UV-B照射がラッカセイ葉におけるレーザー誘起蛍光の 葉内分布に及ぼす影響

福地 健一¹, 高橋 邦夫¹, 立本 英機²

¹木更津工業高等専門学校(〒292-0041 千葉県木更津市清見台東2-11-1)

²千葉大学 工学部(〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町1-33)

Impact of UV-B Irradiation on Transverse Distribution of Laser-Induced Fluorescence in Peanut Leaves

Ken'ichi FUKUCHI¹, Kunio TAKAHASHI¹, and Hideki TATSUMOTO²

¹Kisarazu National College of Technology, 2-11-1, Kiyomidai-Higashi, Kisarazu, Chiba 292-0041

²Faculty of Engineering, Chiba University, 1-33, Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522

(Received February 18, 2004)

This work reports the measurement of the transverse distribution of UV laser-induced fluorescence in peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves by an ISA (Imaging Spectrogram Analysis) system. The ISA system comprised a microscope, an imaging spectrograph, a chilled-CCD camera and image measurement devices. The fluorescence spectra on any line in a section of a leaf were examined in detail. Results reveal that the chlorophyll fluorescence ratio (F740/F685) increased according to the depth from the surface in the control leaf, while it maintained a constant value in the UV-B-exposed leaf. Blue fluorescence (400 nm-500 nm) increased remarkably under UV-B irradiation in the upper epidermis of the leaf. It is thought that this method is useful for examining the growth conditions of plant leaves.

Key Words: UV-B, Laser-induced fluorescence, Distribution of fluorescence in leaves, Imaging spectrogram

1. はじめに

近年、オゾンなどのガス状大気汚染物質¹⁾および酸性降水²⁾が原因と見られる森林の衰退やオゾン層破壊に起因した地表でのUV-B領域の紫外線増加による農作物の減収³⁾など、地球規模で起きている環境変容が植物に及ぼす影響に対して関心が高まっており、その影響評価を行うための技術確立が急務となっている。

我々は、植物葉にレーザーを照射して誘導される蛍光(Laser-Induced Fluorescence: LIF)が、植物の生育状態によって敏感に変化することからLIF測定によって植物のストレス状態を初期段階で検出可能であることを見出した⁴⁻⁶⁾。この技術を応用すれば、植物に対する遠隔かつ非破壊的な生育診断が可能となり、葉に可視被害が生ずる以前の段階でストレスを検知し、森林樹木や農作物に対して修復するための処置を行うことができるものと考えている。また、植物葉内における蛍光分布を測定するためにMFI(Micro Fluorescence Imaging)装置を開発し、レーザーによって誘導された蛍光と生葉内の細胞組織との関わりを計測することで、細胞レベルでの生体情報を得ることができることを明らかにした^{7,8)}。MFI装置は、葉の断面組織における微弱蛍光の発光分布を顕微鏡で拡大

し、干渉フィルターによって特定波長だけを取り出しイメージインテンシファイヤー付CCDカメラで二次元画像として計測する機能を有する。しかし、異なった波長の蛍光分布を計測するためには、それぞれの波長に対応した透過特性を持つ干渉フィルターに交換する必要があることから、蛍光のスペクトル分布を同時に計測することや異なった波長の蛍光の時間的な変化を比較するには不向きである。

我々はラッカセイ葉(*Arachis hypogaea* L.)にUV-Bを照射すると、光合成機能に障害が生じクロロフィル蛍光(F685およびF740)が相対的に小さくなるのと同時に、400 nm～500 nmにかけての青色蛍光(Blue Fluorescence)が特異的に増加することを見出した⁶⁾。青色蛍光の増加はオゾンや自動車排気ガスのストレス負荷では観察されない⁵⁾ことから、UV-Bストレスの検出に関して重要な情報を含んでいるものと考えられる。そこで、MFI装置によって葉内の青色蛍光が増加する部位を調べようと試みた。しかし青色蛍光は経時変化を示し、蛍光計測の為にレーザー光を照射すると急激に減衰し、照射10秒後には照射直後の約半分の強度になってしまうため⁶⁾、測定波長ごとに干渉フィルターの交換が必須であるMFI装置では、クロロフィル蛍光と青色蛍光の葉内分布を正確に測定することは困難で

あった。

そこで、干渉フィルターの代わりにイメージング分光器を用いて葉断面のライン上の蛍光スペクトルをイメージング分光画像として計測し、パーソナルコンピュータを用いて画像解析することで、ライン上の多点における蛍光スペクトルを同時計測することが可能な、イメージング分光画像解析 (Imaging Spectrogram Analysis: ISA) 装置の開発を行った。本研究では、ラッカセイ葉に UV-B を照射することで蛍光の葉内分布にどのような変化が生ずるかを、ISA 装置を用いて測定し、細胞レベルでの UV-B ストレス影響の解明を試みた。

2. 実験方法

2.1 ISA 装置の概要

Fig. 1 に ISA 装置の概略を示す。レーザー光源は、UV-A 領域 (351 nm ~ 364 nm) で発振する CW Ar⁺ レーザー (GLG3410, NEC) を使用し、レーザー光を Fig. 2 に示すように、葉の水分欠乏を防ぐよう作成したサンプルホルダー表面から上部に約 50 μ m だけ出た葉の断面の上面表皮側へ照射した。レーザー照射によって誘導された蛍光を顕微鏡に導き、シャープカットフィルター L39 (透過限界波長 390 nm) によってレーザー光の散乱成分をカットし、顕微鏡接眼部に取り付けたイメージング分光器 (ImSpector V8, デルフトハイテック) によって分光し、分光感度特性が 300 nm ~

Fig. 1 Block diagram of the ISA (Imaging Spectrogram Analysis) system.

Fig. 2 The sample holder for the ISA system.

1000 nm であるモノクロチルド CCD カメラ (冷却温度 + 5 $^{\circ}$ C, C5985-02, 浜松ホトニクス) で検出した。

イメージング分光器のスリット幅は 150 μ m であり、分光波長領域 360 nm から 805 nm を分解能約 10 nm で測定することができる。Fig. 3 にイメージング分光器の構造を示す。測定対象物体における任意の水平ライン上の光情報はレンズ系およびスリットでコリメートされ、プリズム / グレーティング / プリズム (PGP) によって図の垂直方向に分光される。イメージング分光器の射出側に前述のモノクロチルド CCD カメラを設置し、検出器の水平方向に測定対象物のライン上の位置を、垂直方向にこのライン上の分光情報を得た。

光検出器として用いたモノクロチルド CCD カメラの撮影素子は 1/2 インチインターライン CCD でメモリ画素数は 756 (H) $\times$ 483 (V) $\times$ 8 bit (D) である。CCD カメラの露光時間 (10⁻⁴ s ~ 5 min) およびアンプゲイン (0 dB ~ 16 dB) は、CCD コントロールユニットにて制御した。CCD カメラからのビデオ信号は CCD カメラコントロールユニットのフレームメモリを介し MPEG エンコーダー (USB-MPG, I-O DATA) に転送し、ビデオフォーマットを MPEG - 1 (Moving Picture Experts Group) 形式に変換してから USB ポートを通してパーソナルコンピュータ (PC-LL1000N/8, NEC) に取り込んだ。動画生成ソフト MPEG Creator (I-O DATA) のキャプチャー機能を用いてビデオ画像を静止画像 (680 (H) $\times$ 480 (V), JPEG 形式) に変換した後、開発した画像解析ツール F-image⁹⁾ を用いてイメージング分光画像の解析を行った。

ISA 装置で得られたイメージング分光画像の水平軸 (X 軸) は Fig. 3 の CCD 面における Spectral axis (波長軸) に、垂直軸 (Y 軸) は Spatial axis (空間座標軸) に相当する (以後、水平軸のプロファイル分光プロファイル、垂直軸のプロファイル空間プロファイルと記す)。

分光プロファイルの波長軸校正は、Hg ランプおよび Cd ランプの輝線スペクトルを測定し、そのピーク位置を検出して行った。分光プロファイルの強度分布は、イメージング分光器の波長透過率特性や CCD の波長感度特性等の影響を受ける。そこで波長毎の強度分布が校正されたタングステンランプを標準光源とし、波長感度補正を行った。また、空間プロファイルのスケールを決定するために、標準スケール (10 μ m 間隔で精度よく目盛を刻んだスライドガラス) にタングステンランプを投射し、その反射光を ISA 装置で測定した。その結果、倍率 5 倍の対物レンズで測定を行った場合の空間分解能が 10.8 μ m/ch であることを確認した。

Fig. 3 Structure of the ImSpector in the ISA system. PGP: Prism/Grating/Prism.

2.2 試料調整

千葉県の代表的な作物であるラッカセイを播種後45日間、温度 $24^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\% \pm 10\%$ に制御した人工気象室内で育成した。育成中は植物育成灯(ビオルックスHG, $10\text{ W} \times 4$ 本, $20\text{ W} \times 16$ 本, NEC)を用いて、千葉県の年間平均全日射量の約2分の1を目安とした光合成有効光量子束密度(PPFD: Photosynthetic Photon Flux Density) $260\text{ }\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (LI-190SA, LI-COR)の光を日中12時間(7時~19時)照射した。

葉緑素計(SPAD-501, ミノルタ)を用いて計測したGM (Green Meter) 値¹⁰⁾が成熟したラッカセイ葉としては標準的な値である約40であるものを供試葉とした。

2.3 測定方法

人工気象室内(温度: $24^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度: $60\% \pm 10\%$ 、PPFD: $180\text{ }\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)において、複葉であるラッカセイの右葉を対照葉とし、左葉だけに夏季における晴天ピーク値の約2.5倍である 5.0 Wm^{-2} のUV-B¹¹⁾を6時間照射し、千葉県における平均日積算UV-B照射量(年間平均で一日あたり 14 kJm^{-2})¹¹⁾の1週間分に相当する約 100 kJm^{-2} のUV-B処理を行った。UV-B処理時のPPFDがラッカセイ育成時($260\text{ }\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)より小さいのは、UV-B光源の設置により、試料に対する人工気象室上部側の植物育成灯照射が妨げられたためである。UV-Bの光源には、280 nmから320 nmを主波長とするUV-B蛍光管(G15T8E, Sankyodenki)を用いたが、UV-B蛍光管の放射光には、地表にはほとんど到達しない波長290 nm以下の短波長成分¹²⁾がわずかに含まれ植物葉に著しい成長阻害をもたらすことから、シャープカットフィルターUV29(透過限界波長290 nm)を用いて短波長成分をカットした。またUV-B処理中は対照葉の上部にシャープカットフィルターL39を設置し、対照葉には可視光線だけが照射されるようにした。UV-B照射処理が終了してから18時間後(UV-B照射処理開始から24時間後)に試料を人工気象室から取り出し、Fig. 2に示した試料ホルダーに対照葉を取り付け、葉端より10 mmの部位を両面剃刀で切断した。UV Ar⁺レーザーを葉の上面表皮に照射し、ISA装置を用いてレーザー照射直後の葉の断面における蛍光葉内分布を測定した。同様にUV-B処理葉を用いて、対照葉とほぼ同一部位における蛍光の葉内分布を測定した。レーザーの出力は0-400 mWの範囲で調整可能であるが、レーザー照射による試料へのダメージを考慮し、出力を20 mWに設定した。

3. 結果と考察

Fig. 4にラッカセイ葉の断面図を示す。レーザー光は、葉の上面表皮より図中に矢印で示した位置に照射した。供試葉の葉厚は約 $250\text{ }\mu\text{m}$ でレーザー光入射部付近の構造は、上面表皮(約 $20\text{ }\mu\text{m}$)、柵状組織(約 $150\text{ }\mu\text{m}$)、海綿状組織($60\text{ }\mu\text{m}$)、下面表皮(約 $20\text{ }\mu\text{m}$)であった。Fig. 5に対照葉(a)およびUV-B処理葉(b)のイメージ分光画像を示す。図の横軸は波長(nm)、縦軸は上面表皮からの深さ(μm)を示しており2.1で述べた方法で波長感度補正を行っ

Fig. 4 Image of a peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaf cross section. The scale bar indicates $100\text{ }\mu\text{m}$.

Fig. 5 Spectrograms of the control (a) and the UV-B of 100 kJm^{-2} exposed (b) peanut leaf cross section measured by the ISA system. The vertical axes mean the depth from upper surface of each leaf. UE: Upper epidermis, PC: Palisade cells.

てある。また、イメージング分光画像の輝度は、それぞれの画像において最大値が256になるように線形変換を行い規格化した。

観察された蛍光のうち685 nm付近のピーク(F685)および740 nm付近のピーク(F740)はクロロフィルからの蛍光で、F685は主に光化学反応IIの情報を含んでおり、F740は光化学反応IIの他に光化学反応Iの情報も含むと考えられている¹³⁾。これらのクロロフィル蛍光とは別に、波長400 nmから600 nmにかけて観察される青緑色領域の蛍光は、葉内に蓄積されたフラボノイドやフェノール等の化合物からの蛍光であると考えられ¹⁴⁾、波長450 nm付近(F450)と波長530 nm付近(F530)にブロードな肩が認められた。対照葉、UV-B処理葉ともに波長400 nm~600 nm付近の青緑色蛍光は上面表皮(Upper epidermis)付近で強く観察され、波長650 nm~800 nm付近のクロロフィル蛍光は、青緑色蛍光と比較して葉の内部である柵状組織(Palisade

cells)まで分布した。これらの蛍光分布を詳しく調べるために、葉の上面表皮から10 μm , 20 μm , 30 μm , 40 μm の位置(Fig. 4で示したラッカセイ葉断面図にa, b, c, dで示した部位)における分光プロファイルを解析した。その結果をFig. 6に示す。対照葉(a)においては、青緑色蛍光は葉の上面表皮付近でのみ観測され、その強度はクロロフィル蛍光の2分の1から3分の1程度で、上面表皮より30 μm 以降ではほとんど観測されなかった。クロロフィル蛍光は柵状組織から放射されたものが後方散乱される影響で、クロロフィルを含まない表皮細胞でもLIFスペクトルと同様⁶⁾にF685とF740に大きなピークが観測された。そのピーク値は葉の上面表皮から10 μm の位置ではF685の方が大きい。柵状組織内でF685が再吸収されるために深度20 μm では逆にF740が大きくなり、30 μm 以降ではF685はピークとして認識できないほど減少した。一方、UV-B処理葉(b)では、青緑色蛍光は対照葉と同様に深さ20 μm までの上面表皮付近でのみ観測されたが、その強度は対照葉の2倍ほど大きく、クロロフィル蛍光と同程度であった。また、クロロフィル蛍光の強度はF740よりF685の方が若干大きく、その強度比は表皮からの深さにほとんど依存しなかった。

次に、植物葉蛍光の特徴点であるF450, F530, F685, F740の空間プロファイルをFig. 7に示す。対照葉(a)とUV-B処理葉(b)の空間プロファイルを比較するにあたり、UV-Bストレスに対して変化の少ないF530に注目し、それぞれのF530の最大値が1になるように規格化した^{6,13)}。F450およびF530は、対照葉およびUV-B処理葉とも、上面表皮から10 μm の位置で最大となった。F450のピーク値は、対照葉で約0.8であったのに対して、UV-B処理葉では約1.7に増

Fig. 6 Spectral profiles of 10 μm (solid line), 20 μm (dotted line), 30 μm (dashed line) and 40 μm (dot-dashed line) from upper epidermis in the control (a) and the UV-B exposed (b) peanut leaf cross section.

Fig. 7 Spatial profiles of F450 (solid line), F530 (dotted line), F685 (dashed line) and F740 (dot-dashed line) in the control (a) and the UV-B exposed (b) peanut leaf cross section. Relative intensity normalized at the value of F530.

加した。クロロフィル蛍光については、対照葉ではF685のピーク値とF740のピーク値がともに約2.5であったのに対して、UV-B処理葉ではF685のピーク値が約1.5、F740のピーク値が約1.0であった。それぞれの波長におけるピーク位置は、対照葉についてはF685が16.2 μm , F740が22.7 μm で長波長成分であるF740が葉の深部にシフトしたが、UV-B処理葉では、F685, F740ともに21.6 μm であった。蛍光の分布に関しては、対照葉ではF685が上面表皮より100 μm までしか観測されなかったがF740はさらに内部の150 μm 付近まで存在した。一方、UV-B処理葉では、F685, F740ともに100 μm までしか観測されなかった。クロロフィル蛍光であるF685とF740の関係を詳しく調べるために、Fig. 7の空間プロファイルをもとに、F740とF685の強度比(F740/F685)を求め、その結果をFig. 8に示す。F740/F685の値は、対照葉では上面表皮より深さ20 μm 以降の柵状組織において急激に増加したが、UV-B照射葉では、上面表皮中および柵状組織中ともにほぼ一定の値を保った。

以上の結果から次のことが考えられる。F450は上面表皮でしか観測されず、UV-B処理によってその強度が増加した。このことから、UV-B照射によって葉の表皮細胞で何らかの色素が誘発され、増加した色素が青色域の蛍光を発したものと考えられる。また、対照葉ではF685が柵状組織に存在するクロロフィルに再吸収され効率よく利用されたためF740/F685の値が増加し、分布もF740の方が

F685より葉の深部まで見られたものと考えられる。一方、UV-B処理葉ではクロロフィルに何らかの機能障害が生じたため、F685の再吸収が行われず、F740とF685のピーク位置および分布範囲が等しく、F740/F685も葉の深さに関係なく一定の値をとったものと考えられる。

ところで、大気汚染ガス(オゾンおよび自動車排気ガス)の暴露によって障害を受けたラッカセイ葉では、クロロフィルの機能低下に伴い青色蛍光の再吸収が行われなくなった結果、柵状組織内でも青色蛍光が比較的強く観察された⁵⁾。しかし本実験ではUV-B処理によってクロロフィルの機能低下が生じているにもかかわらず、青色蛍光(F450)は上面表皮のみでしか観察されず、柵状組織ではほとんど観察されなかった。このことに関連して、DeLucia等¹⁵⁾はファイバーオプティックス法¹⁶⁾による蛍光の葉内強度の測定を行い、葉に照射した紫外線は表皮細胞で強く吸収されることを報告している。また、Caldwell等¹⁷⁾はダイズの葉にUV-Bを照射するとUV-B吸収色素が増加し、葉における紫外線の透過率が減少することを明らかにした。これらのことから、UV-B処理葉で青色蛍光が表皮細胞のみでしか観察されなかったのは、UV-B処理で誘発された紫外線吸収色素によって、照射したUVレーザー光(351 nm~364 nm)自身の表皮付近での吸収が増加し、葉の深部に入り込む光量が減少したことで、柵状組織での青色蛍光が減少したと考ええると、本実験の結果を矛盾なく説明することができる。

4. まとめ

ISA装置を用いてラッカセイ対照葉とUV-B照射葉における蛍光の葉内分布測定を行った結果、UV-B照射によって蛍光の葉内分布に次のような変化が生じることが分かった。

1) 対照葉では葉の柵状組織内で葉の深部にいくに従ってF740/F685が増加するが、UV-B照射葉では深さに関係なくほぼ一定の値を示す。

Fig. 8 Ratios of chlorophyll fluorescence intensity (F740/F685) within the mesophyll tissue of the control (solid line) and the UV-B exposed (dashed line) peanut leaf.

2) UV-B照射によって上面表皮付近で青色蛍光が著しく増加するが、大気汚染ガス暴露葉と異なり柵状組織内における青色蛍光の増加は認められない。

以上のことから、ISA装置を用いて葉の深度方向に対する可視領域全ての蛍光分布を同時に計測することで、葉に生じた障害を細胞組織と関連付けて分析することができ、LIF法による生育診断を行う際に、葉内情報をもとにLIFスペクトル変化の要因を調べる一手法として利用可能であることが分かった。

今後の課題として、画像解析ツールを改良してイメージング分光画像を現在の静止画解析から動画解析ができるようにすれば、蛍光葉内分布の時間変化分析が可能となる。暗適応処理を行った葉を用いてクロロフィル蛍光の時間変化(誘導期現象)を測定し、葉の活性指標(vitality index)¹⁸⁾を求めることで、細胞組織レベルでの活性評価が可能となり重要な生体情報を取得できるものと期待できる。さらに、ステッピングモーター等を用いて試料を規則的に移動させ、一次元(ライン)分光スペクトルを順次計測することで、2次元(面)の蛍光スペクトル測定が可能になると思われる。

植物の生育診断を実現するためには、複数の評価方法を組み合わせる必要がある。我々が手がけているLIFスペクトル計測法、ISA装置による蛍光葉内分布の測定法、近年成果を上げているレーザー誘起時間分解蛍光法¹⁹⁾等を組合せることで、より精度の高い診断が可能になるものと考えられる。

参考文献

- 1) 伊豆田 猛, 松村 秀幸, 河野 吉久, 清水 英幸: 大気環境学会誌 **36**(2001) 60.
- 2) 伊豆田 猛, 松村 秀幸, 河野 吉久, 清水 英幸: 大気環境学会誌 **36**(2001) 137.
- 3) O. David, D. Quijje, T. Paul, L. Hei, L. Yong, and P. Shaobing: J. Plant Physiol. **148**(1996) 26.
- 4) 高橋 邦夫, 峰内 健一, 江森 康文, 小林 智, 石井 弘允: 照明学会誌 **81**(1997) 420.
- 5) 峰内 健一, 高橋 邦夫, 立本 英機: 大気環境学会誌 **34**(1999) 445.
- 6) K. Mineuchi, K. Takahashi, and H. Tatsumoto: Environ. Technol. **22**(2001) 151.
- 7) K. Takahashi, K. Mineuchi, T. Nakamura, M. Koizumi, and H. Kano: Plant, Cell and Environment **17**(1994) 105.
- 8) 高橋 邦夫, 峰内 健一, 江森 康文, 小林 智, 石井 弘允: 照明学会誌 **80**(1996) 827.
- 9) 福地 健一, 高橋 邦夫, 立本 英機: 木更津工業高等専門学校紀要 **37**(2004) 77.
- 10) 稲田 勝美: 農業および園芸 **68**(1993) 99.
- 11) 佐々木 政子: 香粧会誌 **22**(1998) 102.
- 12) 菅沼 浩敏: 農業電化 **51**(1998) No.11, 2.
- 13) Z. G. Cericovic, G. Samson, F. Morales, N. Tremblay, and I. Moya: Agronomie **19**(1999) 543.
- 14) I. Moya, G. Guyot, and Y. Goulas: Journal of Photogrammetry and Remote Sensing **47**(1992) 205.
- 15) E. H. DeLucia, T. A. Day, and T. C. Vogelmann: Plant, Cell and Environment **15**(1992) 921.
- 16) T. C. Vogelmann and L. O. Bjorn: Physiol. Plant **60**(1984) 361.
- 17) M. M. Caldwell, S. D. Flint, and P. S. Searles: Plant, Cell and Environment **17**(1994) 267.
- 18) H. K. Lichtenthaler: in *Applications of chlorophyll fluorescence*, ed. H. K. Lichtenthaler (Kluwer academic publishers, 1988) p.129.
- 19) 竹内 麻希子, 齊藤 保典, 中沢 嘉明, 川原 琢也, 野村 彰夫: レーザー研究 **30**(2002) 666.