

原著論文

ホウレンソウ葉の水分欠乏に伴う励起-蛍光 matrix への影響

小西充洋・大政謙次

東京大学大学院農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥区 1-1-1

要旨

蛍光分光計測は植物葉の色素や構造、生理機能の情報を非破壊・非接触で得るのに適している。本研究では、3次元分光蛍光光度計を用いて、暗期乾燥状態におかれたホウレンソウ葉を対象とし、複数の励起波長に対する蛍光スペクトル（励起-蛍光 matrix）の経時変化を計測した。その結果、励起波長によらず、450nm, 680nm, および725nmに蛍光極大が認められた（それぞれF450, F680, およびF725）。さらに、これらの蛍光強度から算出された蛍光強度比F450/F680とF450/F725は、水ストレス処理初期の比較的相対含水率変化が小さいときにも大きく変化した。これは、暗期条件下の水分欠乏では紫外線防御機能を有する色素等の蓄積は起こらないのでF450はほとんど変化しないが、葉の萎凋による計測領域内のクロロフィル濃度増加のため、F680とF725が大きく減少したことによると考えられた。また、これらの比の変化は励起波長が短いほど大きかった。これは、F450は励起波長が短いほど大きくなるのに対し、F680, F725は小さくなるためと考えられた。このことから、ホウレンソウの相対含水率変化の検知には短波長の紫外線（330 nm程度）によって励起したときのF450/F680およびF450/F725が適していると考えられた。

キーワード

クロロフィル濃度、蛍光強度比、水分欠乏、励起-蛍光 matrix

緒言

植物から発せられる蛍光の分光計測は、葉内の様々な色素の含有量や生理機能、細胞構造などの情報が得られるため、植物の障害の診断に用いられる (Chappelle and Williams 1987, Lichtenthaler and Rinderle 1988, 大政 1988, Omasa 1990, 1998, Tobe and Omasa 1999, Kim et al. 2001, Omasa and Takayama 2002)。植物蛍光としては、主に赤色から遠赤色波長域のクロロフィル蛍光 (Papageorgiou 1975, Krause et al. 1992, Govindjee 1995) と、青色から緑色波長域の細胞壁、液胞内の色素等からの蛍光 (Harris et al. 1976, Chappelle and Williams 1987, Kim et al. 2001) が知られている。クロロフィル蛍光は、植物の光合成反応中心から発せられる蛍光で、常温において赤色波長域と遠赤色波長域に主に二つの極大をもつことが知られている (Govindjee 1995)。この蛍光のクエンチング

を計測することにより、光合成反応系に関する情報を非破壊・非接触で得ることができる (Krause et al. 1992, Maxwell et al. 2000)。さらに、画像計測により、目ではみることのできない葉面における気孔や光合成の patchiness の現象を調べることができる (Omasa et al. 1987, Daley et al. 1989, Omasa 1990, 1998, Omasa et al. 1991, Osmond et al. 1998, Govindjee and Nedbal 2000, 高山・大政 2001, Omasa and Takayama 2002)。一方、細胞壁や液胞内の色素等からの蛍光と考えられている青色から緑色の波長域に極大をもつ steady-state 蛍光は、大気汚染物質や農薬などの様々なストレスによって引き起こされる植物色素や細胞構造の変化の診断に利用される (Stober et al. 1994, Kim et al. 2001)。

Steady-state 蛍光分光計測では、従来、励起光源として紫外波長域の単色光源（例えば、UV-

A 蛍光灯：300–400nm や YAG-Nd レーザー：355nm) が用いられてきたが (Chappelle and Williams 1987, Kim et al. 2001), 近年, 様々な波長特性をもつ LED やレーザー等が開発され, 特定のストレスの検知に適した励起波長を選択することが可能になってきた. このような背景から, 複数の励起波長を用いた蛍光分光計測が行われるようになり, 植物の水分状態の影響解析にも適用されている (Philpot et al. 1996, Schweiger et al. 1996, Matouskova et al. 1999). しかし, 連続的に励起光と蛍光の分光解析ができる励起-蛍光 matrix 計測により, 植物の水分状態の経時変化を調べた例はみられない. そこで, 本研究では, 3次元蛍光分光光度計を用いて, 植物の水分状態の変化に伴う励起-蛍光 matrix の変化について検討し, 植物の相対含水率変化の影響を調べるのに適した励起波長, 蛍光波長を明らかにした.

材料および方法

供試植物

供試植物には, ホウレンソウ (*Spinacia Oleracea* L. cv. Megaton, タキイ種苗) を用いた. 種子を水に浸したウレタンマット上に播種し, 発芽後, 室温 20°C/18°C (Day/Night), 明期 11 時間, 葉面における PPF (Photosynthetic Photon Flux) が約 300 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の人工光温室において, 約 4 週間水耕栽培した. 光源には蛍光ランプを使用した. 栽培用養液として大塚ハウス A 処方液 1 単位濃度を用い, 減少分をその都度供給し, バブリングを行った. 栽培用養液の EC, pH は栽培を通してそれぞれ 210 mS m^{-1} , 6.1 であった.十分に成熟したホウレンソウ個体を 60 分間暗処理した後, 同程度の面積をもつ成熟葉を葉柄から切離し, チャンバー内において暗期で水ストレス処理 (室温 17°C, 相対湿度 50%) を行った.

相対含水率の測定方法

ホウレンソウ葉の相対含水率の算出には次の式を用いた (Matouskova et al. 1999).

$$\text{相対含水率 (relative water content)} = (m_{\text{fresh}} - m_{\text{dry}}) / (m_{\text{saturated}} - m_{\text{dry}}) \cdot 100$$

$$m_{\text{saturated}} = f \cdot m_{\text{init}}$$

ここで, m_{fresh} は水ストレス処理後の葉重, m_{dry} は乾燥処理 (90°C, 24 時間) 後の葉重, m_{init} は主茎から切離した直後の葉重, および $m_{\text{saturated}}$ は最大膨潤時の葉重である. 係数 f は予備実験から, 1.25 とした. 相対含水率の測定は 8 サンプルに対して, 水ストレス処理開始直後から 9 時間後まで 1.5 時間毎に行った.

励起-蛍光matrixの計測方法

励起-蛍光 matrix の計測には, 3次元分光蛍光光度計 (HITACHI F-4500) を用いた. 光源にはキセノンランプが用いられており, 回折格子によって励起波長, 蛍光波長をともに 200nm から 900nm まで 1nm 刻みで分光できる. これにより複数の励起波長毎の蛍光スペクトル (励起-蛍光 matrix) を得ることができる.

本研究では, 励起波長範囲を 5 nm 刻みに 330 nm から 500 nm, 蛍光波長範囲を 5 nm 刻みに 440 nm から 740 nm とした. この励起波長および蛍光波長の範囲は, LIF 計測でよく用いられる波長範囲である. また, スキャンスピードを 30000 (nm^2/min), 励起光側および蛍光側スリット幅をそれぞれ 5nm, 10nm とした. この条件において, 励起光強度の極大 (波長: 470nm) の PPF は約 18 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であった. 励起光波長の 2 倍の波長にみられる 2 次光の影響を避けるため, 光学フィルター (L-42 HOYA) を用いた. 励起光は葉の表側に照射し, 計測領域内に主脈が入らないように留意した. 1 回の計測に要した時間は約 2 分間であった. 励起-蛍光 matrix の計測は, 8 サンプルに対して水ストレス処理開始直後から 9 時間後まで 1.5 時間毎に行った.

クロロフィル濃度 (SPAD 値) の測定方法

クロロフィル濃度の測定には葉緑素計 (MINOLTA SPAD-502) を用いた. SPAD 値はクロロフィル濃度と相関のある値である (Azia et al. 2001). SPAD 値の測定は, 8 サンプルに対して, 水ストレス処理開始直後から 9 時間後まで 1.5 時間毎に行った. 励起-蛍光 matrix の計測領域内を, 1 サンプルにつき 5 回測定し, 平均値を求めた.

結果および考察

Fig. 1に、水ストレス処理後のホウレンソウ葉の相対含水率の経時変化を示す。処理開始直後の相対含水率は81.1%であったが、処理1.5時間後には69.0%に達した。その後、相対含水率はほぼ一定の割合で減少し、9時間後49.0%になった。なお、水ストレス初期の相対含水率の減少は、1.5時間後以降の減少と比べ大きかった。

Fig. 2に、水ストレス処理開始後、0時間、3時間、6時間、および9時間での励起-蛍光matrix

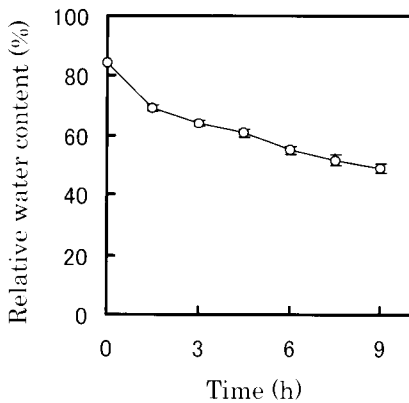


Fig. 1: Change in relative water content with time for spinach leaves after the water-stressed treatment in the dark at 40% RH and 17 °C for 9 hours. The vertical bar indicates \pm SE (standard error). Relative water content represents an average value calculated from 8 measurements.

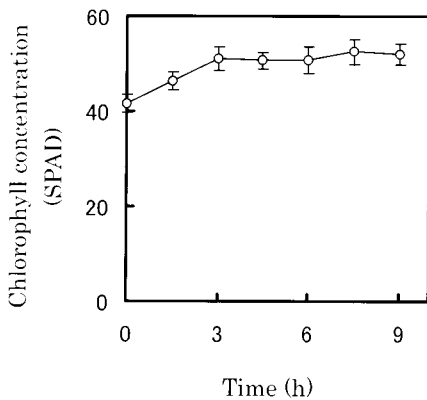


Fig. 3: Change in chlorophyll concentration (SPAD) with time for the spinach leaves after the water-stressed treatment for 9 hours. The vertical bar indicates \pm SE. SPAD represents an average value calculated from 8 measurements.

を示す。励起波長にかかわらず、450nm (この波長の蛍光強度をF450と表す)、680nm (F680)、および725nm (F725) に蛍光極大が認められた。蛍光の強度は水ストレス処理によって変化したが、これらの極大波長は、この処理によっても変化がみられなかった。蛍光極大であるF680、F725はともに励起波長435nm (E435と表す)、475nm (E475) のとき極大であった。

Fig. 3に葉緑素濃度 (SPAD 値) の経時変化を示す。水ストレス処理開始後0時間のSPAD値は41.6であり、処理開始後3時間までほぼ一定の割合で増加して51.0になり、その後はほぼ一定の値を示した。

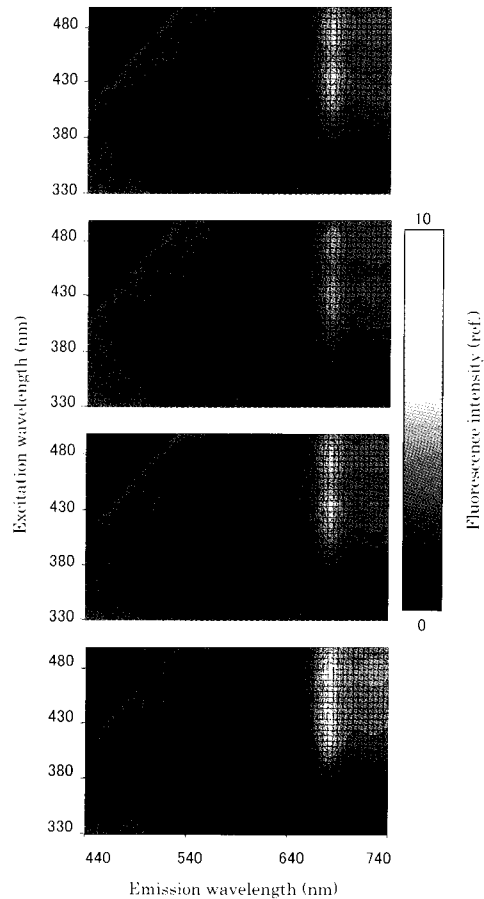


Fig. 2: Excitation-emission fluorescence matrices of the spinach leaves measured at 0 hour (0h), 3 hours (3h), 6 hours (6h), and 9 hours (9h) after the water-stressed treatment using a 3-D fluorescence spectrophotometer. The fluorescence intensity represents an average value calculated from 8 measurements.

葉内の水分減少を引き起こす要因としては、気孔からの蒸散とクチクラ蒸散があるが、本実験では、水ストレス処理を行う前に、約60分間の暗処理を行ったので、気孔からの蒸散は比較的小さいと考えられる。処理1.5時間後までの相対含水率の減少がそれ以降に比べ大きいのは、気孔閉鎖に加えて、処理初期の相対含水率の大きいときほど葉に含まれる自由水の割合が大きいためであったと考えられる(桜井ら 2001)。

植物葉のクロロフィル含量が大幅に減少するほど極端に水分を減少させた場合、クロロフィル蛍光の極大波長が変化する例も報告されているが(Lichtenthaler and Rinderle 1988)、本実験ではそのような変化は認められなかった(Fig. 2)。また、E330からE500までの全ての励起波長において、蛍光極大F680、F725が認められた。これは、クロロフィルa、クロロフィルbやカロテノイドなどの色素によって吸収されたエネルギーのうち、蛍光としては主にクロロフィルa蛍光として放散されることを示していた(Heidt 1998)。

励起波長が紫外波長域の場合にみられる青色から緑色波長域の蛍光は、主に細胞壁や液胞に含まれる色素から発する蛍光と考えられる(Chappelle and Williams, 1987)。

Fig. 4に、図2で認められた蛍光極大F450、F680、F725、およびフラビン色素やカロテノイド類等からの蛍光(Chappelle and Williams, 1987, Schweiger et al. 1996)と考えられているF520の経時変化を示す。F450およびF520は水ストレス処理によってほとんど経時変化がみられなかった。これは、本実験では光を照射しなかったため、フラビン色素やカロテノイド類等の中に含まれる過剰な光エネルギーによる光合成機能障害を回避するための色素が蓄積されなかったと考えられる(Schweiger et al. 1996, Lang et al. 1996)。F680、F725はともにE435、E475のとき極大であった。これは、クロロフィルa、クロロフィルbの光吸収がそれぞれ435nm、475nmで極大となるためと考えられた(Heidt 1998)。水ストレス処理3時間後までF680、F725

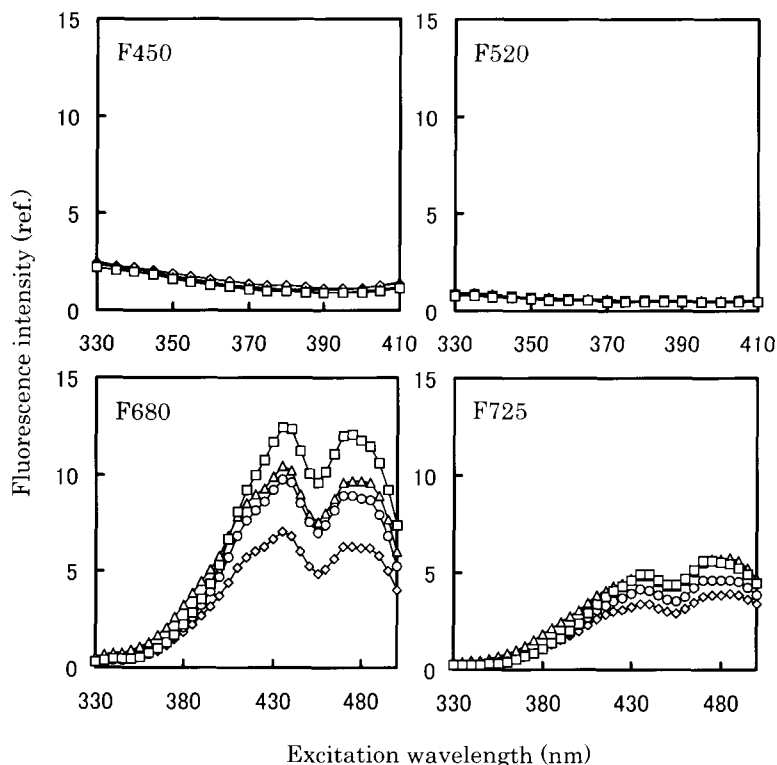


Fig. 4: Changes in fluorescence intensities (F450, F520, F680, and F725) for spinach leaves measured at 0 hour (Δ), 3 hours (\diamond), 6 hours (\circ) and 9 hours (\square) after the water-stressed treatment.

は減少し、その後増加した。水ストレス処理3時間後までのクロロフィル蛍光強度の減少は、このとき SPAD 値が増加したことから (Fig. 3)、水分減少に伴う葉の萎れによって計測領域内 (励起光を照射した領域内) のクロロフィル濃度が増加したため、単位クロロフィル量当りの励起光強度が相対的に小さくなり、蛍光収率が減少したことによると考えられる。また、水ストレス処理3時間後以降のクロロフィル蛍光強度の増加は、過度の水ストレスによって光合成反応系が障害を受けたためと考えられる (Matouskova et al. 1999)。このとき、蛍光強度の増加率は F725 に比べ F680 のほうが大きかったが、これはクロロフィルの吸収帯に含まれる F680 の再吸収が減少したためと推察される (Hagg et al. 1992)。

Fig. 5 に、蛍光強度比 F450/F520, F450/F680, F450/F725, および、F680/F725 の経時変化を示す。F450/F520 は全励起波長において、ほとんど変化がみられなかった。これは、F450 と F520 がともに水ストレス処理によってほとんど変化しないためである。F450/F680 は水ストレス処理3時間後までは増加し、その後減少した。これは、F450 が水ストレス処理によってほとんど変化し

ないが、F680 は水ストレス処理3時間後までは大きく減少し、その後増加したためと考えられる。この変化は、励起波長が短くなるほど顕著であった。この原因は、励起波長が短くなるほど F450 が大きく、また、F680 が小さくなることによると考えられる。F450/F725 でも F450/F680 と同様の変化がみられた。しかし、F680/F725 は全励起波長において、ほとんど変化がみられなかった。これは、F680 がクロロフィルによって再吸収を受けるが (Hagg et al. 1992)、その程度は小さく、また、F680 および F725 がともにクロロフィル a からの蛍光であるため、ほぼ同様の経時変化をしたことによると考えられる。

Fig. 6 に、相対含水率と変化が最も大きかった E330 のときの蛍光強度比との関係を示す。F450/F680 は相対含水率が 60% (水ストレス処理 4.5 時間後) になるまではほぼ一定の割合で大きくなり、その後減少した。F450/F725 も F450/F680 と同様の変化がみられた。しかし、F450/F520 と F680/F725 は相対含水率の変化によらずほぼ一定値を示した。植物ストレスの診断を目的とした steady-state 蛍光分光計測では、YAG-Nd レーザーや紫外蛍光灯などで励起された青色の蛍光

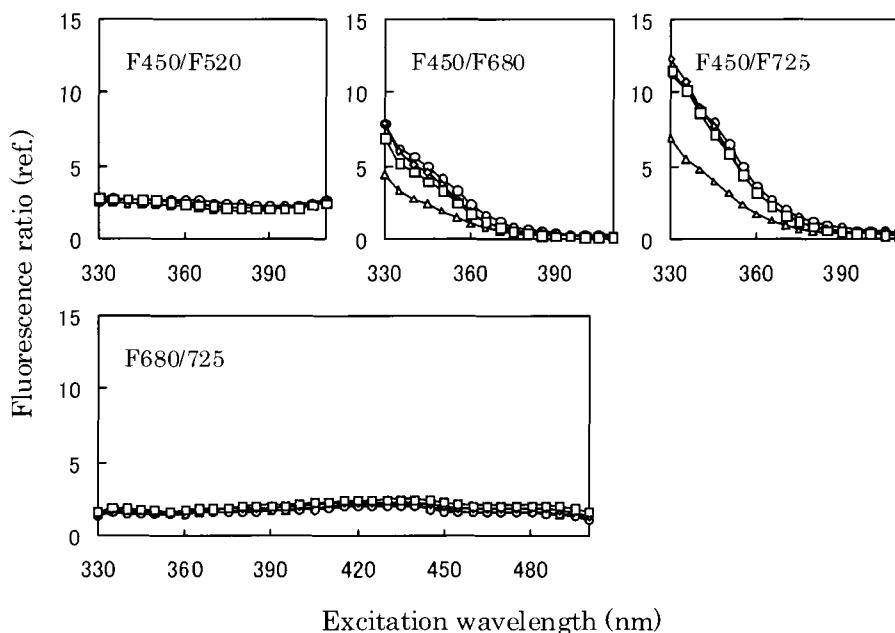


Fig. 5: Changes in fluorescence ratios (F450/F520, F450/F680, F450/F725, and F680/F725) for spinach leaves measured at 0 hour (Δ), 3 hours (\diamond), 6 hours (\circ) and 9 hours (\square) after the water-stressed treatment.

強度（本研究ではF450）、緑色の蛍光強度（本研究ではF520）、赤色の蛍光強度（本研究ではF680）、および遠赤色の蛍光強度（本研究ではF725）の比が多く用いられている（Chappelle and Williams 1987, Stober and Lichtenthaler 1992, 1993, McMurtrey et al. 1994, Lichtenthaler et al. 1996, Subhash et al. 1999, Kim et al. 2002）。本研究から、これらの蛍光強度比のうち、F450/F680およびF450/F725がホウレンソウ葉の相対含水率変化の影響を調べるのに最も適していることが明らかになった。また、F450/F680 およびF450/F725 の変化を調べる際、生体に比較的影響が小さいと考えられるUV-A以上の励起波長範囲においては、既往の研究で用いられている光源（355nm）よりもより短波長の励起波長（例えば330nm）の光源のほうが適していることが示唆された。さらに、F450/F680 およびF450/F725 は水ストレス処理の前半で増加し、後半で減少した。このことから、既往の研究でみられた水ストレス処理前と処理後のみの計測（Philpot et al. 1996, Schweiger et al. 1996, Matouskova et al. 1999）では変化が検知できない可能性が示唆されたので、経時変化を計測することが重要であると考えられる。

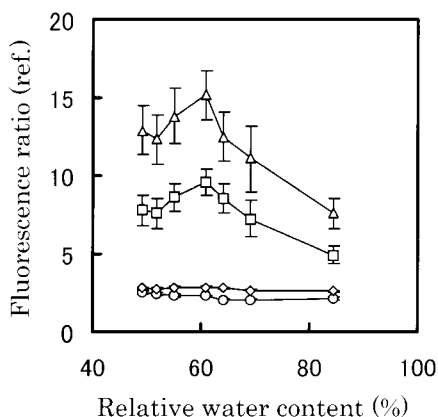


Fig. 6: Relationship between fluorescence ratios (F450/680 (△), F450/F725 (□), F450/F520 (◇), and F680/F725 (○)) and relative water content for spinach leaves during the water-stressed treatment. Excitation wavelength was 330nm. The fluorescence ratio represents an average value calculated from 8 measurements. The vertical bar indicates \pm SE.

おわりに

葉柄から切離したホウレンソウ葉を水ストレス処理し、励起-蛍光matrixの経時変化を計測した。蛍光強度比F450/F680 およびF450/F725 は、F450/F520, F680/F725 に比べ、水ストレス処理による相対含水率の変化に伴い大きく変化した。また、この変化は励起波長が短いほど顕著であった。さらに、F450/F680 およびF450/F725 は水ストレス処理初期で増加、その後減少した。このことから、本研究で用いた励起波長範囲（330nm～500nm）と蛍光波長範囲（440nm～710nm）では、励起波長330nmにおける蛍光強度比F450/F680あるいはF450/F725を経時的に計測することがホウレンソウ葉の相対含水率変化の影響を調べるのに最も適していることが明らかになった。

植物に対する特定のストレスを検知するために最適な励起波長、蛍光波長を励起-蛍光matrixから選択することにより、より正確で、早期のストレス検知が可能になることが示唆された。

引用文献

- Azia, F. and K. Stewart (2001) Relationships between extractable chlorophyll and SPAD values in muskmelon leave. *J. Plant Nutrition*, 24: 961-966.
- Chappelle, E. W. and D. Williams (1987) Laser induced fluorescence (LIF) from plant foliage. *IEEE. Trans. Geosci. Remote Sensing*, GE-25: 726-736.
- Daley, P. F., K. Raschke, J. T. Ball and J. A. Berry (1989) Topography of photosynthetic activity of leaves obtained from video images of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.* 90: 1233-1238.
- Govindjee (1995) Sixty-three Years Since Kautsky: Chlorophyll a Fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol.*, 22: 131-160.
- Govindjee and L. Nedbal (2000) The chlorophyll fluorescence imaging and its application in plant science and technology. *Photosynthetica*, 38: 481-482.
- Hagg, C., F. Stober and H. K. Lichtenthaler (1992) Pigment content, chlorophyll fluorescence and photosynthetic activity of spruce clones under normal and limited nutrition. *Photosynthetica*, 27: 385-400.
- Harris, P. and R. Hartley (1976) Detection of bound ferulic acid in cell walls of the gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature*, 259: 508-510.

- Heldt, H.・金井龍二〔訳〕(1998)「植物生化学」, シュプリンガー, 東京, 37-93.
- Kim, M., J. McMurtrey, C. Mulchi, C. Doughy, E. W. Chappelle and Y. Chen (2001) Steady-state multispectral fluorescence imaging system for plant leaves. *Applied Optics*, 40: 157-166.
- Krause, G. and E. Weis (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Plant Physiol.*, 42: 313-349.
- Lang, M., Lichtenthaler, M., Sowinska, F., Heisel and J. A. Miede (1996) Fluorescence imaging of water and temperature stress in plant leaves. *J. Plant Physiol.*, 148: 613-621.
- Lichtenthaler, H. K., M. Lang, M. Sowinska, F. Heisel and J. A. Miede (1996) Detection of vegetation stress via a new high-resolution fluorescence imaging system. *J. Plant Physiol.*, 148: 599-612.
- Lichtenthaler, H. K. and U. Rinderle (1988) Role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions of plants. *CRC. Critical Rev. Anal. Chem.*, 19: 29-85.
- Matouskova, M., H. Bartoskova, J. Naus and R. Novotny (1999) Reaction of photosynthetic apparatus to dark desiccation sensitively detected by the induction of chlorophyll fluorescence quenching. *J. Plant Physiol.*, 155: 399-406.
- Maxwell, K. and G. Johnson (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Experimental Botany*, 51: 659-668.
- McMurtrey, V. J. E., E. W. Chappelle, M. S. Kim, J. J. Meisinger and L. A. Corp (1994) Distinguishing nitrogen fertilization levels in field corn (*Zea mays* L.) with actively induced fluorescence and passive reflectance measurements. *Remote Sens. Environ.*, 47: 36-44.
- 大政謙次 (1988) 画像計測とリモートセンシング, 大政謙次・近藤矩朗・井上頼直編, 「植物の計測と診断」, 朝倉書店, 東京, 155-192.
- Omasa, K. (1990) Image instrumentation methods of plant analysis. ed. Linskens H. F. and J. F. Jackson. 'Modern Methods of Plant Analysis. New Ser. Vol. 11', Springer, N.Y., 203-243.
- Omasa, K. (1998) Image instrumentation of chlorophyll a fluorescence. *Proc. SPIE*, 3382: 91-99.
- Omasa, K., K. Shimazaki, I. Aiga, W. Larcher and M. Onoe (1987) Image analysis of chlorophyll fluorescence transients for diagnosing the photosynthetic system of attached leaves. *Plant Physiol.*, 84: 748-752.
- Omasa, K. and K. Takayama (2002) Image instrumentation of chlorophyll a fluorescence for diagnosing photosynthetic injury. ed. Omasa, K., H. Saji, S. Youssefian and N. Kondo, 'Air Pollution and Plant Biotechnology', Springer, Tokyo, 287-308.
- Omasa, K., S. Maruyama, M. A. Matthews and J. S. Boyer (1991) Image diagnosis of photosynthesis in water-deficit plants. 'IFAC Mathematical and Control Applications in Agriculture and Horticulture', Pergamon Press, Oxford, 383-388.
- Osmond, C. B., P. F. Daley, M. R. Badger and U. Luttge (1998) Chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of a field-portable imaging system. *Bot. Acta*, 111: 390-397.
- Papageorgiou, G. (1975) Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis. ed. Govindjee, 'Bioenergetics of Photosynthesis', Academic Press, N.Y., 319-371.
- Philpot, W., M. Duggin, R. Raba and F. Tsai (1996) Analysis of reflectance and fluorescence spectra for atypical features: Fluorescence in the yellow-green. *J. Plant Physiol.*, 148: 567-573.
- 桜井英博・柴岡弘郎・芦原坦・高橋陽介 (2001) 「植物生理学入門」, 培風館, 東京, 232-249.
- Schweiger, J., M. Lang and H. K. Lichtenthaler (1996) Differences in fluorescence excitation spectra of leaves between stressed and non-stressed plants. *J. Plant Physiol.*, 148: 536-547.
- Stober, F. and H. K. Lichtenthaler (1992) Changes of the laser-induced blue, green and red fluorescence signatures during greening of etiolated leaves of wheat. *J. Plant Physiol.*, 140: 673-680.
- Stober, F. and H. K. Lichtenthaler (1993) Studies on the Localization and Spectral Characteristics of the Fluorescence Emission of Differently Pigmented Wheat Leaves. *Bot. Acta*, 106: 365-370.
- Stober, F., M. Lang and H. K. Lichtenthaler (1994) Studies on the blue, green, red fluorescence signature of green etiolated and white leaves. *Remote Sens. Environ.*, 47: 65-71.
- Subhash, N., O. Wenzel and H. K. Lichtenthaler (1999) Changes in Blue-Green and Chlorophyll Fluorescence Emission and Fluorescence Ratios during Senescence of Tobacco Plants. *Remote Sens. Environ.*, 69: 215-223.
- 高山弘太郎・大政謙次 (2001) 除草剤による植物の光合成機能障害の画像診断—尿素系土壌処理剤が *in situ* のキュウリ葉に与える影響の解析—, 植物工場学会誌, 13: 217-253.
- Tobe, K. and K. Omasa (1999) Leaf age dependence of chlorophyll fluorescence parameters in water-stressed leaves of *Phaseolus vulgaris* L., *J. Agric. Meteorol.* 55: 155-163.

受付日 : 2002 年 10 月 21 日

受理日 : 2003 年 1 月 16 日

Effects of Water Deficit on the Excitation-emission Matrix of Spinach Leaves

Atsumi Konishi and Kenji Omasa

*Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
Yayoi 1-1-1, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan*

Summary

Fluorescence spectrometry is a suitable method to non-destructively and remotely obtain information on the pigments, cell structure and physiological functions of plant leaves. In this study, the excitation-emission matrices of water-stressed spinach leaves in the dark were measured by a 3-D fluorescence spectrophotometer, and changes with time of these matrices were analyzed. Independently of the excitation wavelength, local maximum fluorescence intensities were captured at 450nm, 680nm, and 725 nm (F450, F680, and F725, respectively). F450/F680 and F450/F725 drastically changed with decreasing relative water content in the early stage of the water-deficit process. F450 hardly changed during the water-stressed treatment, which implied UV-defensible pigments were not accumulated in the dark. On the other hand, at an early stage of the water-deficit process, F680 and F725 appreciably decreased, and at that time, chlorophyll

concentration increased, which implied chlorophyll contents in the measurement area were increased by the shrinkage of leaves, and fluorescence yield accordingly decreased. In the latter stage of the water-deficit process, F680 and F725 appreciably increased, which implied the photosynthetic reaction process was damaged by the extent of the water-deficit. As the excitation wavelength was shorter, F450/F680 and F450/F725 changed more extensively because F680 and F725 were smaller and F450 was larger. These results showed F450/F680 and F450/F725 excited by short-wavelength ultraviolet rays (for example, 330nm) were suitable for detecting changes of relative water content in spinach leaves.

Keywords

chlorophyll concentration, excitation-emission matrix, fluorescence ratio, water deficit
