

C5

LIF法による植物葉の蛍光スペクトルと葉内蛍光分布 Distribution of fluorescence within intact leaves and laser induced fluorescence(LIF) spectra of plant leaves.

高橋邦夫¹⁾、峰内健一¹⁾、中村時久¹⁾、小林智²⁾、石井弘允³⁾

Kunio TAKAHASHI¹⁾、Ken-ichi MINEUCHI¹⁾、Tokishisa NAKAMURA¹⁾、
Satoshi KOBAYASHI²⁾ and Hiromitsu ISHII³⁾

1) 木更津工業高等専門学校、2) 日本電気、3) 日本大学理工学部

1) Kisarazu National College of Technology、2) NEC、3) Nihon University

Abstract

The UV laser induced blue-green (450nm and 530nm) and red fluorescence emission (687nm and 741nm) of plant leaves is characterized by pigments excluding chlorophyll (blue-green regions) and chlorophyll (red region). The transverse distribution of fluorescence (450nm, 530nm, 687nm and 741nm) within the leaves of camellia, mangrove, and green and white mottle pothos were examined by using a microfluorescence imaging (MFI) system. The LIF spectra of plant leaves were measured with the LIF system. The relations of fluorescence spectra and distribution of fluorescence within intact leaves were studied.

1.はじめに

植物の生育状態や植生の調査等を行うために、レーザー誘起蛍光法を植物に応用したレーザー アクティブ リモートセンシングの手法が、近年盛んに研究されている。高等植物葉内からのlaser induced fluorescence (LIF) スペクトルは、葉内に蓄積された化合物による450nm付近の蛍光ピークと530nm付近の肩およびクロロフィルによる685nm付近と740nm付近の蛍光ピークを持つ^{1)、2)、3)}。この蛍光のピークや肩の相対強度は、生育過程や植物種³⁾等で異なった形を示す。葉外に放射される蛍光スペクトルは、葉内に蓄積された化合物や蛍光の葉内分布と密接な関係がある。葉内の蛍光分布に関する情報は、光合成や葉外に放射される蛍光スペクトルへの影響を考える上で非常に重要なことと考へた。そのため、葉の内部の蛍光分布を調べるため、Micro-Fluorescence Imaging (MFI)装置⁴⁾を使用し、同時にオプティカルマルチチャンネル アナライザーとレーザーで構成されたLIF装置⁵⁾で、蛍光分布測定に用いた生葉のLIF スペクトルも計測した。本稿では、LIFスペクトルと葉内の蛍光分布との関係について述べる。

2.試料と方法

試料は、葉の細胞構造による影響を調べるため、温帯地方に分布する常緑樹のツバキの葉と熱帯地方に多く分布し多層の表皮細胞を持つマングローブの葉と、クロロフィルの有無による影響を調べるため、ポトスのクロロフィルをほとんど含まない白い斑入りの葉とクロロフィルを多く含む緑色の葉を用いた。

葉内の蛍光分布と照射光分布を計測するMFI装置をFig.1に示す。MFI装置は、UV (351nm~364nm) のcw Arレーザー、顕微鏡、イメージインテンシファイヤー (IL) 付 CCDカメラ、イメージプロセッサー、フレームメモリーボードとマイクロコンピューターで構成されている。

生葉の表面へ垂直に照射したレーザー光により誘導された蛍光は、レーザー光軸と垂直方向に放射されたものを、顕微鏡をとおして鏡筒内に組み込まれた半値幅が約5nmで

中心波長450nm、530nm、687nm、741nmの干渉フィルターを通してI.I.付CCDカメラで検出した。

画像データは、512×512のマトリックスでイメージプロセッサに記録され、そして256×240マトリックスのTVモニターに表示した。画像データ間の計算や画像解析は、マイクロコンピュータによって行った。蛍光分布を測定した葉の蛍光スペクトルは、LIF装置で計測した。

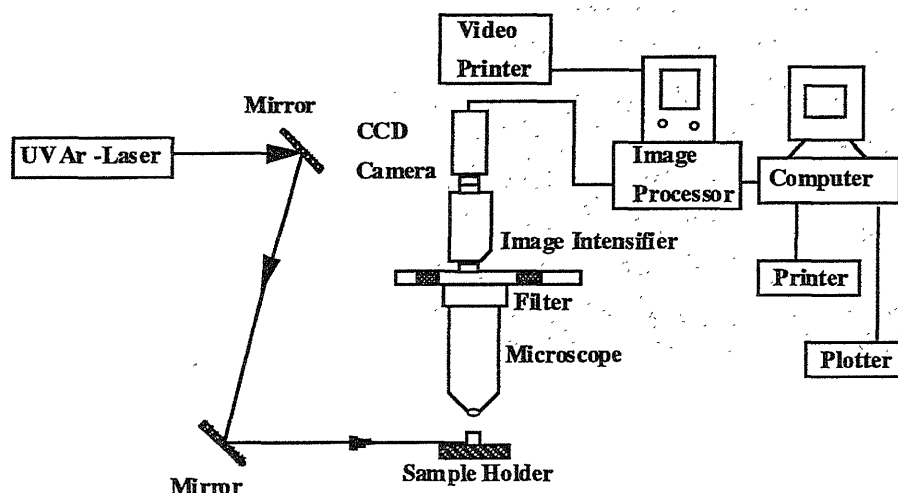


Fig.1 MFI system of blockdiagram

3.結果

成長した葉の緑色の濃いツバキの生葉の上面表皮細胞とツバキとは異なった多層の表皮細胞構造を持ったマングローブにUVレーザー光を照射したとき、葉内の蛍光(450nm、530nm、687nm、741nm)分布と入射光の散乱分布の三次元プロファイル及び葉の形態をFig.2に示した。

この結果、ツバキ葉内に入射したUV光は、葉の表面から百数十 μm 以内でほとんど散乱、吸収され、葉の深部ではほとんど検出できなかった。450nm(F450)と530nm(F530)の蛍光分布は、両者とも表皮細胞付近で強く、表皮細胞の下に位置する柵状組織内では見られなかった。クロロフィルによる687nm(F687)と741nm(F741)の蛍光分布は、柵状組織内で最大になっており、葉の内部にいくにしたがって急激に減少した。F741のピークは、F687のピーク位置より葉の内部にシフトした。

二つの葉のLIFスペクトルをFig.3に示す。この結果、LIFスペクトルのF687/F450とF741/F450比は、ツバキ葉で0.20と0.27、マングローブ葉で0.08と0.12であった。F450やF530の蛍光スペクトルは、植物種によって葉内に蓄積された化合物の種類や量に影響されるが、さらにもう一つの要因としては、葉内の青緑色の蛍

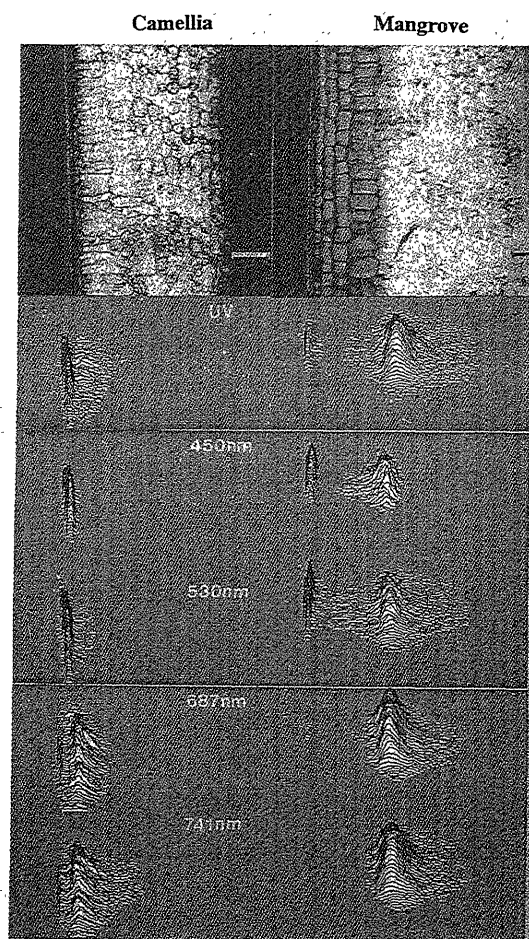


Fig.2 Stacked profiles of UV light scattered and fluorescence (450nm, 530nm, 687nm and 741nm) within camellia and mangrove tree leaves. Scale bar; 200 μm .

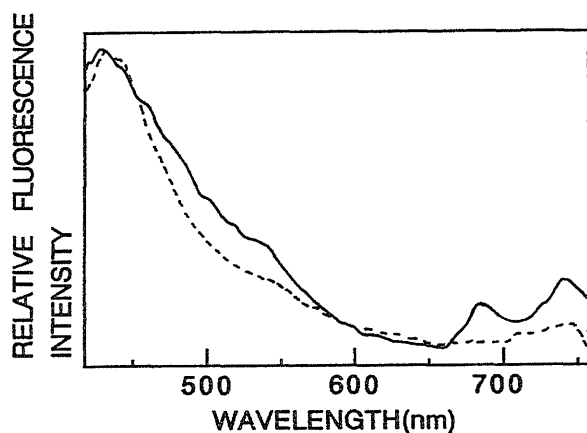


Fig.3 LIF spectra of camellia (—) and mangrove (---) tree leaves.

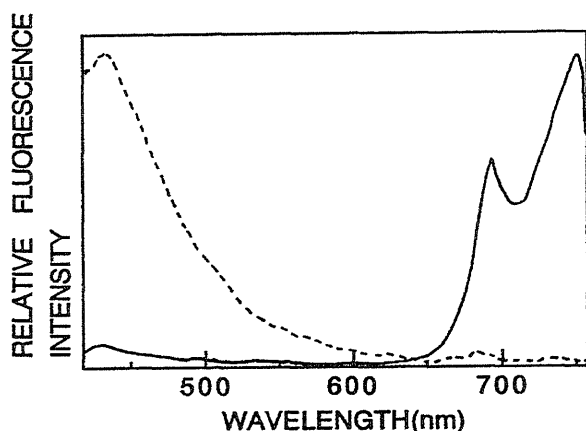


Fig.4 LIF spectra of green (—) and white mottle (---) leaves of pothos.

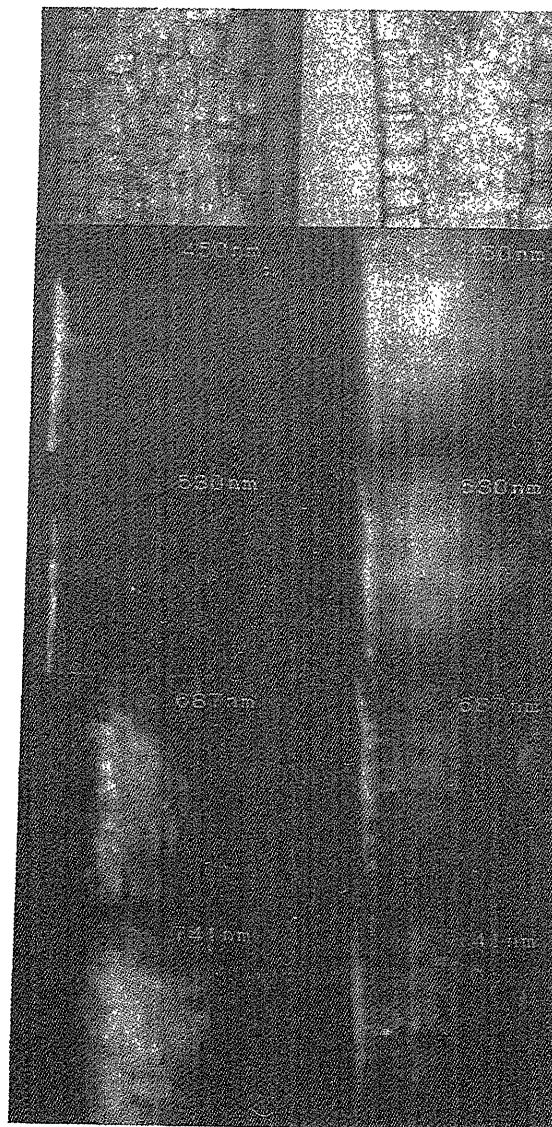


Fig.5 Distribution of fluorescence(450nm, 530nm, 687nm and 741nm) within white mottle(right) and green pothos (left) leaves. Scale bar;200 μ m.

光とクロロフィルによる蛍光の葉内分布位置が植物種によって異なることも関与していると考えられる。

この測定で得られたF450やF530の蛍光分布は、表皮細胞付近にのみ分布してしていたが。この分布位置が、葉内のクロロフィルの存在による影響を調べるため、クロロフィルを含まない白い斑入りのポトス葉とクロロフィル含有量の多い濃い緑色のポトス葉を用いた。この葉にUVレーザーを照射し、LIFスペクトルを測定した。その結果をFig.4に示す。白い斑入りの葉のLIFスペクトルは、F450やF530のピークが非常に強く、F687やF741のピークについてはほとんど見られなかった。これとは逆に、濃い緑色のポトス葉のLIFスペクトルは、F687とF741のピークが強く、F450とF530のピークが弱くなった。

このような葉の蛍光分布について測定した結果をFig.5に示す。白い斑入り生葉のF450、F530の蛍光強度分布は、葉内の一部の細胞壁を除くすべての細胞部分で見られた。これに対して、クロロフィルを含んだ緑色葉のF450、F530の蛍光強度分布は、表皮

細胞付近で強く、他の細胞組織ではほとんど見られなかった。緑色葉のF687、F741の蛍光強度分布は、表皮細胞付近にはほとんど見られず、表皮細胞より内部に位置する細胞組織の部分に強く現れた。白い斑入りの生葉のF687、F741の蛍光は、非常に弱い表皮細胞壁とさらに弱く表皮細胞より内部ある細胞にも分布した。このポトスのクロロフィルを含んだ葉と含まない葉の蛍光分布の測定結果から、F450とF530を誘起する蛍光物質は、葉内すべての細胞に存在する。しかし、クロロフィルを含む細胞付近ではF450とF530の蛍光は、クロロフィルによって再吸収され光合成に利用されてしまい、この蛍光が見られなかった。この結果、F450とF530の蛍光は、クロロフィルの含まない表皮細胞部分だけから外部に放射すると考えられる。

4.まとめ

細胞構造の異なった植物葉内の蛍光は、異なった分布をした。緑色葉からの450nmや530nmの蛍光は、主にクロロフィルを含まない表皮細胞付近に分布し、葉の内部の柵状組織ではほとんど見られなかった。また、687nmと741nmの蛍光は、主にクロロフィルを含む柵状組織内に分布した。さらに、葉内のF450やF530の蛍光は、クロロフィルにより再吸収・再利用されていることがわかった。MFI装置による測定で得られた葉内の蛍光分布の結果は、葉外に放射されるLIFスペクトルに密接に関係していることが明らかになった。

今後は、さらに多くの植物葉について、その蛍光分布の特徴を測定すると共に、オゾンやNOX、SOX等の大気汚染物質による傷害を受けた葉の蛍光分布と蛍光スペクトルの関係についても研究を進め、レーザー アクティブ リモートセンシングの実用化に必要な基礎データの収集を行う必要があるものと考えている。

Reference

- 1) E. W. Chappelle, F. M. Wood, Jr., J.E. McMurtrey III, and W. W. Newcomb: Laser-induced fluorescence of green plants. 1: A technique for the remote detection of plant stress and species differentiation, *Appl. Opt.*, **23**, 134~138 (1984)
- 2) H. K. Lichtenthaler, M. Lang and F. Stober: Laser-induced blue fluorescence and red chlorophyll fluorescence signatures of differently pigmented leaves, In *Proceedings of the 5th International Colloquium-Physical Measurements and Signatures in Remote Sensing*, 727~730 (1991)
- 3) K. Takahashi, K. Mineuchi, T. Nakamura, N. Sakurai, A. Komatsu, M. Koizumi and H. Kano : Laser induced fluorescence of tree leaves; Spectral changes with plant species and seasons, *International Geoscience and Remote Sensing Symposium (IGARSS'93) VOL.IV*, 1985~1987 (1993)
- 4) K. Takahashi, K. Mineuchi, T. Nakamura, M. Koizumi and H. Kano : A system for imaging transverse distribution of scattered light and chlorophyll fluorescence in intact rice leaves, *Plant, Cell and Environment*, **17**, 105~110 (1994)
- 5) K. Takahashi, T. Nakamura, M. Koizumi, H. Kano and S. Suzuki: Laser induced fluorescence of growing camphor tree leaves: influence of chlorophyll content on LIF spectral signature, In *Proceedings of the 5th International Colloquium-Physical Measurements and Signatures in Remote Sensing*, 753~756 (1991)