

論文 (Original article)

近赤外域ハイパースペクトルカメラを用いた、 樹木葉代謝物質の解析方法の提案

北岡 哲^{1)*}、宇都木 玄^{1,3)}、松田 修²⁾、上村 章¹⁾、
原山 尚徳¹⁾、飛田 博順³⁾、射場 厚²⁾

Near-infrared hyper-spectral techniques for the quantification of starch and sucrose in the leaves of cool temperate deciduous broad-leaved trees

Satoshi KITAOKA^{1)*}, Hajime UTSUGI^{1,3)}, Osamu MATSUDA²⁾,
Akira UEMURA¹⁾, Hisanori HARAYAMA¹⁾, Hiroyuki TOBITA³⁾, Koh IBA²⁾

Abstract

In the presence of elevated CO₂ levels, the accumulation of sugar and starch in leaves induces the downregulation of the photosynthetic rate. Therefore, it is important to develop a rapid and convenient system for the measurement of the concentrations of sugar and starch. This study evaluated the use of near infrared (NIR) spectral analysis, which is based on wavelengths longer than 1000 nm, for the determination of the soluble sugar and starch concentrations in the leaves of the dominant deciduous broad-leaved tree species in cool temperate forests. We analyzed three tree species that were grown in the presence of 370 ppm and 720 ppm CO₂, and we compared the mass base sugar and starch concentrations determined by chemical analysis with the concentrations based on the light absorption rates in the NIR spectral analysis. We found that after removing the water by freeze-drying the leaves, there was a strong relationship between the light absorption rates and the soluble sugar concentration in the leaf dry mass base ($r = 0.80$).

Key words : near infrared spectral analysis, deciduous broad-leaved tree, soluble sugar, starch, elevated CO₂

要旨

高 CO₂ 条件下では光合成産物が葉内に蓄積し光合成速度の低下が生じる現象が示唆されており、光合成産物蓄積量の簡便迅速な評価が課題である。本論文では、冷温帯主要落葉樹三種を対象に高 CO₂ 下の可溶性糖類とデンプンの濃度分析について、その特性が明瞭になる波長 1000 nm 以上の近赤外分光解析の適用を試みた。CO₂ 暴露栽培をおこなった試料を約 5 nm の分解能を持つ近赤外ハイパースペクトルカメラで撮影し、化学分析による定量と比較した。その結果、凍結乾燥によって水分を取り除くことで、重さあたりの可溶性糖類濃度と吸光度の間に樹種を統一した検量線を作成でき(重相関係数 $r = 0.80$)、可溶性糖類濃度の簡便な予測が可能になったと考えられた。

キーワード : 近赤外分光解析、落葉広葉樹、可溶性糖類、デンプン、高 CO₂

1. はじめに

温暖化は CO₂ 濃度の上昇が原因となるため、植物による CO₂ 吸収能の増大に期待が寄せられている。植物の光合成による同化作用は CO₂ と水を基質とするため、高 CO₂ 条件は同化作用を促進すると考えられていた。たとえばイネ、ムギ、マメ類、コンニャクなどの作物では高 CO₂ 下で多収性が確認されており(今井 1988)、植物工場などでも高 CO₂ の利用例が見られる(池田ほか 1984)。しかし土壌養分、特に窒素が不

足した場合、高 CO₂ を十分に生かす事ができず収量が増加しない例が観察されている(Arp 1991, Oren et al. 2001)。森林を構成する樹木の場合、土壌養分が制限となり高 CO₂ による同化速度の著しい増大が認められない報告がある(Lavola and Tütto 1994, Körner 2000)。葉内での同化速度は CO₂ と水から糖・デンプンへの炭酸同化作用だけではなく、同化産物のタンパク質への合成・転流効率にも影響される。

この論文では落葉広葉樹林を形成する樹木を対象に

原稿受付：平成 24 年 6 月 8 日 Received 8 June 2012 原稿受理：平成 24 年 8 月 28 日 Accepted 28 August 2012

1) 森林総合研究所北海道支所 Hokkaido Research Center for Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

2) 九州大学 理学研究院 生物科学部門 Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University

3) 森林総合研究所 Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

* 森林総合研究所北海道支所 〒062-8516 北海道札幌市羊ヶ丘 7 Hokkaido Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI), Hitsujigaoka 7, Toyohira, Sapporo, Hokkaido 062-8516, Japan.

高 CO₂ 下での光合成による代謝産物解析手法に焦点を当てた。落葉広葉樹林は高緯度地帯の森林を形成し高 CO₂ 等の環境変動の影響をより多く受ける生態系であると考えられる (Paster and Post 1988, Bonan 2008)。光合成により糖・デンプンが生成されるが、それらはミトコンドリアの TCA 回路において中間代謝物質である 2- オキソグルタル酸に合成される。2- オキソグルタル酸はグルタミン脱水素酵素の働きによって植物体に吸収された窒素 (アンモニウムイオン) と反応し、窒素同化に重要なグルタミン酸へと合成される (テイツ・ザイガー 2002)。しかし高 CO₂ 下で窒素が不足した場合、糖・デンプンがタンパク質合成に利用されずに葉内に蓄積してしまい (Lavola and Tütto 1994, Curtis et al. 2000)、光合成速度の低下 (ダウンレギュレーション) が生じる可能性が示唆されている (Stitt 1991, Tissue et al. 1993)。また樹種により窒素利用形態が多様であるため (Reich et al. 1995)、高 CO₂ 下で生じる代謝産物の生産量に差が生じ、ダウンレギュレーションの強弱に樹種間差があると考えられる (Ceulemans and Mousseau 1994)。そのため多くの樹種を高 CO₂ 下で生育し、光合成速度の変化と葉内の糖デンプン蓄積量の関係を明らかにする必要がある。一個体内の個葉においても葉序により光合成能力や窒素濃度が異なるため (Koike 1990, Ellsworth and Reich 1992)、ハイスループット (高い処理能力) で糖・デンプン濃度を測定することは、個体や樹種の高 CO₂ に対する反応の理解に必要かつ重要である。また解析において非破壊的に糖デンプンを定量化できれば、同部位の窒素やリンの定量分析に供することができる。

これまで述べたように高 CO₂ 下での光合成反応の解析には葉内の代謝産物の定量化が重要である。近年物質の状態や濃度を解析する手法として分光特性の利用があげられる。これまでの分光特性を用いたハイスループット解析手法として、可視域を利用した葉面温度の測定から、高 CO₂ に対する気孔応答欠如ミュータントの摘出を行った例 (Negi et al. 2008) や、衛星画像からの広域のクロロフィル活性評価 (NDVI) も分光特性を活かしたハイスループット解析手法である (近藤 2004)。近赤外域 (700 - 2500nm) の分光解析は分子振動による光吸収原理を利用した非破壊的物質測定法であり、医学分野や、農学、食物科学分野に広く用いられている (河野 1996, 西村 2009, Takahashi et al. 2011)。例えば穀物の水分量やタンパク質・脂質などの主要成分の定量化がすでに実用化されている (河野 1996, 近藤 2007, 平川・棟加登 2008)。近赤外のうちでも長波長域は糖やデンプン、タンパク質などに高い反射率を示すが、同時に水分の影響でその反応が隠されてしまうことが多い (西村 2009, 西沢ほか 2009)。特に植物葉は糖・デンプンなどの濃度がコメやダイズ種子などに比べて低く、水分含有量がその微量な変化

を解析する障害となっている。このため従来は樹木葉における長波長域は水分特性のみを表すと考えられてきた (Slaton et al. 2001)。本論文では高 CO₂ 下で育てられた樹木葉について、近赤外分光法を用いた代謝異常の検討をおこなうために必要な解析手法を論じる。具体的には超高解像度 (5 nm) のハイパースペクトルカメラを用い、凍結乾燥により水分条件を除外した糖・デンプンの非破壊的分析システムを考案し、定量化の性能を評価する。ハイパースペクトルカメラは対象物の近赤外光の長波長域の分光特性を高分解能のカメラで撮影し、二次元画像として解析することができる。この解析手法の確立によって、代謝物質の局在と代謝異常を生じている特定部位の面的評価を効率的におこなうことができると考える。

2. 材料と方法

近赤外分光分析計として SWIR200-R (Emerging Technologies, MS, USA) を用いた。本計測器は 1250 nm - 2500 nm を波長バンド幅 5 nm で分光し、解像度は 320 (水平) × 256 (垂直) の 8 万画素であり 14 bit 階調のダイナミックレンジを持つ。対象物の測定サイズは 8 × 6 cm となり、SWIR200-R の後ろ側方 2 地点からハロゲンランプによる照射と対象物からの分光反射率を SWIR200-R によって測定する。測定システム全体像を写真 1 に、撮影画面例を写真 2 に示す。SWIR200-R はビデオカメラほどの重量とサイズであり (写真 1)、光源システムを準備できれば、簡単に移動可能である。

北方系落葉広葉樹樹種であるエゾキヌヤナギ、シラカンバ、イタヤカエデの 3 樹種を対象に実験を行った。森林総合研究所北海道支所内の環境調節棟を用い、2009 - 2011 年の各年それぞれ 5 月 10 日から 370 ppm (現状 CO₂) およびその約 2 倍の 720 ppm (高 CO₂) で各樹種の実生を CO₂ 暴露栽培した。CO₂ 処理開始から 14 週間後の早朝に葉のサンプルを採集した。両 CO₂ からそれぞれ 5 個体を無作為に選択し、主軸の先端から 5 番目の葉を対象とした。採集した葉は速やかに各々封筒に入れ -45 °C で 48 時間凍結乾燥させた (FD-5N, EyELA, 東京理化学機器、東京)。また比較として凍結乾燥を行わなかったサンプルも用意した。各樹種 5 枚の葉について SWIR200-R を用いて撮影し、スペクトローム解析を行った。次に各材料の撮影部位をサンプリングし、乳鉢、乳棒を用いて粉碎し 2 mm メッシュの篩にかけた。篩にかけた粉末試料約 3 mg を重さあたりの可溶性糖類 (グルコース、フルクトース、シクロロースなどの 80 % エタノールに可溶性示糖類を本研究では可溶性糖類と定義する) およびデンプン濃度の定量に供した。80 % のエタノール 500 μl を粉末試料の入った 2 ml のエッペンチューブに加えて攪

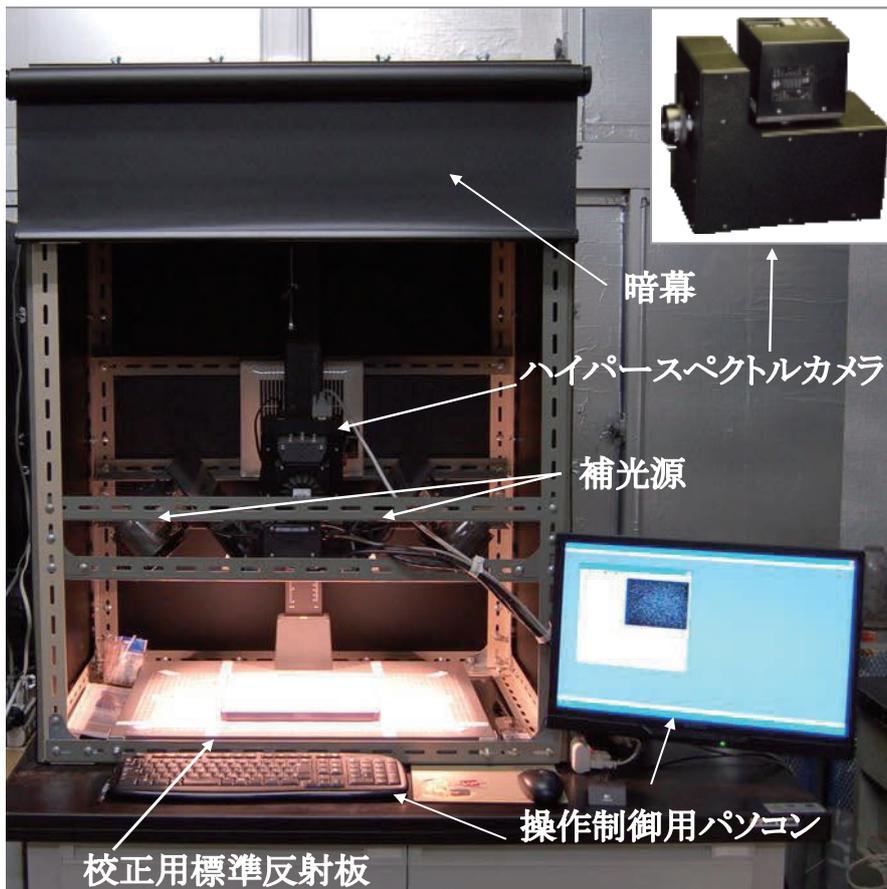


写真1 近赤外ハイパースペクトルカメラの測定システム

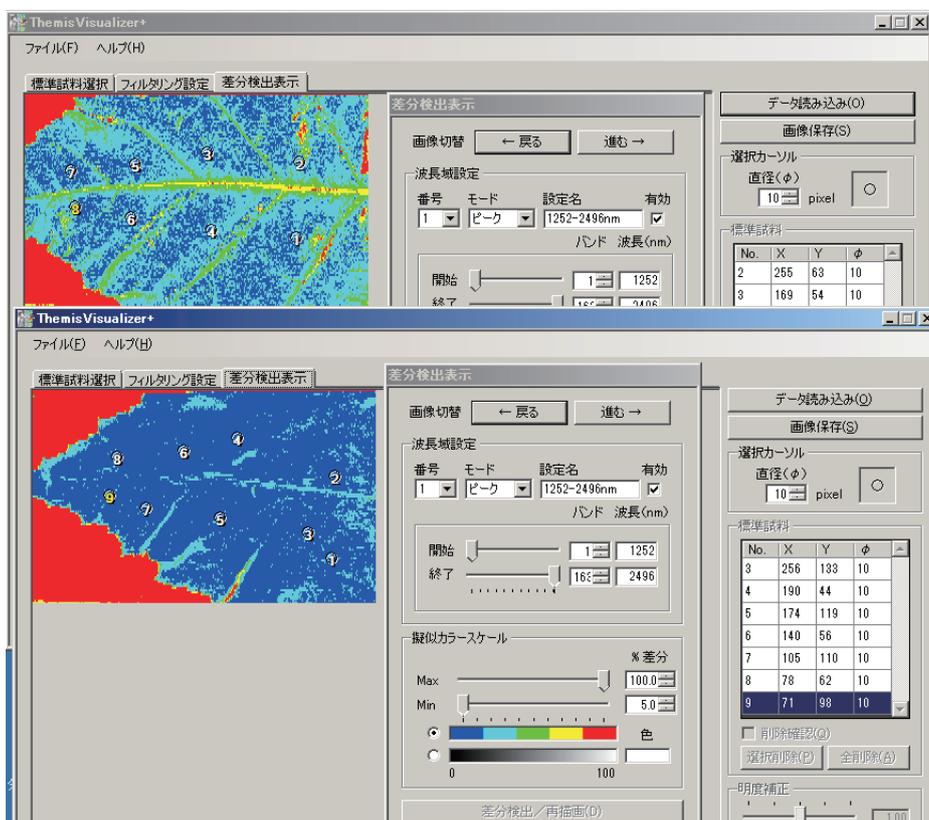


写真2 シラカンバの撮影画面の例 (上: 生葉、下: 凍結乾燥葉)

拌し、遠心分離器 (15000 rpm、15 分) にかけて上澄みと残渣にわけた。この作業を 3 回繰り返した後、上澄みを可溶性糖類濃度の定量に供し、残渣はデンプン濃度の定量に供した。

可溶性糖類の試料である上澄みは 55 °C の恒温槽に静置してエタノールを完全に蒸発させた後、超純水 1 ml を加えて攪拌したものをフェノール硫酸法で定量した (Kabeya and Sakai 2003)。試験管に試料水溶液 500 μ l を取り、フェノール試薬を 500 μ l 加え攪拌し、濃硫酸を 2.5 ml 加えた。試料を室温に 5 分間静置したのち、分光光度計 (U-1900, 日立製作所、東京) で 490 nm の吸光度を測定した。

デンプンの試料である残渣には 0.2 N の水酸化カリウムを 500 μ l 加えて 100 °C で 30 分加熱した。加熱した試料を 5 分間静置した後、1 N の酢酸 200 μ l を加えて中和した。中和した試料に酵素であるアミログルコシターゼ溶液 500 μ l を加えて攪拌し、55 °C の恒温槽に 30 分間置いた。その後ただちに取り出し、沸騰水中に 1 分間浸してアミログルコシターゼを失活させた。試料を室温で冷却した後、遠心分離機にかけ (15000 rpm、20 分)、その上澄みをデンプン抽出区分として定量に供した。デンプン濃度の定量にはムロターゼ・GOD 法 (グルコース CII- テストワコー、和光純薬、東京) を用いた。試料 100 μ l にグルコーステストワコー発色液 3 ml を加え 37 °C で 5 分間反応させたのち、分光光度計で 505 nm の吸光度を測定した。可溶性糖類濃度、デンプン濃度の標準試料にはグルコース CII- テストワコーのブドウ糖標準液 I を用いて検量線を作成した (決定係数 $r^2 = 0.97$: 可溶性糖類、0.99: デンプン)。統計解析には R (R developing core team, Vienna, Austria) を用いた。可溶性糖類濃度、デンプン濃度についての検定は分散分析を用いた。またハイパースペクトルカメラより得られた吸光度と可溶性糖類濃度、デンプン濃度の関係の統計解析には R の部分最小二乗 (partial least square: PLS) 回帰解析パッケージ (pls) を用いて解析を行った。PLS 回帰解析法は近年計量化学の分野で広く用いられはじめてきた解析法で、主成分分析よりも高い予測精度が得られる (相島 1996)。

3. 結果と考察

各樹種の個葉について可溶性糖類濃度の範囲は 105 - 255 mg g^{-1} 、デンプン濃度は 75 - 270 mg g^{-1} であった (図 1)。この値は、これまで現状 CO₂ (約 370ppm) 下で生育する木本樹種から得られた糖・デンプン濃度 (Eguchi et al. 2008) より高い濃度が含まれており、それらは高 CO₂ で得られた試料によるものであった。シラカンバとエゾノキヌヤナギでは高 CO₂ 下で可溶性糖類およびデンプン濃度が有意に高い値を示した (図 1)。また高 CO₂ 下でも樹種によって糖・デンプンの濃

度には差がみられ、高 CO₂ 下における個葉生産量を解析する上で、多くの糖・デンプン濃度と光合成速度・窒素濃度との関係解析が必要となる。

シラカンバの 370 ppm で育てた試料の生葉と凍結乾燥葉の吸収スペクトル、そして 720 ppm で育てた凍結乾燥葉の吸収スペクトル (吸光度) を図 2a に示す。凍結乾燥葉に対する生葉の吸収スペクトルはどの波長域にいても非常に高い。図 2b には 370 ppm で育てた生葉と凍結乾燥葉の各波長における吸光度の二次微分スペクトル (尾崎 1996) を示したが、水の分光特性がみられる 1870 nm 付近と 1920 nm 付近 (尾崎 1996) で生葉の二次微分スペクトルの変化が大きくなっている。これらのことは、生葉に含まれる水による光の吸収が強く表れることで、他の物質の吸光特性の検出が困難になることを示している (図 2a, b)。370 ppm と 720 ppm の凍結乾燥葉を比べると、1900 nm 以上の波長域の一部で、両者の吸光度が異なる場所が見られた (図 2a)。したがって凍結乾燥葉による解析から、CO₂ 処理による水以外の葉の構成物の変動を検知できる可能性が考えられた。糖やデンプンなどの炭水化物の分光特性は 1900 - 2500 nm の波長域に現れてくるといわれており (須田 2008)、特にグルコースやデンプンは 1900 nm、2100 nm、2470 nm 付近に吸光度のピークがみられる (尾崎 1996)。よってこの波長域の吸光度の二次微分スペクトルを図 2c に示した。370 ppm で育てた葉と 720 ppm で育てた葉で二次微分スペクトルが明瞭に異なる箇所が認められた。この傾向はエゾノキヌヤナギ及びミズナラについても同様であった。この波長域の吸光度を用いて可溶性糖類濃度、デンプン濃度についての PLS 解析を行った (表 1)。

その結果、検量線式が得られ、シラカンバの可溶性糖類では重相関係数が 0.93、同様にデンプンで 0.95 という高い値が得られた。またエゾノキヌヤナギの可溶性糖類でも重相関係数 0.97、同様にデンプンで 0.85 という高い重相関係数が得られた。一方イタヤカエデでは可溶性糖類の重相関係数が 0.93 と高かったが、デンプンでは 0.67 とやや低い値であった。3 種をプールした PLS 解析の結果において、可溶性糖類では 0.8 という高い重相関係数が得られたが、デンプンでは 0.46 と低い値となった。リンゴ果実中の可溶性糖類の定量例 (Cho et al. 1998) を見ると、グルコースについての重回帰分析の結果では 2108、2248、2100 nm の波長における吸光度が説明変数として得られ (重相関係数: $R = 0.84$)、ショ糖についての重回帰分析は 1672、1720、2276、2300、2396、2408、2420、2472 nm の吸光度が説明変数として得られている (重相関係数: $R = 0.86$)。本研究における単一樹種を用いた可溶性糖類の検出精度は、既存の研究成果に対して充分であり、また複数樹種を用いた場合の利用にも耐えることができると言えよう。一方サトイモのデンプン濃度の測定

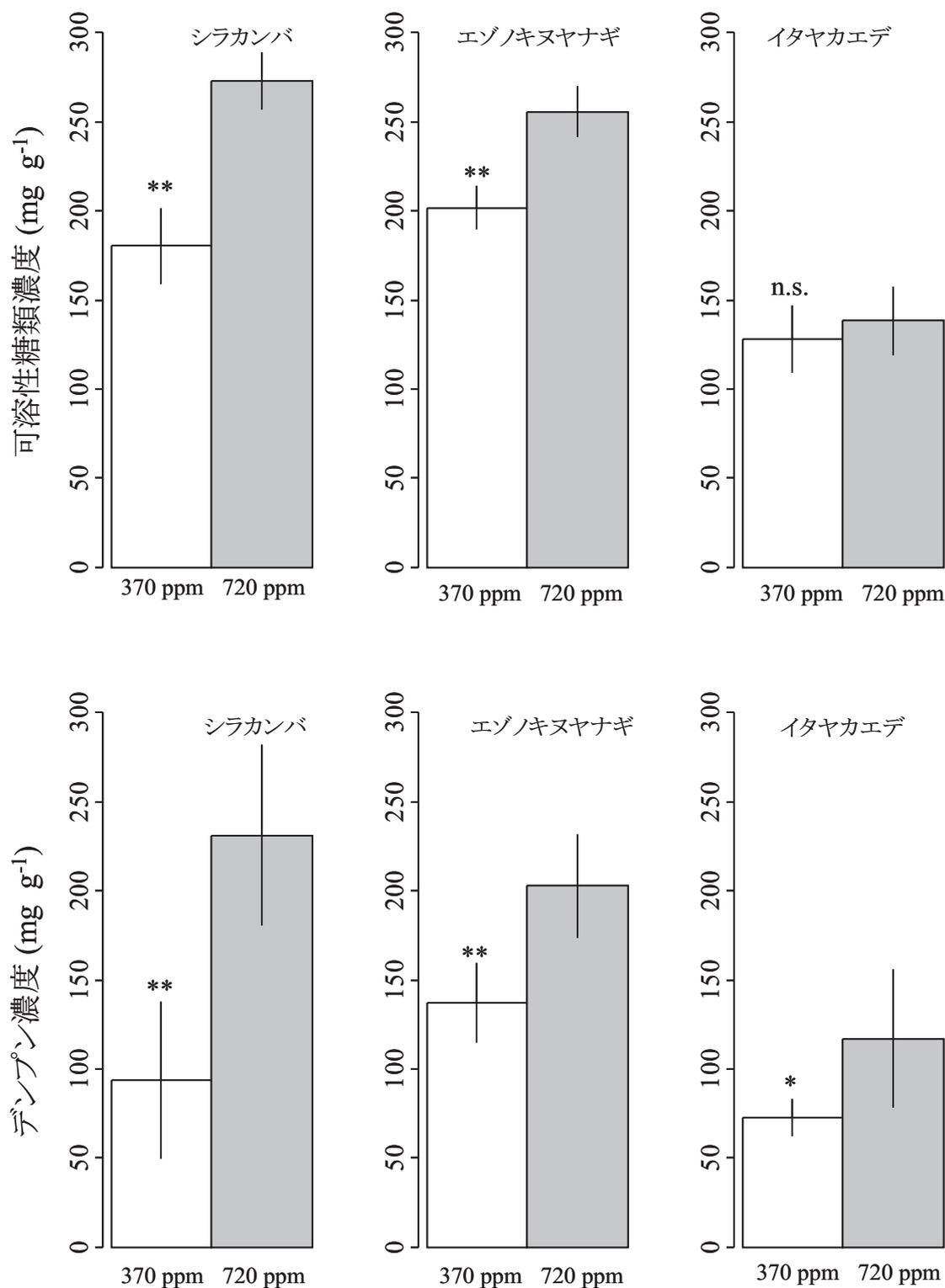


図1 370 ppmと720 ppmのCO₂濃度で育てたシラカンバ、エゾノキヌヤナギ、イタヤカエデの可溶性糖類濃度およびデンプン濃度。図中の記号は分散分析の結果を示す、*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, n.s.: 有意差なし、である。

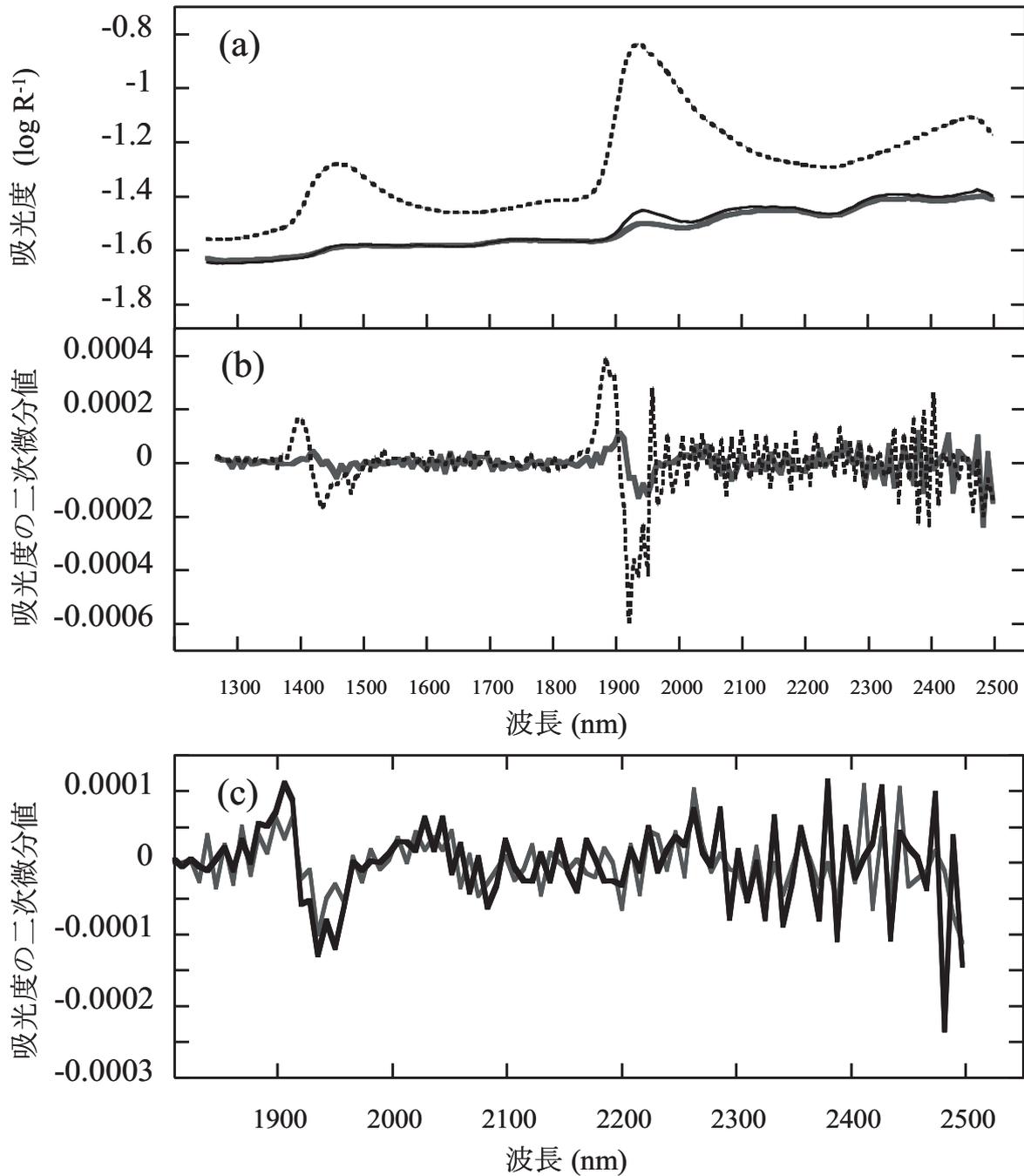


図2 (a): シラカンバの生葉、凍結乾燥葉の波長 (1250 - 2500 nm) における吸光度 ($\log R^{-1}$), R: は反射率である。370 ppm の生葉 (破線)、370 ppm の凍結乾燥葉 (灰実線)、720 ppm の凍結乾燥葉 (黒実線) である。
 (b): 370 ppm で育てたシラカンバの生葉と凍結乾燥葉の波長 (1250 - 2500nm) における吸光度の二次微分値。生葉 (破線)、凍結乾燥葉 (実線) である。
 (c): 370 ppm (灰実線) と 720 ppm (黒実線) で育てたシラカンバ凍結乾燥葉の波長 (1900 - 2500 nm) における吸光度の二次微分値。

表1 PLS 回帰解析法による検量線の作成結果

樹種名	目的変数	RMSEP ¹⁾	R ²⁾	SEC ³⁾	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>
シラカンバ	可溶性糖類	4.60 (4)	0.93	0.11	426.18	-58.73	41.99	372.56	1188.60
	デンプン	6.68 (4)	0.95	0.09	870.39	-112.70	137.73	636.31	2309.30
エゾノキヌヤナギ	可溶性糖類	1.43 (3)	0.97	0.07	120.94	125.59	1.45	156.15	144.71
	デンプン	5.26 (3)	0.85	0.15	96.79	255.80	-16.52	-147.68	325.03
イタヤカエデ	可溶性糖類	2.17 (4)	0.93	0.10	716.60	-219.61	-139.96	139.65	872.39
	デンプン	5.69 (2)	0.67	0.17	12.19	-23.92	50.89	-120.48	54.86
シラカンバ・ イタヤカエデ・ エゾノキヌヤナギ	可溶性糖類	4.00 (2)	0.80	0.67	9.01	10.52	-0.65	71.98	149.80
	デンプン	7.30 (1)	0.46	0.24	16.81	26.12	18.28	27.08	144.45

1): 予測値の平均自乗誤差, 2): 重相関係数, 3): 検量線の標準誤差, である。検量線式は
 目的変数 (y) = $a \times abs_{1450} + b \times abs_{1920} + c \times abs_{2106} + d \times abs_{2473} + e$;
 ただし abs_{1450} は波長 1450nm における吸光度、 abs_{1920} は波長 1920nm における吸光度、 abs_{2106} は波長 2106nm における吸光度、 abs_{2473} は波長 2473nm における吸光度である。

例 (須谷 2008) では吸光度とデンプン濃度の関係に産地によるばらつきがみられ、最も相関性の高いもので、1026、1244、2338、2416 nm の吸光度が説明変数として得られている (重相関係数: $R = 0.48$)。

今回は 5 nm 程度の分解能のハイパースペクトルカメラを用い、凍結乾燥によって水分を取り除くことで、可溶性糖類と吸光度の間に樹種を統一した検量線を作成でき、可溶性糖類濃度の簡便な予測が可能になったと考えられる。しかし樹種を統一した場合デンプンと吸光度の重相関係数が小さく、デンプンに関してはハイスループットな定量方法を開発できなかった。この理由として樹種によるデンプン構成の相違が考えられる。デンプンはグルコースが直鎖状に結合したアミロースと網状に結合したアミロペクチンという、構造の異なるグルコースの結合体が多数重合したものである。例えば作物では種や品種によって、デンプン中のアミロース、アミロペクチン含有率が異なる (Bewley and Black 1994)。アミロースとアミロペクチンの分光特性も考慮した解析手法の確立が今後の課題である

う。しかし可溶性糖類に関してはハイパースペクトルカメラで面としてその局在を特定できることから、代謝的に異常を示す樹木葉、またはその部位をあらかじめ特定することができ、より効率的な分析をおこなうことができると考えられる。さらに既存の糖類の分析法であるフェノール硫酸法は、腐食性の極めて強い劇物である濃硫酸を多量に用いるが、このような取り扱いに慎重を期す分析回数を軽減することができる。現状ハイパースペクトルカメラの値段が高い事、撮影までに多少の手間がかかることが問題点としてあげられる。しかし、この機器を室内作業専用として設置することで、多くの樹木葉の代謝物定量の簡便迅速化と局在探索のために有効な手法になると考えられる。

謝辞

本研究は生研センターのイノベーション創出基盤的研究推進事業の支援を受けた。また材料の提供にご協力頂いた北海道下川町の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- 相島鐵郎 (1996) 近赤外分光の応用 - 農業・食品分析 -. 尾崎幸洋・河田聡編 “日本分光学会 測定法シリーズ 32: 近赤外分光法”. 学会出版センター, 109-118.
- Arp, W. J. (1991) Effects of source-sink relations on photosynthetic acclimation to elevated CO₂. *Plant Cell Environ.*, 14, 869-875.
- Bewley, J. D. and Black, M. (1994) *Seeds: Physiology of Development and Germination. Second edition.* Plenum Press, New York, 460pp.
- Bonan, G. B. (2008) Nature forests and climate change: forcing, feedbacks and the climate benefits of forests. *Science*, 320, 1444-1449.
- Ceulemans, R. and Mousseau, M. (1994) Effects of elevated atmospheric CO₂ on woody plants. *New Phytol.*, 127, 425-446.
- Cho, R. K., Sohn, M. R. and Kwon, Y. K. (1998) New observation of nondestructive evaluation for sweetness in apple fruit using near infrared spectroscopy. *J. Near. Infrared Spectrosc.*, 6, A75-A78.
- Curtis, P. S., Vogel, C. S., Wang, X., Pregitzer, K. S., Zak, D. R., Lussenhop, J., Kubiske, M. and Terri, J. A. (2000) Gas exchange, leaf nitrogen, and growth efficiency of *Populus Tremuloides* in a CO₂-enriched atmosphere. *Ecol. Appl.*, 10, 3-17.
- Eguchi, N., Karatsu, K., Ueda, T., Funada, R., Takagi, K., Hiura, T., Sasa, K. and Koike, T. (2008) Photosynthetic responses of birch and alder saplings grown in a free air CO₂ enrichment system in northern Japan. *Trees Struc. Func.*, 22, 437-447.
- 平川達也・棟加登きみ子 (2008) 近赤外分析計を用いた飼料イネの試料成分迅速推定法. 福岡農試研報., 27, 81-85.
- 池田 彰・江崎謙治・中山繁樹 (1984) 全方向照射における植物生育特性 I. サラダ菜生長速度に及ぼす光強度, 炭酸ガス濃度および気温の影響. 生物環境調節, 22, 71-77.
- 今井 勝 (1988) 二酸化炭素と作物生産. 日作紀., 57, 380-391.
- Kabeya, D. and Sakai, S. (2003) The Role of Roots and Cotyledons as Storage Organs in Early Stages of Establishment in *Quercus crispula*: a Quantitative Analysis of the Nonstructural Carbohydrate in Cotyledons and Roots. *Ann. Bot.*, 92, 537-545.
- 河野澄夫 (1996) 近赤外分光の応用 - 農業・食品分析 -. 尾崎幸洋・河田聡編 “日本分光学会 測定法シリーズ 32: 近赤外分光法”. 学会出版センター, 157-172.
- Koike, T. (1990) Autumn coloring, photosynthetic performance and leaf development of deciduous broad-leaved trees in relation to forest succession. *Tree Physiol.*, 7, 21-32.
- 近藤昭彦 (2004) グローバルリモートセンシングによる植生・土地被覆変動の抽出とその要因解析. 水文・水資源学会誌, 17, 459-467.
- Körner, Ch. (2000) Biosphere responses to CO₂-enrichment. *Ecol. Appl.*, 10, 1590-1619.
- Krapp, A., Hofmann, B., Shafer, C. and Stitt, M. (1993) Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the “sink” regulation of photosynthesis. *Plant J.*, 3, 817-828.
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M. and Iba, K. (2008) CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature*, 452, 483-486.
- Lavola, A. and Tütto, R. J. (1994) The effect of elevated carbon dioxide and fertilization on primary and secondary metabolites in birch, *Betula pendula* (Roth). *Oecologia*, 99, 315-321.
- 西村吾朗 (2009) 近赤外生体分光法の展望 -1μm 波長域の可能性. 脈管学 49, 139-145.
- 西沢 隆・森 佑子・福島慎也・夏賀元康・丸山康広 (2009) 近赤外分光法によるイチゴ果実糖組成の非破壊測定. 日食化誌, 56, 229-235.
- Oren, R., Ellsworth, D., Johnsen, K., Phillips, N., Ewers, B., Maier, C., Schäfer, K., McCarthy, H., Hendrey, G., McNulty, S. and Katul, G. (2001) Soil fertility limits carbon sequestration by forest ecosystems in a CO₂-enriched atmosphere. *Nature*, 411, 469-472.
- 尾崎幸洋 (1996) 近赤外分光の基礎. 尾崎幸洋・河田聡編 “日本分光学会 測定法シリーズ 32: 近赤外分光法”. 学会出版センター, 11-57.
- Pastor, J. and Post, W. M. (1988) Responses of northern forests to CO₂ induced climate change. *Nature*, 334, 55-58.
- Paul, M. J. and Driscoll, S. P. (1997) Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signaling nitrogen deficiency through source-sink imbalance. *Plant Cell Environ.*, 20, 110-115.
- Reich, P. B., Kloeppel, B. D., Ellsworth, D. S. and Walters, M. B. (1995) Different photosynthesis-nitrogen relations in evergreen conifers and

- deciduous hardwood tree species. *Oecologia*, 104, 24–30.
- Salton, M. R., Hunt, E. R. Jr. and Smith, W. K. (2001) Estimating near-infrared leaf reflectance from leaf structural characteristics. *Am. J. Bot.*, 88, 278–284.
- Sheen, J. (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell*, 2:1027–1038.
- Stitt, M. and Krapp, A. (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ.*, 22, 583–621.
- 須田和子 (2008) 近赤外分光法によるサトイモのデンプン測定. 園田学園女子大学論文集, 42, 211–216.
- Takahashi, A., Shimada, T. and Kawano, S. (2011) Nondestructive determination of tannin content in intact individual acorns by near-infrared spectroscopy. *Ecol. Res.*, 26, 679–685.
- L. テイツ・E. ザイガー 編 (2002) (西谷和彦・島崎研一郎監訳, 2004) 植物生理学 (第3版), 培風館, 696 pp.
- Tissue, D. T., Thomas, R. B. and Strain, B. R. (1993) Long-term effects of elevated CO₂ and nutrients on photosynthesis and Rubisco in loblolly pine seedlings. *Plant Cell Environ.*, 16, 859–865.