

植物葉の蛍光リモートセンシング計測システムの開発とストレス障害

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学技術部 公開日: 2015-02-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 増田, 健二 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00008037

植物葉の蛍光リモートセンシング計測システムの開発とストレス障害

増田 健二

技術部 プロジェクト・安全支援部門

CCD分光器を用いて、酸性液(pH 4.0:緩衝液)や有害紫外線(UV-B,C)などの植物のストレス要因を与え、植物葉のクロロフィル濃度やその他化合物の構成要素に関する情報をレーザー励起蛍光法(Laser-Induced Fluorescence, LIF法)によりスペクトル解析する。CCDカメラを用いて、クロロフィル量の有無による蛍光の葉内分布の違いを明らかにするとともに、ここで得られた知見をもとに、ストレスによるLIFスペクトルへの影響について調べた。また遠隔計測システムの開発として、CCDカメラによる二次元的なクロロフィル蛍光画像解析法を確立する。太陽光スペクトル中の暗線によるFLD(Fraunhofer Line-Discrimination)法を用いた植物蛍光分布画像システムの開発を行う。生育場所において直達太陽光励起による植物葉蛍光を計測する。

1. はじめに

植物における活性酸素生成(ストレス)要因としては、水分・土壌など様々なものがあるが、本研究では地球環境の悪化の一原因となっている大気汚染物質(NO_x , SO_2 , etc.)による酸性雨とオゾン層破壊に起因する有害紫外線(ultraviolet B:UV-B)に着目した。これらの大気汚染物質に暴露した植物葉から放射されるクロロフィル蛍光スペクトルをレーザー励起蛍光(Laser-Induced Fluorescence:LIF)法[1],[2],[3]を用いて測定し、光合成能力とストレス指標を評価した。クロロフィルから放出される蛍光を解析することにより、葉の組織を壊さずに非接触で葉緑体中の光合成能力、すなわちストレスシグナルを計測する。高ストレス状態では、活性酸素濃度が増加して光合成が抑制される。植物葉からのLIFは、照射するレーザー光の波長によってそのスペクトルが異なる。可視レーザー光で励起した場合には、主にクロロフィルの2つの化学反応系I,IIに関係した赤色(690nm)から近赤外(740nm)で極めて強い蛍光が見られ、このスペクトルの変化を解析することにより、植物葉のクロロフィル濃度や光合成色素の構成要素に関する情報が得られる。また紫外レーザー光励起の場合には、クロロフィル以外にもフラボノイドによる緑色(490nm)蛍光が見られる。本研究では、クロロフィル量の有無による蛍光の葉内分布の違い等を観察するとともに、ここで得られた知見をもとに、ストレスによるLIFスペクトルへの影響について調べた。

2. レーザー励起蛍光法

試料植物葉として、緑色の葉に白色の斑入りのポトス(*Pothos*, *Epipremnum aureum*)葉を用いたときの蛍光顕微鏡(Leica TCS SP8)写真を示す。倍率63倍で表面から100 μm 程度の深さまで測定が可能である(Fig.1)。LIF測定ではCCD分光器(Ocean Optics USB2000)を用いて蛍光スペクトルを測定する。532nmレーザー光による励起(Fig.2-a)では、クロロフィルによる650-770nmの赤色の蛍光があり、690nm(F690)と740nm(F740)に蛍光のピークが見られる。F740は、光合成活性状態のチラコイド膜上に存在する光化学系Iのクロロフィルから発せられており[4]、これらのクロロフィル蛍光強度比(F740/F690)は、植物生体内でのクロロフィル濃度の指標[5]となることが知られている(Fig.2)。

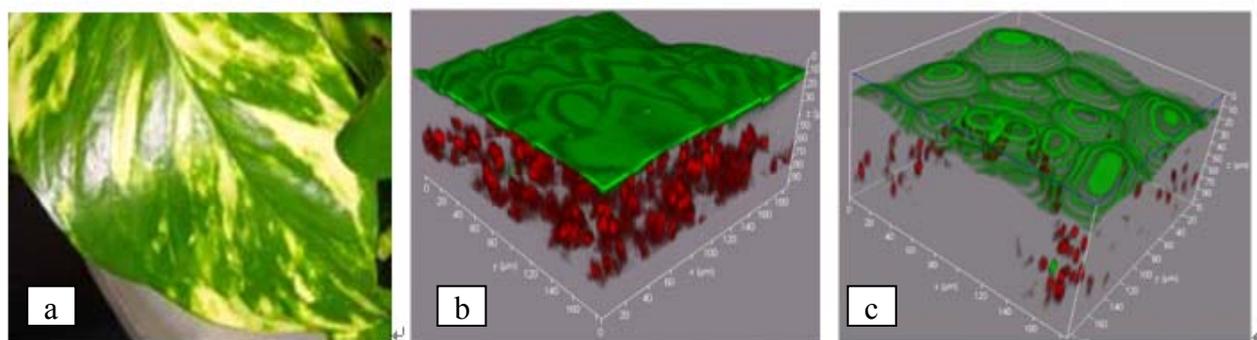


Fig. 1 ポトス葉の蛍光顕微鏡写真：a,ポトス葉の写真、b,緑葉部分、c,白葉部分。緑葉では深さ 30 μm 程度からの柵状組織にクロロフィルから発せられる赤色-近赤外域の蛍光が見られ、表皮（クチクラ）では 5 μm の厚さでフラボノイドによる緑色蛍光が観察される。白葉では、赤色蛍光は米粒状に点在しており、緑色蛍光もより薄くなり楕円縞模様となっている。

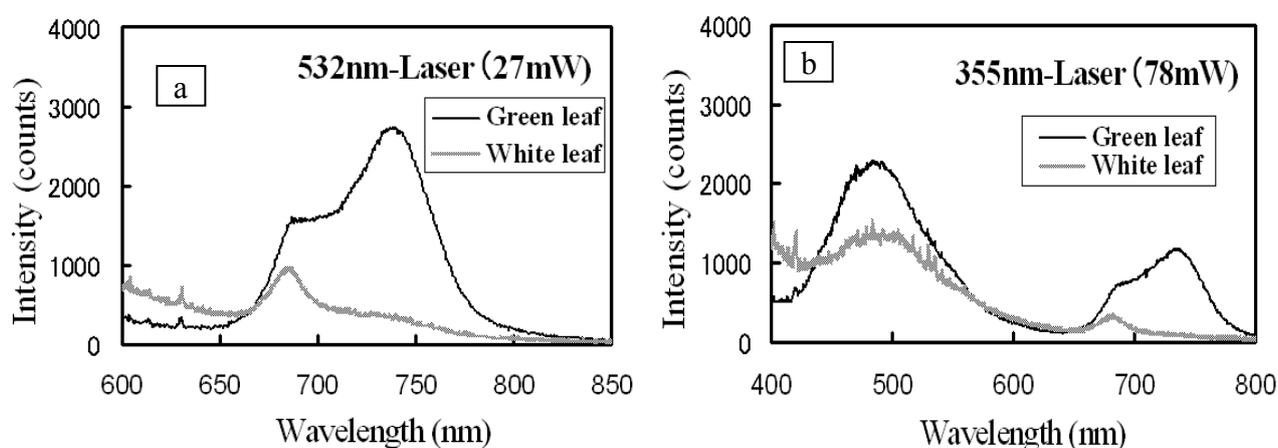


Fig. 2 ポトス葉を用いて LIF 法による蛍光強度測定：a, 紫外（355nm, 78mW）、b,可視（532nm,27mW）。クロロフィルをほとんど含まない白葉では、740nm（F740）の蛍光ピークがなくなり、690nm（F690）の蛍光ピークも半分程度の強度となった。紫外励起による 490nm（F490）の蛍光ピークの比較において、フラボノイド量に依存した蛍光強度が観測された。

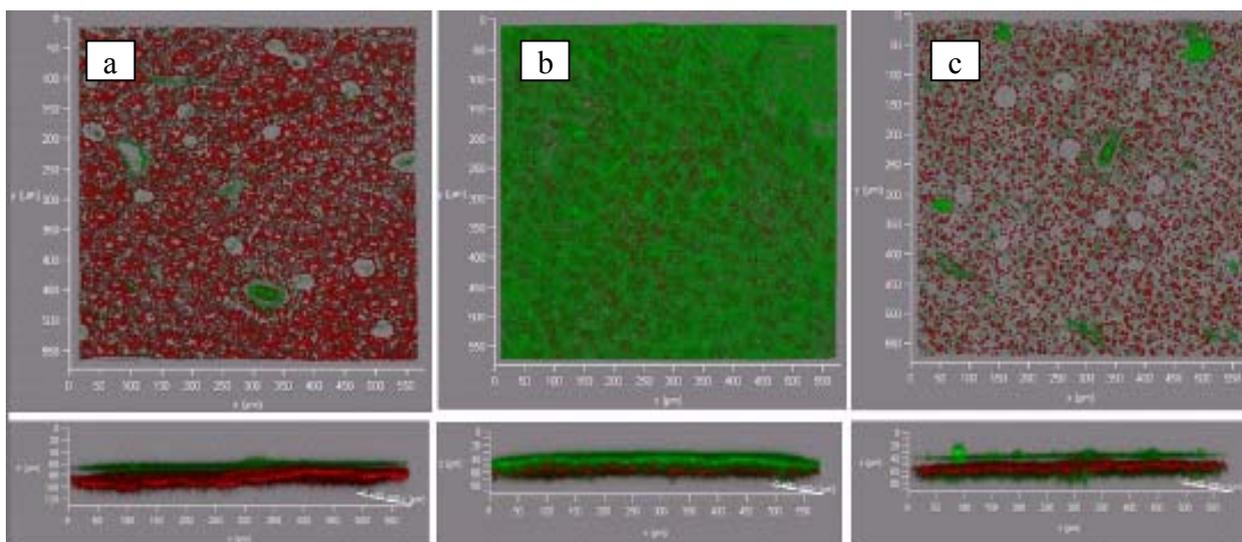


Fig. 3 ストレス障害による蛍光顕微鏡写真：a, Natural, b, UV-C Exposure, c,PH-4.0 Exposure, 厚さ 5 μm のフラボノイド蛍光 (a) が UV-C の 6 時間暴露(b)によって 15 μm 程度に増殖し、クロロフィルが減少している。酸性水(pH 4)に葉の表面を 6 時間浸水させた後、1 週間放置した場合、葉は黄色く変色し、クロロフィル・フラボノイドともに減少している。

3. ストレス障害と蛍光スペクトルの関係

試料植物葉としてモンステラ (*Monstera*) を用いた。酸性水 (pH 4) や有害紫外線 (UV-C) などの植物のストレス要因を与え、植物葉のクロロフィルやフラボノイド濃度に関する情報を蛍光強度比 (F740/F690) や F490 の強度比較によって取得する。

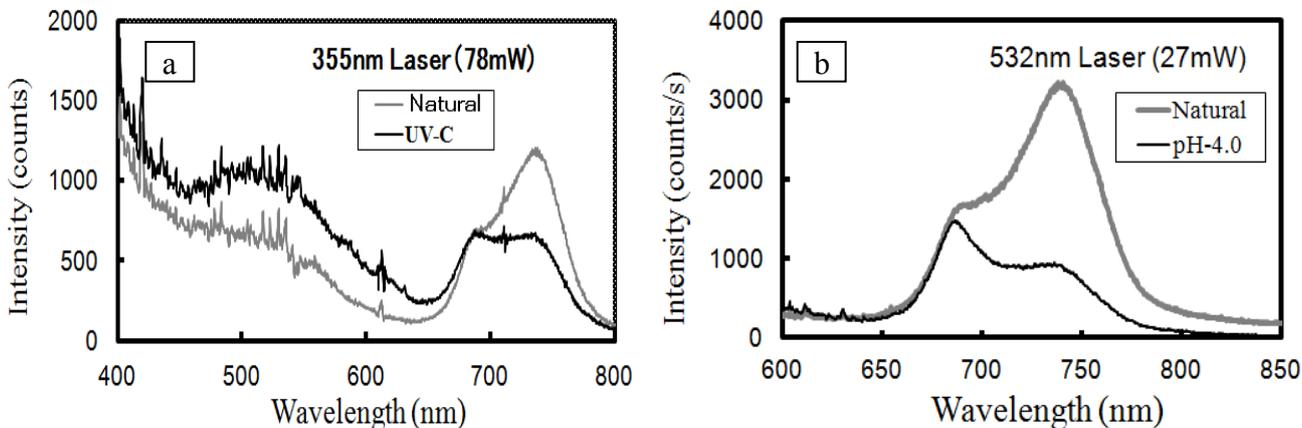


Fig. 4 モンステラ葉のストレス障害による蛍光スペクトル、LIF 法では、UV-C(a)と酸性水 pH-4(b)ストレスにより、光化学系 II のクロロフィル蛍光 (F740) は半分程度の強度となったが、光化学系 I の F690 蛍光には変化は見られず、740nm ピーク蛍光とクロロフィル濃度の関連性が確かめられた。また、フラボノイド蛍光 (F490) 強度の上昇が見られた。

4. 広角レンズを用いた LIF 法による葉面の蛍光分布測定

可視域 (532nm) レーザー光を拡幅し、白板に貼り付けた葉面全体に照射する。CCD カメラ (BITRAN BU51LN) に広角レンズと干渉フィルタ (CWL:750nm, FWHM:40nm) を取り付け、F740 の二次元的な蛍光画像を取得する (Fig.5)。

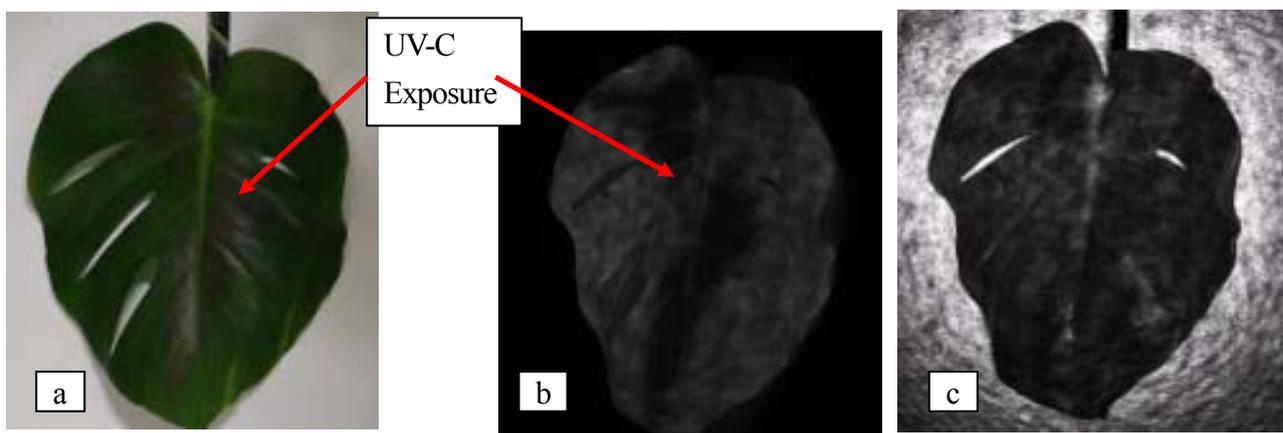


Fig. 5 LIF 法による葉面の蛍光分布 : a, モンステラ葉の中央 (茶色) 部分を UV-C で 6 時間暴露したデジタルカメラ写真。c, 532nmlaser の反射光。b, 蛍光画像。UV-C ストレスによってクロロフィルが減少し、蛍光強度の減少が画像として取得できた。

5. 植物葉蛍光リモートセンシング計測

Fig.6 のように、数 10m の距離の植物葉の蛍光をリモートセンシング計測するシステムとして、微弱な蛍光を天体望遠鏡 (口径 200 mm) により集光させる。さらに、レデューサを装着さ

せ、焦点距離を短縮させると、画角が広くなり明るい(小さな)像が得られる。Fig.6(a)のように、CCDカメラとフィルターを用いて、強度分布画像を取得する。また、レデューサの結像位置に平凸レンズ置き、ファイバーに集光し分光器に受光して、強度を向上させる (Fig.6-b)。

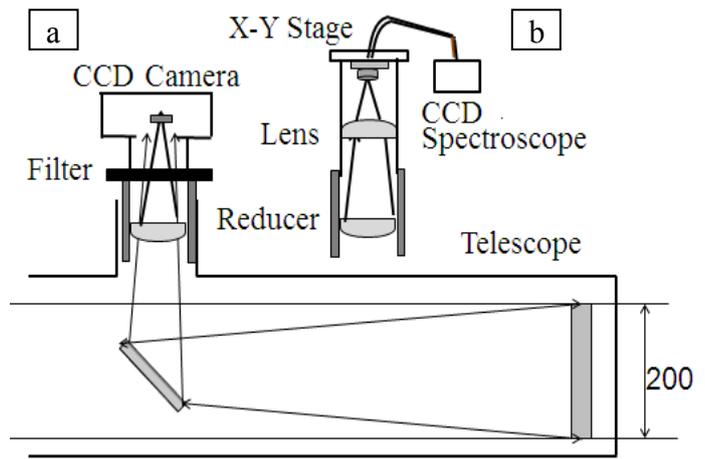


Fig.6 リモートセンシング計測システム

6. 天体望遠鏡を用いた LIF 法による 葉面の蛍光分布測定

試料植物葉として、緑色の葉に白色の斑入りのポトス (*Pothos*, *Epipremnum aureum*)

葉を用いた。ポトス葉は、緑葉部分には多くのクロロフィルを含むが白葉部分にはほとんどクロロフィルが含まれていない。Fig.7(a)のように532nmレーザー光を拡幅し植物葉の全面に照射して、天体望遠鏡(口径130mm)により集光させ、冷却式CCDカメラ(BITRAN BU-51LN)、レデューサ、干渉フィルター(CWL750nm, FWHM40nm)を用いて、二次元的なクロロフィル蛍光(F740)強度分布画像を取得した。Fig.7(b)は距離10mから撮影(積分時間20ms)した通常のCCDカメラ画像で、白葉部分からの反射光が強くなっている。Fig.7(c)は干渉フィルターを用いて撮像した蛍光画像(積分時間50s)である。緑葉部分が白く写り、クロロフィル蛍光強度を示している。



Fig.7 植物葉蛍光リモートセンシング計測 : a, 532nmレーザー光をポトス葉に照射する。b, 10mの距離からCCDカメラを用いて撮影(積分時間20ms)すると白葉部分が反射光は強いため白く写る。c, 干渉フィルター(CWL:750nm, FWHM:40nm)を用いて蛍光(積分時間50s)を撮影する。緑葉部分が白く写り、蛍光分布が撮影できた。

7. 直達太陽光励起による蛍光スペクトル計測

屋外において直達太陽光励起による植物葉蛍光リモートセンシング計測システムを開発する前段階として、実験室において距離15mで直達太陽光励起による植物葉蛍光スペクトル計測を行った。試料植物葉として、モンステラ(*Monstera*)を用いた。直達太陽光(94,800lx)が葉全面に照射するように配置した。15mの位置に望遠鏡(口径130mm)を設置し、CCD分光器(Ocean Optics USB 2000)を用いて計測する。Fig.8にレーザー励起蛍光(LIF)法および直達太陽光励起蛍光(Direct-Solar Radiation Induced Fluorescence, DSRIF)法[6],[7]によるモンス

テラ葉の蛍光スペクトルを示す。LIF法の蛍光スペクトルに対して、DSRIF法では葉表面からの反射光も含まれており、除去する方法が必要となる。

屋外において、20~30mの距離にある樹木(クスノキ・マツ・カエデ・イチョウ)について、直達太陽光励起による植物蛍光スペクトル計測を行った。DSRIF法では葉表面からの反射光も含まれ、蛍光のみのスペクトルとはなっていないが、緑葉の広葉樹のクスノキと針葉樹のマツについては、クロロフィル蛍光波長(F740)に蛍光のピークが見られる(Fig. 9)。

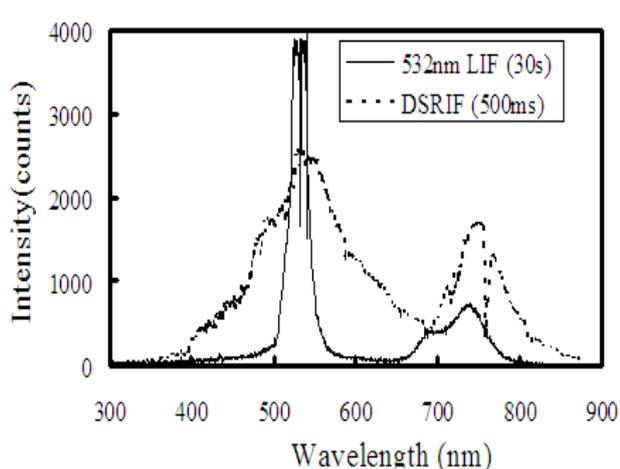


Fig.8 LIF と DSRIF スペクトル比較

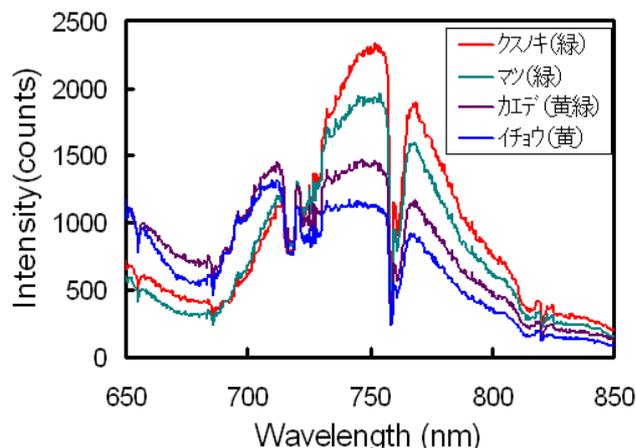


Fig.9 屋外樹木の DSRIF スペクトル

8. 直達太陽光励起による植物蛍光分布画像

CCD分光器(USB2000)を用いて計測された直達光、760.68nm透過(FWHM 1nm)フィルター装着時の透過光、および、実験室内でのモンステラの葉からのレーザー励起(532nm, 27mW)蛍光スペクトルを示す

(Fig. 10)。太陽光誘起のクロロフィル蛍光は非常に微弱なため、太陽スペクトル暗線(solar blind、O₂線: 759~762nm)域を利用する。技術的には、CCDカメラを用いて葉面全体の蛍光分布画像を取得した。積分時間はいずれも100msであり、距離は、(a)クスノキ 30m (b)マツ 25m (c)カエデ 20m (d)イチョウ 25mである。緑葉のクスノキとマツの場合にクロロフィル蛍光強度が大きいことがわかる(Fig. 11)。

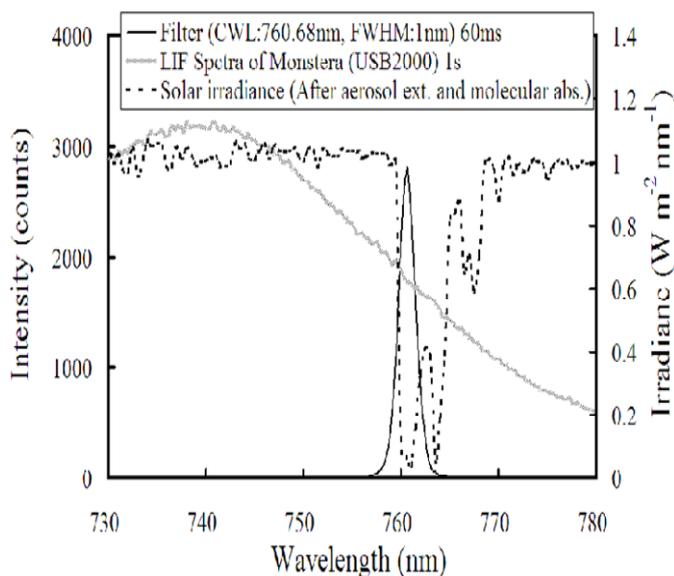


Fig.10 太陽スペクトル暗線 (O₂線: 759~762 nm)

9. まとめ

532nmレーザー励起した場合には、クロロフィルの赤色(670nm)から近赤外(740nm)で極めて強い蛍光が見られ、このスペクトルの変化を解析することにより、植物葉のクロロフィル濃度に関する情報が得られる。紫外域の355nmレーザー励起した場合には、クロロフィル以外にもフラボノイドからの緑色(490nm)の蛍光スペクトルが見られる。これら化合物の種類および濃度から蛍光強度や共焦点蛍光顕微鏡に

よる観察から葉内分布の違い等を明らかにするとともに、赤色蛍光 (F670) と近赤外蛍光 (F740) の蛍光強度比 (F670/F740) とクロロフィル濃度の関係を解析することによりストレスによる影響について調べた。緑葉と白い斑入りのポトス葉を用いて CCD カメラを用いて葉面全体の蛍光分布画像を取得した。この特徴を応用した LIF 法による葉面の蛍光分布画像計測は、植物の生育状態をリモートセンシング的に測定できる有効な方法である。今後は、屋外での FLD 法を用いてクロロフィルなどの蛍光解析に応用する。クロロフィル蛍光は太陽光に比べて非常に微弱なため、太陽スペクトルの暗線 (O2 線-A バンド: 760.68 nm) 域を利用する。この方法では、太陽光エネルギーによる生育場所において光合成能力に伴う、環境悪化に伴うストレス評価への活用などに期待される。

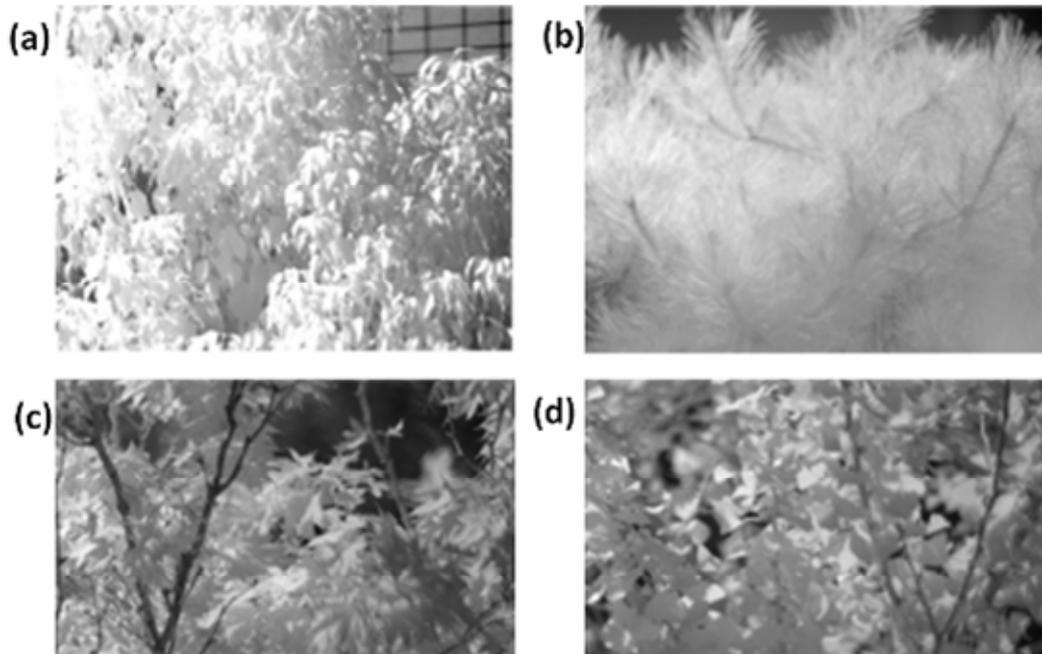


Fig. 11 直達太陽光励起蛍光 (DSRIF) 画像 (a) クスノキ, (b) マツ, (c) カエデ (d) イチョウ

謝辞

本研究は、三浦・臼杵プロジェクトの一貫として行いました。機械工学科D2 名和靖矩氏には、共焦点レーザー蛍光顕微鏡での計測をして頂きました。また、川田善正教授には別の視点での助言を頂き、深く感謝致します。

参考文献

- [1] H. K. Lichtenthaler *et al.*: Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *J. Plant Physiol.*, 148, 599-612 (1996).
- [2] 増田健二, 名和靖矩, 齊藤隼人, 馬淵佑作, 眞子直弘, 川田善正, 久世宏明, レーザー励起蛍光法を用いた植物の酸性雨と紫外線ストレス計測、第 60 回応用物理学会春季学術講演会 (2013.3.27-30)
- [3] Kenji. Masuda, Y. Nawa, H. Saitou, Y. Mabuthi, N. Manago, Y. Kawata, H. Kuze.: Proceeding of 2013 Japan-Taiwan Bilateral Symposium in Nano/Bio-Photonics 61-64, Shizuoka Univ. (Nov.24-27,2013)
- [4] Z. G. Cerovic *et al.*, Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects, *Agronomie*, 19, 543-578 (1999)
- [5] 峰内健一, 高橋邦夫, 立本英機: 大気汚染ガスが植物の LIF スペクトルと蛍光の葉内分布に及ぼす影響, *大気環境学会誌*, 34, 445-4556 (1999)
- [6] L. Guanter *et al.* : Developments for vegetation fluorescence retrieval from spaceborne high - resolution spectrometry in the O2 - A and O2 - B absorption bands. *J. Geophys. Res.*, vol. 115, D19303 (2010)
- [7] 増田健二, 齊藤隼人, 馬淵佑作, 眞子直弘, 久世宏明, 直達太陽光励起による植物葉の蛍光スペクトル計測システムの開発、第 55 回日本リモートセンシング学会秋季学術講演会論文集 33-34, (2013..11.21-22)