

速報

葉緑素計 (SPAD-502) によるシダレザクラとソメイヨシノの葉中クロロフィル濃度の比較*¹陶山健一郎*² ・ 作田耕太郎*³

陶山健一郎・作田耕太郎：葉緑素計 (SPAD-502) によるシダレザクラとソメイヨシノの葉中クロロフィル濃度の比較 九州森林研究 62 : 90-93, 2009 シダレザクラとソメイヨシノの葉における SPAD 値の特性比較およびクロロフィル濃度 (Chl 濃度) の決定因子を明らかにするために、両種の Chl 濃度について葉緑素計および抽出-分光法での計測を着葉期間中に複数回同時に行った。SPAD 値は単位葉面積あたりの Chl 濃度と相関が認められ、その関係は 5 月の測定時を除いて樹種間で差が認められなかった。このことから両樹種の単位葉面積あたりの Chl 濃度は開葉期以外は SPAD 値を用いて比較可能であることがわかった。着葉期間における SPAD 値は両樹種ともに開葉時に大きく上昇し、7 月頃ピークを向かえた後、落葉前に低下する傾向を示した。ソメイヨシノの SPAD 値は、光量および光量に対する葉の形態変化の影響を受けていたが、シダレザクラの SPAD 値はいずれの因子の影響も弱かった。

キーワード：シダレザクラ、ソメイヨシノ、クロロフィル濃度、SPAD 値、季節的变化

I. はじめに

葉中のクロロフィル濃度 (以下、Chl 濃度) を測定するには、葉をアセトンなどの有機溶媒中ですりつぶし、分光測光法を用いて抽出液中の Chl 濃度を推量する方法が一般的である (Porra *et al.*, 1989)。しかし、この方法は非常に手間と時間がかかる上に試料を破壊してしまうという短所がある。そこで、より簡便かつ非破壊的に Chl 濃度を推定する機器として葉緑素計 (SPAD-502, コニカミノルタ) が使われている (只木・木下, 1988)。葉緑素計は測定器に葉をはさむだけで瞬時に Chl 濃度と正の直線関係を示す指数である SPAD 値を測定することができる。SPAD 値は、葉中のクロロフィルに吸収される赤色光 (650nm) と吸収されない赤外光 (940nm) の 2 つの波長の光を葉に照射し、それらの透過率の差をもとに算出されている。しかし、SPAD 値は測定対象とする葉の特性によって Chl 濃度との関係が異なるために、種間差などの調査においては抽出-分光法などでの測定値との検定が必要となる。

我々はこれまでに、枝垂れ性樹木の特徴的な樹形が葉の生理的特性に及ぼす影響について調査を行っており、その中でシダレザクラの一次枝に沿った SPAD 値の変化を測定した。その結果、シダレザクラの SPAD 値は同属のソメイヨシノと比較して光環境との関係が弱いことが指摘された (陶山・作田, 2009)。しかし、晩夏のみ調査結果であったことから、年間を通しての測定によって検証する必要があると考えた。

本研究では、シダレザクラとソメイヨシノの Chl 濃度について、葉緑素計および抽出-分光法での計測を着葉期間中に複数回同時に行い、両樹種における SPAD 値の特性比較を行い、さらに Chl 濃度を決定する因子について明らかにすることを目的とした。

II. 材料と方法

供試材料には、九州大学農学部構内に生育するシダレザクラ (*Prunus pendula* Maxim.) とソメイヨシノ (*Prunus yedoensis* Matsumura) 各 1 個体を用いた。両個体の樹高と地際直径はシダレザクラが 3.2m, 24.8cm, ソメイヨシノが 4.9m, 28.3cm だった。

光環境の測定を 2007 年の 5 月と 8 月に行った。各個体の樹冠上部と下部より一次枝を 3 本選定し、基部から先端部にかけて 5 箇所でデジタルカメラ (COOLPIX 910, Nikon) と魚眼レンズ (Fish-eye Converter FC-E8, Nikon) を用いて全天空写真を撮影した。撮影は曇天日に行い、撮影画像より画像解析ソフトを用いて撮影地点の相対光強度 (Relative Light Intensity : *RLI*) を算出した。

SPAD 値の測定は 2007 年の 5 月から 9 月まで毎月行った。各個体の樹冠上部および下部より一次枝を 3 本ずつ選定し、枝基部から先端部にかけて着生する葉において葉緑素計 (SPAD-502, コニカミノルタ) を用いて SPAD 値を計測した。

抽出-分光法による Chl 濃度の測定は 2007 年の 5 月, 7 月, 9 月に行った。各個体の樹冠上部, 下部より葉を 9 枚ずつ採取し, 1 枚の葉から直径 1.3cm のリーフディスクを 3 枚打ち抜いた。リーフディスクは生重量測定後、液体窒素で凍らせてから 80% アセトン溶液中ですりつぶした。得られた抽出液は、遠心分離機を用いて沈殿を除去したのち、分光光度計 (Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences) を用いて 645nm, 663nm の吸光度を計測した。計測値と Porra の式 (Porra *et al.*, 1989) より Chl 濃度を算出した。

$$\text{Chl } a + b(\text{nmol}) = 19.54A^{645} + 8.29A^{663}$$

*¹ Suyama, K. and Sakuta, K. : Chlorophyll concentration in leaves of *Prunus pendula* Maxim. and *Prunus yedoensis* Matsumura adult trees measured with leaf chlorophyll meter (SPAD-502).

*² 九州大学生物資源環境科学府 Grad. Sch. Biores. and Bioenvir. Sci., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

*³ 九州大学大学院農学研究院 Fac. Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

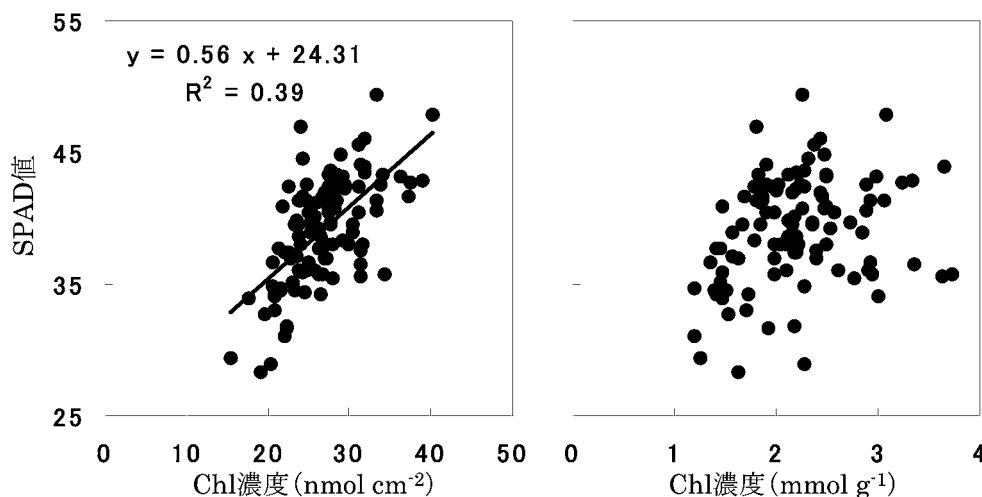


図-1. 単位葉面積あたりのChl濃度（左）および単位葉重あたりのChl濃度（右）に対するSPAD値の関係（シダレザクラとソメイヨシノの結果をまとめて表示）

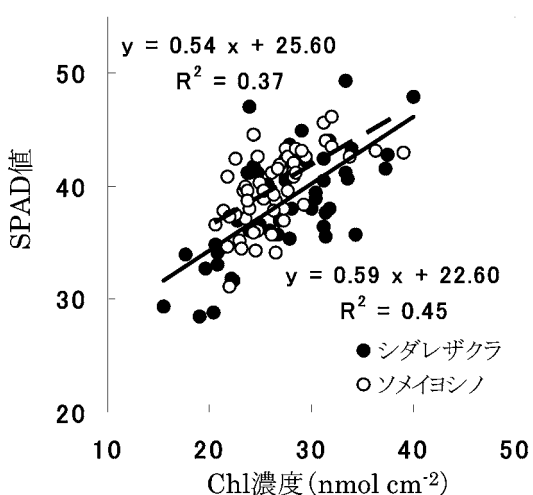


図-2. 樹種別に示した単位葉面積あたりのChl濃度に対するSPAD値の関係（図中の実線はシダレザクラの回帰直線、破線はソメイヨシノの回帰直線）

式中の A^{645} , A^{663} はそれぞれ645nmの吸光度, 663nmの吸光度を示す。また, リーフディスクの面積と生重量より単位生重量あたりの葉面積を算出した。

以上の結果をもとに抽出-分光法で求めたChl濃度とSPAD値の関係を調査した。樹種間での両者の関係を比較するために, 抽出-分光法で求めたChl濃度を共変量, SPAD値を従属変数, 樹種を独立変数として共分散分析を行った。

Ⅲ. 結果と考察

1. Chl濃度に対するSPAD値の関係

抽出-分光法によって求めたChl濃度に対するSPAD値の関係を図-1に示した。SPAD値はChl濃度と直線関係があり, 単位葉面積あたりで表したChl濃度とのみ相関が認められた ($p < 0.001$)。この結果は過去の報告とも一致した(吉川ほか, 1994)。SPAD値は一定面積に照射した赤色光の透過率によって算出されるため, 単位葉面積あたりのChl濃度との相関が認められたと考えられる。

表-1. 測定時期別のChl濃度に対するSPAD値の樹種間比較

測定時期	樹種	傾き a	切片 b	F 値	p 値
5月	シダレザクラ	0.67	19.31	6.70	<0.05
	ソメイヨシノ	0.88	15.90		
7月	シダレザクラ	0.61	23.64	0.97	0.33
	ソメイヨシノ	0.50	27.73		
9月	シダレザクラ	0.38	27.32	4.00	0.05
	ソメイヨシノ	0.56	24.66		

表中の傾きaおよび切片bは回帰式 $Y = aX + b$ (X:Chl濃度, Y:SPAD値)の係数。回帰式はすべて有意性が認められた(決定係数 $R^2 = 0.28 \sim 0.70$)。

単位葉面積あたりのChl濃度に対するSPAD値の関係を樹種間で比較したところ(図-2), 回帰直線の傾きに有意差は認められなかった。その一方で, 回帰直線の切片は樹種間で有意差が認められた ($p < 0.01$)。切片に差が認められたことについてより詳細に検討するため, 測定時期別に樹種間の比較を行った(表-1)。7月と9月では回帰直線の傾き, 切片ともにシダレザクラとソメイヨシノ間で有意差は認められなかったが, 5月の測定では回帰直線の切片に樹種間差が認められた ($p < 0.05$)。したがって, 図-2に示した2本の回帰直線の切片に差が認められたのは, 開葉期である5月のChl濃度に対するSPAD値の関係を樹種間差があったためと考えられる。実際に7月と9月の測定値のみを用いて同様の解析を行ったところ, Chl濃度に対するSPAD値の関係を樹種間で有意差は認められなかった。Chl濃度に対するSPAD値の関係が樹種間で異なる理由としては, これまでに測定葉の厚さや葉内構造による影響が指摘されている(吉川ほか, 1994; Yamamoto *et al.*, 2002)。本研究では, シダレザクラとソメイヨシノという近縁な種での比較であり, 7月と9月の測定では樹種による影響は小さく, 5月の測定における樹種間差には, 開葉期における葉の成熟度の違いが影響を与えたものと考えられる。

以上の結果より, シダレザクラとソメイヨシノのSPAD値は開葉期を除いて, 単位葉面積あたりのChl濃度の指標となり, 直接比較が可能であるといえる。開葉期の葉については抽出-分光法などで求めたChl濃度と検定を行い, 値を補正する必要がある。

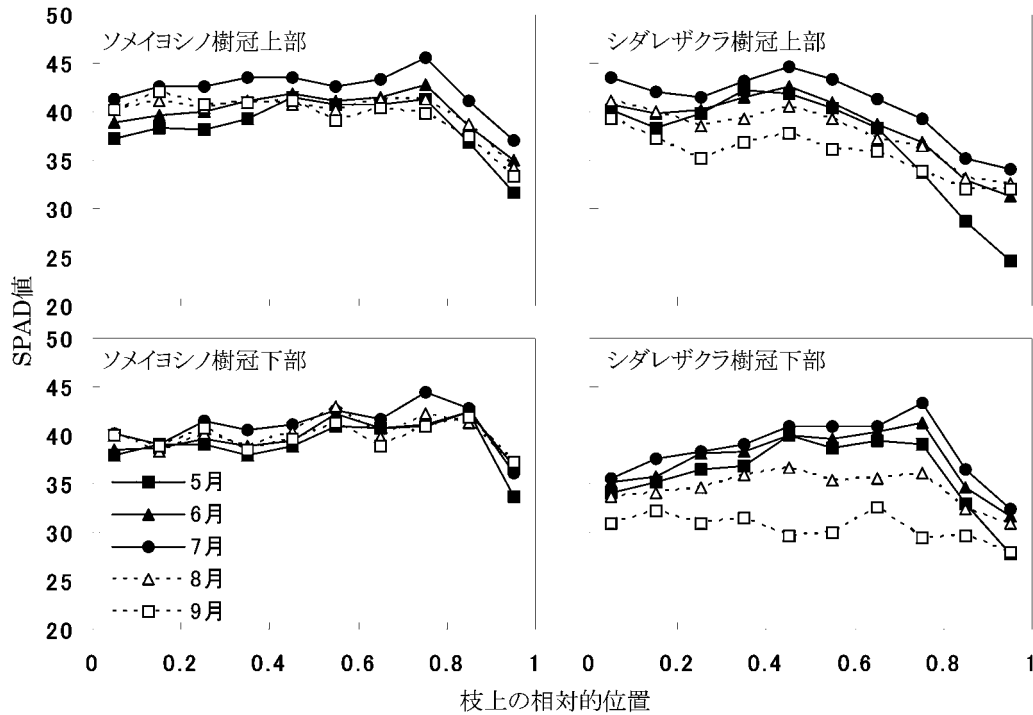


図-3. 測定時期別の枝上の相対的位置と SPAD 値との関係
(横軸は測定した葉の枝上での相対的位置を示す。
枝の基部を0, 枝先端部を1とする)

2. シダレザクラとソメイヨシノの相違点

シダレザクラおよびソメイヨシノの測定時期別の枝上の相対的位置と SPAD 値との関係を図-3に示した。両樹種とも SPAD 値は5月から徐々に上昇し、7月でピークを迎えたのちに8月、9月と低下する傾向が認められた。シダレザクラの樹冠下部における8月、9月の SPAD 値の低下が著しかったが、シダレザクラではソメイヨシノよりも早く8月下旬より落葉が開始されたためと考えられる。続いて、両樹種の RLI に対する SPAD 値の関係を図-4に示した。ソメイヨシノの SPAD 値は5月、8月ともに RLI が80%まではほぼ一定の値を示したが、RLI が80%以上では負の関係が認められた。一方、シダレザクラでは、5月の測定では RLI に対する SPAD 値の間に何らかの関係は認められなかった。8月の測定では RLI の増加とともに SPAD 値はやや上昇していたが、有意性は認められなかった。

シダレザクラおよびソメイヨシノの単位生重量あたりの葉面積に対する測定葉における単位葉重あたりの Chl 濃度の関係を図-5に示した。ソメイヨシノでは、単位生重量あたりの葉面積に対する単位葉重あたりの Chl 濃度の間に比例関係が認められ、回帰直線は図中に示した単位葉面積あたりの Chl 濃度が一定 (0.03mmol cm⁻²) の場合の直線と近かった。シダレザクラでも単位生重量あたりの葉面積に対する単位葉重あたりの Chl 濃度の間には比例関係があったが、ソメイヨシノに比べるとその関係は弱かった。ソメイヨシノの SPAD 値は5月から徐々に増加し、7月でピークを迎えたのち、8月9月と低下した(図-3)。只木・木下(1988)は、Chl 濃度は春先の開葉時に大きく増加したあと、展開が完了する5月以降も6月、7月まで上昇し、その後は安定、もしくは緩やかに低下し、落葉前に急激に低下することを報告している。本研究の結果はこの報告と一致した。SPAD 値に対する

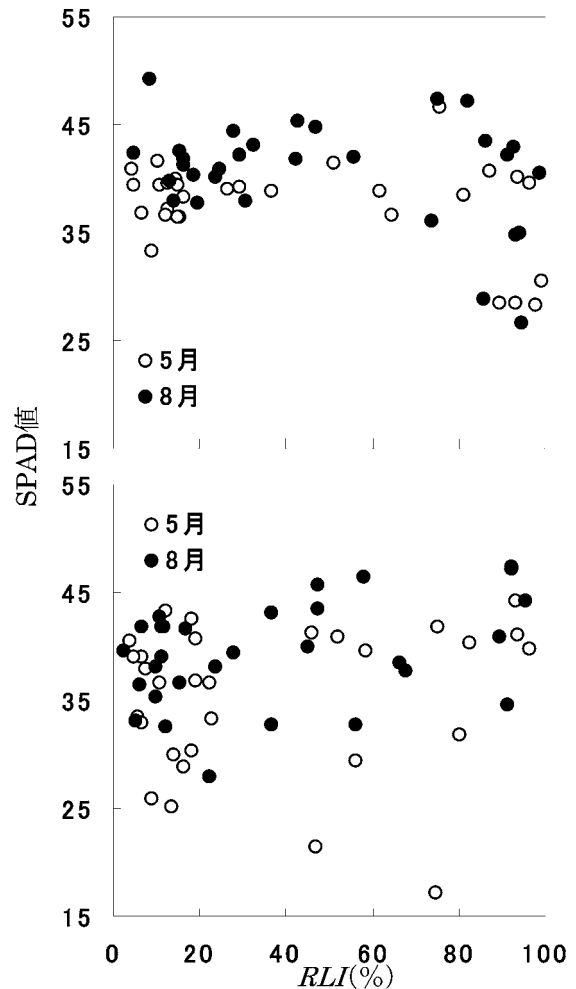


図-4. 相対光強度 (RLI) に対する SPAD 値の関係

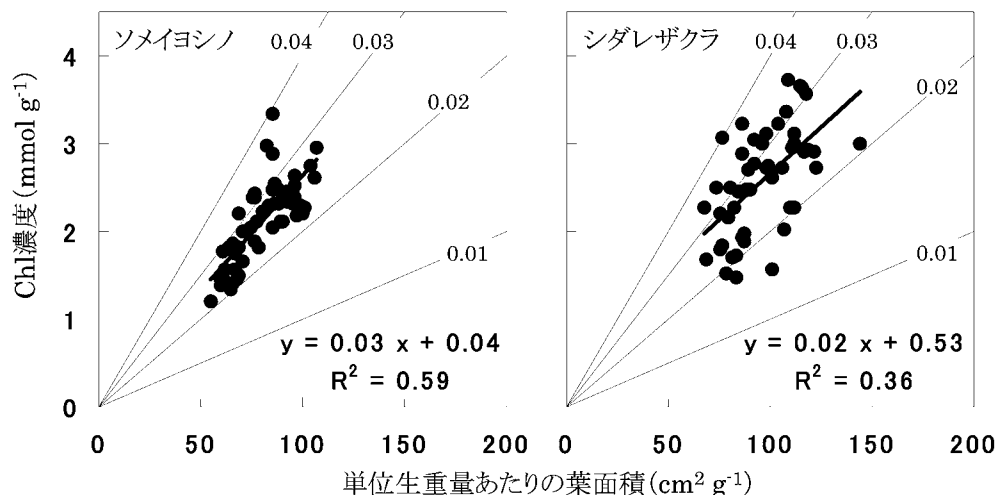


図-5. 単位生重量あたりの葉面積に対する単位葉重あたりのChl濃度の関係
(各図中の4本の細線は単位葉面積あたりのChl濃度が一定の場合
(0.01, 0.02, 0.03, 0.04 mmol cm⁻²; 図中の数字と対応)を示す直線)

*RLI*の関係は、*RLI*が80%以下のときに光環境にかかわらずほぼ一定の値を示していた(図-4)。一般的に、光環境によって葉の単位重量あたりのChl濃度は変化する(Gratani *et al.*, 2006)。しかし、今回の結果では光環境とSPAD値は対応していなかった。その原因として光量の変化に伴う葉の形態変化の影響が考えられる。ソメイヨシノでは、単位生重量あたりの葉面積に対する単位葉重あたりのChl濃度の間に比例関係が認められ、単位葉面積あたりのChl濃度が一定(0.03mmol cm⁻²)の直線に近かった(図-5)。すなわち、ソメイヨシノでは、光環境の悪化とともに単位葉重あたりのクロロフィルの上昇と単位葉重あたりの葉面積の増加が同調していたと考えられる。その結果、相互に相殺され単位葉面積あたりのChl濃度と相関の高いSPAD値は光環境に関わらずほぼ一定になったものと考えられる。以上より、ソメイヨシノのChl濃度は葉の着生する場所の光環境と光環境に伴う葉の形態変化のどちらの影響も強く受けて変化していることが示唆された。

シダレザクラでは、SPAD値の測定時期別の変動はソメイヨシノと同様の傾向を示しており(図-3)、Chl濃度変化の季節性がシダレザクラのChl濃度の特異性(陶山・作田, 2009)に影響する因子とは考えにくい。また、シダレザクラの*RLI*とSPAD値に相関は認められなかった(図-4)。シダレザクラの単位生重量あたりの葉面積に対する単位葉重あたりのChl濃度の間の比例関係はソメイヨシノよりも弱く(図-5)、シダレザクラのSPAD値に対する単位生重量あたりの葉面積の影響は弱いと考えられる。以上より、本研究におけるいずれの因子もシダレザクラのChl濃度への影響はソメイヨシノよりも弱く、シダレザクラのChl濃度の特異性に対する他の因子の影響が示唆された。その候補としては、個葉および枝の水分環境(Bhardwaj & Singhal, 1981)や枝垂れ性の原因とされている植物ホルモン(中村,

2000)などが考えられ、今後さらなる調査を行っていく必要がある。

IV. まとめ

本研究より、シダレザクラおよびソメイヨシノのSPAD値は単位葉面積あたりのChl濃度と直線関係があり、その関係は開葉期を除いて樹種間で差がないことが明らかにされた。また、ソメイヨシノのChl濃度は光量と光量に伴う葉の形態変化の影響を強く受けていると考えられたが、シダレザクラのChl濃度はいずれの因子の影響も弱く、これら以外の因子に制御されている可能性が示唆された。

本研究を行うにあたって乙須拓洋氏をはじめ九州大学大学院農学研究院植物機能利用学研究室の皆様には多くのご協力を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

V. 引用文献

- Bhardwaj R. and Singhal G. S. (1981) *Plant Cell Physiol* 22 : 155-162.
- Gratani L. *et al.* (2006) *Trees* 20 : 549-558.
- 中村輝子 (2000) *宇宙生物科学* 14 : 123-130.
- Porra R. J. *et al.* (1989) *Biochimica. et Biophysica. Acta.* 975 : 384-394.
- 陶山健一郎・作田耕太郎 (2009) 九大演報 (印刷中)
- 只木良也・木下真実子 (1988) *J. Jpn. For. Soc.* 70 : 488-490.
- Yamamoto A. *et al.* (2002) *J. Plant Nutrition* 25 : 2295-2301.
- 吉川賢ほか (1994) *日緑工誌* 19 : 215-222.
- (2008年12月6日受付; 2009年1月16日受理)