

# クロロフィル蛍光分析が与える各種パラメーターの 樹種および無機養分条件による変動

橋本良二\*・加藤 司\*\*

Parameter variations due to tree-species and nutrition conditions  
in chlorophyll fluorescent analyses

Ryoji HASHIMOTO\* and Tsukasa KATO\*\*

## 1. はじめに

植物の成長反応は、葉の光合成諸過程の働きを通してよく説明される。このことから、植物成長や生産などの分野では光合成の測定が古くからさまざまな技術を駆使して盛んにおこなわれている。クロロフィル蛍光法 (Genty et al., 1989; Schreiber et al., 1994) は、微小な葉でも非破壊的に対処でき、光合成能力はもとより光ストレスなどの有用な生理情報を瞬時に引き出せるので、現在最も重要視されている測定法の一つである。

本法では、一連の光照射条件の下で測定されるクロロフィル蛍光強度をもとに、クロロプラストの光化学系における光励起エネルギーの光化学的消費と非光化学的消費が量的に評価される。生態生理の分野では、光化学的および非光化学的消費を示すパラメーターとして、ETRあるいはNPQがよく用いられている (Han et al., 2004; Chakrabarty et al., 2006)。ETRとNPQは、光強度の増大にともない上昇し、CO<sub>2</sub>固定能力の低い植物では比較的低い光強度で飽和値 (ETR<sub>max</sub>, NPQ<sub>max</sub>) を示す (Björkman and Demmig-Adams, 1994; Hashimoto et al., 2006)。ETR<sub>max</sub>は電子伝達速度の最大値でCO<sub>2</sub>固定能力との高い相関が予想され、NPQ<sub>max</sub>は光過剰状態で引き起こされる高還元状態を緩和する能力を示すと考えられている (浅田, 1999)。また、 $F_v/F_m$ も、その生育状態での最大量子収率を表すことから、慢性的な光ストレスの指標としてよく用いられている。

---

Received January 15, 2010

Accepted April 12, 2010

\* 岩手大学環境科学系 (農学部共生環境課程)

\*\* 岩手大学大学院農学研究科農林環境科学専攻

しかし、これらのパラメーターが樹種や生育条件によりどのように変化するかについては不明な点が多く、パラメーター間相互の関係についても十分検討されているわけではない(橋本, 2003; 加藤・橋本, 2007)。クロロフィル蛍光分析法が、コンパクトで迅速そして高精度でおこなえるに至ったにもかかわらず、フィールド研究にあまり活用されていないのは、一つにはこうした事情が関係していると考えられる。

本研究では、土地栄養条件に対してたがいに異なった成長反応を示すヒバとスギを選び、培地の無機養分条件を変えて芽生えを育て、葉のクロロフィル蛍光分析で得られる上記3種のパラメーターの変化パターンと相互関係について検討をおこなった。

## II. 材料と方法

### 1. 材料と生育条件

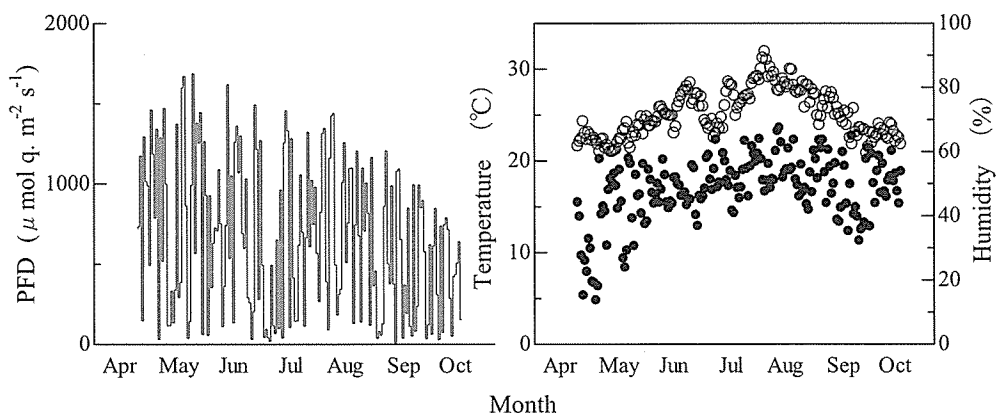
ヒバ種子は、青森県農林総合研究センター十和田圃場の採種園で2004年秋に採取したものをを用いた。スギ種子は、岩手県林木育種場が2005年春に配布したものをを用いた。プラスチック製白色角型プランター(24×12×11cm)に市販の園芸用鹿沼土を入れ、2005年4月に播種した。播種量は、プランターあたりスギ、ヒバでそれぞれ約1500, 2000粒とした。プランターの数、各樹種8個とした。プランターは実験室南側窓辺に設置されたプランター一台に並べ、給水ともなって生じる底部からの流出水を溜めるための受け皿を下に置いた。播種床に自然光を入れ、人工光(昼光色蛍光灯)で13時間の補光をおこなった。人工光の照射光強度(光合成有効量子束密度, PFD)は、約 $100 \mu \text{mol} \text{ q. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ であった。播種後は、培地表面が乾かないようにこまめに給水をおこなった。両樹種とも、5月上旬から中旬にかけて発芽した。

発芽後は、培地の無機養分条件を変えて芽生えを育てた。養分条件は、無施肥処理と3つの施肥処理を設け、施肥処理では市販の園芸用液体複合肥料(ハイポネックス5-10-5液, 村上物産)を原液として希釈液を与えた。無施肥処理は給水のみであり、施肥処理では給水とともに液肥として原液の2000, 1000, 500倍の希釈液を与えた。これらの培地処理を、それぞれ処理A, B, C, Dと呼ぶ。培地B, C, Dでは、芽生えの成長状態を観察しながら、1~3週間おきに各プランターで400mlの液肥を与えた。育成期間中の施肥総量は、培地B, C, Dで1プランターあたり窒素(N)で0.18, 0.55, 1.03g, リン酸( $\text{P}_2\text{O}_5$ )で0.36, 1.02, 2.06gであった。なお、育成期間中、芽生えどうしの成長競争を緩和するため適宜間引きをおこなった。

育成期間中、光量子センサー(IKS-25, 小糸, 東京)を用い10分間隔でPFDを記録し、温湿度測定器(TR-72, T and D, Matsumoto)を用い30分間隔で気温と相対湿度を記録した。図-1に、育成期間中における平均PFDおよび日平均気温と相対湿度の推移を示す。

### 2. クロロフィル蛍光分析

#### 1) 試料葉



図一 芽生えの生育期間における光合成有効光量子束密度 (PPFD) と温湿度の推移  
PPFDは9時から15時までの平均、気温 (白丸) と相対湿度 (黒丸) は日平均。

ヒバでは、子葉とほぼ同時に約10対の小さな初生葉が発生し、それらが展開完了後数週間して鱗片葉の形成が始まった。スギでは、子葉展開完了後数週間して初生葉が発生した。発芽当年の芽生えの成長では、ヒバでは鱗片葉、スギでは初生葉の光合成活動が乾物成長に大きく関与するので、それらをクロロフィル蛍光の試料葉とした。施肥の効果は8月から9月にかけて成長量や葉色などの面で目立ってきたので、このことを確認し、10月初旬から中旬に、各樹種各処理で10個体を選び個体ごとに測定をおこなった。ヒバではひとつかたまりの鱗片葉、スギでは一枚の初生葉を対象とした。いずれの測定でも、十分展開し切った成熟葉を選んだ。

## 2) 光曲線

測定前日の夕方、プランターを実験室の暗所におき、十分給水し一晩おいた。クロロフィル蛍光の測定は、光化学系II (PS II) で発生する蛍光を検出しておこない、クロロフィル蛍光分析計 (MINI-PAM, Heinz Walz, Germany) を用いた。まず、 $F_0$ 、 $F_m$ を測定した後、活性光の強度を段階的に $1500 \mu\text{mol q. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 付近まで上げ、各段階で蛍光強度が安定するのを待って (8~15分)、測定した。ここで、 $F_0$ 、 $F_m$ はそれぞれ暗黒状態での (初発) 蛍光強度および最大蛍光強度であり、 $F$ 、 $F_m'$ はそれぞれ活性光照射状態での蛍光強度および最大蛍光強度である。最大蛍光強度を求める際の飽和光の強度は約 $6000 \mu\text{mol q. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、照射時間は0.8秒とした。活性光の照射は市販のスライドプロジェクターでおこない、光源 (JCD, 100V 150WM, PHILIPS, 東京) に加える電圧で光強度を調節した。活性光強度は、光量子センサー (LI-190S, LI-COR, USA) で測定した。屋外の空気をエアポンプで引き込み、ビニール管を通して試料葉にあて、試料葉の外圍の炭酸ガス濃度および葉温の上昇を抑えた。測定中の炭酸ガス濃度は $370\sim390 \mu\text{l l}^{-1}$ 、葉温は $20\sim24^\circ\text{C}$ の範囲にあった。なお、本研究では、各パラメーターと光強度との関係を光曲線と呼んだ。

## 3) パラメーター

$F_v/F_m$  ( $F_v = F_m - F_0$ ) は暗順応下におけるPS IIの光化学的効率 (最大量子収率) を表し、生育条件下での光ストレスに関するパラメーターとみなされており、ストレスを生じていない状態では0.8~0.83の値を示す (Schreiber et al., 1994)。

$(F_m' - F)/F_m'$  は活性光下での光化学的効率 (量子収率) を表し、活性光下におけるクロロフィル励起エネルギーの光化学的消費量は、電子伝達速度 (ETR,  $\mu \text{ mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) とし以下で与えられる。

$$\text{ETR} = 0.5 aI (F_m' - F) / F_m' \quad (1)$$

ここで、 $I$  は葉に照射される光エネルギーの強度 (PFD,  $\mu \text{ mol q. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) である。 $a$  は葉における光エネルギー吸収率で、葉のクロロフィル濃度に依存する (後述)。0.5は光化学系 I と光化学系 II の間における光化学系 II への光エネルギー配分比である。

一方、以下の式で表されるNPQは、活性光下におけるクロロフィル励起エネルギーの非光化学的消費に関するパラメーターとされている。

$$\text{NPQ} = (F_m - F_m') / F_m' \quad (2)$$

## 3. LMAとクロロフィル濃度の測定

各個体で蛍光分析終了後、測定葉を含めヒバで生重10~25mg、スギで5~10mgを採取し、スキャナーで画像をPCに取り込み、葉面積を求めた (LIA32 for Windows 95 ver. 0.374  $\beta$  2)。葉は、80°Cで24時間乾燥した後、重量を測定し、LMA ( $\text{g m}^{-2}$ ) を求めた。

各処理における個体の葉のクロロフィル濃度を測定するため、蛍光分析をおこなった個体とは別に、30個体を選び、各個体より生重で約20~30mgを採取し、液体窒素で粉々にし、80%アセトンで抽出した。抽出液について、分光光度計で663.6nmと646.6nmの吸光度を測定し、

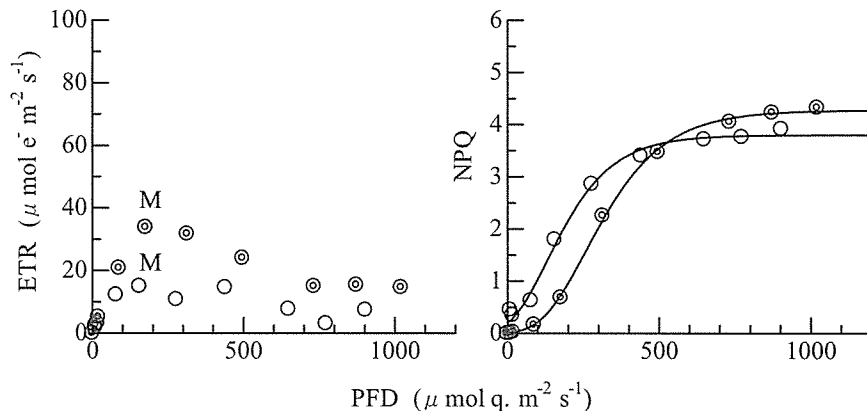


図-2. ヒバのETRおよびNPQ光曲線の一例

ETR光曲線のMは最大値 ( $\text{ETR}_{\text{max}}$ ) を表す。NPQ光曲線はGompertz関数,  $y = a \exp(-b \exp(-cx))$ , で近似した。◎:  $a=4.28$ ,  $b=5.95$ ,  $c=6.92 \times 10^{-3}$ , ○:  $a=3.80$ ,  $b=2.99$ ,  $c=8.34 \times 10^{-3}$ 。

クロロフィルa, bの濃度を, Porra et al. (1989) の式にしたがって求めた。(1) 式の吸収率  $a$  は, 測定で得られたクロロフィル濃度 ( $c$ ,  $\text{mmol m}^{-2}$ ) を用い以下の式より求めた (Öquist et al., 1992)。

$$a = 0.96 c / (c + 0.047) \quad (3)$$

#### 4. 統計

クロロフィル蛍光分析のパラメーターについては, 培地間で一元配置分散分析をおこない, 等分散性を検定し (Bartlett), 多重比較 (Scheffé) をおこなった。等分散でない時は, Kruskal Wallis検定をおこなった。また, 同一培地における樹種間で, 平均値の差を検定した (Welch法)。これらの統計には, 統計ソフトウェア (Excel Statistics 2002 for Windows, SSRI, Tokyo) を用いた。

### III. 結 果

#### 1. パラメーターの変化

##### 1) 光曲線の例

ヒバとスギのETRおよびNPQ光曲線の測定例を, それぞれ図-2, 3に示す。ETRは, 照射光強度の増大にともない弱光下では直線的に上昇し, 強光域で光飽和に達し最大値を示した後, 強光阻害により低下した。NPQは, 照射光強度の増大にともない弱光下ではわずかに上昇し, その後次第に大きく上昇するようになり, 最終的には一定値に収束した。NPQ光曲線は, Gompertz関数でよく近似された。本研究では, ETR光曲線では測定で得られた最大値を  $\text{ETR}_{\text{max}}$ , NPQ曲線ではGompertz関数が与える収束値を  $\text{NPQ}_{\text{max}}$  とした。

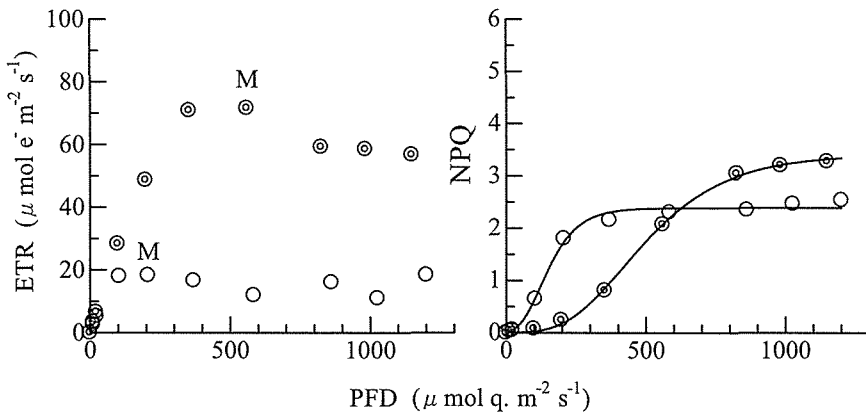


図-3. スギのETRおよびNPQ光曲線の一例

図-2. の注を参照。◎:  $a=3.41, b=7.92, c=4.95 \times 10^{-3}$ , ○:  $a=2.39, b=5.18, c=1.35 \times 10^{-3}$ 。

表一．培地の養分条件がETR<sub>max</sub>, NPQ<sub>max</sub> および F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> に及ぼす影響

Nutrition	ETR <sub>max</sub> (μmol e <sup>-</sup> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )				NPQ <sub>max</sub>				F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>			
	T. dolabrata		C. japonica		T. dolabrata		C. japonica		T. dolabrata		C. japonica	
	n	var. hondai	t	var. hondai	t	var. hondai	t	var. hondai	t	var. hondai	t	
A	10	19.4 ± 5.7	18.7 <sup>c</sup> ± 5.0	0.30	3.50 ± 0.83	3.19 <sup>ab</sup> ± 0.42	1.05	0.673 <sup>b</sup> ± 0.061	0.747 <sup>b</sup> ± 0.027	3.50 <sup>**</sup>		
B	10	24.0 ± 7.1	33.0 <sup>bc</sup> ± 6.6	2.94 <sup>**</sup>	3.41 ± 0.91	2.54 <sup>b</sup> ± 0.68	2.43 <sup>*</sup>	0.744 <sup>a</sup> ± 0.031	0.786 <sup>a</sup> ± 0.016	3.78 <sup>**</sup>		
C	10	34.3 <sup>a</sup> ± 9.0	59.1 <sup>ab</sup> ± 14.7	4.55 <sup>**</sup>	3.78 ± 0.40	2.75 <sup>ab</sup> ± 0.67	4.19 <sup>**</sup>	0.757 <sup>a</sup> ± 0.049	0.793 <sup>a</sup> ± 0.005	2.36 <sup>*</sup>		
D	10	32.4 <sup>ab</sup> ± 8.0	66.9 <sup>a</sup> ± 16.9	5.85 <sup>**</sup>	4.16 ± 0.60	3.28 <sup>a</sup> ± 0.43	3.75 <sup>**</sup>	0.750 <sup>a</sup> ± 0.044	0.787 <sup>a</sup> ± 0.013	2.48 <sup>*</sup>		

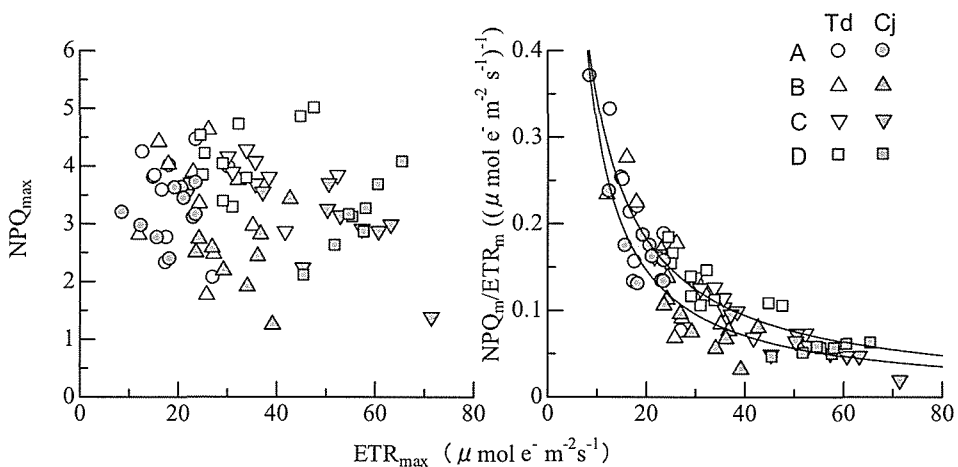
データは平均値と標準偏差。処理間で多重比較 (Scheffé), 樹種間で *t* 検定をおこなった。異なるアルファベットは有意差 ( $P < 0.05$ ) を表わす。\*: 危険率 5% で有意, \*\*: 危険率 1% で有意。

## 2) パラメーター

ヒバとスギにおける各培地での ETR<sub>max</sub>, NPQ<sub>max</sub>, F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> の平均値を, 表一に示す。培地間の ETR<sub>max</sub> のちがいについては, ヒバでは培地 A で小さく, 培地 C, D で大きかった。培地 C は B と比べても大きかった。スギも培地 A で小さく, 培地 C, D で大きかった。また, 培地 D は B より大きかった。樹種間の ETR<sub>max</sub> のちがいについては, 培地 A では有意差はなかったが, 培地 B, C, D ではヒバで小さくスギで大きかった。

培地間の NPQ<sub>max</sub> のちがいについては, ヒバではちがいはなかった。スギでは, 培地 B と D の間にちがいがあり, 前者で小さかった。樹種間の NPQ<sub>max</sub> のちがいについては, 培地 A では有意差はなかったが, 培地 B ではヒバで大きく ( $P < 0.05$ ), 培地 C, D でもヒバで大きかった ( $P < 0.01$ )。

培地間の F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> のちがいについては, ヒバでは培地 A で小さく培地 B, C, D で大きかった。スギでも, 同様であった。樹種間の F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> のちがいについては, 培地 A, B ではヒバで小さくスギで大きく ( $P < 0.01$ ), 培地 C, D でも同様であった ( $P < 0.05$ )。



図一．ETR<sub>max</sub> と NPQ<sub>max</sub> との関係 (左図) および ETR<sub>max</sub> と NPQ<sub>max</sub>/ETR<sub>max</sub> との関係 (右図) A, B, C, D は培地養分処理。Td, Cj はそれぞれヒバ, スギ。右図の回帰式は  $y = 1/(ax + b)$ ,  $a$ ,  $b$  はヒバでは 0.2565, 0.3472, スギでは 0.3626, -0.4215。

2. パラメーター間の関係

ETR<sub>max</sub>とNPQ<sub>max</sub>との関係およびNPQ<sub>max</sub>/ETR<sub>max</sub>とETR<sub>max</sub>との関係を、図-4に示す。ヒバ、スギともに、ETR<sub>max</sub>とNPQ<sub>max</sub>の間に有意な相関はなかった。NPQ<sub>max</sub>は全体的にヒバで高かった。一方、ETR<sub>max</sub>とNPQ<sub>max</sub>/ETR<sub>max</sub>との関係では、ヒバ、スギともにETR<sub>max</sub>の増大にともないNPQ<sub>max</sub>/ETR<sub>max</sub>は減少し、双曲線でよく近似された。両者の関係は樹種間で分離し、NPQ<sub>max</sub>/ETR<sub>max</sub>は全体的にヒバで高かった。

F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>とETR<sub>max</sub>との関係およびF<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>とNPQ<sub>max</sub>との関係を、図-5に示す。F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>とETR<sub>max</sub>との関係では、F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>はETR<sub>max</sub>が高いレベルで高く維持され、ETR<sub>max</sub>がおおよそ30 μmol e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>以下になると低下したが、低下が起こる境界値はヒバで高いようであった。F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>とNPQ<sub>max</sub>との関係では、F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>はNPQ<sub>max</sub>が低いレベルで高く維持され、NPQ<sub>max</sub>がおお

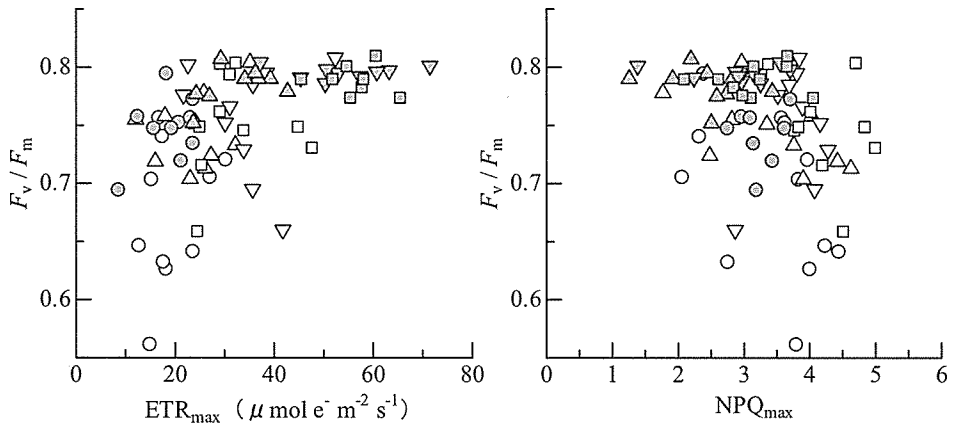


図-5. ETR<sub>max</sub>とF<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>との関係(左図)およびNPQ<sub>max</sub>/ETR<sub>max</sub>とF<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>との関係(右図) 凡例については図-4を参照。

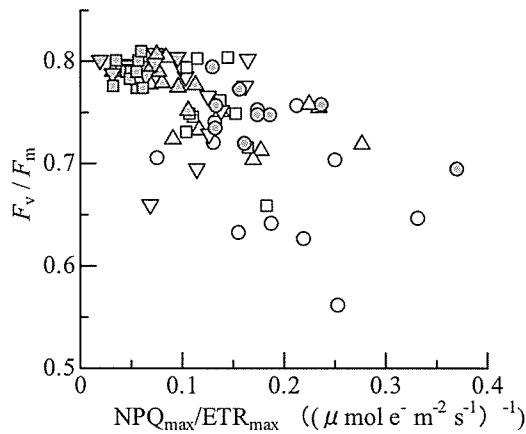


図-6. NPQ<sub>max</sub>/ETR<sub>max</sub>とF<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>との関係 凡例については図-4を参照。

よそヒバで3.5, スギでは2.5以上になると低下するようであった。図-6は、 $F_v/F_m$ について  $NPQ_{max}/ETR_{max}$ との関係でプロットしたものである。 $F_v/F_m$ は、 $NPQ_{max}/ETR_{max}$ が低いレベルで高く維持され、おおよそ0.1以上になると低下した。この関係では、スギとヒバで分離しないようであった。

## IV. 考 察

### 1. 変化特性

パラメーターの養分条件による変化では、 $ETR_{max}$ はスギ、ヒバともに施肥により上昇したが(表-1)、 $NPQ_{max}$ はヒバでは変化せず、スギでは培地間に差はあったが、施肥量にともない上昇あるいは低下するわけではなく、その影響は不明瞭であった。 $F_v/F_m$ は、スギ、ヒバともに無施肥で低かったが、施肥では施肥量による変化は認められなかった。以上を総合すると、 $ETR_{max}$ は養分条件(生育環境条件)に最も敏感に反応するパラメーターである。

パラメーターの樹種間差では、 $ETR_{max}$ は無施肥ではちがいはなかったが、施肥下ではヒバで低くスギが高かった。これに対し、 $NPQ_{max}$ は施肥条件にかかわらずヒバがスギに比べ高く、 $F_v/F_m$ では同様にスギがヒバに比べ高かった。このように、3つのパラメーターの樹種間のちがいは明瞭であり、これらのパラメーターを通して光合成の色素組成や光化学反応系の諸機能、また施肥反応における樹種間の差異が検出できる。

### 2. パラメーター間の関係

$NPQ_{max}$ は $ETR_{max}$ の変化に対しヒバ、スギともに一定の増減傾向を示さず、それぞれの樹種で一定の範囲をもつようであった(図-4)。このことから、 $ETR_{max}$ と $NPQ_{max}/ETR_{max}$ との関係は双曲線で近似される関係になる(図-4)。この関係は、 $ETR_{max}$ の上昇にともない相対的に( $ETR_{max}$ との対比で) $NPQ_{max}$ が低下する、あるいは $ETR_{max}$ の減少にともない相対的に $NPQ_{max}$ が上昇することを示している。また、樹種間における $NPQ_{max}$ の相対的レベルのちがいも、よく表している。

上述のように、施肥により $F_v/F_m$ は変化するが、 $NPQ_{max}$ では変化が明瞭ではないことから、 $F_v/F_m$ の変化を $NPQ_{max}$ で説明することは困難であり、むしろ $ETR_{max}$ との関係で見るのが適当であろう(図-5)。 $F_v/F_m$ と $ETR_{max}$ との関係では、 $F_v/F_m$ は $ETR_{max}$ があるレベル以下になると大きく低下するが、低下が起こる境界値は樹種で異なるようである。このことは、 $F_v/F_m$ の変化は単に $ETR_{max}$ によるのではないことを意味している。 $F_v/F_m$ と $NPQ_{max}/ETR_{max}$ との関係では(図-6)、 $F_v/F_m$ は $NPQ_{max}/ETR_{max}$ があるレベル以上になると低下するが、低下が起こる境界値は樹種でちがいはないようである。よって、 $F_v/F_m$ は $ETR_{max}$ とともに $NPQ_{max}$ に依存しており、両者の比を反映しているように見える。



成長反応を議論するうえで、3つのパラメーターのうち $ETR_{max}$ と $NPQ_{max}$ がキー・パラメーターである。 $ETR_{max}$ は樹種とともにとくに環境条件で大きく変化するパラメーターであり、 $NPQ_{max}$ はむしろ樹種に依存する遺伝的なパラメーターのように見える。 $ETR_{max}$ の変化は必然的に $NPQ_{max}/ETR_{max}$ の変化をもたらし、 $F_v/F_m$ の変化と密接に結びついているようである。

## 引用文献

- 浅田浩二 (1999) 葉の光環境変動に対する迅速適応。(渡邊 昭・篠崎一雄・寺島一郎監修 [植物の環境応答]). 107-119, 秀潤社, 東京.
- Björkman, O., Demmig-Adams, B. (1994) Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In "Ecophysiology of Photosynthesis" (ed. Schulze, E., Caldwell, M.M.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p17-47.
- Chakrabarty, D., Park, S. Y., Ali, M. B., Shin, K. S. and Paek, K. Y. (2006) Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiology* 26, 377-388.
- Genty, B., Briantais, J., Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990, 87-92.
- Han, Q., Katahata, S., Kakubari, Y., Mukai, Y. (2004) Seasonal changes in the xanthophyll cycle and antioxidants in sun-exposed and shaded parts of the crown of *Cryptomeria japonica* in relation to rhodoxanthin accumulation during cold acclimation. *Tree Physiology* 24 : 609-616.
- 橋本良二 (2003) クロロフィル蛍光法によるヒバ芽生えの光合成測定. 岩手大学農学部演習林報告 34 : 81-89.
- Hashimoto, R., Katou, T. and Shirahata, M. (2006) Light responsibility of juvenile seedlings of *Thujaopsis dolabrata* var. *hondai* Makino evaluated from chlorophyll a fluorescence analyses. *Environmental Control of Biology* 44 : 233-244.
- 加藤 司・橋本良二 (2007) ヒバ芽生えの葉の光化学系II反応に及ぼす土地栄養条件の影響. 岩手大学農学部演習林報告 38 : 105-113.
- Öquist, G., Chow, W.S., and Anderson, J.M. (1992) Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosystem II. *Planta* 186: 450-460.
- Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C. (1994) Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In "Ecophysiology of

Photosynthesis" (ed. Schulze, E., Caldwell, M.M.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg,  
p 49–70.