,
- x ; 光合成有効放射量( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )である .

## 第7章 窒素施用が普通ソバの初期光合成に及ぼす影響

### 第2節 結果

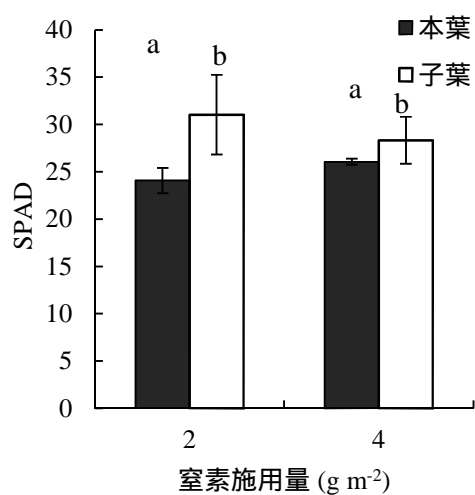
第7.1図は、窒素施用がSPAD値へ及ぼす影響を示した。窒素  $2 \text{ g m}^{-2}$  処理区における子葉のSPAD値は、31.0を示し、本葉の26.0よりも高い値を示した。4  $\text{g m}^{-2}$  処理区においても、子葉のSPAD値は、28.3を示し、本葉の24.0よりも高い値となった。一方、窒素処理による差は、見られなかった。

第7.2図は、窒素施用が実効量子収率へ及ぼす影響を示した。実効量子収率は、2  $\text{g m}^{-2}$  区において子葉と本葉が0.75となり、4  $\text{g m}^{-2}$  区において0.76を示した。なお、窒素水準及び子葉と本葉間の部位別の差の有意義は見られなかった。最大量子収率は第7.3図に示したが、これにおいても窒素水準及び子葉と本葉間の部位別の差は無く、いずれも0.76となった。

第7.1表は、本実験で用いたモデルのパラメータとモデルの説明力を示した。モデルの係数の当てはまり程度は、本葉の2  $\text{g m}^{-2}$  のみが $R^2=0.889$ と低かったが、残りは、 $R^2=0.997$ 以上と良好であった。それに基づいて電子伝達速度の光飽和曲線を示すと、第7.4図のようになった。子葉におけるETRの上限の推定値は、2  $\text{g m}^{-2}$  水準では $44.8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であったのに対し、4  $\text{g m}^{-2}$  水準では1.88倍の $82.0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ を示した。本葉においては2  $\text{g m}^{-2}$  水準で $31.8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であったのに対し4  $\text{g m}^{-2}$  では1.55倍の $49.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ となった。PARに対する反応速度を表すパラメータbは、子葉の2  $\text{g m}^{-2}$  が0.00049と低く、他の区は0.0008前後となり、ほぼ同じ値を示した。

また、第2表は、PAMの計測時における葉面積と乾物重量を示した。子葉の葉面積は、2  $\text{g m}^{-2}$  水準では $346 \text{ mm}^2$ であったのに対し、4  $\text{g m}^{-2}$  水準では0.86倍の $296 \text{ mm}^2$ を示した。本葉においては2  $\text{g m}^{-2}$  水準で $273 \text{ mm}^2$ であったのに対し4  $\text{g m}^{-2}$  では1.50倍の $412 \text{ mm}^2$ となった。この大小関係の傾向は、乾物重でも同様の結果となった。子葉の乾物重は、2  $\text{g m}^{-2}$  水準では0.029 gであったのに対し、4  $\text{g m}^{-2}$  水準では0.024 gを示した。本葉においては2  $\text{g m}^{-2}$  水準で0.015 gであったのに対し4  $\text{g m}^{-2}$  では0.021 gとなった。

## 第 7 章 窒素施用が普通ソバの初期光合成に及ぼす影響



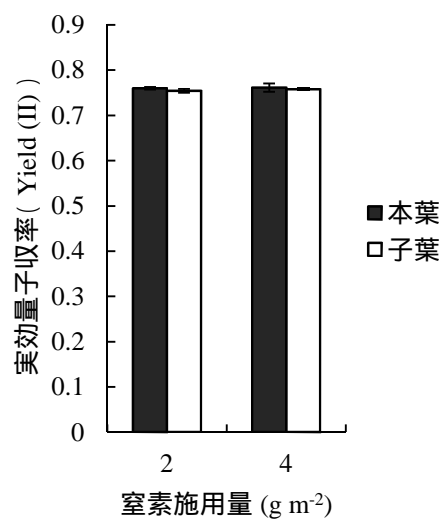
第 7.1 図 窒素施用が SPAD 値に及ぼす影響 .

種 : 普通ソバ .

測定時期 : 本葉 3 枚目展開時 .

測定部位 : 子葉と本葉 2 枚目 .

バーは標準偏差を表す . 異符号間に 5% 水準で有意差あり .



第 7.2 図 窒素施用が実効量子収率に及ぼす影響 .

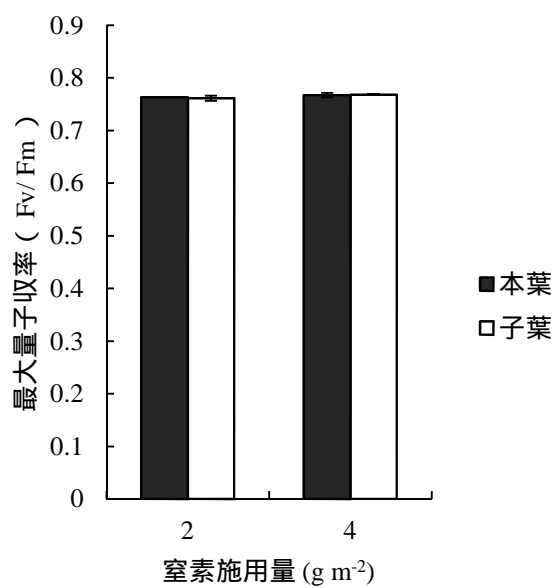
種 : 普通ソバ .

測定時期 : 本葉 3 枚目展開時 .

測定部位 : 子葉と本葉 2 枚目 .

バーは標準偏差を表す .

## 第7章 窒素施用が普通ソバの初期光合成に及ぼす影響



第 7.3 図 窒素施用が最大量子収率に及ぼす影響 .

種 : 普通ソバ .

測定時期 : 本葉 3 枚目展開時 .

測定部位 : 子葉と本葉 2 枚目 .

バーは標準偏差を表す .



## 第7章 窒素施用が普通ソバの初期光合成に及ぼす影響

第7.1表 モデルのパラメータと説明力．

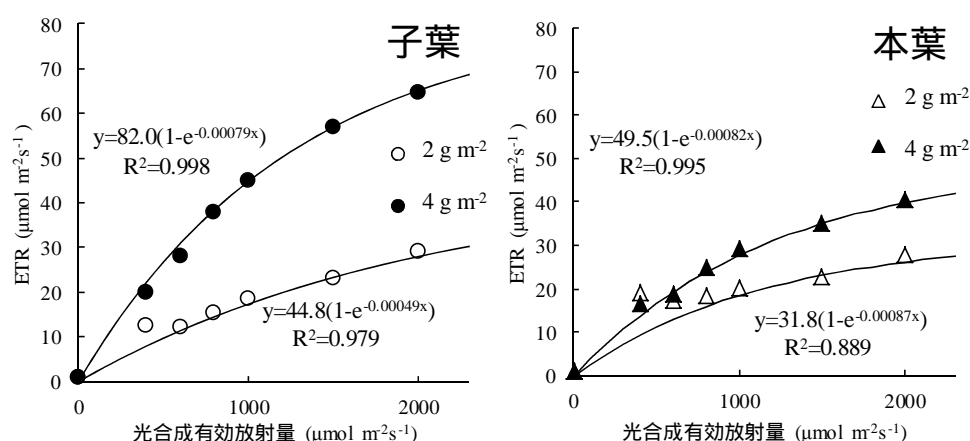
部位	窒素水準 (g m <sup>-2</sup> )	パラメータ		R <sup>2</sup>
		a	b	
子葉	2	44.8	0.00049	0.979
	4	82.0	0.00079	0.998
本葉	2	31.8	0.00087	0.889
	4	49.5	0.00082	0.995

a；モデル式におけるパラメータであり電子伝達速度の上限を示す係数．

b；モデル式におけるパラメータであり光合成有効放射に対する反応速度の変化を示す係数．

第7.2表 窒素施用量が葉面積と葉重に及ぼす影響．

部位	窒素水準 (g m <sup>-2</sup> )	葉面積 (mm <sup>2</sup> )	葉重 (DW g)
子葉	2	346 ± 7	0.029 ± 0.000
	4	296 ± 28	0.024 ± 0.002
本葉	2	273 ± 6	0.015 ± 0.000
	4	412 ± 8	0.021 ± 0.001



第7.4図 施用量が電子伝達速度の光-光合成曲線に及ぼす影響．

種：普通ソバ．

測定時期：本葉3枚目展開時．

測定部位：子葉と本葉2枚目．

### 第3節 考察

SPAD 値は、子葉と本葉において差がみられたが、施肥水準の違いは検出できなかった。葉緑素計による診断は、普通ソバにおけるこれまでの報告(伊藤ら, 2013)と同様に、窒素処理の違いを明確には検出できなかった。その理由は、SPAD 値が赤色と遠赤色光の透過と吸収のバランスを測定し算出しているため(北川ら, 1987)、そのバランスを大きく変える程の変化がクロロフィル a 含量や葉の構造等に生じなければ検出しにくくなるためであると考えられた。

一方で、PAM による診断は、光飽和曲線において窒素水準の違いが検出できた。特に、電子伝達速度は、光合成有効放射を  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  程度に設定して測定することにより、窒素水準によって違いが生じた。このことから、電子伝達速度の測定は、窒素栄養の診断に用いることができると考えられた。窒素水準の診断は、SPAD 値に反映されにくい、接触診断ではあるが PAM によってできると考えられた。電子伝達系の評価は、葉面積や乾物重のような形態調査から知ることのできない、光合成の明反応に関する潜在的な活性や効率を判断するために効果的な手法といえる。

本試験でのモデル計算結果から、窒素施用は光合成の明反応を強化し、特に電子伝達速度の最大値を向上させるため、普通ソバの生産性の向上に明反応の面から寄与していると考えられた。窒素施用を2倍にすることで、電子伝達速度の最大値が約 1.5-1.8 倍になると推定された。このことから窒素施用は、強光条件下における光化学系 II の光合成明反応の機能を強化すると考えられた。そのメカニズムは、実効量子収率と最大量子収率が変わらないことから、光化学系 II を強光下において正常に保つ為に、光化学系 II の機能強化だけでなく、表皮にポリフェノールのような抗酸化物質が多く生産される (Suzuki *et al.* 2005) ことも、PSII の機能維持に寄与しているのかもしれない。普通ソバへの窒素施肥は、光合成の明反応における光化学系の安定性に

## 第7章 窒素施用が普通ソバの初期光合成に及ぼす影響

も寄与していることが示唆された。

さらに、子葉と本葉の部位別による違いから(第7.4図)、子葉は本葉に比べて強光下での電子伝達速度が高く、窒素施用にも反応性が高いことが明らかとなった。子葉の明反応の能力の高さは、普通ソバの栽培期間が短期間であること、最初に出現する子葉が初期の物質生産に重要なことを裏付けると考えられた。子葉は、晴天時の日中において本葉の約2倍のエネルギーを産出していると考えられ、また強光への適応性が高いと考えられた。子葉は、発芽時のみでなく、強光条件下での初期成長にとって極めて重要な光合成器官と言えよう。

また、秋栽培型普通ソバの花芽分化は、本葉の2~4葉が出現する時期に起こることが知られている。普通ソバの子葉は、生殖器官分化と個体の栄養成長量が決まる初期ステージに重要な役割を担っていると考えられた。

### 第8章 紫外レーザー励起蛍光による窒素栄養の情報取得

普通ソバ(*Fagopyrum esculentum* M.)は、栄養条件が不利な条件下でも生育可能なので救荒作物とされているが、その一方で、収量を確保するには窒素施肥が必要である。普通ソバの葉は、最大純光合成速度を 25 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s 付近で示し、光合成の適温域は 20-30 $^{\circ}$ C と広いと報告されている(杉本・佐藤, 1999)。個葉の光合成速度に及ぼす窒素施肥の影響についてはほとんど研究されていない。普通ソバの安定・高位生産をするためには、最適な窒素栄養状態を管理する必要があり、ソース能の向上の為に新しい栄養診断法が求められている。

これまで、著者らはキセノン光源による紫外励起蛍光分析(Sekinuma *et al.*, 2010)を試みて、クロロフィルや RuBisCO 量が推定可能なことを報告してきた(Sekinuma and Inoue, 2013c)。さらに、PAM クロロフィル蛍光計測は、普通ソバの窒素施用が光合成の明反応に及ぼす影響を検出できることも明らかにした(関沼・井上, 2013d)。PAM クロロフィル蛍光計測は、光合成における明反応の中心である光化学系がエネルギー利用の効率を非破壊で計測し評価するものである。しかし、PAM は、光の利用効率を評価できるが、二次代謝物の含量やその働きを同時に評価することは難しい。

前章では、紫外レーザー励起蛍光計測による新しい植物栄養診断手法の開発のためにレーザー励起の特徴を明らかにした(関沼・井上, 2013a)。紫外レーザー励起蛍光は、紫外光で励起することにより、蛋白質やポリフェノールの情報を取得できる特徴を持っている(Cerovic *et al.*, 1999)。また、紫外レーザー励起蛍光は、PAM がクロロフィル蛍光に特化しているのに対して、400-800 nm における多波長からの情報取得が可能であり、その情報を総合的に利用することが可能である。

これまでの研究は、クロロフィルに着目した研究が多く報告されており、蛍光スペクトルから比率を計算し、クロロフィル量が推定されている。Saito

## 第8章 紫外レーザー励起蛍光による窒素栄養の情報取得

*et al.* (2005) は、740 nm/685 nm の比率からクロロフィル a の含量を推定できると報告している。ここでさらに新たな指標が開発できれば、紫外レーザー励起蛍光計測による植物栄養状態の診断手法をさらに発展することができ、作物生産現場においても有効と考えられる。

そこで、本章では、励起力の向上と単波長光による精密な情報の取得が期待される紫外レーザー励起蛍光による栄養診断法を確立するため、異なる窒素施用量が紫外レーザー励起蛍光スペクトルに及ぼす影響を検討した。さらに、紫外レーザー励起蛍光スペクトルの2波長の比率からなる指標を多数用いて、普通ソバの窒素施用の影響や植物の栄養診断が可能なのかを検討した。

## 第 8 章 紫外レーザー励起蛍光による窒素栄養の情報取得

### 第 1 節 材料および方法

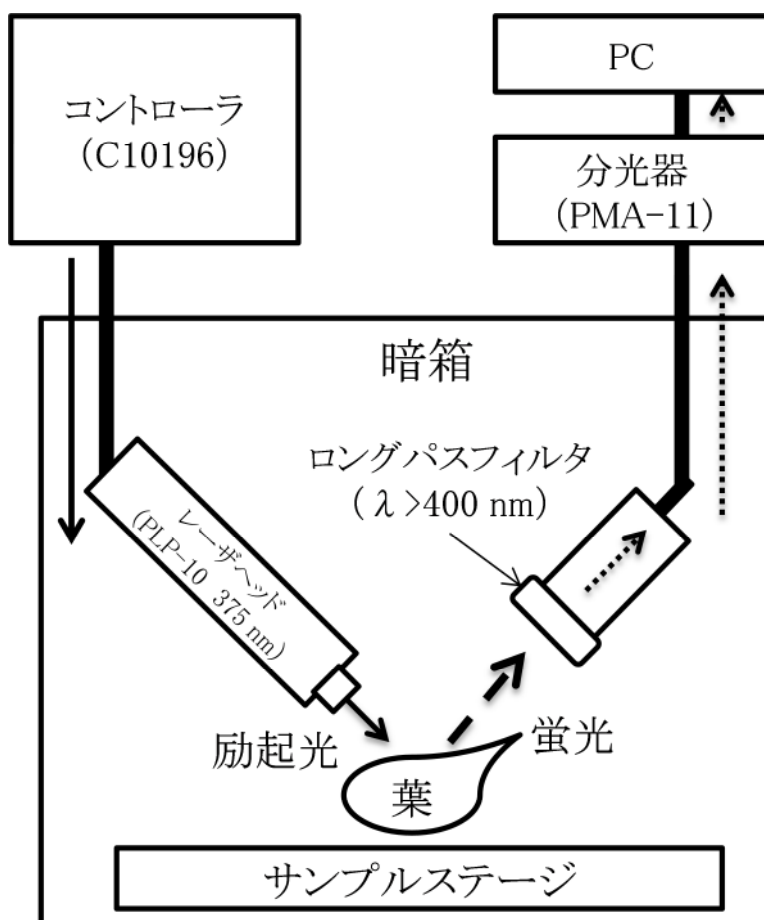
供試した普通ソバの品種は、信濃 1 号であり 10 月 11 日にワグネルポットに播種し、ガラスハウス内で適宜灌水し栽培した。ワグネルポット内に 3 個体を生育させ、硫酸を 0, 1, 2, 8 g m<sup>-2</sup> の 4 水準に設定し、3 反復乱塊法で試験を行った。葉色(SAPD 値)は、蛍光を測定する際に葉緑素計(SPAD-502, コニカミノルタ)を用いて計測した。

蛍光の測定は、第 6 章で構築した紫外レーザー励起蛍光システムにより行なった。蛍光の測定は、本葉 3 枚目が展開し始めた播種後 16 日目における子葉と本葉 2 枚目に行った。子葉と本葉の蛍光は 30 分の暗順応処理を行ってから測定した。蛍光スペクトルは、685 nm の蛍光強度が最大値を示した時のスペクトルをデータ解析に用い、1 nm 間隔で取得されたスペクトル原データの 5 点の移動平均を算出した。

蛍光指標は、蛍光スペクトルの異なる 2 波長の比率を用いて算出した。指標に用いた 2 波長は、第 8.1 図で示すように、紫外レーザー励起蛍光スペクトルで観察される特徴的な波長を用いた。その特徴的なピークは、460, 560, 680, 740 nm に見出され、それぞれを A, B, C, E とした。また、710 nm の局所(谷)の蛍光強度を D とした。A-E の蛍光強度は、第 8.1 表で示す通りの生理生態学的意味を表すものである。普通ソバの光合成明反応潜在力指数(Potential Photoreaction Index: PPI)は、抗酸化力(x)と、明反応の生産性(y)の積で表すことができると考え、以下の式で求めた。

$$x=f(B/A), y=f(E/C)$$

$$PPI=x \times y \quad (B/A) \times (E/C) \text{である。}$$



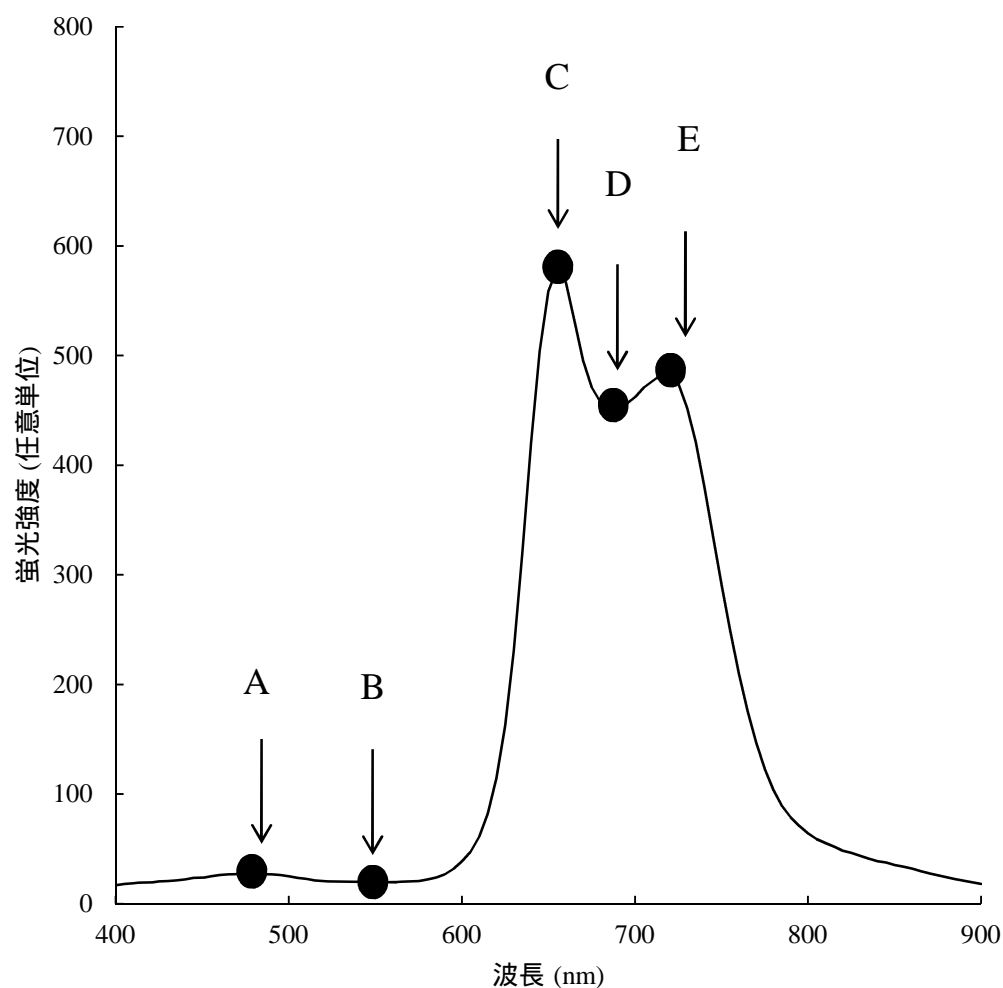
第 8.1 図 LIF 測定システム .

紫外レーザー励起蛍光計測の場合の紫外光源 :

ピコ秒ライトパルサ PLP-10

レーザーダイオードヘッド : PLP-10-038(窓出力)

コントローラ : C10196 , 100 MHz 動作 .



第 8.2 図 紫外レーザー励起蛍光スペクトルにおいて指標にした波長 .

植物種(品種) : 普通ソバ(信濃 1 号)

栽培環境 : ガラスハウス内ワグネルポット (1/2000 a) .

窒素施用量 :  $4 \text{ g m}^{-2}$

計測時期 : 本葉 3 枚目の展開時 . 測定部位 : 本葉 .

暗順応時間 : 30 分 .

スペクトル処理 : 原スペクトル



## 第8章 紫外レーザー励起蛍光による窒素栄養の情報取得

第8.1表 蛍光指標の生理生態学的意味．

蛍光指標	意味	略称
B/A	ポリフェノール濃度や光酸化に対する抵抗性の一指標	
C/B	光化学系IIに由来する蛍光	
E/B	光化学系Iに由来する蛍光	
E/C	光化学系Iと光化学系IIの比率や、クロロフィルaの濃度の指標	
E/D	光化学系Iに由来する蛍光	
(B/A)×(E/C)	光化学系の活性と抗酸化能の積で、光合成明反応潜在的能力と抗酸化による維持能力を総合評価するための指標	PPI

A: 460 nm の蛍光強度 , B: 560 nm の蛍光強度 , C: 680 nm の蛍光強度 ,

D: 710 nm の蛍光強度 , E: 740 nm の蛍光強度 .

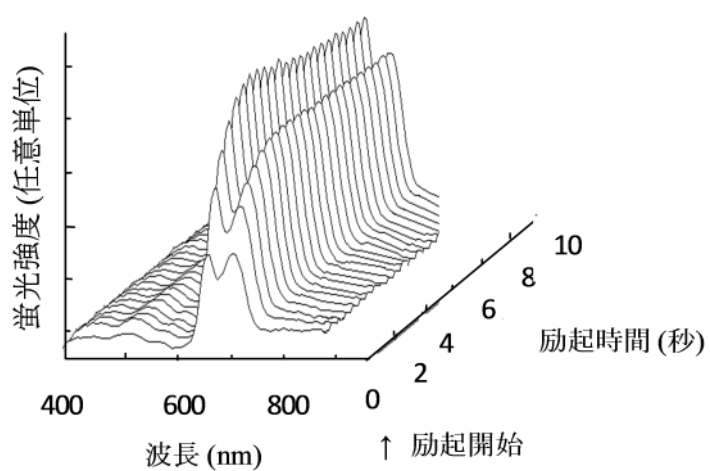
### 第2節 結果

紫外レーザー励起蛍光によって得られるスペクトルを第 8.3 図に示した。400-600 nm にかけての蛍光は極めて低い強度を示し、特徴的なピークは 685 nm と 745 nm で検出された。

蛍光スペクトルを測定した時点での葉の葉色値と窒素施用量の関係を第 8.4 図に示した。SPAD 値は子葉で高く、本葉で低い値となり、窒素水準に応じた変化は見られなかった。

光化学系 II と関係の深い 685 nm の蛍光強度を窒素施用量と比較した(第 8.5 図)。子葉の蛍光強度は、窒素施用の増加に応じて急激な増加の後に減少が見られたのに対して、本葉の蛍光強度は緩やかな増加の後には変化が少なくなる曲線を描いた。

子葉における蛍光指標の変動は、第 8.2 表に示した。窒素水準間の有意差は、 $C/B$ 、 $E/B$  と  $E/D$  の指標が 1%水準で認められた。本葉における蛍光指標の変動は、第 8.3 表に示した。窒素水準間の有意差は、全ての指標において 1%水準で差が認められた。第 8.6 図は、特に生理生態学的に意味のあると考えられる PPI について窒素施用が及ぼす影響を示した。子葉は、 $2-4 \text{ g m}^{-2}$  水準で増加する傾向が見られるが、窒素水準間において有意差はみられなかった。一方で、本葉は、窒素施用が増えると指標も増加する傾向であり、PPI は窒素水準が  $4 \text{ g m}^{-2}$  を超えると上昇した。第 8.4 表は、窒素水準と各蛍光指標との関係を示した。子葉では、相関関係が見られなかったが、本葉においては、 $B/A$  が最も高い相関係数 0.97 を 1%水準で示し、 $E/C$  が 0.90、PPI が 0.95 とそれぞれ 5%水準での正の相関関係を示した。

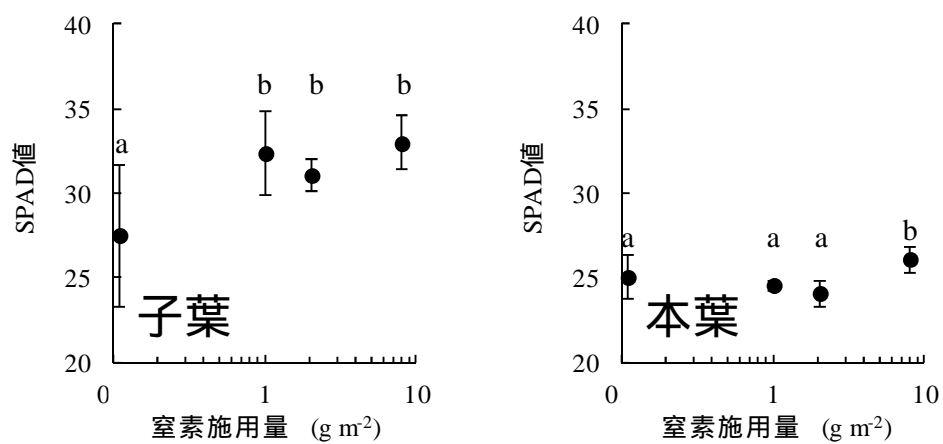


第 8.3 図 普通ソバの葉の紫外レーザー励起蛍光スペクトルと時間変化 .

励起波長 : 375 nm . 測定波長 : 400-900 nm .

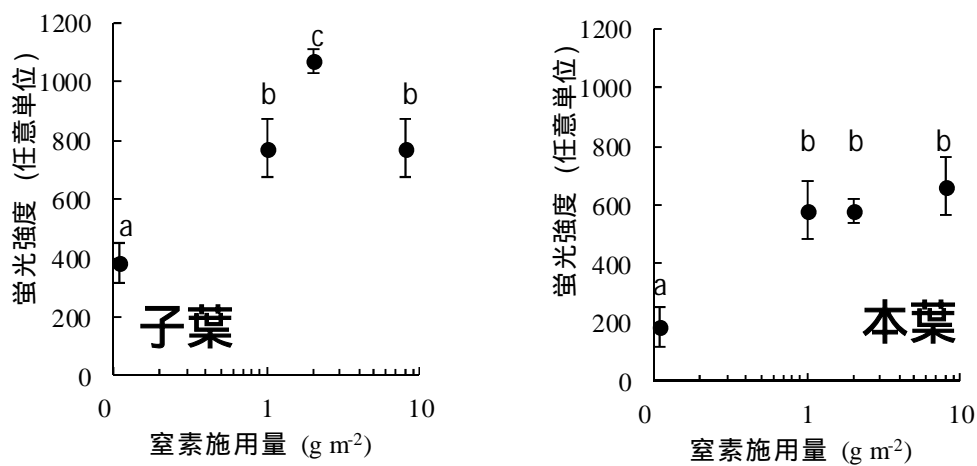
露光時間 : 500 ミリ秒 . 繰り返し回数 : 30 回 .

測定時間 : 12.5 秒 .



第 8.4 図 窒素施用量が SPAD 値に及ぼす影響 .

異符号間において 5%水準で有意差あり .



第 8.5 図 窒素施用量が 685 nm の蛍光強度に及ぼす影響 .

異符号間において 5%水準で有意差あり .

## 第8章 紫外レーザー励起蛍光による窒素栄養の情報取得

第8.2表 子葉の蛍光指標の変動.

窒素 処理区 ( $\text{g m}^{-2}$ )	B/A	C/B	E/B	E/C	E/D	PPI (B/A)×(E/C)
0	0.73 ± 0.05	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	1.00 ± 0.01	0.85 ± 0.01	0.73 ± 0.05
1	0.70 ± 0.07	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	1.11 ± 0.02	0.80 ± 0.01	0.78 ± 0.08
2	0.77 ± 0.03	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.05 ± 0.03	0.85 ± 0.01	0.81 ± 0.03
4	0.76 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	1.05 ± 0.10	0.85 ± 0.02	0.80 ± 0.06
8	0.76 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	1.01 ± 0.02	0.84 ± 0.01	0.77 ± 0.02
窒素水準	n.s.	**	**	n.s.	**	n.s.
p値	-	0.001	0.001	-	0.001	-

A: 460 nmの蛍光強度, B: 560 nmの蛍光強度, C: 680 nmの蛍光強度, D: 710 nmの蛍光強度,  
E: 740 nmの蛍光強度.

数値は, 平均値 ± 標準偏差で示した.

\*は5%水準で, \*\*は1%水準でそれぞれ有意であり, n.s.は有意でないことを表す.

第8.3表 本葉の蛍光指標の変動.

窒素 処理区 ( $\text{g m}^{-2}$ )	B/A	C/B	E/B	E/C	E/D	PPI (B/A)×(E/C)
0	0.69 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.83 ± 0.03	0.95 ± 0.02	0.57 ± 0.05
1	0.71 ± 0.03	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.83 ± 0.02	0.92 ± 0.02	0.58 ± 0.03
2	0.74 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.85 ± 0.07	0.93 ± 0.04	0.63 ± 0.07
4	0.75 ± 0.04	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.84 ± 0.02	0.95 ± 0.00	0.63 ± 0.03
8	0.80 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	1.06 ± 0.05	0.82 ± 0.02	0.85 ± 0.04
窒素水準	**	**	**	**	**	**
p値	0.005	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

A: 460 nmの蛍光強度, B: 560 nmの蛍光強度, C: 680 nmの蛍光強度, D: 710 nmの蛍光強度,  
E: 740 nmの蛍光強度.

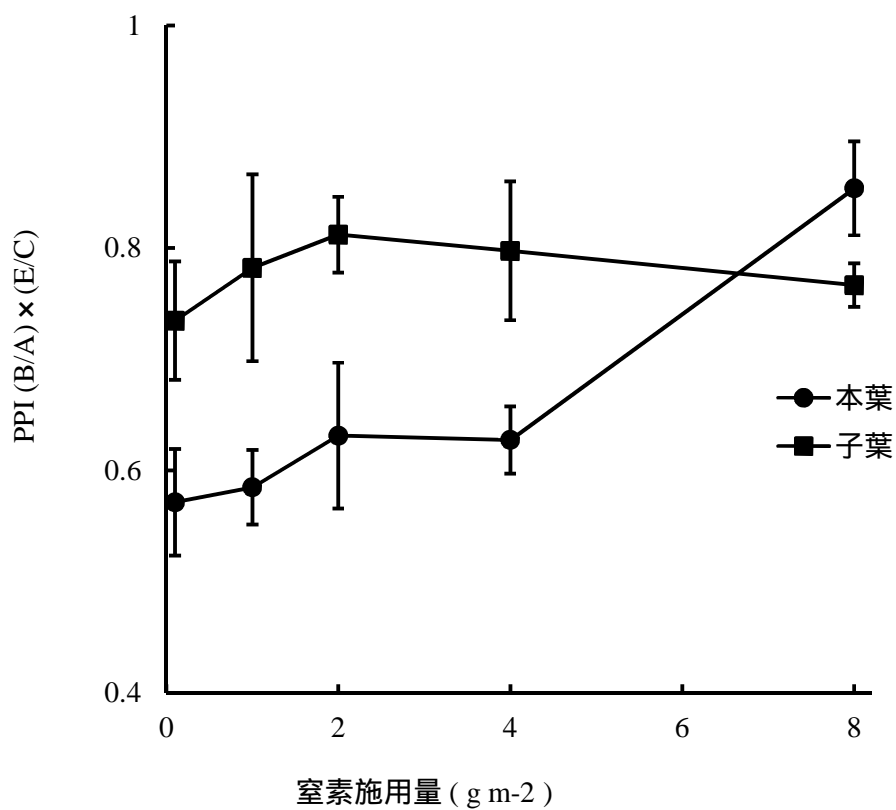
数値は, 平均値 ± 標準偏差で示した.

\*は5%水準で, \*\*は1%水準でそれぞれ有意であり, n.s.は有意でないことを表す.

第8.4表 窒素水準と各蛍光指標との相関関係.

部位	相関係数					
	B/A	C/B	E/B	E/C	E/D	PPI (B/A)×(E/C)
子葉	0.48 n.s.	-0.60 n.s.	-0.55 n.s.	-0.32 n.s.	0.19 n.s.	0.13 n.s.
本葉	0.97 **	-0.53 n.s.	-0.61 n.s.	0.90 *	-0.85 +	0.95 *

+, \*, \*\*はそれぞれ10, 5, 1%水準で有意であり, n.s.は有意でないことを表す.



第 8.6 図 窒素施用が蛍光指標に及ぼす影響 .

PPI : 光合成明反応潜在力指数

バーは標準偏差を表す .

### 第3節 考察

紫外レーザー励起蛍光法は、これまで検出できなかった窒素施用にともなうクロロフィルの応答を非破壊で検出できる可能性が示唆された。北川ら(1989)は、イネにおいて SPAD 計による葉色で栄養診断ができると報告した。しかし、普通ソバの SPAD 値の大小は、下胚軸の硝酸態窒素濃度が異なる条件下においてもわずかな傾向はみられたものの、差は検出されなかったとの報告がなされている(伊藤ら, 2013)。本実験でも SPAD 値は、窒素施用量によって大きな変化が認められなかったため、SPAD 値に基づいて栄養診断や追肥の目安にすることは困難と考えられた。他方、紫外レーザー励起蛍光スペクトルの強度は、窒素施用量によって変化したことから窒素栄養診断に利用できることが示唆された。

紫外レーザー励起蛍光により窒素栄養に対する応答が検出できたのは、計測メカニズムの違いのためと推察された。つまり、SPAD 計は、光を受けた葉面の反射スペクトルのうち 670 nm 付近と赤外の 2 波長の吸光度差を用いて算出されている(Inada, 1963)。葉の反射特性は、葉内の窒素濃度と相関が高く、葉の形態と成分の特徴を簡易に測定できる。他方で蛍光は、クロロフィルや二次代謝物質が励起された際の光化学系 II や電子伝達系などの過剰エネルギーへの反応に敏感に反応すると考えられる。SPAD 値に窒素施用量が反映されにくい主な理由は、普通ソバの葉が UV 光を遮蔽する代謝物質が葉の表皮に多く(Kreft *et al.*, 2003)、透過吸収特性が一定に保たれやすい為ではないかと推察される。紫外レーザー励起蛍光においても、励起光自体の減衰や一次励起した蛍光の吸収が予想されるため、それらの一連の働きを含めた、クロロフィルの状態が検出できたと考えられた。紫外レーザー励起蛍光の情報は、SPAD のような構造と構成物質の量ではなく、クロロフィルの働きの状態を反映しており、非破壊で窒素施用の効果を検出できる可能性がある。

蛍光指標 PPI は、窒素水準の違いが反映されているため、光合成明反応の

潜在力に関する植物栄養診断に適用できるものと考えられた。普通ソバの葉の窒素栄養状態は、葉色板(松島ら, 1970; 北川ら, 1987)による反射光では違いを検出しにくい。しかしながら、本研究における紫外レーザー励起蛍光での  $B/A$ ,  $E/C$ , PPI の蛍光指標は、窒素水準に応じて増減をしており(第 8.3 表)、窒素施用の効果の検出に有効と考えられた。

本試験による蛍光指標 PPI は、明反応の生産性と光障害に対する防御性の両者を踏まえた総合指標と考えられる。まず、 $B/A$  の指標は、光酸化や光合成明反応にともなう酸化に対する能力として定義した。普通ソバの葉におけるこの指標の意味は、普通ソバの葉が、ポリフェノール、特にフラボノイドを多く含んでおり(Suzuki *et al.*, 2005)、その含量の多少を表していると考えられる。その理由は、ルチンやケルセチンが蛍光を出しにくい特性をもった物質であり(Komori *et al.*, 2008)、葉への UV 障害防御機能を持つ(Kreft *et al.*, 2003)からである。A 点(460 nm)の波長の光は、よく知られているようにポリフェノール含量と負の相関関係があることから、普通ソバが高標高地帯における紫外線からのストレスへの抵抗性を示す指標とみなせる。

次に、 $E/C$  の指標は、光化学系 I と光化学系 II に由来する蛍光強度の比率を算出しており、クロロフィル a の濃度の指標とみなすことができる。Saito *et al.* (2002) は、これをクロロフィル a の非破壊推定の指標として報告している。この指標は、普通ソバのみならず他の作物においても光合成の明反応の潜在力の評価に有用と考えられた。

この実験の結果から、本葉は、窒素施用量に応じて PPI が増加しており(第 8.6 図)、強い正の相関関係も示した。PPI は、生理的な意義を考えて計算したものであるが、生殖成長開始期にもあたる初期の栄養成長段階における、本葉の窒素応答を明瞭にとらえることができたと考えられ、次の成長段階での PPI による下位葉の潜在力の低下と上位葉の能力の上昇に関する評価が、今後の課題である。



## 第8章 紫外レーザー励起蛍光による窒素栄養の情報取得

以上より，紫外レーザー励起蛍光スペクトルから算出した蛍光指標を用いることにより生理生態学的な特徴を検出できた．この指標は，施肥により安定的な高収量と高品質なソバを収穫できる栽培法の模索や，求肥力の違いである施肥反応性や過剰施肥条件下での耐倒伏性の評価が可能となり育種の推進に役立つと考えられた．

### 第9章 普通ソバとイネの紫外レーザー励起蛍光スペクトル

第9章は、前章までで明らかにしたレーザー励起蛍光の単純強度による診断(関沼・井上, 2013b)や、蛍光指標による診断(関沼・井上, 2013c)の種を超えての適用性を検討する。

前章まで検証してきた紫外レーザー励起蛍光計測は、非破壊で即時性のある診断が可能な方法である。しかし、実際の農業で診断技術が使えるかどうかは、農業の現場に則して、検討しなければならない課題がある。1つ目は、他の作物種での診断が可能な技術なのか。2つ目は、品種による違いが、スペクトルに反映されるのか。3つ目は、品種によるスペクトルの差と施肥による違いが検出できるかである。紫外励起蛍光計測は、それぞれの種の葉の構造や、内容する成分の違い、さらには、生理生態的な特徴も反映した結果が得られることが予想されるため、詳細な測定条件と得られる結果の対応関係を調べる必要がある。

以上のように、他の作物種で検討することは、測定デバイスの汎用性の向上につながる。汎用性の向上は、測定デバイスの低価格化につながり、理論や診断方法の頑強性の確認のみでなく、最終的な農家への導入段階を想定した際に、購入の障壁を少なくする。また、新規の測定法は、限られた研究対象に依存するため、デバイスの実用性のために、適用の範囲の検証が欠かせない。また、デバイスの普及には、安価な測定機器が開発されることが必要であり、測定対象とする作物が多くなることも欠かせない。

診断技術を栽培の現場で使用するには、種や品種を横断し用いる際にあらかじめキャリブレーションを行い推定精度の確認が必要である。以上のように農業の現場で想定される多様な影響の中で、作物の栄養診断を行う必要があり、それらの状況下でも目的とした診断を行える必要がある。

本章は、ソバ以外の作物への紫外励起蛍光計測による診断の適用を検討す

## 第9章 普通ソバとイネの紫外レーザー励起蛍光スペクトル

るために，日本国内とアジアで最も栽培が多い，イネについて品種や窒素施肥による紫外励起蛍光スペクトルの差異を検討した．

## 第9章 普通ソバとイネの紫外レーザー励起蛍光スペクトル

### 第1節 材料および方法

イネは、コシヒカリ、IR72、Banten、CH86の4品種を用い、信州大学農学部構内のハウス内にて1/2000 a ワグネルポットに1個体を移植して適宜灌水し栽培した(第9.1表)。施肥は、基肥として尿素を窒素量で0、2.5、5、10 g m<sup>-2</sup>の4水準として行った。3反復栽培し、出穂前の止め葉の先端15 cmを切除し乾燥抑止処理を行い、室温25℃条件下で暗順応させた後、蛍光スペクトルを取得した。

比較に用いた普通ソバの品種は、信濃1号である。播種は、8月5日にワグネルポットに行い、ガラスハウス内で適宜灌水し栽培した。ワグネルポット内に3個体を生育させ、硫酸を用いて窒素水準を4 g m<sup>-2</sup>として、3反復で栽培したものをを用いた。蛍光の測定は、普通ソバの開花期の上位にある完全展開葉を用い、30分の暗順応処理を行ってから測定した。

蛍光スペクトルの計測は、第3章で用いた紫外励起蛍光計測システムと第6章で用いた紫外レーザー励起蛍光計測システムを用いた。計測は、励起光照射後に露光時間0.5秒を30回繰返した。1枚の葉につき、9箇所を測定し、それぞれ異なる場所の蛍光を測定した。スペクトルの前処理は、検出機付属の基本ソフトウェア(U6039-01、浜松ホトニクス)を使用して行った。取得蛍光スペクトルは、680 nmの蛍光強度が最大となる瞬間の蛍光スペクトルとした。検出した蛍光スペクトルは、1 nm間隔で取得されたスペクトル原データの5点の移動平均を算出した。さらに600 nmの蛍光強度を基準として相対蛍光強度を算出してデータ解析に用いた。紫外レーザー励起蛍光計測により検出した蛍光スペクトルは、680 nmの蛍光強度を基準として相対蛍光強度を算出して比較に用いた。

## 第9章 普通ソバとイネの紫外レーザー励起蛍光スペクトル

第9.1表 イネの品種の説明.

品種 (記号)	亜種	播種	発芽	出穂日	出穂前測定日	出穂後測定日	備考
コシヒカリ(KO)	Japonica	4月16日	4月22日	8月10日	7月30日	8月19日	
IR72 (IR)	Indica	4月16日	4月22日	9月7日	8月1日	9月17日	多茎
Banten (BA)	Japonica(Javanica)	4月16日	4月22日	8月25日	8月1日	9月3日	少茎
Ch86 (CH)	Indica	5月21日	5月24日	8月24日	8月2日	9月3日	葉色黄緑色

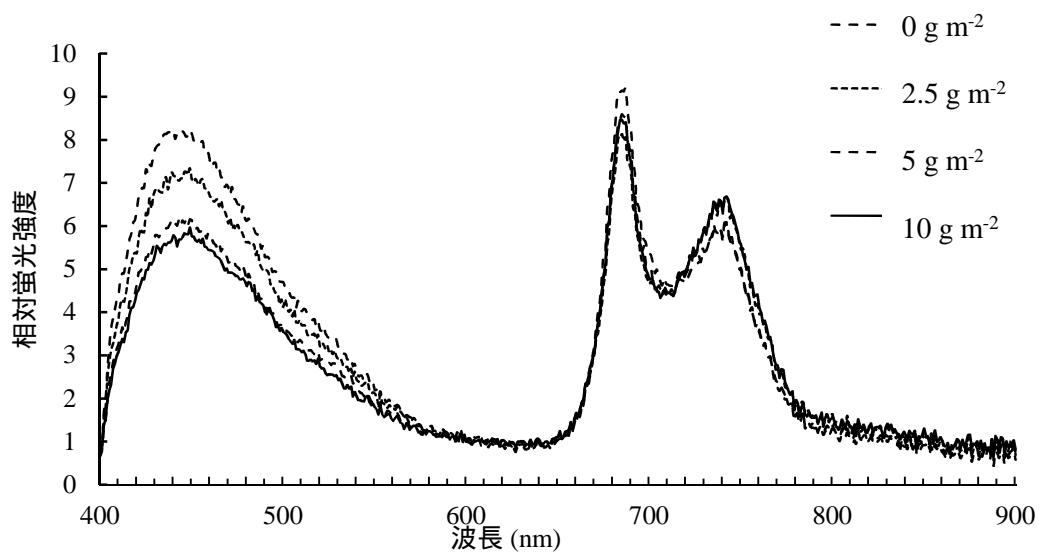
### 第2節 結果

第 9.1 図は、イネのコシヒカリにおける窒素施用量が蛍光スペクトルへ及ぼした影響を示した。コシヒカリのスペクトルは、青緑色蛍光の強度にばらつきが生じるが、赤色蛍光、遠赤色蛍光における変化はほぼ検出できなかった。

窒素施肥量が  $5 \text{ g m}^{-2}$  におけるイネの品種間の蛍光スペクトルの違いを第 9.2 図に示した。青緑色蛍光の強度に僅かな差が見られるが、5.5-7.5 の範囲の値となったが、赤色蛍光は 2-9 の範囲の値となり品種により強度が大きく異なった。

また、第 9.3 図イネのコシヒカリと普通ソバの信濃 1 号における紫外励起蛍光スペクトルの特徴を比較した。普通ソバの蛍光スペクトルは、イネの蛍光スペクトルと比較すると、青緑色蛍光の蛍光強度が顕著に低く、赤色蛍光の強度が僅かに大きくなった。

イネの葉における紫外励起蛍光スペクトルと紫外レーザー励起蛍光スペクトルの違いを第 9.4 図に示した。蛍光強度の最大値を示す 685 nm と最低値を示す 600 nm を基準に 2 つの相対値を算出して比較した。イネの葉のスペクトルは、400-550 nm の蛍光強度が紫外励起蛍光計測の方が、高い比率で取得できた(第 9.4 図)。一方で、紫外レーザー励起蛍光計測は、450 nm や 525 nm におけるピークが検出できた。685 nm と 740 nm のピークは、紫外レーザー励起蛍光計測の方が高い強度で検出が可能で、400-550 nm の広いピークは、紫外励起蛍光計測が高い強度で検出できた。



第 9.1 図 コシヒカリにおける窒素量と蛍光スペクトル .

植物種：イネ．品種：コシヒカリ．

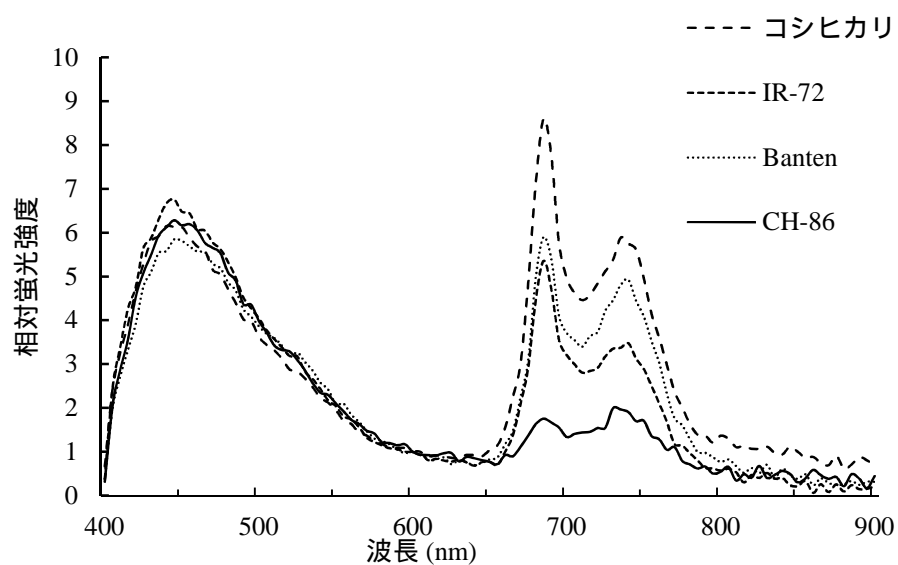
栽培環境：ガラスハウス内ワグネルポット(1/2000 a)．

窒素施用量：0 , 2.5 , 5 , 10 g m<sup>-2</sup> ．

計測時期：出穂期．測定部位：止葉．

暗順応時間：30 分 ．

スペクトル処理：600 nm の蛍光強度を基準に相対化 ．



第 9.2 図 蛍光スペクトルのイネの品種間差 .

植物種：イネ .

品種：コシヒカリ , IR-72 , Banten , CH-86 .

栽培環境：ガラスハウス内ワグネルポット (1/2000 a) .

窒素施用量：5 g m<sup>-2</sup> .

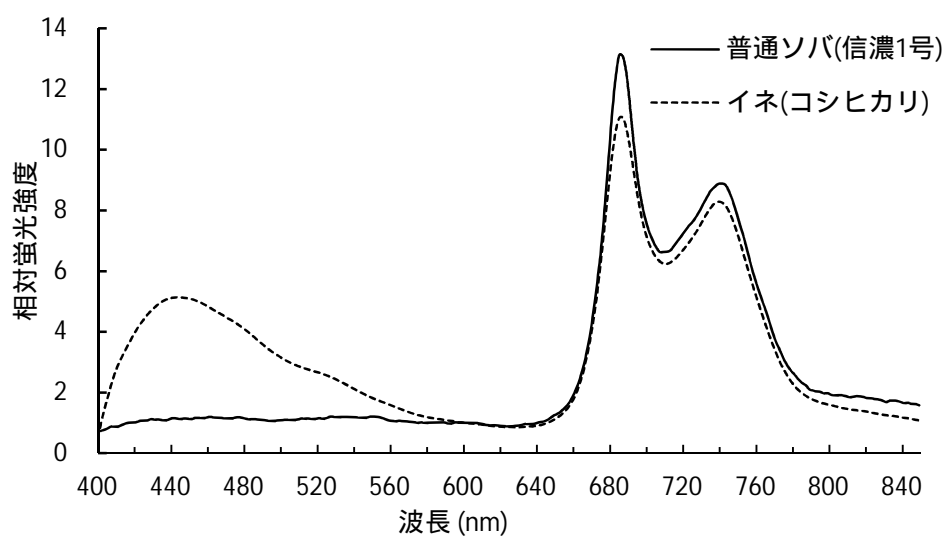
計測時期：出穂期 . 測定部位：止葉 .

暗順応時間：30 分 .

スペクトル処理：600 nm の蛍光強度を基準に相対化 .



## 第9章 普通ソバとイネの紫外レーザー励起蛍光スペクトル



第 9.3 図 イネと普通ソバの蛍光スペクトル .

植物種(品種) : イネ(コシヒカリ) .

普通ソバ(信濃 1 号) .

栽培環境 : ガラスハウス内ワグネルポット (1/2000 a) .

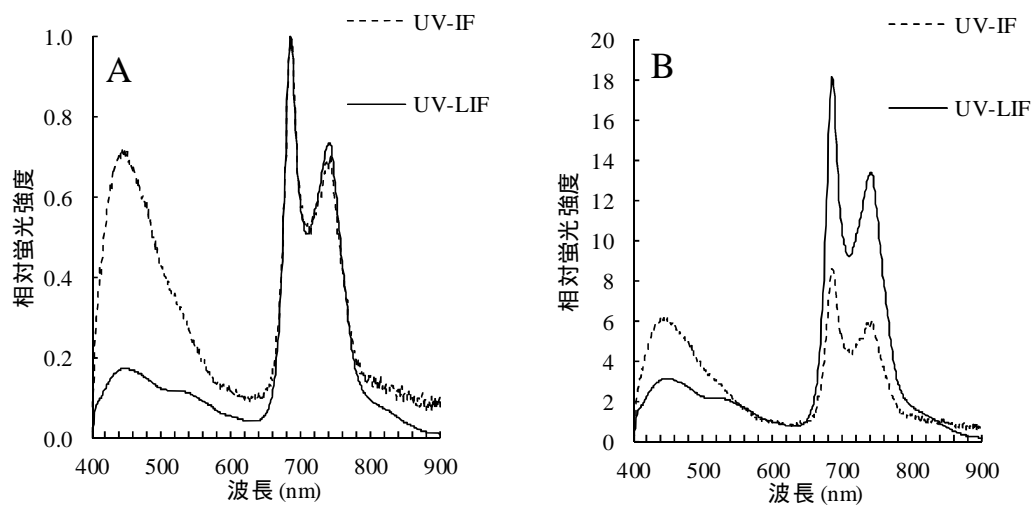
窒素施用量 :  $5 \text{ g m}^{-2}$  .

計測時期 : 出穂期 . 測定部位 : 止葉 .

暗順応時間 : 30 分 .

スペクトル処理 : 600 nm の蛍光強度を基準に相対化 .

## 第9章 普通ソバとイネの紫外レーザー励起蛍光スペクトル



第 9.4 図 イネの葉の励起光源の違いによる蛍光スペクトルの事例 .

A : 685 nm の蛍光強度を 1 として相対値を算出 .

B : 600 nm の蛍光強度を 1 として相対値を算出 .

植物種 : イネ . 品種 : コシヒカリ .

栽培環境 : ガラスハウス内ワグネルポット (1/2000 a) .

窒素施用量 :  $5 \text{ g m}^{-2}$  .

計測時期 : 出穂期 . 測定部位 : 止葉 .

暗順応時間 : 30 分 .

### 第3節 考察

イネの葉の蛍光スペクトルは，あくまでも相対的な比較における議論になるが，コシヒカリの蛍光スペクトルは，施肥水準が異なっても相対蛍光強度変異幅は青緑色蛍光では2,赤色蛍光では1の範囲であるため，施肥による相対蛍光強度の違いが生じても蛍光スペクトルのパターンの変化は少ないと考えられる．一方，品種による相対蛍光強度の変異幅の差は，青緑色蛍光で約2，赤色蛍光で約2-9である．特定の品種における施肥量の差は，品種ごとのスペクトルパターンを有する(Sekinuma *et al.*, 2011)．以上のことから，イネの青緑色蛍光相対強度の変異幅は，小さいと考えられる．よって，品種による赤色蛍光と遠赤色蛍光の相対蛍光強度に差が生じるものの，イネの典型的なスペクトルは，第9.3図で示したスペクトルと考えられる．

また，イネの蛍光スペクトルは，普通ソバと比較すると普通ソバの品種によるスペクトルの変異と同じような赤色蛍光や遠赤色蛍光の変化を示す．このことから，本研究の一連の診断方法は，普通ソバと同様にイネに用いることができる可能性がある．また，レーザー励起蛍光計測は，普通ソバと同様にイネにおいても植物栄養状態の情報取得において優れた方法であると考えられた．

### 第10章 総合考察

本論文では、普通ソバの葉における紫外レーザー励起蛍光スペクトルによる植物栄養の診断方法の開発について取り組んだ。普通ソバの葉における紫外励起蛍光スペクトルは、これまで取得できなかった植物栄養状態の情報をもたらすのか検証した。注目した植物栄養は、植物の栄養として最も基礎的な窒素と、光合成の暗反応の律速要因である RuBisCO である。これらの栄養状態と紫外レーザー励起蛍光の関係を検証した。

第 3 章は、紫外励起蛍光計測によって得られる蛍光スペクトルがどのようなものかを把握した。その結果、普通ソバの紫外励起蛍光スペクトルの特徴は、青緑色蛍光が検出しにくいことが明らかになった。

第 4 章は、クロロフィルと RuBisCO の含量の実用性のある推定法を開発するために、紫外励起蛍光測定における適切な波長帯の選択を試みた。その結果、クロロフィル a 濃度は、赤色蛍光に関係しており、RuBisCO の濃度は、遠赤色蛍光に関係が深いことが明らかになった。

第 5 章は、前章で明らかにした波長帯の蛍光情報を用いて、ケモメトリクスを用いた含量の推定を試みた。その結果、NDSI によるホットスポットの検出が有効であり、クロロフィル a の定量性が  $R^2$  値で 0.876 と高く、RuBisCO 量の定量性も  $R^2$  値で 0.493 と低いものの、段階評価に利用できるレベルで可能なことが明らかになった。

第 6 章において紫外レーザー励起蛍光スペクトルと紫外励起蛍光スペクトルの比較を行なった。その結果、紫外レーザー励起蛍光スペクトルは、紫外励起蛍光において BGF(青緑色蛍光)としか捉えられなかった蛍光強度のピークを、青色蛍光と緑色蛍光に分けることができるため、検出分解能が高く優れていると考えられた。

第 7 章は、材料として扱った普通ソバの初期光合成に窒素が及ぼす影

響を，既に実績のある PAM クロロフィル蛍光計測法を用いて調べた．普通ソバの葉は，子葉が重要な働きをしており，出現間もない本葉よりも電子伝達速度が高く初期生育に貢献していることが明らかとなった．

第 8 章は紫外レーザー励起蛍光分析方法による窒素栄養状態の把握の可能性を蛍光スペクトルの蛍光強度に着目した．その結果，蛍光スペクトルの赤色蛍光強度は，窒素施用量と同様な変化を示すことから，演算やスペクトル前処理を行わなくても診断に持ち得る可能性を示唆した．また，紫外レーザー励起蛍光スペクトルから蛍光指標を算出し検出できるかも試みた．考案した蛍光指標 PPI は，普通ソバの生産性と UV 放射に対する抵抗性のバランスを評価できた．

第 9 章は，デバイスの汎用性を検証するために，イネの紫外励起蛍光計測を行った．品種と施肥の違いが蛍光スペクトルに与える影響は，赤色蛍光に変異を生じさせることであった．レーザー励起蛍光計測は，普通ソバと同様にイネにおいても情報取得の可能性が考えられた．

本研究における新知見は，紫外励起蛍光により非接触でクロロフィル a の精密定量計測と RuBisCO 含量の段階評価が可能なことと，紫外レーザー励起蛍光により紫外線ストレスに対する抵抗性と光合成能のバランスの評価が可能なことである．また，普通ソバの葉の特徴として，

子葉は初期生育期間の光合成への寄与が大きいことと，他の植物に比べ 400-550 nm の蛍光情報が得にくいことを明らかにした．

光合成は，各種要因の多次元関数で表現される複雑な事象である．本研究でわかることは，その一要因に過ぎないが，要因の解明が進むことにより，真の光合成速度のモニタリングが可能であると同時に，光合成の理解につながる．また，本研究は，分光分析に着目しスポット計測による手法を用いたが，レーザーを光学的にスキャンングすることにより

面的な情報を構築することも可能であり，光合成の活性状態を示す物質や機能の働きの偏在や分布を捉えることへ応用することも可能である．

また，紫外レーザー励起蛍光スペクトルから算出した蛍光指標を用いることにより生理生態学的な特徴を検出できた．この指標は，今後普通ソバの物質生産性を向上させる栽培法の模索や，育種の推進に役立つと考えられた．

## 第 11 章 謝辞

### 第 11 章 謝辞

本研究の遂行にあたり，信州大学大学院総合工学系研究科井上直人教授には終始ご指導いただくと同時に種種のご理解ある便宜を賜りました．ここに謹んで深く感謝の意を表します．

また，本論文をまとめるにあたり，御校閲と御教示を賜りました信州大学大学院総合工学系研究科萩原素之教授，春日重光教授，渡邊修准教授，日本大学生物資源学部倉内伸幸教授に心より深く感謝申し上げます．

さらに本研究の鍵である RuBisCO の分析においては，九州大学大学院農学研究院の上野修教授，荒木卓哉准教授(現 愛媛大学農学部)，植物生産生理学研究室の熊谷悦氏(現 東北農研機構)，松井淳氏，濱岡範光氏，中島大賢氏，森田勝也氏をはじめとする研究室のみなさまに御指導，御助言頂きました．また，望月俊宏教にも九州大学での分析指導期間中における便宜を賜りました．九州大学でお世話になりました皆様へ衷心から感謝申し上げます．

蛍光計測機器に関する指導を賜りました浜松ホトニクス社の寺田一志氏にも感謝しております．

また，NDSI 計算プログラムの開発においては，信州大学農学部渡邊修准教授，河上謙一氏には多大なるご助力いただきました．また，NDSI 作成プログラムの利用や解釈において議論させていただいた群馬県農業技術センター大澤実氏にも心から感謝申し上げます．

最後に，信州大学農学部植物栄養学研究室の皆様に深く感謝の意を表します．

第12章 引用文献

1. Allen, Jr.L.H. 1992. Free-air CO<sub>2</sub> enrichment field experiment: An historical overview. *Crit. Rev. Plant Sci.* 11:121-134.
2. Akaike, H. 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In Petrov, B.N. and F. Csaki eds., 2nd international symposium on information theory. Akadimiai kiado, Budapest. 267-281.
3. Billings, W.D. and R.J. Morris 1951. Reflection of visible and infrared radiation from leaves of different ecological groups. *Amer. J. Bot.* 38:327-331.
4. Blankenship, R.E. and R.C. Prince 1985. Excited state redox potentials and the Z scheme of photosynthesis. *Trends. Biochem. Sci.* 10:382-383.
5. Bongi, G., Y. Goulas, I. Moya and G. Schmuck 1991. Détection simultanée dans les bandes bleue et rouge de la fluorescence induite par laser des végétaux. In proceedings 5th International college of Physical Measurements and Signatures in Remote Sensing. Courchevel. 719-722.
6. Bongi, G., A. Palliotti, P. Rocchi, I. Moya and Y. Goulas 1994. Blue-green fluorescence excited by UV laser on leaves of different species originates from cutin and is sensitive to leaf temperature. *Plant Cell Environ.* 17:777-780.
7. Bongi, G., A. Palliotti, P. Rocchi, I. Moya and Y. Goulas 1994. Spectral characteristics and a possible topological assignment of blue green fluorescence excited by UV laser on leaves of unrelated species. *Remote Sens. Environ.* 47:55-64.
8. Bornman, J.F., S. Reuber, Y-P. Cen and G. Weissenböck 1997. Ultraviolet radiation as a stress factor and the role of protective pigments. In Lumsden,



- P.J. ed., Plants and UV-B. Cambridge university press, Cambridge. 157-168.
9. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
  10. Broglia, M. 1993. Blue-green laser-induced fluorescence from intact leaves - Actinic light sensitivity and subcellular origins. *Appl. Opt.* 32:334-338.
  11. Buchanan, B.B., W. Gruissem and R.L. Jones 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. The American Society of Plant Physiology. Rockville, Maryland. 716-728.
  12. Cecchi, G., P. Mazzinghi, L. Pantani, R. Valentini, D. Tirelli and P. De Angelis 1994. Remote sensing of chlorophyll a fluorescence of vegetation canopies: 1. Near and far field measurement techniques. *Remote Sens. Environ.* 47:18-28.
  13. Cecchi, G., L. Pantani, D. Breschi, D. Tirelli and G. Valmori 1992. FLIDAR: a multipurpose fluorosensorspectrometer. *EARSeL Adv. Remote Sens.* 1:72-78.
  14. Cerovic, Z.G., M. Bergher, Y. Goulas, S. Tosti and I. Moya 1993. Simultaneous measurement of changes in red and blue fluorescence in illuminated isolated chloroplasts and leaf pieces: The contribution of NADPH to the blue fluorescence signal. *Photosynth. Res.* 36:193-204.
  15. Cerovic, Z.G., Y. Goulas, M. Gorbunov, J.-M. Briantais, L. Camenen and I. Moya 1996. Fluorosensing of water stress in plants. Diurnal changes of the mean lifetime and yield of chlorophyll fluorescence, measured simultaneously and at distance with a t-LIDAR and a modified PAM-fluorimeter, in maize, sugar beet and Kalancho. *Remote Sens. Environ.* 58:311-321.

16. Cerovic, Z.G., E. Langrand, G. Latouche, F. Morales and I. Moya 1998. Spectral characterization of NAD(P)H fluorescence in intact isolated chloroplasts and leaves: Effect of chlorophyll concentration on reabsorption of blue-green fluorescence. *Photosynth. Res.* 56:291-301.
17. Cerovic, G. Z., G. Samson, F. Morales, N. Tremblay and I. Moya 1999. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie* 19:543-578.
18. Cerovic, Z.G., F. Morales and I. Moya 1994. Timeresolved spectral studies of blue-green fluorescence of leaves, mesophyll and chloroplasts of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Biochim. Biophys. Acta* 1188:58-68.
19. Chappelle, E. W., J. E. McMurtrey, F. M. Wood and W. W. Newcomb 1984. Laser-induced fluorescence of green plants. 2: LIF caused by nutrient deficiencies in corn. *Appl. Opt.* 23:139-142.
20. Chappelle, E.W., J.E.I. McMurtrey and M.S. Kim 1991. Identification of the pigment responsible for the blue fluorescence band in the laser induced fluorescence (LIF) spectra of green plants, and the potential use of the band in remotely estimating rates of photosynthesis. *Remote Sens. Environ.* 36:213-218.
21. Chappelle, E.W. and D.L. Williams 1987. Laser-induced fluorescence (LIF) from plant foliage. *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.* 25:726-736.
22. Chappelle, E.W., F.M. Wood, J.E. McMurtrey and W.W. Newcomb 1984. Laser-induced fluorescence of green plants. 1: A technique for the remote detection of plant stress and species differentiation. *Appl. Opt.* 23:134-138.
23. Chappelle, E.W., F.M. Wood, W.W. Newcomb and J.E. McMurtrey 1985. Laser-induced fluorescence of green plants. 3: LIF spectral signatures of

- five major plant types. Appl. Opt. 24:74-80.
24. Corp, L.A., J.E. McMurtrey, E.W. Chappelle, C.S.T. Daughtry and M.S. Kim 1997. UV band fluorescence (*in vivo*) and its implications to the remote assessment of nitrogen supply in vegetation. Remote Sens. Environ. 61:110-117.
25. Dahn, H.G., K.P. Günther and W. Lüdeker 1992. Characterization of drought stress of maize and wheat canopies by means of spectral resolved laser induced fluorescence. EARSeL Adv. Remote Sens. 1:12-19.
26. Edner, H., J. Johansson, S. Svanberg, H.K. Lichtenthaler, M. Lang, F. Stober, C. Schindler and L.O. Björn 1995. Remote multi-color fluorescence imaging of selected broad-leaf plants. EARSeL Adv. Remote Sens. 3: 2-14.
27. Edner, H., J. Johansson, S. Svanberg and E Wallinder. 1994. Fluorescence lidar multicolor imaging of vegetation. Appl. Optics 33: 2471-2479.
28. Edner, H., J. Johansson, S. Svanberg, E. Wallinder, M. Bazzani, B. Breschi, G. Cecchi, L. Pantani, B. Radicati, V. Raimondi, D. Tirelli, G. Valmori and P. Mazzinghi 1992. Laser-induced fluorescence monitoring of vegetation in Tuscany. EARSeL Adv. Remote Sens. 1:119-130.
29. Evans, J.R. 1983. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Physiol. 72:297-302.
30. Farquhar, G.D., Caemmerer S.V. and J.A. Berry 1980. A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. Planta 49:78-90.
31. Gaberšček, A., Vončina, M.T. Trošt, M. Germa and L.O. Björn 2002. Growth and production of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) treated with reduced, ambient, and enhanced UV-B radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 66:30-36.

32. Goulas, Y., L. Camenen, G. Guyot, Z.G. Cerovic, J.-M. Briantais, G. Schmuck and I. Moya 1997. Measurements of laser-induced fluorescence decay and reflectance of plant canopies. *Remote Sens. Rev.* 15:305-322.
33. Goulas, Y., I. Moya and G. Schmuck 1990. Time-resolved spectroscopy of the blue fluorescence of spinach leaves. *Photosynth. Res.* 25:299-307.
34. Günther, K.P., H.-G. Dahn and W. Lüdeker 1994. Remote sensing vegetation status by laser-induced fluorescence. *Remote Sens. Environ.* 47:10-17.
35. Günther, K.P., W. Lüdeker and H.-G Dahn 1991. Design and testing of a spectral-resolving fluorescence LIDAR system for remote sensing of vegetation. In Hunt J.J. Ed. *Proc. In proceedings 5th international college of physical measurements and signatures in remote sensing*, Courchevel. 723-726.
36. Harris, P.J. and R.D. Hartley 1981. Phenolic constituents of the cell walls of monocotyledons. *Biocehm. Syst. Ecol.* 9:189-203.
37. Hasegawa, T., H. Sakai, T. Tokida, H. Nakamura, C. Zhu, Y. Usui, M. Yoshimoto, M. Fukuoka, H. Wakatsuki, N. Katayanagi, T. Matsunami, Y. Kaneta, T. Sato, F. Takakai, R. Sameshima, M. Okada, T. Mae and A. Makino 2013. Rice cultivar responses to elevated CO<sub>2</sub> at two free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE) sites in Japan. *Functional Plant Biology* 40:148-159.
38. 長谷川健 2005. スペクトルと濃度のそれぞれの誤差. 佐々木良輔編. *スペクトル定量分析*. 講談社, 東京. 91-102.
39. Havaux, M and R. Lannoye 1983. Temperature dependence of delayed chlorophyll fluorescence in intact leaves of higher plants. A rapid method for detecting the phase transition of thylakoid membrane lipids. *Photosynth Res* 4:257-263.

40. Heisel, F., M. Sowinska, J.A. Miehe, M. Lang, H.K. Lichtenthaler 1996.  
Detection of nutrient deficiencies of maize by laser induced fluorescence  
imaging. *J. Plant Physiol.* 148:622-631.
41. 日向康吉 1993. 植物生産の遺伝子工学. 星川清親編. 植物生産学概論.  
文永堂, 東京. 235-260.
42. Inada K. 1963. Studies on a method for determining the deepness of green  
and color chlorophyll content of intact crop leaves and its practical  
applications: 1. Principle for estimating the deepness of green color and  
chlorophyll content of whole leaves. *Japanese Journal of Crop Science*  
32:157-162.
43. Inoue, N., H. Kumagai and M. Hagiwara 2002. Improvement of fertilization  
rate by mass selection in common buckwheat. *Fagopyrum* 19:49-53.
44. Inoue, Y., M. Giashudin, E. Sakaiya, K. Nakano and K. Kawamura 2008.  
NDSI map and IPLS using hyperspectral data for assessment of plant and  
ecosystem variables: With a case study on remote sensing of grain protein  
content, chlorophyll content and biomass in rice. *Journal of the Remote  
Sensing Society of Japan* 28:317-330.
45. Inoue, Y., J. Penuelas, A. Miyata and M. Mano 2008. Normalized difference  
spectral indices for estimating photosynthetic efficiency and capacity at a  
canopy scale derived from hyperspectral and CO<sub>2</sub> flux measurements in rice.  
*Remote Sensing of Environment* 112:156-172.
46. 石澤広明・斎藤保典・雨宮貴明・小松 和彦 2002. レーザ誘起蛍光法に  
よるレタス生育モニタリング. *農業機械學會誌* 64:89-94.
47. 伊藤誠治・関正裕・池田順一 2013. そばの下胚軸硝酸態窒素濃度と収  
量. *北陸作報* 49:14.
48. Johansson J., M. Andersson, H. Edner, J. Mattsson and S. Svanberg 1996.

- Remote fluorescence measurements of vegetation spectrally resolved and by multi-colour fluorescence imaging. *J. Plant Physiol.* 148:632–637.
49. Kautsky, H. and A. Hirsch 1931. Neue versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften.* 19:964.
50. Kim, H.H. and K.S. Brown 1986. Laser and sunlightinduced fluorescence from chlorophyll pigments. In Publications Division, Proceedings of the 1986 international geoscience and remote sensing symposium (IGARSS '86) on remote sensing. Today's solutions for tomorrow's information needs. ESA Publications division, Zurich. 3:1599–1601.
51. Kim, M.S., D. Krizek, C.S.T. Daughtry, J.E. McMurtrey, R.k. Sandhu, E.W. Chappelle, L.A. Corp and E.M. Middleton 1996. Fluorescence imaging system: application for the assessment of vegetation stresses. In Cecchi G., G. D'Urso, E.T. Engman and P. Gudmansen Eds., Remote sensing of vegetation and sea (EUROPTO '96), SPIE, Taormina. 4–13.
52. Kim, M.S., E.H. Lee, C.L Mulchi., J.E. McMurtrey, E.W. Chappelle and R.A. Rowland 1998. Fluorescence imaging of soybean flavonol isolines. In sdvances in laser remote sensing for terrestrial and oceanographic applications, SPIE. Orlando. 3382: 170-178.
53. 北川靖夫・岡山清司・広川智子 1987. 葉緑素計によるコシヒカリの葉色と稲体窒素濃度．富山県農業技術センター研究報告. 1：1-7
54. Klughammer, C. and U. Schreiber 2008. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation pulse method. PAM application notes. 1:27–35.
55. Knipling, E.B. 1970. Physical and physiological basis for the reflectance of visible and near-Infrared radiation from vegetation. *Remote Sensing of*

- Environment. 1:155–159.
56. 小林和彦 2001. FACE(開放系大気 CO<sub>2</sub> 増加)実験. 日本作物學會紀事. 70:1–16.
57. Komori, A., N. Inoue, K. Fujita, S. Kasajima and A. Horii 2007. Measurement of rutin and quercetin in Tartary buckwheat flour by ultraviolet-induced fluorescence. Proceeding of the 10th international symposium on Buckwheat. 10:403–409.
58. Kreft, I., N. Fabjan and M. Germ 2003. Rutin in buckwheat - Protection of plants and its importance for the production of functional food. Fagopyrum 20: 7–11.
59. Kumagai, E., T. Araki and F. Kubota 2007. Effects of nitrogen supply restriction on gas exchange and photosystem 2 function in flag leaves of a traditional low-yield cultivar and a recently improved high-yield cultivar of rice (*Oryza sativa* L.). Photosynthetica. 45:489–495.
60. Kumagai, E., T. Araki and F. Kubota 2009. Characteristics of gas exchange and chlorophyll fluorescence during senescence of flag leaf in different rice (*Oryza sativa* L.) cultivars grown under nitrogen-deficient condition. Plant Prod. Sci. 12:285–292.
61. Kuraishi, S., Y. Hashimoto and M. Shiraishi 1981. Latent periods of cytokinin-induced stomatal opening in the sunflower leaf. Plant Cell Physiology 22:911–916.
62. Lang, M. and H.K. Lichtenthaler 1991. Changes in the blue-green and red fluorescence-emission spectra of beech leaves during the autumnal chlorophyll breakdown. J. Plant Physiol. 138:550–553.
63. Lang, M., H.K. Lichtenthaler, M. Sowinska, F. Heisel and J.A. Miede 1996. Fluorescence imaging of water and temperature stress in plant

- leaves. *J. Plant Physiol.* 148:613-621.
64. Lang, M., H.K. Lichtenthaler, M. Sowinska, P. Summ and F. Heisel 1994. Blue, green and red fluorescence signatures and images of tobacco leaves. *Bot. Acta* 107:230-236.
65. Lang, M., P. Siffel, Z. Braunova and H.K. Lichtenthaler 1992. Investigations of the blue-green fluorescence emission of plant leaves. *Bot. Acta* 105:435-440.
66. Lang, M., F. Stober and H.K. Lichtenthaler 1991. Fluorescence emission spectra of plant leaves and plant constituents. *Radiat. Environ. Biophys.* 30:333-347.
67. Lenk, S, L. Chaerle, E.E. Pfündel, G. Langsdorf, D. Hagenbeek, H.K. Lichtenthaler, D. Van Der Straeten and C. Buschmann 2007. Multispectral fluorescence and reflectance imaging at the leaf level and its possible applications. *J Exp Bot* 58:807-814.
68. Lichtenthalerand, H.K. and J.A. Miehe 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in plant science.* 2:316-320.
69. Lichtenthaler H.K., M. Lang, M. Sowinska, F. Heisel and J.A. Miehe 1996. Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *J. Plant Physiol.* 148:599-612.
70. Lichtenthaler, H.K., M. Lang, M. Sowinska, P. Summ, F. Heisel and J.A. Miehe 1997. Uptake of the herbicide diuron as visualized by the fluorescence imaging technique. *Bot. Acta* 110:158-163.
71. Lichtenthaler, H.K. and J. Schweiger 1998. Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the bluegreen fluorescence emission of plants. *J. Plant Physiol.* 152:272-282.
72. Lüdeker, W., H.-G. Dahn and K.P. Günther 1996. Detection of fungal



- infection of plants by laser-induced fluorescence: An attempt to use remote sensing. J. Plant Physiol. 148:579–585.
73. Lüdeker, W., K.P. Günther and H.-G. Dahn 1995. Comparison of different detection set-ups for laserinduced fluorescence monitoring of vegetation. EARSel Adv. Remote Sens. 3: 32-41.
74. Marjana, R., U. Bukovnik, M. Likar, I. Kreft 2012. UV-B radiation affects flavonoids and fungal colonisation in *Fagopyrum esculentum* and *F. tataricum*. Cent. Eur. J. Biol. 7: 275-283.
75. Makino, A., T. Mae and K. Ohira 1985. Photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in rice leaves from emergence through senescence. Planta 166:414-420.
76. 松島省三・松崎昭夫・富田豊雄 1970. 水稻収量の成立原理とその応用に関する作物学的研究:第 101 報 水稻個体群の葉色表示法について. 日本作物學會紀事 39: 231-236 .
77. 松崎昭夫・松島省三・富田 豊雄 1974. 水稻収量の成立原理とその応用に関する作物学的研究: 第 119 報葉色とその葉鞘染色比による窒素制限効果の判定. 日本作物學會紀事 43: 167-173 .
78. Middleton, E., E.W. Chappelle, A. DeLuca 1995. Evaluating photosynthesis in boreal forest species with fluorescence measurements. In international geoscience and remote sensing symposium, Firenze. 1723-1725.
79. Middleton, E.M., E.W. Chappelle, T.A. Cannon, P. Adamse and S.J. Britz 1996. Initial assessment of physiological response to UV-B irradiation using fluorescence measurements. J. Plant Physiol. 148:69–77.
80. 三室守・垣谷俊昭・民秋均 2011. クロロフィル 構造・反応・機能 , 三室守編, 裳華房, 東京. 282-283.

81. Morales, F., R. Belkhodja, Y. Goulas, J. Abad'a and I. Moya 1999. Remote and near-contact chlorophyll fluorescence during photosynthetic induction in iron-deficient sugar beet leaves. *Remote Sens. Environ.* 69:170-178.
82. Morales F., Z.G. Cerovic and I. Moya 1994. Characterization of blue-green fluorescence in the mesophyll of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves affected by iron deficiency. *Plant Physiol.* 106:127-133.
83. Morales F., Z.G. Cerovic and I. Moya 1996. Timeresolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves: Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore in the epidermis. *Biochim. Biophys. Acta* 1273:251-262.
84. Morales, F., Z.G. Cerovic and I. Moya 1998 . Timeresolved blue-green fluorescence of sugar beet leaves. Temperature-induced changes and consequences for the potential use of blue-green fluorescence as a signature for remote sensing of plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 25:325-334.
85. Moya, I., Y. Goulas, F. Morales, L. Camenen, G. Guyot and G. Schmuck 1995. Remote sensing of timeresolved chlorophyll fluorescence and back-scattering of the laser excitation by vegetation. *EARSeL Adv. Remote Sens.* 3:188-197.
86. Moya, I., G. Guyot and Y. Goulas 1992. Remotely sensed blue and red fluorescence emission for monitoring vegetation. *ISPRS journal of photogrammetry and remote sensing* 47:205-231.
87. 中林広一 2008. ソバは漢字でどう書くか-中国の文献に現れるソバー . 高松幸治編, うどんそば. 田島書店, 東京. 41-145.
88. Ortiz-Lopez, A., D.R. Ort and J.S. Boyer 1991. Photophosphorylation in attached leaves of *Helianthus annuus* at low water potentials. *Plant Physiol.*

96:1018-1025.

89. 尾崎幸洋・宇田明史・赤井俊雄 2002. 化学者のための多変量解析—ケモメトリックス入門—. 鈴木俊男編, 講談社, 東京. 50-73 .
90. Papageorgiou, G. 1975. Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. In Govindjee ed., *Bioenergetics of Photosynthesis*. Academic Press, New York. 319-371.
91. Peng, S. and G.S. Khush 2003. Four decades of breeding for varietal improvement of irrigated lowland rice in the international rice research institute. *Plant Prod. Sci.* 6:157-164.
92. Philpot, W.D., M. Duggin, R. Raba, F.-A. Tsai 1996. Analysis of reflectance and fluorescence spectra for atypical features: fluorescence in yellow-green. *J. Plant Physiol.* 148:567-573.
93. Porra, R.J., W.A. Thompson and P.E. Kriedemann 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta - Bioenergetics* 975:384-394.
94. Qi, J., A. Chehbouni, A.R. Huete, Y.H. Kerr and S. Soroshian 1994. A modified soil adjusted vegetation index. *Remote Sens. Environ.* 48: 119-126.
95. Rouse J.W. 1974. Monitoring the vernal advancement and retro gradation (green wave effect) of natural vegetation. Texas A&M University Remote Center. 1-8.
96. 斉藤保典 1995. レーザー励起蛍光法による植物の生育状態の診断. *O plus E* 185:87-94.
97. Saito, Y., K. Hatake, E. Nomura, T.D. Kawahara, A. Nomura, N. Sugimoto

- and T. Itabe 1997. Rangeresolved image detection of laser-induced fluorescence of natural trees for vegetation distribution monitoring. Jpn. J. Appl. Phys. 36:7024-7027.
98. Saito, Y., M. Kanoh, K. Hatake, T.D. Kawahara and A. Nomura 1998a. Investigation of laser-induced fluorescence of several natural leaves for application of lidar vegetation monitoring. Appl. Optics 37:431-437.
99. Saito, Y., M. Kanoh, A. Takeuchi, T.D. Kawahara, A. Nomura, H. Ishizawa, T. Matsuzawa and K. Komatsu 1998b. Application of laser-induced fluorescence to growth monitoring of agricultural products (lettuce). In first international conference on geospatial information in agriculture and forestry. Lake buena vista, Florida. 509-515.
100. Saito, Y., K. Kurihara, H. Takahashi, F. Kobayashi, T. Kawahara, A. Nomura and S. Takeda 2002. Remote estimation of the chlorophyll concentration of living trees using laser-induced fluorescence imaging lidar. Optical Review 9:37-39.
101. Saito, Y., H. Kurata, Y. Hara, F. Kobayashi, T. Kawahara and A. Nomura 2005. Three dimensional monitoring of stack plume dynamics by a scanning Mie lidar system as a plume watchdog station. Opttical Review 12:328-333.
102. Saito, Y., T. Matsubara, F. Kobayashi, T. Kawahara and A. Nomura 2005. Laser-induced fluorescence spectroscopy for *in-vivo* monitoring of plant activities. The 7th Fruit, Nut and Vegetable Production Engineering Symposium 7:699-708.
103. Saito, Y., K. Takahashi, E. Nomura, K. Mineuchi, T.D. Kagawa, A. Nomura, S. Kobayashi and H. Ishii 1997. Visualization of laser-induced fluorescence of plants influenced by environmental stress with a microfluorescence imaging system and a fluorescence imaging lidar

- system. In Narayanan R.M. and J.E. Kalshoven Eds., *Advances in laser remote sensing for terrestrial and oceanographic applications*. 190-198.
104. Sandhu, R., M.S. Kim, D.T. Krizek and E. Middleton 1997. Fluorescence imaging and chlorophyll fluorescence to evaluate the role of EDU in UV-B protection in cucumber. *The international society for optical engineering*. 3059:42-51.
105. 佐々木政子 1998. 太陽紫外線の科学. *日本皮膚科学会誌* 108: 1540-1545.
106. 佐々木政子 2000. オゾン層破壊と地表の太陽紫外線. 市橋正光・佐々木政子編, *生物の光障害とその防御機構*. 共立出版, 東京. 1-16.
107. 佐藤裕・杉本秀樹 2008. 播種後の過湿条件が普通ソバの出芽と初期生育に及ぼす影響. *日作四国支報* 45:68-69.
108. Schreiber, U., U. Schliwa and W. Bilger 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10:51-62.
109. Schreiber, U. 1994. *Ecophysiology of Photosynthesis*. In Schulze, E.D. and M.M. Caldwell eds., Springer, Berlin. 49-70.
110. Schreiber, U., W. Bilger, H. Hormann and C. Neubauer 1998. Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In: Raghavendra, A.S. ed., *Photosynthesis: A comprehensive treatise*. Cambridge university press, Cambridge. 320-336.
111. Schweiger, J., M. Lang and H.K. Lichtenthale 1996. Differences in fluorescence excitation spectra of leaves between stressed and non-stressed plants. *J. Plant Physiol.* 148:536-547.
112. Sekinuma, M., T. Natori, R. Mahamud and N. Inoue 2010. Diversity

- analysis of photosynthetic function using ultraviolet induced fluorescence in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). Proceedings of the 11th international symposium on buckwheat 11:205-210.
113. Sekinuma, M., T. Natori, F. Sasaki, F. Kato and N. Inoue 2011. Ultraviolet-induced fluorescence of rice leaf as influenced by nitrogen application and cultivars. The proceedings of 7th Asian crop science association congruence 7: 170.
114. Sekinuma, M. and N. Inoue 2013a. Near sensing of RuBisCO and chlorophyll contents in common buckwheat leaf by ultraviolet-induced fluorescence. Proceeding of the 12th international symposium on buckwheat. 12:69-71.
115. Sekinuma, M. and N. Inoue 2013b. Non-destructive measurement of RuBisCO and chlorophyll in common buckwheat leaf by ultraviolet-induced fluorescence. *Fagopyrum* 30:27-32.
116. Sekinuma, M. and N. Inoue 2013c. Statistical estimation of RuBisCO and chlorophyll contents by ultraviolet-induced fluorescence in common buckwheat. *Fagopyrum* 30:33-40.
117. 関沼幹夫, 井上直人, 2013a. イネとソバの葉における植物栄養学的情報の取得 レーザーとキセノン光源による紫外励起蛍光スペクトルの比較 . 北陸作物学会報 48: 7-10.
118. 関沼幹夫, 井上直人, 2013b. 紫外レーザー励起蛍光分析による普通ソバの葉における窒素栄養の情報取得. 北陸作物学会報 48: 11-13.
119. 関沼幹夫, 井上直人, 2013c. 紫外励起蛍光スペクトルによる植物栄養診断手法の開発 窒素施用によるソバ個葉の特性解析 . 北陸作物学会報 48: 14-17.
120. 関沼幹夫, 井上直人, 2013d. 窒素レベルがソバの初期光合成に及ぼす

影響. 北陸作学会報 48: 18-21.

121. Sims, D.A. and J.A. Gamon 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote sensing of environment* 81:337-354.
122. Sinclair, T.R. and R.C. Muchow 1999. Radiation use efficiency. *Adv. Agron.* 65:215-265.
123. Smith, J.H.C. and A. Benitez 1955. Modern methods of plant analysis. In Peach, K. and M.V. Tracey eds. Vol.4, Springer-Verlag, Berlin. 143-196.
124. Sowinska, M., F. Heisel, J.A. Miede, M. Lang, H.K. Lichtenthaler and F. Tomasini 1996. Remote sensing of plants by streak camera lifetime measurements of the chlorophyll a emission. *J. Plant Physiol.* 148:638-644.
125. Stober, F., M. Lang and H.K. Lichtenthaler 1994. Blue, green, and red fluorescence emission signatures of green, etiolated, and white leaves. *Remote Sens. Environ.* 47:65-71.
126. Stober, F. and H.K. Lichtenthaler 1992. Changes of the laser-induced blue, green and red fluorescence signatures during greening of etiolated leaves of wheat. *J. Plant Physiol.* 140:673-680.
127. Stober, F. and H.K. Lichtenthaler 1993a. Characterization of the laser-induced blue, green and red fluorescence signatures of leaves of wheat and soybean grown under different irradiance. *Physiol. Plant.* 88:696-704.
128. Stober, F. and H.K. Lichtenthaler 1993b. Studies on the constancy of the blue and green fluorescence yield during the chlorophyll fluorescence induction kinetics (Kautsky effect). *Radiat. Environ. Biophys.* 32:357-

365.

129. Stober, F. and H.K. Lichtenthaler 1993c. Studies on the localization and spectral characteristics of the fluorescence emission of differently pigmented wheat leaves. Bot. Acta 106:365-370.
130. Subhash, N., P. Mazzinghi, G. Agati, F. Fusi and B. Lercari 1995. Analysis of laser-induced fluorescence line shape of intact leaves: application to UV stress detection. Photochem. Photobiol. 62:711-718.
131. 杉本秀樹・佐藤亨 1999. 西南暖地における夏ソバ栽培. - 播種期の違いが生育・収量に及ぼす影響. 日作紀 68:39-44.
132. Suzuki, T., Y. Honda and Y. Mukasa 2005. Effects of UV-B radiation, cold and desiccation stress on rutin concentration and rutin glucosidase activity in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) leaves. Plant Science. 168:1303-1307.
133. Svanberg, S. 1995. Fluorescence lidar monitoring of vegetation status. Physica Scr. 58:79-85.
134. Theisen, A.F. 1988. Fluorescence changes of a drying maple leaf observed in the visible and near-infrared. In Lichtenthaler H.K. Ed., Applications of chlorophyll fluorescence in photosynthesis research, stress physiology, hydrobiology and remote sensing. Kluwer academic publisher, Dordrecht. 197-201.
135. 渡邊苞・畑中勇・稲田勝美 1999. デジタル式葉緑素計の開発: 第 1 報 構造と性能. 日本作物學會紀事 49:89-90.
136. Wintermans, J.F. and A.D. de Mots 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophyll *a* and *b* and their pheophytins in ethanol. Biochim. Biophys. Acta 109:448-453.
137. Wold, S. 2001. Personal memories of the early PLS development.



Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 58:83-84.

138. Yao, X., Y. Zhu, Y.C. Tian, W. Feng and W.X. Cao 2010. Exploring hyperspectral bands and estimation indices for leaf nitrogen accumulation in wheat. *Int. J. Appl. Earth Obs.*, 12:89-100.

第13章 省略用語

AIC	Akaike information criteria (赤池情報量基準)
BSP	Buffer soluble protein (可溶性タンパク)
CO <sub>2</sub>	Carbon dioxide (二酸化炭素)
CW	Continuous wave (連続波)
ETR	Electron Transfer Rate (電子伝達速度)
LASER	Light amplification by stimulated emission of radiation (レーザー)
LED	Light emitting diode (発光ダイオード)
LIF	Laser induced fluorescence (レーザー励起蛍光)
NDSI	Normalized difference spectral index (正規化分光指数)
PAM	Pulse amplitude modulated (パルス変調)
PAR	Photosynthetically active radiation (光合成有効放射)
PLS	Partial least squared (部分最小二乗法)
PMA	Photo multichannel analyzer (多波長分光器)
PPI	Potential Photoreaction Index (光合成明反応潜在力指数)
RuBisCO	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (ルビスコ)
R <sup>2</sup>	Determination coefficient (決定係数)
SPAD	Soil and plant analyses development (土壌・作物診断機器開発関連事業)
TC	Total chlorophyll (総クロロフィル)
UV	Ultraviolet (紫外線)

## 第 13 章 省略用語

UV-B	Ultraviolet light-B (中波長紫外線)
UV-LIF	Ultraviolet-laser induced fluorescence (紫外レーザー励起蛍光)
UV-IF	Ultraviolet-induced fluorescence (紫外励起蛍光)

### 第14章 和文要旨

植物の栄養診断は，省資源栽培による持続的な栽培のために重要であり，簡単かつ精密に測定できることが求められる．本研究では，近年の光計測技術の進歩により発展した蛍光計測技術の中でも取得できる情報量の多い紫外励起蛍光計測に着目した．

本研究で扱うソバは，紫外線環境に適応した植物群に含まれ，相反する光に対する防御と利用を行い複雑な問題をうまく回避している植物種である．この光への回避と退避性の高さは，ソバが高標高地帯・冷涼な気象下で栽培が可能な理由の一つである．ソバは，他の植物種に比べて，光合成の明反応における重要な役割をする光化学系 II が太陽 UV-B 放射による損傷作用に対して強いと報告(Marjana 2012)されている．また，ソバの太陽 UV-B に対する防御は，他の植物が紫外線を吸収する化合物を葉の表側の表皮細胞に蓄え，葉肉細胞への紫外線を抑制して葉緑体を保護する(Bornman et al. 1997)機構に加え，ルチンによる日傘作用(Kreft 2004)や，光酸化に強いなどの特徴がある．普通ソバは，耐 UV 特性の解析に適した材料である．著者は，植物栄養状態の診断技術の向上の為に紫外レーザー励起蛍光の測定デバイスを開発し，その評価に取り組んだ．

第 1 章は緒論である．作物の植物栄養診断技術として様々な利用法が開発されてきている紫外励起蛍光計測法を用いて，窒素や光合成に関する栄養状態を診断できる非破壊非接触型の測定法を開発し，診断技術の向上や栽培の効率化する診断法の開発を目的とした．第 2 章では，葉の蛍光メカニズムやセンシングにおける研究の歴史などを概説し問題点を抽出している．

第 3 章では，キセノン光源を光源とした紫外励起蛍光計測システムを構築し，蛍光スペクトルを計測した．普通ソバの葉における蛍光スペ

クトルは、品種や施肥のいずれの違いがあっても 400-500 nm の蛍光が検出されにくい特徴があることが明らかになった。

第 4 章では、実用性のあるクロロフィルと RuBisCO の含量推定法を開発するために、紫外励起蛍光測定における関係の深い波長帯の選択を試みた。蛍光スペクトルを NDSI というリモートセンシングの指標を用いて正規化を行い、化学分析項目との相関関係を検討した。その結果、情報のホットスポットが異なる波長帯にあることが明らかになり、クロロフィル a と RuBisCO 含量の同時測定の可能性が明らかになった。第 5 章では、前章で明らかにした光合成関連物質と関係のある波長帯の蛍光情報を用いて、ケモメトリクスによる含量の推定を試みた。NDSI による情報圧縮が有効であることや、クロロフィル a は  $R^2=0.876$  や、RuBisCO/可溶性タンパク質の比が  $R^2=0.739$  と高い推定精度で推定可能であることを示した。

第 6 章～第 8 章では、紫外レーザー励起蛍光の特性を把握しセンシングに有利であることを明らかにした。また、普通ソバの初期生育において、子葉が本葉よりも窒素量の増加によって電子伝達速度が早くなる重要な器官であることをパルス変調クロロフィル蛍光計測法により明らかにした。電子伝達系の評価は、葉面積や乾物重のような形態調査から知ることのできない、光合成の明反応に関する潜在的な活性や効率を判断するために効果的な手法といえる。また、紫外レーザー励起蛍光分析方法による窒素栄養状態の把握を試み、考案した蛍光指標が、紫外線抵抗性と生産性を反映した指標と考えられた。

第 9 章では、アジアにおいて重要なイネにおいて、品種や窒素施用量による蛍光スペクトルへ与える影響を検討し、今後の発展の可能性を示唆した。

第 10 章は、総合考察として本研究の成果を評価した。

研究を通して、紫外レーザー励起蛍光による植物栄養状態を示すクロロフィル a や RuBisCO 比の非破壊・同時測定が可能となり、また、レーザー励起することにより窒素施用の判定や紫外線抵抗性と光合成のバランスを反映した光合成明反応潜在力の評価に有効であることが明らかとなった。これらの成果は、栄養診断技術や栽培技術の向上における有用な知見といえる。