

ワセリン・シーリング葉のクロロフィル蛍光値によるサツマイモ個葉の炭酸固定能力の評価

海, 梅栄
九州大学大学院農学研究院

窪田, 文武
九州大学大学院農学研究院

<https://doi.org/10.15017/8849>

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 61 (2), pp.185-191, 2006-10-27. 九州大学大学院農学研究院
バージョン：
権利関係：

ワセリン・シーリング葉のクロロフィル蛍光値による サツマイモ個葉の炭酸固定能力の評価

海 梅 栄¹・窪 田 文 武*

九州大学大学院農学研究院植物資源科学部門植物生産科学講座植物生産生理学研究室
(2006年6月28日受付, 2006年7月24日受理)

Evaluation of Leaf Photosynthetic Potential Based on Chlorophyll Fluorescence from a Vaseline-sealed Leaf in Sweet Potato

HAIMEIRONG¹ and Fumitake KUBOTA*

Laboratory of Plant Production Physiology, Division of Soil Science and Plant Production,
Department of Plant Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University,
Hakozaki, Higashiku, Fukuoka 812-85182, Japan

緒 言

光合成は作物の物質生産における基本要素であり、品種系統間や種々の栽培環境条件下における個葉の光合成能力を捉え、比較、評価することが作物の生産性向上を図る上で重要である。光合成能力を正確に比較、評価するためには、相当数の個葉について測定値を得る必要があるが、多数の個葉を対象とする測定作業を限られた時間内に遂行することには技術的な困難性を伴う場合が多い。

個葉の光合成速度は、内外要因によって大きく変化することはよく知られており、特に、気孔開度の影響は大きい。多くの場合、気孔が最大に開いた状態でのCO₂ガス交換速度の値が、その個葉が有する光合成能力として評価されるが、気孔が十分開き安定状態に達するまでに時間を要するため、測定数が限定される。

これに対して、クロロフィル蛍光測定では、きわめて短時間に光化学系II (PS II) の量子収率 (Φ_p) や電子伝達速度 (ETR) を求めることが可能であるので、これを光合成能力の指標とすることができれば、多数の個葉についての光合成能力の判定が可能になる。C₄型植物の場合では、光合成速度とETRとの間に直線関係が成立するため、クロロフィル蛍光測定値の利用

が可能である (Krall and Edwards, 1990; Edwards and Baker, 1993; Oberhuber and Edwards 1993)。しかし、C₃型植物では、気孔伝導度 (Gs) に伴う葉内細胞間隙CO₂濃度の変化による光呼吸速度の変化が化学エネルギーの消費に大きく影響し、光合成速度とETRとの間に直線関係が得られないため、ETRを光合成速度の推定基礎とすることはできない (Krall ら, 1992)。

そこで、著者らは、透明な粘着テープで葉表皮をシーリングした個葉のクロロフィル蛍光からC₃型植物の炭酸固定能力を推定する方法を考案し、サツマイモ品種個葉を対象に種々の栽培環境条件下で検討してきた (Haimeirong ら, 2002)。シーリングすると、葉内外のガス交換が遮断されるため、光照射下の葉内の炭素収支は炭酸固定作用と光呼吸作用との間で平衡することになる。この場合、見かけ上は光合成を行っていないことになるが、葉内では光呼吸に由来、放出されるCO₂を基質にして炭酸固定作用が持続する。個葉内閉鎖系での炭酸固定と光呼吸関連酵素の活性が高く、反応速度が速ければ、これが電子伝達に反映し、ETRが高い値を示すことになる。この測定値が葉内の炭酸固定能力の指標となることを前報 (Haimeirong ら, 2002) で確認済みである。前報では、シーリングに透

¹Graduate School of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Heilongtan, Beijiao, Kunming, 650201, China

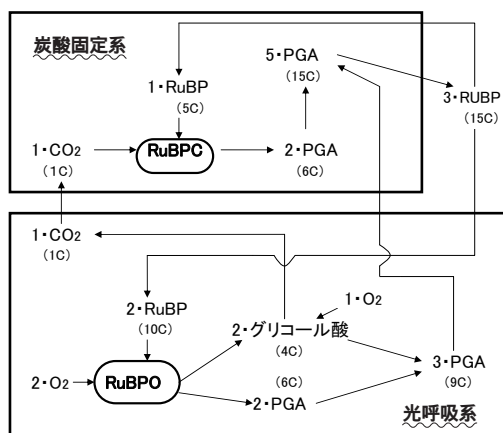
*Corresponding author (E-mail: fkubota@agr.kyushu-u.ac.jp)

明テープを使用した。その場合、測定時間に伴いテープと葉面との接着状況が劣化するなどの課題が残されたため、今回、シーリング方法を改善し、ワセリンによる葉表面シーリングを試みたところ好結果が認められたので報告する。

材料および方法

1. 表皮シーリング状態の個葉内の物質収支の予測
葉の両面に透明テープを貼付あるいはワセリンを塗布して密封（シール）し、ガス交換を停止させると、葉内での CO_2 の供給源は暗呼吸と光呼吸による CO_2 の放出に限定される。この CO_2 を基質として光合成が行われることとなる。RuBPCaseによって取り込まれる CO_2 を CO_2P 、また、光呼吸による CO_2 放出を CO_2Pr とすると、葉内閉鎖系の中での暗呼吸を除外した CO_2 収支は、 $\text{CO}_2\text{P}=\text{CO}_2\text{Pr}$ で平衡することになる。その際の炭酸固定と光呼吸における炭素収支関係を予測し模式的に第1図に示した。

ここで、光呼吸による CO_2 放出には O_2 がその反応基質になるが、光呼吸による 1CO_2 の放出に対して 2O_2 が取り込まれる。この代謝系への O_2 の主たる補給は水の開裂に由来する。カルビンサイクルで 1CO_2 固定に要するエネルギーは、PSIIでの伝達電子数 $4e^-$ に相当し、 $2\text{H}_2\text{O}$ の開裂を要する。この水開裂により 1O_2 が放出される。一方、光呼吸系では 1CO_2 の放出に要するエネルギーは、 1CO_2 を固定する場合の2倍の $8e^-$ を要するため、 $4\text{H}_2\text{O}$ の開裂が必要であり、この際 2O_2 が放出される。シーリング葉内で



第1図 表皮をシーリングした個葉内における炭酸固定・光呼吸系の炭素収支の予測。
() 内は化学物質の炭素数を示す。

1CO_2 が固定され、同時に 1CO_2 が光呼吸系で放出される場合、必要とされるエネルギー供給のために、上述したように $6\text{H}_2\text{O}$ が開裂し、 3O_2 が放出されることになる。

光呼吸による 1CO_2 放出の際 RuBPOase 反応での酸素要求量は 2O_2 であるが、パーオキシゾーム内でのグリコール酸からグリオキシル酸への反応過程で 1O_2 が要求されるため、合計 3O_2 が消費され、水の開裂で放出される 3O_2 とのバランスがとれる。

通常では、光合成で固定された6個の炭素(6C)の内、1Cが生産物として葉緑体外へ転流し、残りの5Cで1RuBPが再生産されて反応が継続することになる。シーリングによって炭酸固定と光呼吸との間の炭素収支がバランスした状態の個葉では、生産物の外部転流が制御されるものと仮定すれば、光呼吸で 1CO_2 を放出するために必要な2RuBPの再生産が可能となる。このため、短時間であれば光合成と光呼吸がバランスした作用状況下で、基質となるRuBPに不足が生じることはないものと予測される。

要するに、シーリング個葉内では、光合成、光呼吸の反応基質となる炭素、酸素およびRuBPの生産と消費が過不足なくバランスした状態で代謝が継続するものと予測される(第1図)。

シーリングされ閉鎖系となった個葉内では葉内に密封された状態で、炭酸固定による CO_2 吸収速度と光呼吸による CO_2 放出速度が同じ値になり、これに要する電子の伝達速度をクロロフィル蛍光測定によって知ることができる。すなわち、光合成活性が高い個葉では、葉内での光呼吸系から炭酸固定系への CO_2 輸送が速く、 Φ_e や ETR も高い値を示すものと考えられる。本研究では、上記仮説のもとに個葉の炭酸固定能力を迅速かつ簡便に比較、検定する手段としてのワセリン・シーリング法の有効性を明らかにした。

2. 実験材料ならびに栽培方法

サツマイモ (*Ipomoea batatas* Lam.) 品種コガネセンガンを2003年7月中旬から8月末の間、九州大学大学院農学研究院農場でポット栽培し、ガス交換速度ならびにクロロフィル蛍光の測定に供試した。ポット栽培に際しては、植物が順調に生育するように、適切な施肥、給水管理を行った。

3. 個葉光合成速度の測定

葉齢が異なる個葉を対象に、 350 から $800\ \mu\text{molm}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ の光強度条件下、空気酸素濃度2段階(通常状態

21%と光呼吸制御状態2%)で、ガス交換速度および関連パラメータ値を赤外線CO₂/H₂O分析計(L-6262, LI-COR社, 米国)で測定した。測定に際しては通気式小型同化箱に個葉(葉面積6.25cm²)を挿入し、葉温を30°Cに調節した。21%および2%酸素濃度空気中の総光合成速度(Pg)を、それぞれPg_{21%}およびPg_{2%}と表記した。Pgは見かけの光合成速度と暗呼吸速度の和である。

これと併行して、同化箱に取り付けたクロロフィル蛍光測定プローブ(PAM2000, Walz社, 独国)を使用して蛍光を測定し、Φ_eとETRを求めた。21%および2%酸素濃度空気中のETR値を、それぞれETR_{21%}およびETR_{2%}と表記した。

Φ_eは(1)式によって求めた。

$$\Phi_e = (F'm - F_s) / F'm \quad \text{----- (1)}$$

ここで、F_sは一定光強度条件下における蛍光発光値、また、F'mはF_s測定中におけるパルス光照射に伴う蛍光スパイク値である。

また、ETRは(2)式によって求めた。

$$ETR = \Phi_e \cdot 0.5 \cdot 0.93 \cdot L \quad \text{----- (2)}$$

ここで、Φ_eは量子収率、Lは葉面光強度である。葉に照射された光はPSIとPSIIに均等配分されると仮定して0.5をLに乗じた。葉の光吸収率を測定し、その平均値は93%であったため、0.93を乗じた。従って、0.5・0.93・LがPSIIのクロロフィルが吸収した光強度となる。なお、葉の光吸収率測定に際しては800 μmol m⁻² s⁻¹の光を葉上面に照射し裏面の光強度を光子計(LI-189, LI-COR, 米国)で測定して吸収率を求めた。

4. 表皮シーリング処理とクロロフィル蛍光測定

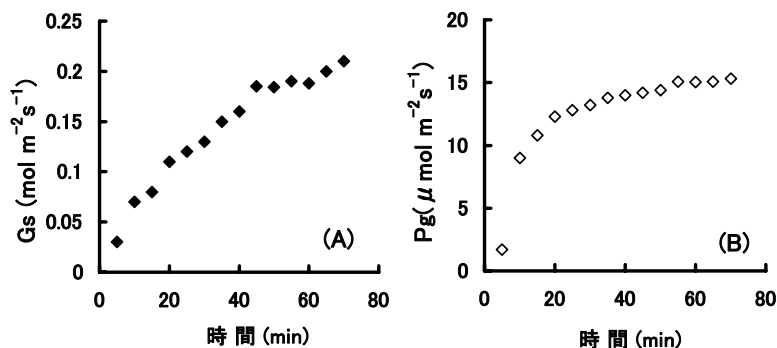
上記測定操作終了後、葉両表面に医療用白色ワセリン(石丸製薬)を塗布し、ガス交換遮断状態におけるクロロフィル蛍光を測定し、Φ_eとETRを求めた。これに比較するため、前報で報告した透明テープによるシーリングも行い、蛍光を測定した。クロロフィル蛍光の測定の際の照射光強度および葉温は上記と同じである。

ここで、ワセリン・シーリング個葉について求めたΦ_eとETRを、Φ_{e-vase}とETR_{vase}とし、テープ・シーリング個葉について求めたものをΦ_{e-tape}とETR_{tape}として表記した。

結果および考察

通常大気条件下で測定したサツマイモ個葉のG_sとPg_{21%}の経時変化の一例を第2図に示した。用いた品種はコガネセンガンであり、光照射に対して気孔反応が鋭敏な品種である(Kubotaら, 1993)。ここに示すように、G_sとPg_{21%}は光照射後、上昇し、60分間以上を経てG_sが0.2 mol m⁻² s⁻¹に達するとPg_{21%}は最大値となり、安定する。携帯型光合成測定装置を圃場現場で使用すれば、比較的簡便にガス交換速度の測定値が得られるが、光合成速度の最大値を得ることを目的にする場合、好条件の場合でも、測定値が安定状態に達するのを確認するには10から20分間を要する場合が多く、さらに長時間を要する場合もある。このため、測定対象とする個葉数が限定されることになる。シーリング法では個葉の蛍光測定によって、光合成能力の比較、評価を迅速に行えるため、多数の個葉を測定対象にする場合、きわめて有効である。

前報に述べたように、個葉の表皮を透明粘着テープでシールしてガス交換を遮断して測定したETR_{tape}値

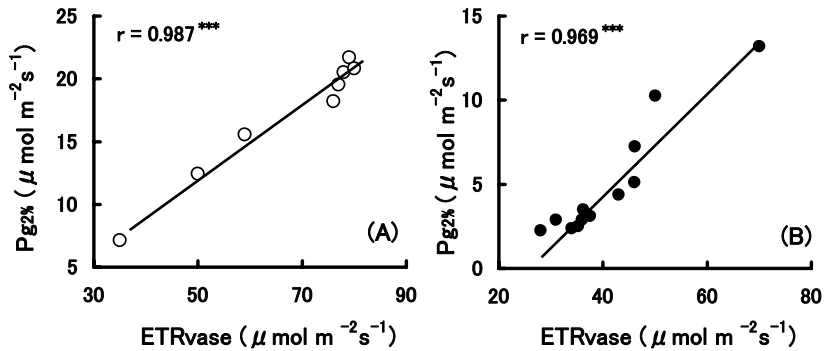


第2図 通常大気条件下で測定した個葉の気孔伝導度(G_s)と総光合成速度(Pg)の光照射後の経時的変化の一事例。測定光強度条件は500 μmol m⁻² s⁻¹である。

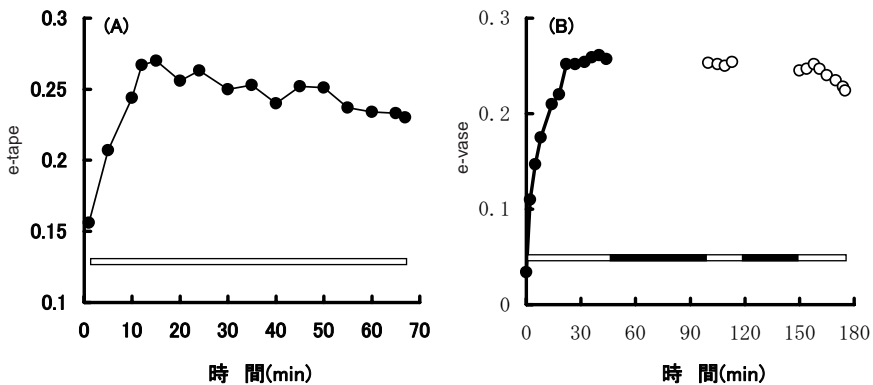
から葉内の炭酸固定能力を推定することを考案し、推定法が適切であることを証明した。ガス交換遮断用資材として粘着テープよりもワセリンを使用した方が、作業が速やかに行われると考えられたため、これを検討し、第3図に示した。異なる光強度条件下の個葉(第3図-A)と異なる葉位の個葉(第3図-B)における ETR_{vase} と $Pg_{2\%}$ との相関関係を見ると、両図とも両パラメータ間に高い正の相関関係が認められる。すなわち、光環境が変化しそれに伴って $Pg_{2\%}$ も変化するが、それが ETR_{vase} と直線関係にあるため、クロロフィル蛍光を測定し ETR_{vase} を求めれば $Pg_{2\%}$ の値を推定できる(第3図-A)。また、第3図-Bに示すように、葉齢が異なる個葉の $Pg_{2\%}$ も ETR_{vase} の値から推定することができる。ここでは、 $Pg_{2\%}$ を葉の炭酸固

定能力とみなした。

第4図-Aと-Bには、植物体から切り離した個葉をテープおよびワセリンでそれぞれシーリングし、その後の Φ_{e-tape} と Φ_{e-vase} の経時的变化を測定して示した。第4図-Aで見られるように、テープでシールした場合、時間が経過するに伴い Φ_{e-tape} 値が低下する現象が見られる。このため、テープ・シーリングを行った場合、光照射開始15~20分後の安定した時点の Φ_{e-tape} から ETR_{tape} を求め、炭酸固定能力の指標とすることが適切である。このように、20分間程度の光照射前処理を行った個葉を蛍光プローブで測定するが、1点の測定に要する作業時間は2~3分間である。光照射後の時間の経過に伴って蒸散作用が活発となり、テープ裏面に水滴が付着することが原因となり、



第3図 ワセリン・シーリング個葉における電子伝達速度(ETR_{vase})と2%酸素濃度空気条件下で測定した総光合成速度($Pg_{2\%}$)との相関関係。異なる光強度条件下(380~800 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)における測定値(A)、異なる葉位の個葉の光強度500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ における測定値(B)。***は0.1%で有意差があることを示す。



第4図 テープ・シーリング個葉(A)およびワセリン・シーリング個葉(B)の光化学系II量子収率(それぞれ Φ_{e-tape} および Φ_{e-vase})の個葉サンプリング後の経時的变化。□, 個葉に連続光照射状態(500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$); ■, 個葉保存状態(暗黒); ●, Φ_e 連続測定; ○, 15分間光照射後の Φ_e 。

Φ_{e-tape} が低下するものと考えられる。

第4図-Bにはワセリン・シーリング個葉の Φ_{e-vase} を示した。ここでは、180分間の間に2度の遮光保存期間において、3回測定している。サンプリング後150分間までは、初期と同一の測定値を得ることが可能であり、その後、減少する傾向にあった。この結果は、ワセリンでシーリングすれば、葉内の活性が低下せず、処理後2時間以上保存した個葉でも、蛍光測定によって炭酸固定能力を正確に推定できることを意味し、測定操作上の利点になる。

実用之际には第5図に示したA、B、C、Dの手順で測定作業を行うと効率的である。圃場で個葉をサンプリングし、直ちにワセリンを塗布し(A)、湿り気を持たせたビニル袋に入れ、通常気温、遮光条件で保存する(B)。サンプリング後、2時間以上活性が保たれるため、この間、任意の時間にクロロフィル蛍光を測定することができる。保存した個葉を取り出して実験台上に並べて一括照射し(C)、順次蛍光を測定する(D)。この手順で、多数の個葉を迅速に測定することができる。測定者を2名とし、(C)と(D)の作業過程を併行して行えば、1時間に50~60点の測定が可能であり、極めて速やかに炭酸固定能力を検定できる方法であるといえる。

なお、遮光下で個葉を保存した場合、光合成関連酵素の活性が低下しているため、活性化のための前処理としての照射が必要である(Kubota *et al.*, 1994)。前処理照射時間は、先に述べたように20分間程度、また、光強度は $500 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 程度で十分である。

ここでは、炭酸固定能力の評価、判定法を述べてきたが、個葉の光合成速度は気孔開度の影響も強く受けて変化する。気孔の開度を観察することも個葉光合成特性を把握するための重要な項目である。気孔の開度状況は、浸潤法(石原ら, 1972; 窪田ら, 1992)や携

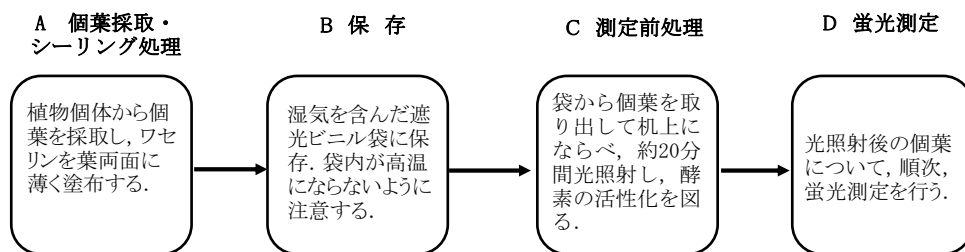
帯顕微鏡観察法(窪田ら, 1992)を用いれば、簡便かつ速やかに観察することができる。ワセリン・シーリング法と気孔観察をあわせて行えば、多数の個葉についての光合成特性を炭酸固定能力と気孔によるガス交換制御の両面から評価することが可能となり、光合成能力の選抜指標として広く利用できよう。

個葉のガス交換を遮断した場合、いくつかの問題点あげられる。まず、生産された電子エネルギーの代謝系でのロスを考えると、水開裂に伴う酸素発生量は光合成や光呼吸に対応する量を超えることが予測され、葉内の O_2 濃度は漸次上昇する可能性がある。長時間にわたって照射を継続すると葉内 O_2 濃度の上昇、メーラー反応やPSIのサイクリック作用の作動などが予測され、エネルギー収支系が複雑になる。このため、シーリング処理した個葉については短時間の内にクロロフィル蛍光を測定する必要があるが、本実験材料、実験条件では30分間以上、照射しても、測定に問題は生じなかった。

さらに、検討すべき点は、暗呼吸による CO_2 放出と O_2 吸収である。 CO_2 放出は CO_2 固定作用に影響し、 O_2 吸収は光呼吸作用と競合関係にある。このため、暗呼吸速度が高まってくると閉鎖系葉内での炭酸固定と光呼吸との間の CO_2 収支バランスに影響する可能性がある。個葉光合成能力についてより精度が優れた値を得るため、シーリング個葉における暗呼吸が炭酸固定、光呼吸ならびにPSII電子伝達速度に与える影響について実験を進めている。

摘 要

ワセリンをサツマイモ個葉の両面に塗布してガス交換遮断した状態でクロロフィル蛍光を測定して電子伝達速度をもとめ、葉内の炭酸固定能力を推定、評価した。老化程度の異なる個葉を供試し、種々の光強度下



個葉の活性を室温下で2時間維持することが可能。

第5図 試料採取から蛍光測定に至る手順。

でガス交換速度とクロロフィル蛍光を測定した。炭酸固定能力（酸素濃度2%の空気を使用し、光呼吸制御状態で測定した光合成速度）とワセリン塗布処理後の電子伝達速度との間に正の直線関係が認められ、クロロフィル蛍光測定値から炭酸固定能力を推定、評価することが可能であった。ワセリン・シーリング法を用いた場合、蛍光測定作業効率の改善が認められ、特に、個葉の保存に顕著な効果が認められた。植物体から切り離れた個葉にワセリンを塗布し、高温、遮光、常温下で保存すると、サンプリング後約2時間、活性が維持され、この時間内であれば、サンプリング時と同レベルの電子伝達速度測定値を得ることができた。このように、本法ではサンプリング後の任意の時間帯に保存個葉の一括測定が可能となり、測定手順が単純化されるため、多数の個葉を対象に炭酸固定能力の評価を迅速に行なうことができる。

文 献

- Edwards, G. E. and N. R. Baker 1993 Can CO₂ assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis? *Photosynth. Res.*, **37** : 89-102
- 石原 邦・平沢 正・飯田 修・小倉忠治 1972 水稻葉身の小さい気孔開度の測定法 - 改良浸潤法について-。日作紀, **48** : 319-320
- Haimeirong, F. Kubota and Y. Yoshimura 2002 Estimation of photosynthetic activity from the electron transport rate of photosystem 2 in a film-sealed leaf of sweet potato, *Ipomoea batatas* Lam. *Photosynthetica.*, **40** : 337-341
- Krall, J. P. and G. E. Edwards 1990 Quantum yields of photosystem II electron transport and carbon dioxide fixation in C₄ plants. *Aust. J. Plant Physiol.*, **17** : 579-588
- Krall, J. P., G. E. Edwards. and M. S. B. Ku 1992 Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves. *Plant Physiol.*, **86** : 180-187
- 窪田文武・R. Knof・弥富道男・縣 和一 1992 カンショ葉の気孔開度の測定法。日作紀, **61** : 687-688
- Kubota, F., Y. Yoshimura and W. Agata 1993 Stomatal movement and CO₂ exchange rate of sweet potato plant (*Ipomoea batatas* Lam.) in relation to water environments - A comparison between native and improved varieties. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **38** : 97-110
- Kubota, F., K. Nada and W. Agata 1994 Photosynthetic control factors in a single leaf of sweet potato, *Ipomoea batatas* Lam. 3. Estimation of *in vivo* rubisco activity from CO₂ exchange rate of a peeled leaf. *Jpn.J.Crop Sci.*, **63** : 89-95
- Oberhuber, W., Z. Dai and G. E. Edwards 1993 Light dependence of quantum yield of photosystem II and CO₂ fixation in C₄ and C₃ plants. *Photosynth. Res.*, **35** : 265-274

Summary

The leaf photosynthetic potential was evaluated based on the electron transport rate (ETR) of the photosystem II in a sweet potato leaf the surface of which was sealed with Vaseline to stop the gas exchange flow. Directly after the total carbon assimilation rate ($Pg_{2\%}$, or photosynthetic potential) of a leaf was measured in 2%-O₂ air, the leaf was sealed with Vaseline and the ETR was measured. These measurements were tested using young to aged leaves at different light intensities. A close positive relationship was found between $Pg_{2\%}$ and ETR. This result indicates that $Pg_{2\%}$, or the leaf photosynthetic potential, is estimated by this method. When the detached leaf was Vaseline-sealed and placed in a moistened vinyl-bag in the shade at room temperature, the activity of the preserved leaves was sustained for more than two hours after sampling. Since the chlorophyll fluorescence of a Vaseline-sealed leaf can be monitored within a few minutes, a lot of stocked leaves are possible to be measured collectively. The value obtained is used as a selection criterion for the leaf photosynthetic.