



クロロフィル蛍光イメージングを用いた トマトの熱ストレスの早期検出

Arjen Tegels – 修士課程インターンシップ

日付	2026/8/03			
場所	ヴァーヘニンゲン、オランダ			
所有者	PhenoVation B.V. アグロビジネスパーク65A 6708 PV ワーヘニンゲン オランダ www.phenovation.com			
作成者	アリエン・テーゲルス インターン			
文書バージョン	1			

クロロフィル蛍光イメージングを用いたトマトの熱ストレスの早期検出

修士課程インターンシップ

日付: 2026 年 6 月 30 日

著者: Arjen Tegels (1587129)

電子メール: arjen.tegels@wur.nl

会社の監督者:

プリシラ・マルコム・ディーデ・デジャーガー

会社名: PhenoVation B.V.

大学の指導教員:

カタリーナ・スモレジエノバ

オランダ、ヴァーヘニンゲン大学、園芸および製品生理学議長グループ

24 ECTS

HPP70424

目次

1 はじめに.....	4
2 材料と方法.....	7
2.1 植物の材質、成長、ストレス条件.....	7
2.2 測定.....	8
2.2.1 クロロフィル蛍光測定.....	8
2.2.2 マルチスペクトル測定.....	9
2.3 データ分析.....	11
3 結果.....	12
3.1 暗所測定のコイミソグ.....	12
3.2 光測定のコイミソグ.....	14
3.3 測色との比較.....	16
4 ディスカッション.....	17
結論.....	19
謝辞.....	20
利益相反に関する声明.....	20
AI ステートメント.....	20
参考文献.....	21
付録.....	24
付録 1: 植物成長中の相対湿度のグラフ.....	24
付録 2: 計算されたすべてのOJIPパラメーターの完全な表.....	25
付録 3: すべての暗順応時間におけるOJIPプロトコルからのすべての測定パラメーター...	27
付録 4: 追加の植物の写真.....	28
付録 5: HUEおよびNDVIの拡散データ.....	31

概要

熱ストレスは作物生産に対する脅威を増大させており、大きな被害が出る前に熱ストレスを検出するには一貫した指標が必要です。さらに、これらの指標は作物の表現型解析にも使用でき、植物に対する熱ストレスの影響の理解を向上させることができます。この研究の目的は、熱ストレスの指標としてクロロフィル蛍光の一時的上昇(OJIP)から得られるパラメーターのパフォーマンスを評価することでした。さらに、これらの結果は、色およびマルチスペクトル測定に基づくパラメーターと比較されました。

この研究は、0.4Mpで333fpsカメラを使用して測定が行われたため、完全なOJIP曲線の高品質イメージングの最初の例の1つを示しています。トマト植物は、ストレスのないベースラインを確立するために、25/20℃(昼/夜)の恒温温室で栽培されました。その後、35/24℃で10日間熱処理を行いました。暗順応クロロフィル蛍光(OJIP)測定は、暗順応の30分、5時間、および7時間後に行われました。光に適応した測定は、夜明けと一日の終わりに行われました。合計28のパラメーターが完全なOJIP曲線から導出され、そのうちの4つが詳細に分析されました。

PITOTALおよび δRO はいずれも、暗順応時間に関係なく、処理1日後にそれぞれ12%および20%の有意な減少によるストレスを明確に示しました。対照的に、文献で一般的に使用されるストレスの指標である F_v/F_m およびPIABSは、ストレスをそれほど明確に示さず、治療の最初の数日間は増加を示しました。さらに、光におけるPSII光化学の平均量子効率(F_q'/F_m')は、熱処理中の植物をベースライン測定と比較した場合、明らかな低下を示しませんでした。しかし、画像データの値の広がり进行分析したところ、一部の葉はストレス処理に応じて効率が大幅に低下したが、他の領域は安定したままか増加したことが明らかになりました。その結果、ストレス処理に応じて、第12.5分位数とピクセル間のデータの広がりの中点値との間の距離が増加しました。

クロロフィル蛍光ベースのパラメーター、色およびマルチスペクトルベースのパラメーター (NDVI およびHUE)とは異なり、処理後10日以内のストレスは示されませんでした。代わりに植物の健康と緑色の増加が示されました。

これらの結果は、一過性のOJIP上昇に由来するパラメーターの分析が、測定のタイミングに関係なく、トマト植物の熱ストレスを検出する高感度な方法を提供することを示しています。

1 はじめに

地球規模の気候変動に伴う異常気象の増加により、非生物的ストレスにさらされる期間が長くなっています。こうした気候変動下で収量を維持・向上させるには、作物の生産性を最適化することが不可欠です。植物の形質を体系的に測定する手法である「作物フェノタイピング」は、ストレス条件下で高い能力を発揮する遺伝子型を育種家や研究者が特定する上で広く活用されています。現在、ハイスループット・フェノタイピングの多くはカラー画像やマルチスペクトル測定に基づいて行われていますが、その場合、ストレスの影響が検出されるまでには2～3週間を要します(W. Dijskma, 私信, 2026)。作物の最適化において重要な要素の一つが、光合成の速度と効率です。光合成能力を定量化する手法として、高感度かつ非破壊的な「クロロフィル蛍光」測定が挙げられます(Moustaka & Moustakas, 2023)。

光合成装置、特に光化学系II(PSII)内のクロロフィルが光エネルギーを吸収すると、そのエネルギーは主に光化学反応を駆動しますが、一部は熱として散逸し、また一部は蛍光として再放出されるという3つの経路をたどります(Baker, 2008; Murchie & Lawson, 2013)。クロロフィル分子から再放出されるこの蛍光シグナルは、専用の装置を用いて測定することが可能です(Baker, 2008; Moustaka & Moustakas, 2023; Murchie & Lawson, 2013)。これら3つの経路は相互に関連しているため、ある経路の減少は他の経路の相対的な増加をもたらします。その結果、蛍光測定のみに基づいて、各経路の相対的な割合を算出することができます。こうした測定にはいくつかのプロトコルが存在しますが、基本的には、クロロフィル蛍光の測定は、最小蛍光(F_o)および最大蛍光(F_m)の測定に基づいています。

本研究では、Strasserら(2004)によるOJIP過渡現象測定プロトコルに焦点を当てています。 F_o と F_m のみを測定するパルス振幅変調(PAM)法とは異なり、OJIPプロトコルでは、短時間の測定で、最小蛍光レベルから最大蛍光レベルに至るまでの蛍光強度の動的な応答も捉えることができます。OJIP曲線における蛍光強度の立ち上がりを測定する際、光化学反応を飽和させるのに十分な強度の光パルス(飽和パルス)が照射されます。OJIP曲線に沿った蛍光強度の増大は、光合成装置が段階的に飽和していく様子を反映しています。つまり、光化学反応に利用される吸収光の割合が徐々に減少し、代わりに蛍光として放出される光の割合が増加していくのです。最小蛍光レベルは、暗順応後のパルス照射開始直後に測定され、最大蛍光レベルはパルス照射の終了時に測定されます。この経時的な応答を対数時間軸上にプロットすると、特徴的なプラトー(平坦部)が確認されます(図1)。これらの各プラトーは、電子伝達系における律速段階(ボトルネック)に対応しています。各時点での蛍光強度データに基づき、約28種類のパラメーターが算出されます(Strasserら, 2000)。

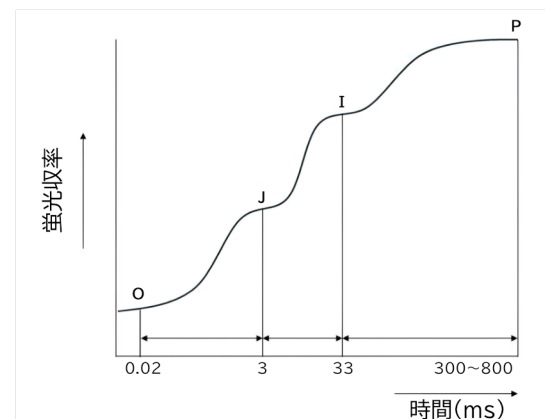


図1: 対数タイムスケールでの時間経過(ミリ秒)に伴うクロロフィルA蛍光収量の動的応答。OJIP曲線の特徴的なプラトー、O(最小蛍光)、J(3ミリ秒)、I(33ミリ秒)、およびP(800ミリ秒、最大蛍光)も示されています(Dejager, 2025)。

OJIP関連の各パラメーターは、植物の光合成系における生理学的プロセスやエネルギーフラックスと関連しており、光エネルギーが吸収された瞬間からその行方を追跡するものです(Strasser et al., 2000)。光合成は植物においてストレスの影響を受けやすいプロセスとして知られているため(Berry & Bjorkman, 1980; Stefanov et al., 2011; Zhang & Sharkey, 2009)、これらのプロセスやエネルギーフラックスもストレスの影響を受けます。影響を受ける電子伝達鎖の特定の部位は、ストレスの種類や植物種によって異なります。例えば、リンゴの木を対象とした研究では、乾燥が電子伝達鎖の初期段階(QAとQBの間)に特異的な影響を及ぼすことが明らかになりました(Wang et al., 2018)。また、トウモロコシの葉に関する研究でも、熱ストレスが同様に電子伝達鎖の初期段階に影響を及ぼすことが報告されています(Li et al., 2020)。対照的に、タバコを用いたKhatri & Rathore (2019)の研究では、乾燥および塩ストレスが、電子伝達鎖へ電子を供給する酵素(水分解複合体)に特異的な影響を及ぼすことが示されています(Khatri & Rathore, 2019)。

測定のタイミングはストレス反応の検出に大きな影響を与えます。光はこのシステムへのエネルギー源であるため、特にストレス期間中の過剰な光は、PSIIでの活性酸素種(ROS)の形成を引き起こし、光合成装置への光酸化的損傷のリスクを高め、非生物学的ストレスによって引き起こされる損傷を悪化させる可能性があります(Alonso et al., 2017)。さらに、植物は、特に夜間に積極的にPSIIを修復します(Khan et al., 2025)。このメカニズムの結果として、修復メカニズムがストレスによって引き起こされる損傷を軽減できるため、暗期の終わりまたは明期の始まりに測定が実行されると、ストレスの検出が遅れる可能性があります。

本プロジェクトの目的は、トマトの熱ストレスを早期に検出するために、OJIP曲線に基づくパラメーターと、カラー/マルチスペクトル測定による指標とを比較し、OJIP曲線測定システムが優位性を持つかどうかを評価することでした。前述の通り、マルチスペクトルおよびカラー測定を用いた場合、トマトの熱ストレスは処理開始から約3週間後に検出されます(W. Dijkema, 私信, 2026年)。さらに、検出感度が最も高くなる時点を特定するため、時間帯の異なる測定値の比較も行いました。これらすべてのデータを用いて、以下の研究課題の検討を行いました。

1. OJIPプロトコルから得られるどのパラメーターを用いれば、トマトの熱ストレスを早期に検出できるか、またその検出はどの時間帯に行われるか。さらに、この手法は「色+マルチスペクトル」による測定と比較してどう異なるか。
2. トマトの熱ストレスを最も早期に検出するためには、一日のうちどの時間帯に測定を行うべきか。

これらの研究課題に基づき、以下の仮説を立てました。

1. トマトに熱ストレスを負荷した後、パフォーマンス指数(Performance Index)および総パフォーマンス指数(Total Performance Index)は、有意に早期に低下すると予想されました。一方、Fv/Fmの感度はそれらよりも低いと予想されました。また、光合成に関するすべての測定項目は、色およびマルチスペクトルに関する測定項目よりも感度が高いと予想されました。
2. 熱ストレスの検出において、明期終了間際の測定は、夜明け前の測定と比較して感度が高いと予想されました。

総合性能指数(PITOTAL)は、植物内の光合成装置の健全性に関連する複数のパラメーターを組み合わせたものです(Arslan, 2023; Tsimilli-Michael, 2020)。吸収性能指数(PIABS)は非常に似ていますが、パラメーターが1つ少なくなります。このため、両方のパラメーターはストレスに対して非常に敏感であると予想されます(Ceusters et al., 2019; Zushi et al., 2012)。対照的に、Fv/Fm(PSII光化学の最大量子効率)は、植物種、熱ストレスの重症度、および持続時間に応じて、熱ストレスに応答してわずかに減少するだけであるため、感度が低いと予想されます(Bjerring Jensen et al., 2024; Zhou et al., 2015)。それにもかかわらず、すべてのクロロフィル蛍光パラメーターは、カラーおよびマルチスペクトルに基づく測定で3週間かかるよりも早く熱ストレスを検出すると予想されます。光周期の終わりに行われる測定は、夜間に光合成システムが修復されるため、熱ストレスの影響を最短時間で検出できると期待されています。

2 材料および方法

2.1 植物材料、生育およびストレス条件

トマト(*Solanum lycopersicum*)品種「マネーメーカー(Moneymaker)」を、Bronson Climate Incrementum 1500(Bronson Climate b.v.社、オランダ・ザルトボメル)内で生育させました(図2)。播種後9日間(DAS)はプラグ(Eazyplug、HGA Garden B.V.社、オランダ・ゴイルレ)で育苗し、その後、培養土とパーライトを3:1の比率で混合した用土(Plagron社、オランダ・オスペル/Pokon社、オランダ・フェーネンダール)を充填した0.75 Lのポットに移植しました。

発芽中、次の設定を適用しました:相対湿度(RH)85%、CO₂ 450ppm、白色光(41:41:18 R:G:B)光合成活性放射線(PAR)の光強度 $150\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、昼夜16/8時間の光周期、日中25°C、夜間20°Cの温度設定。移植後(DAS9回)、光は樹冠の高さで白色光(PAR)の $300\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ に増加し、試験中に植物が成長するにつれて植物の樹冠の上部では同じレベルに保たれました。RHを75%に設定すると、蒸気圧不足(VPD)は日中0.79kPa、夜間0.58kPaとなりました(付録1)。2グラムのOsmocote(登録商標)肥料(Everris International B. V、オランダ、ヘールレン)(15:9:11のNPK)を各ポットに添加しました。植物は2つの試験にわたって測定されました(セクション2.2)。最初の試行では、ベースライン測定は23、24、および25DASで行われ、熱処理は27DAS後に適用されました。2番目の試行では、ベースライン測定を21、22、23、24、および28DASで取得し、その直後(28と29DASの間)に熱処理を適用しました。温熱処理は日中35°C、夜間24°Cに温度を変化させました。人工気候室ではこれより低い設定が許可されなかったため、相対湿度は75%に保たれ、熱処理中のVPDは日中1.41kPa、夜間0.75kPaとなりました。



図2: ブロンソン気候室内での2番目の試験のセットアップ。黒い線内の8つの植物のみが試験に含まれました。他の植物はテスト後に廃棄されました。気候室には植物が植えられた同様のレベルがもう1つありました。

2.2 測定

クロロフィル蛍光は、OJIPプロトコルに従い、異なる時点において測定された(図3)。日の出前および日の出時の光順応状態での測定は試験1(実線の枠)の一部として行われ、その他の測定は試験2(破線の枠)において実施されました。マルチスペクトルおよびカラーの測定は、試験1では日の出時の光順応状態での測定と同時に、試験2では日没時の測定と同時に行われました。

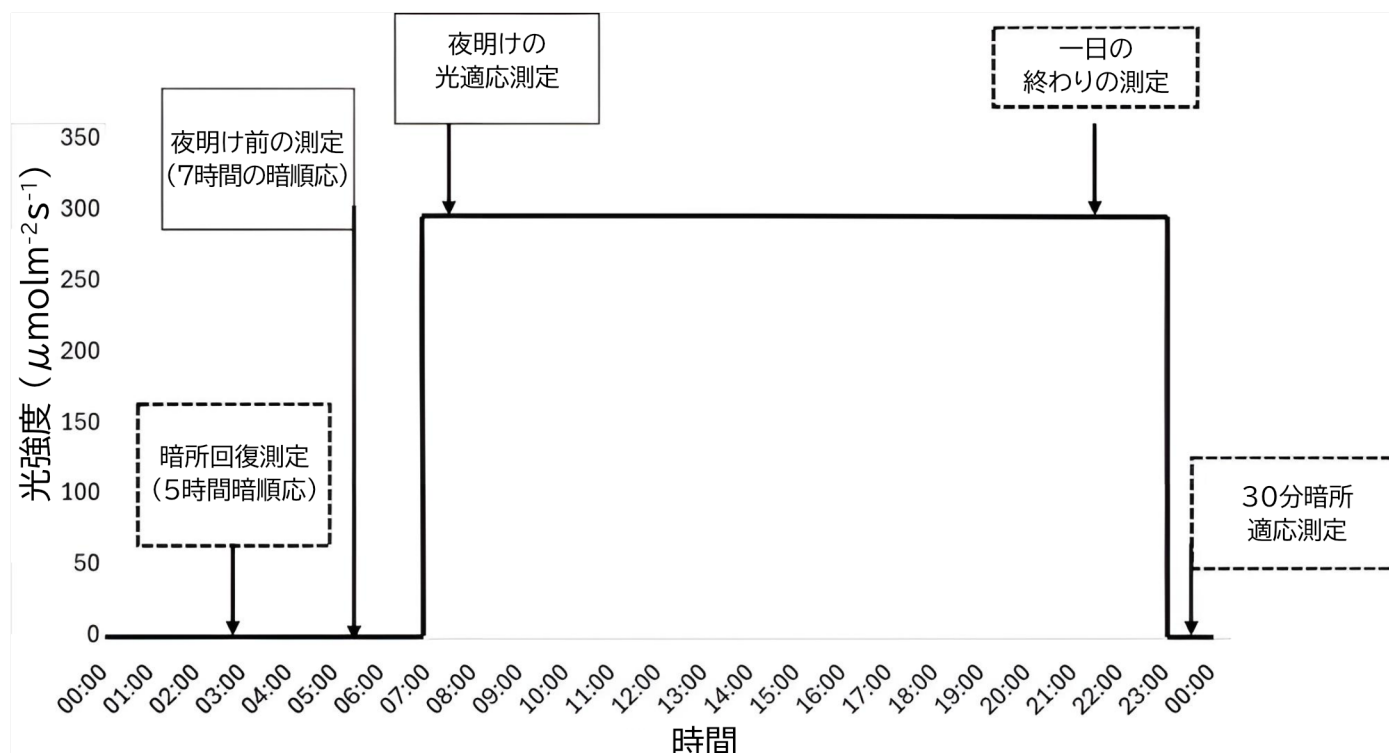


図3: 試験1および試験2におけるOJIP測定のタイミング。試験1(実線の枠)では、夜明け前(7時間の暗順応)および夜明け時の光順応状態での測定が行われ、試験2(破線の枠)では、30分間および5時間の暗順応後、ならびに日没時の測定が行われました。

2.2.1 クロロフィル蛍光の測定

OJIP誘導曲線における過渡的な蛍光上昇時のクロロフィル蛍光は、高速カメラ(PhenoVation B.V. 社製、オランダ・ワーゲニンゲン; 解像度0.4 MP、撮影速度333フレーム/秒)を搭載するように改良された「PlantExplorer Pro Field」を用いて測定しました。OJIPパラメーターの抜粋を表1に示します。算出された全パラメーターのリストは付録2に記載されています。これらのパラメーターは、暗順応させた植物については F_o 、 F_j 、 F_i 、および F_m の蛍光値を用いて算出しました(図1、表1)。光順応させた植物については、光照射下での定常状態蛍光(F_s')および光照射下での最大蛍光(F_m')を用いました。測定には、群落上部における光合成有効光量子束密度(PPFD)が $6450 \mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となる飽和パルス光を使用しました。群落上部とカメラ、光源、およびセンサーとの距離が常に一定になるよう、測定日ごとに測定プラットフォームの高さを調整しました。

2.2.1.1 試行1:夜明け前(または夜明け)の測定

最初の試行では、OJIPプロトコルと改良型PlantExplorer proを用い、8個体の植物を測定しました。暗順応下での測定において、残留する光防御機構が完全に緩和された状態を確保するため、夜明け前に測定を行いました。暗所での測定後、夜明け時の光順応下での測定を行うため、PlantExplorer pro内で植物に $240 \pm 5 \mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色光を20分間照射しました(図3)。

2.2.1.2 試験2:日没時および暗所回復時の測定

2回目の試験では、OJIPプロトコルを用いた測定を3つの異なる時点で行いました(図3)。それらは、明期終了前の2時間(日没時の測定)、明期終了から30分後(30分間の暗順応後の測定)、および暗期に入ってから5時間後(暗所回復時の測定)です(図3)。明期終了時の測定においては、測定前に植物をPlantExplorer内で60秒間順応させました。この測定では、気候制御チャンバー内の光合成有効放射(PAR)強度と同じである $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光を作用光として用い、8個体の植物を測定しました。暗所でのその他の測定については、16個体の植物を測定しました。

2.2.2 マルチスペクトル測定

両試験期間中の各測定日において、PlantExplorer PRO+(12.3メガピクセル;PhenoVation B.V.、オランダ・ワーゲニンゲン)を用い、すべての植物体に対してマルチスペクトル測定およびカラー(RGB)測定を実施しました。暗順応を妨げないように、これらの測定はクロロフィル蛍光測定の後に実施されました。測定はすべて、PlantExplorer Pro Fieldの標準測定プロトコルに従って行われました。機器の技術的な詳細については、PhenoVation.com(Dejager, 2026)を参照ください。マルチスペクトル測定およびカラー測定のデータから、RGB画像に加え、NDVIおよびHUEの値が算出されました。HUEは色相(色)を定量的に表す指標です。NDVIは正規化植生指数(Normalized Difference Vegetation Index)の略であり、植物の健全性を示す指標として一般的に用いられます。これは、RNir(769 nm)およびRred(640 nm)の信号を比較することによって算出されます(式1)。

$$\text{NDVI} = \frac{\text{RNir} - \text{Rred}}{\text{RNir} + \text{Rred}} \quad (1)$$

表1: OJIPプロトコルから計算または測定されたパラメーターと、PhenoVationの記載された標準に従って説明および式が記載されています。Arslan(2023)、Strasser et al.(2004)、および Tsimilli-Michael(2020)に基づいています。

記号	式	説明
F_0		暗順応させた試料において、電子伝達を誘起するには不十分だが、最小蛍光を誘起するには十分な光強度で測定される、クロロフィル蛍光の最小値
F_j		Jプラトー(3ms)における蛍光収率
F_i		Iプラトー(33ms)における蛍光収率
F_m		暗順応させた試料に飽和パルスを照射して測定される、蛍光の最大値
$F_{S'}$		光順応状態の植物における定常状態蛍光
$F_{m'}$		光順応状態の植物における最大蛍光
$F_q'/F_{m'}$ または ϕ_{PSII}	$\frac{F_{m'} - F_{S'}}{F_{m'}}$	PSII作動効率: 光化学反応に利用されるエネルギーの割合。光条件下におけるPSII光化学反応の最大量子効率
$F_v F_m$ または ϕ_{Po}	$\frac{F_m - F_0}{F_m}$	PSII光化学反応の最大量子効率
V_i	$\frac{F_i - F_0}{F_m - F_0}$	最大可変蛍光に対する比率として算出された、Iプラトーにおける相対可変蛍光
V_j	$\frac{F_j - F_0}{F_m - F_0}$	最大可変蛍光に対する比率として算出された、Jプラトーにおける相対可変蛍光
PI_{ABS}	$\frac{\gamma RC}{1 - \gamma RC} * \frac{\phi P_0}{1 - \phi P_0} * \frac{\psi E_0}{1 - \psi E_0}$	反応中心の活性、エネルギー変換効率、および最初の電子受容体への電子伝達を反映する、複数の過程を統合した指標
PI_{TOTAL}	$\frac{\gamma RC}{1 - \gamma RC} * \frac{\phi P_0}{1 - \phi P_0} * \frac{\psi E_0}{1 - \psi E_0} * \frac{\delta R_0}{1 - \delta R_0}$	反応中心の活性、エネルギー変換効率、およびPSIの最終電子受容体への電子伝達を反映する指標
δR_0	$\frac{1 - V_i}{1 - V_j}$	PSIの最終電子受容体へ伝達される電子の効率
ψE_0	$1 - V_j$	QAを超えて(QBおよびPQプールへ)伝達される電子の効率
γRC	$\frac{RC}{(ABS + RC)}$	PSIIのクロロフィルa分子が反応中心として機能する確率。活性型PSII反応中心の密度を反映する

2.3 データ解析

PlantExplorer Pro FieldおよびPro+で取得された生画像からのデータ抽出は、PlantAlize (PhenoVation社製、未公開ソフトウェア)を用いて行われました。同ソフトウェアによって生成された数値データに対する統計解析および処理は、Windows版RStudio 2025.09.2+418 "Cucumberleaf Sunflower" Release(2025-10-20)を用いて実施されました。また、RStudio内では以下のパッケージが使用されました:lme4 (Bates et al., 2015)、lmerTest (Kuznetsova et al., 2017)、Emmeans(Lenth & Piaskowski, 2025)、Writexl(Ooms, 2025)、patchwork(Pedersen, 2025)、ggplot2(Wickham, 2016)、stringr(Wickham, 2025)、tidyverse(Wickham et al., 2019)、readxl(Wickham & Bryan, 2025)、dplyr(Wickham et al., 2023)。画素間におけるデータの広がり解析するため、比例距離(PD)を算出しました。これは、中央値と12.5パーセンタイル(Q12.5)との間の相対的な距離を、中央値に対する比率として表したものです(式2):

$$PD = \frac{\text{median} - Q12.5}{\text{median}} \quad (2)$$

ベースラインとストレス測定値の差が有意であるかどうかをテストするために、線形混合効果モデルが使用されました。植物IDはランダム効果として設定され、日は固定効果として設定されました。パラメーターの値が応答変数でした。正規性をテストするためにシャピロ・ウィルクテストを使用し、サンプル間の分散が等しいかどうかをテストするためにバートレットテストを使用して、仮定は必要に応じてテストされました。

3 結果

3.1 | 暗順応下での測定タイミング

OJIPプロトコルから算出された28種類のOJIPパラメーターのうち、文献で一般的に用いられているPSIIの最大量子収率(F_v/F_m)、光照射下におけるPSII光化学反応の最大量子収率(F_q'/F_m')、吸収エネルギー基準の性能指数(PIABS)、および総合性能指数(PITOTAL)について、詳細な解析を行いました。さらに、その他の全パラメーターの中で、光化学系Iの最終電子受容体への電子伝達効率(δRO)についても詳細な解析を行いました。これは、熱ストレス開始から1日後に、ベースラインと比較して一貫かつ極めて有意な低下を示したためです。他のパラメーターでは、これと同程度の変化は認められませんでした(付録3)。

処理開始から1日後、トマトの F_v/F_m は、すべての暗順応時間において有意に増加しました(昼/夜温: $35^{\circ}\text{C}/24^{\circ}\text{C}$)。高温処理開始後の最初の3日間では、すべての暗順応時間において、基準測定日(処理前)の値と比較して約3%有意に増加しました($P < 0.05$) (図4A)。対照的に、 δRO は、処理開始1日後にはすべての測定時間において基準値より20%有意に低下しました($P < 0.05$) (図4B)。 δRO は処理開始3日後(31DAS)までに基準値の約70%まで低下し、その水準で安定しました。さらに、PITOTALは、高温処理開始から1日以内に、暗順応時間5時間および7時間の測定において12%有意に低下し、光合成能力の低下が示された($P < 0.05$) (図4D)。処理開始2日後には、暗順応時間30分の測定においても有意な低下が認められました($P < 0.05$)。PITOTALは高温処理期間中を通じて基準値より有意に低い状態が続き、処理開始3日後(31DAS)には、暗順応時間30分および5時間の測定において基準値の約65%で安定しました。PITOTALで見られた傾向とは対照的に、PIABSは、暗順応時間7時間の測定において、処理開始9日目および10日目(37DASおよび28DAS)にのみ有意な増加を示しました($P < 0.05$) (図4C)。加えて、PIABSは処理開始後最初の2日間において有意に増加し、暗順応時間30分および5時間の測定のいずれにおいても光合成能力の向上が示された($P < 0.05$) (図4C)。OJIPプロトコルから得られたすべてのパラメーターの絶対値は、付録3に記載されています。

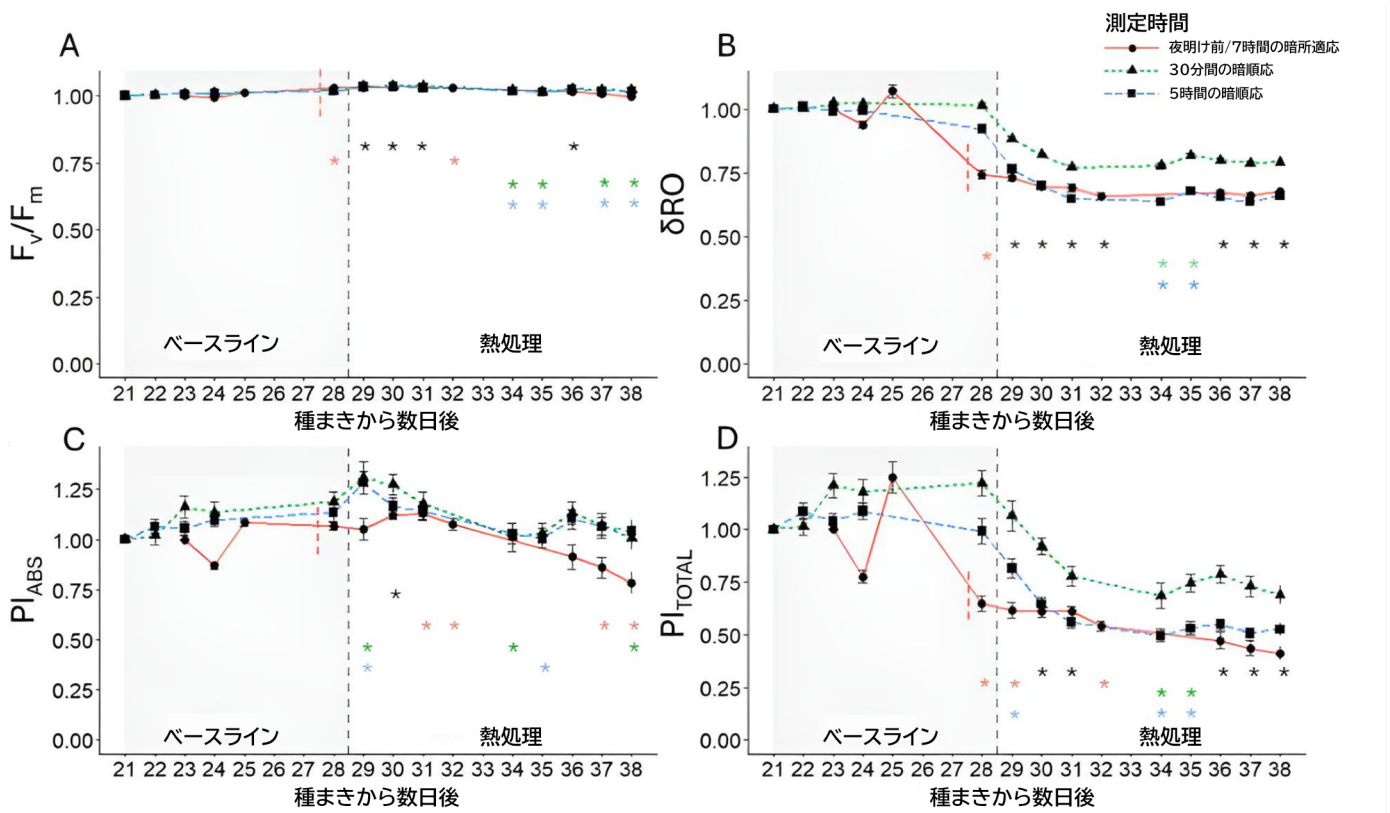


図4: トマト品種「マナーメーカー」(*Solanum lycopersicum*)において、暗期中の異なる3つの時点(暗所滞在30分後、5時間後、7時間後/夜明け前)で測定されたOJIPパラメータの正規化値。A. PSII光化学系の最大量子収率(F_v/F_m)、B. PSIの最終電子受容体への電子伝達効率(δRO)、C. 吸収ベースの性能指数(PI_{abs})、D. 総性能指数(PI_{TOTAL})。各値は、ベースライン測定を行った初日の値を基準に正規化されています。植物のクロロフィル蛍光は、数日間にわたり繰り返し測定されました。点は平均値を、エラーバーは平均標準誤差を表します(サンプル数: 暗所滞在30分後および5時間後は $n=16$ 、暗所滞在7時間後/夜明け前は $n=9$)。*印は、すべての測定時点においてベースラインとの間に有意差があったこと($P < 0.05$)を示します。色付きの*印は、当該測定項目のみがベースラインと有意に異なっていたことを示します。夜明け前の測定については、27日目以降に高温処理(昼 35°C /夜 24°C)が開始されました(赤い垂直線で表示)。その他の測定項目については、28日目以降に高温処理が開始されました(灰色の垂直線で表示)。

3.2 光測定タイミング

夜明けに測定した場合、高温処理の実施後1～5日目(播種後28～32日)において、 Fq' / Fm' は5%有意に増加しました($P < 0.05$) (図5A)。日没時に測定した場合、高温処理後1日目には Fq' / Fm' が有意に低下しましたが、それ以降の測定の多くでは、ベースラインの測定値と同等の値を示しました(図5A)。

画像を精査したところ、熱処理後に Fq' / Fm' 値が低い領域(図5B、濃いオレンジ色の領域)(付録4)が存在し、損傷が生じていることが明らかになりました。この結果を受け、植物のキャノピー内における Fq' / Fm' 値の空間分布を詳細に検討することにしました。熱処理が平均値に及ぼした影響は比較的小さかったものの、画像全体における Fq' / Fm' 値の分布を示すヒストグラムでは、左への歪み(left skewedness)の増大が認められました。これは、 Fq' / Fm' 値が低い画素の割合が増加したことを反映しています(図5B、5C、5E)。画素分布における歪みの変化を定量化するため、 Fq' / Fm' 値の中央値と12.5パーセンタイル値(Q12.5)との間の距離を比較しました。ここで、中央値とQ12.5は、それぞれ全画素の50%および12.5%がそれ以下の値となる Fq' / Fm' 値を表します。これら2つの値の間の距離が大きいほど、 Fq' / Fm' 値が低い画素の割合が高いことを示します。日没時に測定を行った植物では、Q12.5と中央値との距離は、処理開始から1日後に0.077から0.157へと増大しました($P < 0.05$) (図5D)。一方、夜明け時に測定を行った植物では、Q12.5と中央値との距離は、処理開始から3日後に有意な増大を示しました(図5F)。

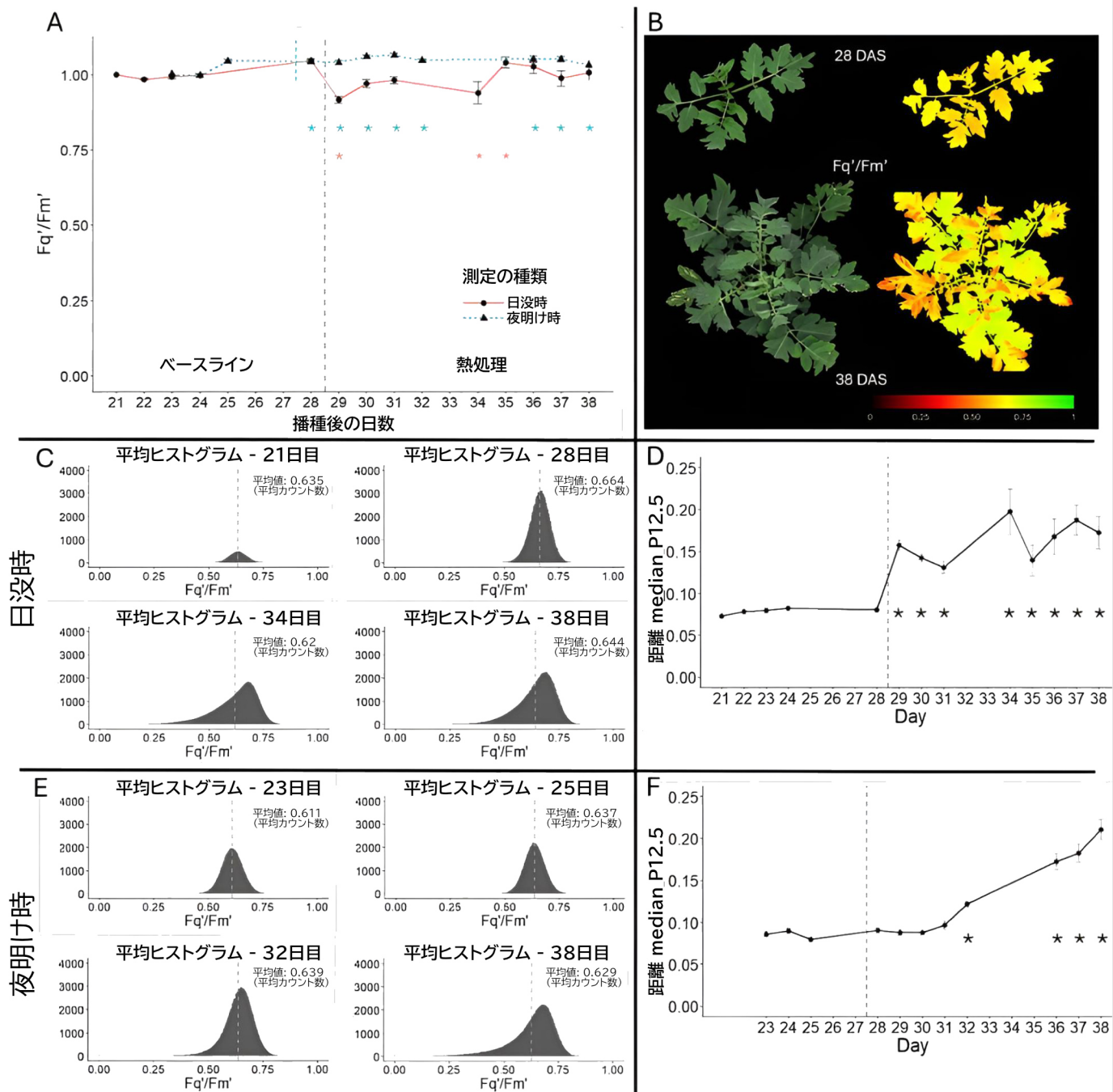


図5: トマト品種で測定された光におけるPSII効率の正規化値(Fq'/Fm')夜明けと一日の終わりのマナーメーカー(*Solanum lycopersicum*) (A)、一日の終わりに測定された Fq'/Fm' 画像 (B)、一日の終わり(C)と夜明け(E)の Fq'/Fm' 測定のピクセルの広がり平均ヒストグラム、および一日の終わり(D)と夜明けの測定のヒストグラムの中央値から12四分位までの比例距離(F)。植物のクロロフィル蛍光を数日間にわたって繰り返し測定しました。 Fq'/Fm' の値は、ベースライン測定の初日に基づいて正規化されました。点は平均値を表し、エラーバーは平均値の標準誤差を表します(一日の終わりには $n=16$ 、夜明けには $n=9$)。色付きの * は、それぞれの測定時間がベースラインと有意に異なっていたことを示します ($P < 0.05$)。夜明けの測定では、青の垂直線で示されているように、27日目以降に熱処理(昼は35°C、夜は24°C)が開始されました。一日の終わりの測定では、灰色の縦線で示されているように、28日目以降に熱処理が開始されました。中央値からQ12.5までの比例距離は、式2を使用して計算されました。

3.3 色彩測定との比較

色モデルであるHUE(色相)の測定結果から、熱処理にもかかわらず植物は有意に緑色が強くなったことが示されました。具体的には、基準時点での平均値106から、処理開始後1～3日目(播種後29～32日)には平均値111へと有意に増加しました($P < 0.05$)(図6AC)。植物の健全性を示す反射率ベースの指標であるNDVIは、熱処理開始から2日目(播種後30日)に0.427から0.474へと基準値より有意に高くなり(図6BD)、植物の健全性が向上したことが示されました。HUEおよびNDVIの全測定値のばらつきについては、付録5に記載されています。

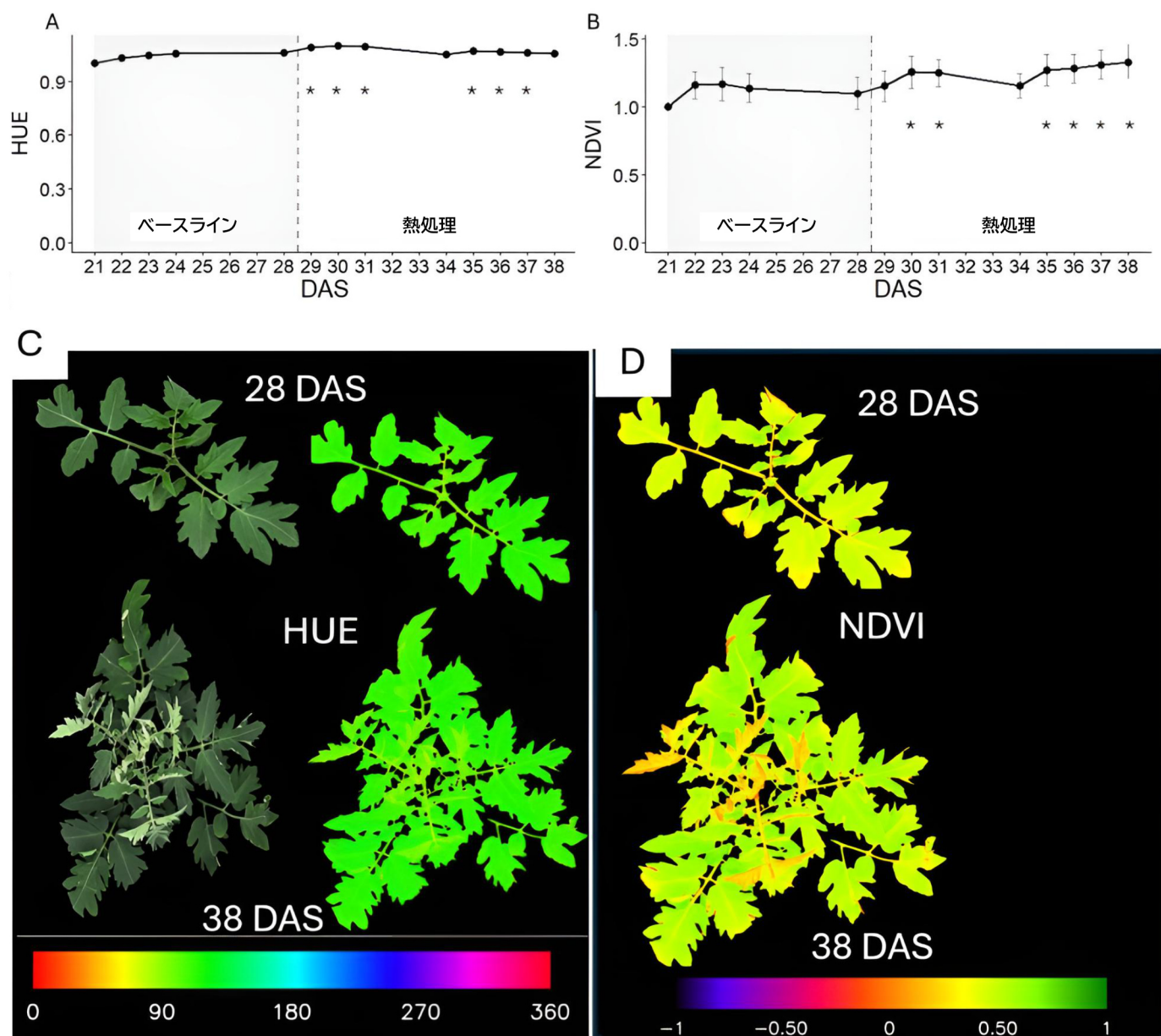


図6:熱処理前後における色および反射率の測定結果(トマト品種マナーメーカー *Solanum lycopersicum*)。パネルA:HUE(色相)、B:NDVI、C:播種後28日および38日目のHUE画像、D:播種後28日および38日目のNDVI画像。植物の色および反射率は、播種後21日から38日にわたり複数回測定されました。各点は平均値を、エラーバーは平均の標準誤差($n=16$)を示します。*は、測定値がベースライン(基準値)と有意に異なること($P < 0.05$)を示します。熱処理(昼35℃/夜24℃)は播種後28日目から開始されました(垂直の破線で表示)。

4 考察

本研究の主な目的は、熱ストレスの早期検出において、画像計測に基づく過渡的OJIP曲線の測定が、カラー画像やマルチスペクトル画像による測定よりも優位性を持つかどうかを明らかにすることでした。これらの測定手法を比較するため、トマトの個体に対する熱ストレスの影響を調べる事例研究を実施しました。さらに、クロロフィル蛍光測定によってストレスを最適に検出するためには、どのタイミングで測定を行い、どのパラメーターを解析すべきかを特定する必要もありました。本研究の結果は、OJIPプロトコルに基づく画像ベースのクロロフィル蛍光パラメーターが、熱ストレスの早期検出において信頼できるツールとなり得ることを示す概念実証(PoC)としての役割を果たすものです。クロロフィル蛍光測定にあたっては、「PlantExplorer Field」に、より高速(333 fps)なカメラを初めて搭載しました。このシステムを用いて、過渡的OJIP曲線に関する高品質な植物画像を撮影・計測しましたが、これは新規性の高い試みです。これらの画像に基づき、OJIP曲線に関連する28種類のパラメーターを算出しました。

PITOTALはストレス検出において最も信頼できるパラメーターです

一般的なクロロフィル蛍光パラメーターであるFv/Fmは、熱処理を行うと概して上昇しました(図4、付録4)。これは、Fv/Fmの低下がストレスの指標とされる既存の知見(Samat et al., 2025; Zhou et al., 2015, 2017)とは対照的です。しかしながら、他のOJIP関連パラメーターは、温度評価においてFv/Fmよりも高い感度を示すことが知られています(Zushi et al., 2012)。本研究において、これらOJIPパラメーターのうち最も興味深い結果を示したのは δRO とPITOTALでした。測定前の暗順応時間にかかわらず、これら2つのパラメーターの測定値は、他の算出パラメーターよりも大きな幅で減少したためです(図4、付録3)。対照的に、PITOTALと同様の指標であり、文献上ではストレスの発生を検出する上で感度が高く信頼できるパラメーターとされるPIABS(Ceusters et al., 2019)は、それほど明確な傾向を示しませんでした(図4C)。この違いは、PITOTALの算出式にはPSI(光化学系I)の最終電子受容体への電子伝達効率に関連する δRO が含まれているのに対し、PIABSの算出式には含まれていないという事実によって説明できます(表1)。このことは、 δRO の減少と併せて、熱が電子伝達鎖のこの最終段階に特異的に影響を及ぼしていることを示唆しています(Strasser et al., 2004; Tsimilli-Michael, 2020)。 δRO については熱に応答して増加する場合も減少する場合も報告されているため(Arslan, 2023; Zhang et al., 2017)、これらの結果は既存の知見と部分的にしか一致していません。さらに、文献によれば、PIABSとPITOTALはいずれも熱ストレスに応答して減少するとされています(Arslan, 2023; Zhang et al., 2017)。加えて、文献における知見の不一致も、 δRO を熱ストレスの指標として用いる際の信頼性を低下させています。以上の理由から、一貫した明確な応答を示すPITOTALこそが、熱ストレス検出において最も信頼できるパラメーターであると言えます。さらに、PITOTALは光合成鎖の複数の構成要素を組み合わせているため、より堅牢な指標と言えます。異なる種類のストレスは光合成鎖の異なる部位に影響を及ぼすことから、この特性は本指標の有用性を高めるものとなっています(Khatri & Rathore, 2019; Wang et al., 2018; Zhang & Sharkey, 2009)。

暗所での測定タイミングは検出速度に影響しません

前述の通り、測定を行う時間帯は、トマトにおける熱ストレスの検出速度に有意な影響を及ぼしませんでした(図4および5)。一般的に、夜間に光阻害から回復する時間が確保されるため、光合成能は午前中の方が高いと予想されます(Kalaji et al., 2017)。しかし、先行研究によれば、熱がこの回復を制限する可能性が示唆されています。これは、光と熱処理が組み合わさることで、明期に活性酸素種(ROS)が蓄積する可能性があるためです(Didaran et al., 2024; Samat et al., 2025)。中程度の熱ストレス下では、蓄積したROSが光化学系II(PSII)の修復系に作用します(Allakhverdiev et al., 2008)。その結果、修復が阻害されたことで、測定時間帯による有意差が生じなかった可能性があります。このことは、当該の影響が熱ストレスに特有のものである可能性を示唆しています。したがって、他のストレスの影響を測定する際には、測定時間帯の影響について改めて評価することが推奨されます。

画像解析と空間的不均一性

PITOTALや δRO とは対照的に、 Fq' / Fm' の測定値では、その平均値において明確な減少傾向は認められませんでした(図5A)。しかし、画像データのヒストグラムを観察すると、熱処理を行った場合には、画像内における Fq' / Fm' の高値および低値の頻度が増加していることが明らかになりました(図5B~5D)。その結果、中央値とQ12.5(下位12.5%値)との間の差が拡大し、トマトの個体に対する熱の影響が示されました。この影響は、日中のストレス蓄積(Didaran et al., 2024; Samat et al., 2025)に起因すると考えられますが、日没時に測定を行った場合、より短時間で確認されました(図5D~F)。画像全体を用いた解析に基づくこれらの結果は、現在のOJIP測定の標準である「葉の特定の一点での測定」ではなく、画像解析装置を利用することの大きな利点と強みを浮き彫りにしています。すなわち、特定の点に注目するのではなく、キャノピー(植物群落)全体にわたる状況を包括的に把握できるという点です。熱ストレスの影響を受けた葉の種類や生育段階については、視覚的に明確なパターンは認められませんでした。これは、熱ストレス条件下では一般的に古い葉の方が大きな損傷を受けやすいとする既存の知見(Arslan, 2023)とは対照的な結果です。

色に関する測定では熱ストレスは検出されませんでした

特定のクロロフィル蛍光パラメーターとは対照的に、平均HUE(色相)およびNDVI(正規化差植生指数)は、熱処理開始後10日間の熱ストレスに対して明確な減少傾向を示しませんでした(図6)。HUEの平均値は、熱処理によって緑色度が増加したことを示しました。これは、熱が通常、葉の黄変を引き起こすという既往の知見(Arslan, 2023; Moyankova et al., 2026)とは対照的です。また、NDVIの増加も既往の知見とは逆の結果です。なぜなら、NDVIはストレスに反応して低下すると報告されているからです(Merrick et al., 2022; Moyankova et al., 2026)。さらに、Merrickら(2022)の研究では、反射率に基づく測定よりもクロロフィル蛍光に基づく測定の方が、より短時間でストレスを検出できると報告されています。これは我々の知見や現場からの報告と一致しており、植物フェノタイピングの環境下では、RGBやマルチスペクトル画像による熱ストレスの検出に2~3週間を要するとされています(W. Dijskma、私信、2026)。この期間中、葉の捲れ(カール)により、NDVIデータのばらつきにわずかな変化が生じました(付録5)。熱によって若い葉が捲れると、上方に設置されたカメラから葉の裏面(背軸側)が見えるようになったためです(Liu et al., 2023)。葉の裏面は、表面(向軸側)と比較して色が薄く、反射特性も異なります。その結果、該当箇所における反射率の値が大きく変化し、データの平均値やばらつきに影響が及びました。このように、近接する捲れていない葉の色には変化がなかったにもかかわらず(付録4)、色やNDVIの値には影響が生じました。このことは、色やマルチスペクトル測定に基づく迅速かつ正確な解析を行う上で、課題となる可能性があります。

推奨事項

今後のプロジェクトでは、熱ストレスに対する耐性の程度が異なる幅広い品種を検討することが推奨されます。もし品種間でストレスに対するPITOTALの応答にも差異が見られる場合、本研究で述べたプロトコルは表現型解析の手順として適しています。先行研究により、暗順応させた試料に対するクロロフィル蛍光測定(OJIPプロトコルに基づくポイント測定)を用いてストレス耐性の変異を定量化し、その情報を植物の選抜に活用できることが実証されています(Arslan, 2023; Stefanov et al., 2011; Zhou et al., 2015)。

さらに、詳細な空間画像解析を行うことで、特定の葉位や葉齢の葉が他の葉よりも強く熱の影響を受けているかどうかを調べ、植物に対する熱ストレスの影響についてより深い情報を得ることが可能になります。 F_q'/F_m' に加え、今後の研究で他のパラメーターにも同様の解析を適用すれば、興味深い結果が得られる可能性があります。第一に、すでに熱に対して敏感な反応を示すパラメーター(PITOTALや δRO)について、植物のどの部位が最も短時間で影響を受けるのか、あるいはすべての葉が同時に影響を受けるのかを明らかにできるでしょう。第二に、熱処理によって平均値には有意な変化が見られなかった他のパラメーターについても、より詳細な解析が可能になります。これらについても、 F_q'/F_m' と同様のパターン、すなわち平均値には負の影響が及ばないものの、データのばらつきには影響が見られるといった結果が示されるかもしれません。

最後に、熱ストレスを負荷せず、かつ同等の生育段階にある植物を用いて同様の測定を行う「真の対照区(コントロール)」を設けることが推奨されます。本研究では、植物の育成に使用できる人工気象器が1台に限られていた点が、採用した手法の弱点となっていました。そのため、ストレスを負荷した植物の測定値は、負荷前に記録された基準値(ベースライン)との比較しか行えませんでした。真の対照区を設けて測定を行えば、熱ストレス負荷後のパラメーター変化が単なる植物の成長によるものではないことを確認できたはずです。もっとも、対照区においてPITOTALや F_v/F_m が安定して推移することは既に示されているため(Arslan, 2023; Zhang et al., 2017)、今回の変化が成長に起因するものである可能性は極めて低いと考えられます。

結論

適切なパラメーターを解析対象とした場合、OJIP過渡現象の測定により、トマトに対する熱ストレスの影響を2日以内に検出することができました。さらに、熱ストレスを検出するまでの時間は、暗順応の期間(30分、5時間、または7時間)にほとんど依存しませんでした。光照射下での測定においては、データの空間的不均一性を解析した場合にのみ、熱ストレスの検出が可能でした。また、熱ストレスの検出に要する時間は、測定時刻にも依存しませんでした。総じて、本研究により、OJIPプロトコルに基づくクロロフィル蛍光パラメーターが、熱ストレスの早期検出において強力なツールであることが実証されました。

謝辞

インターンシップ期間中、私と本プロジェクトを綿密に指導・支援してくださったPriscilla Malcolm氏とDiede Dejager氏に心より感謝申し上げます。また、質問への回答や必要な場面での協力など、多岐にわたるサポートをしてくださったJorick de Wit氏、Vincent Jalink氏、Wilko Dijksma氏、Rob van der Schoor氏、Kiran Jayaraj氏にも深く感謝いたします。最後に、インターンシップの指導および継続的なフィードバックをいただいたKatarína Smoleňová氏に御礼申し上げます。

利益相反に関する声明

本研究はPhenoVation B.V.にて実施・支援されました。データの収集および処理は、偏りなく行われました。

AIに関する記述

RStudioにおけるデータ処理および解析コードの修正案を検討する際、人工知能(AI)モデルを使用しました。また、文献調査の一部において、Consensus (consensus.app) および Perplexity (perplexity.ai) を利用しました。AIツールから得られた情報については、必ず引用元の学術論文を読み、内容を確認しました。さらに、文章のスペルや文法の正確性を確認するために、Grammarly (Grammarly.com) や ChatGPT (chat.openai.com) を使用することもありました。

参考文献

- Allakhverdiev, S. I., Kreslavski, V. D., Klimov, V. V., Los, D. A., Carpentier, R., & Mohanty, P. (2008). Heat stress: An overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 98(1), 541–550.
<https://doi.org/10.1007/s11120-008-9331-0>
- Alonso, L., Van Wittenberghe, S., Amorós-López, J., Vila-Francés, J., Gómez-Chova, L., & Moreno, J. (2017). Diurnal Cycle Relationships between Passive Fluorescence, PRI and NPQ of Vegetation in a Controlled Stress Experiment. *Remote Sensing*, 9(8), 770.
<https://doi.org/10.3390/rs9080770>
- Arslan, Ö. (2023). The Role of Heat Acclimation in Thermotolerance of Chickpea Cultivars: Changes in Photochemical and Biochemical Responses. *Life*, 13(1), 233.
<https://doi.org/10.3390/life13010233>
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 89–113.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1–48.
<https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Berry, J., & Bjorkman, O. (1980). Photosynthetic Response and Adaptation to Temperature in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 31(1), 491–543.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.31.060180.002423>
- Bjerring Jensen, N., Vrobel, O., Akula Nageshbabu, N., De Diego, N., Tarkowski, P., Ottosen, C.-O., & Zhou, R. (2024). Stomatal effects and ABA metabolism mediate differential regulation of leaf and flower cooling in tomato cultivars exposed to heat and drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 75(7), 2156–2175.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erad498>
- Ceusters, N., Valcke, R., Frans, M., Claes, J. E., Van den Ende, W., & Ceusters, J. (2019). Performance Index and PSII Connectivity Under Drought and Contrasting Light Regimes in the CAM Orchid *Phalaenopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1012.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01012>
- Dejager, D. (2026, May 7). Phenovation | Camera technology. Phenovation.
<https://www.phenovation.com/camera-technology>
- Didaran, F., Kordrostami, M., Ghasemi-Soloklui, A. A., Pashkovskiy, P., Kreslavski, V., Kuznetsov, V., & Allakhverdiev, S. I. (2024). The mechanisms of photoinhibition and repair in plants under high light conditions and interplay with abiotic stressors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 259, 113004.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2024.113004>
- Kalaji, H. M., Schansker, G., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Ferroni, L., Goltsev, V., Guidi, L., Jajoo, A., Li, P., Losciale, P., Mishra, V. K., Misra, A. N., Nebauer, S. G., Pancaldi, S., Penella, C., Pollastrini, M., Suresh, K., Tambussi, E., ... Ḃaba, W. (2017). Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynthesis Research*, 132(1), 13–66.
<https://doi.org/10.1007/s11120-016-0318-y>
- Khan, I., Sohail, Zaman, S., Li, G., & Fu, M. (2025). Adaptive responses of plants to light stress: Mechanisms of photoprotection and acclimation. A review. *Frontiers in Plant Science*, 16.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1550125>

- Khatri, K., & Rathore, M. S. (2019). Photosystem photochemistry, prompt and delayed fluorescence, photosynthetic responses and electron flow in tobacco under drought and salt stress. *Photosynthetica*, 57(1), 61–74.
<https://doi.org/10.32615/ps.2019.028>
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Christensen, R. H. B. (2017). lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *Journal of Statistical Software*, 82(13), 1–26.
<https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>
- Lenth, R. V., & Piaskowski, J. (2025). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.emmeans>
- Li, Y.-T., Xu, W.-W., Ren, B.-Z., Zhao, B., Zhang, J., Liu, P., & Zhang, Z.-S. (2020). High temperature reduces photosynthesis in maize leaves by damaging chloroplast ultrastructure and photosystem II. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 206(5), 548–564.
<https://doi.org/10.1111/jac.12401>
- Liu, B., Song, L., Deng, X., Lu, Y., Lieberman-Lazarovich, M., Shabala, S., & Ouyang, B. (2023). Tomato heat tolerance: Progress and prospects. *Scientia Horticulturae*, 322, 112435.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112435>
- Merrick, T., Bennartz, R., Jorge, M. L. S. P., Pau, S., & Rausch, J. (2022). Evaluation of Plant Stress Monitoring Capabilities Using a Portable Spectrometer and Blue-Red Grow Light. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 22(9), 3411.
<https://doi.org/10.3390/s22093411>
- Moustaka, J., & Moustakas, M. (2023). Early-Stage Detection of Biotic and Abiotic Stress on Plants by Chlorophyll Fluorescence Imaging Analysis. *Biosensors*, 13(8), 796.
<https://doi.org/10.3390/bios13080796>
- Moyankova, D., Stoykova, P., Petrova, A., Christov, N. K., Veleva, P., Savova, G., & Atanassova, S. (2026). Non-Destructive Detection of Heat Stress in Tobacco Plants Using Visible-Near-Infrared Spectroscopy and Aquaphotomics Approach. *AgriEngineering*, 8(1).
<https://doi.org/10.3390/agriengineering8010033>
- Murchie, E. H., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 3983–3998.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Ooms, J. (2025). writexl: Export Data Frames to Excel “xlsx” Format.
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.writexl>
- Pedersen, T. L. (2025). patchwork: The Composer of Plots.
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.patchwork>
- Samat, A. T., Soltabayeva, A., Bekturova, A., Zhanassova, K., Auganova, D., Masalimov, Z., Srivastava, S., Satkanov, M., & Kurmanbayeva, A. (2025). Plant responses to heat stress and advances in mitigation strategies. *Frontiers in Plant Science*, 16.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1638213>
- Stefanov, D., Petkova, V., & Denev, I. D. (2011). Screening for heat tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines and cultivars using JIP-test. *Scientia Horticulturae*, 128(1), 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.12.003>
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., & Srivastava, A. (2004). Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. In G. C. Papageorgiou & Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* (pp. 321–362). Springer Netherlands.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12

- Strasser, R., Srivastava, A., & Tsimilli-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*.
- Tsimilli-Michael, M. (2020). Revisiting JIP-test: An educative review on concepts, assumptions, approximations, definitions and terminology. *Photosynthetica*, 58(SPECIAL ISSUE), 275–292.
<https://doi.org/10.32615/ps.2019.150>
- Wang, Z., Li, G., Sun, H., Ma, L., Guo, Y., Zhao, Z., Gao, H., & Mei, L. (2018). Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biology Open*, bio.035279.
<https://doi.org/10.1242/bio.035279>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
<https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wickham, H. (2025). *stringr: Simple, Consistent Wrappers for Common String Operations*.
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.stringr>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L. D., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T. L., Miller, E., Bache, S. M., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D. P., Spinu, V., Yutani, H. (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686.
<https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wickham, H., & Bryan, J. (2025). *readxl: Read Excel Files*.
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.readxl>
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., & Vaughan, D. (2023). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*.
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.dplyr>
- Zhang, L., Hu, T., Amombo, E., Wang, G., Xie, Y., & Fu, J. (2017). The Alleviation of Heat Damage to Photosystem II and Enzymatic Antioxidants by Exogenous Spermidine in Tall Fescue. *Frontiers in Plant Science*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01747>
- Zhang, R., & Sharkey, T. D. (2009). Photosynthetic electron transport and proton flux under moderate heat stress. *Photosynthesis Research*, 100(1), 29–43.
<https://doi.org/10.1007/s11120-009-9420-8>
- Zhou, R., Kjær, K. H., Rosenqvist, E., Yu, X., Wu, Z., & Ottosen, C.-O. (2017). Physiological Response to Heat Stress During Seedling and Anthesis Stage in Tomato Genotypes Differing in Heat Tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 203(1), 68–80.
<https://doi.org/10.1111/jac.12166>
- Zhou, R., Yu, X., Kjær, K. H., Rosenqvist, E., Ottosen, C.-O., & Wu, Z. (2015). Screening and validation of tomato genotypes under heat stress using Fv/Fm to reveal the physiological mechanism of heat tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 118, 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.006>
- Zushi, K., Kajiwar, S., & Matsuzoe, N. (2012). Chlorophyll a fluorescence OJIP transient as a tool to characterize and evaluate response to heat and chilling stress in tomato leaf and fruit. *Scientia Horticulturae*, 148, 39–46.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.022>

付録

付録 1: 植物成長中の相対湿度のグラフ

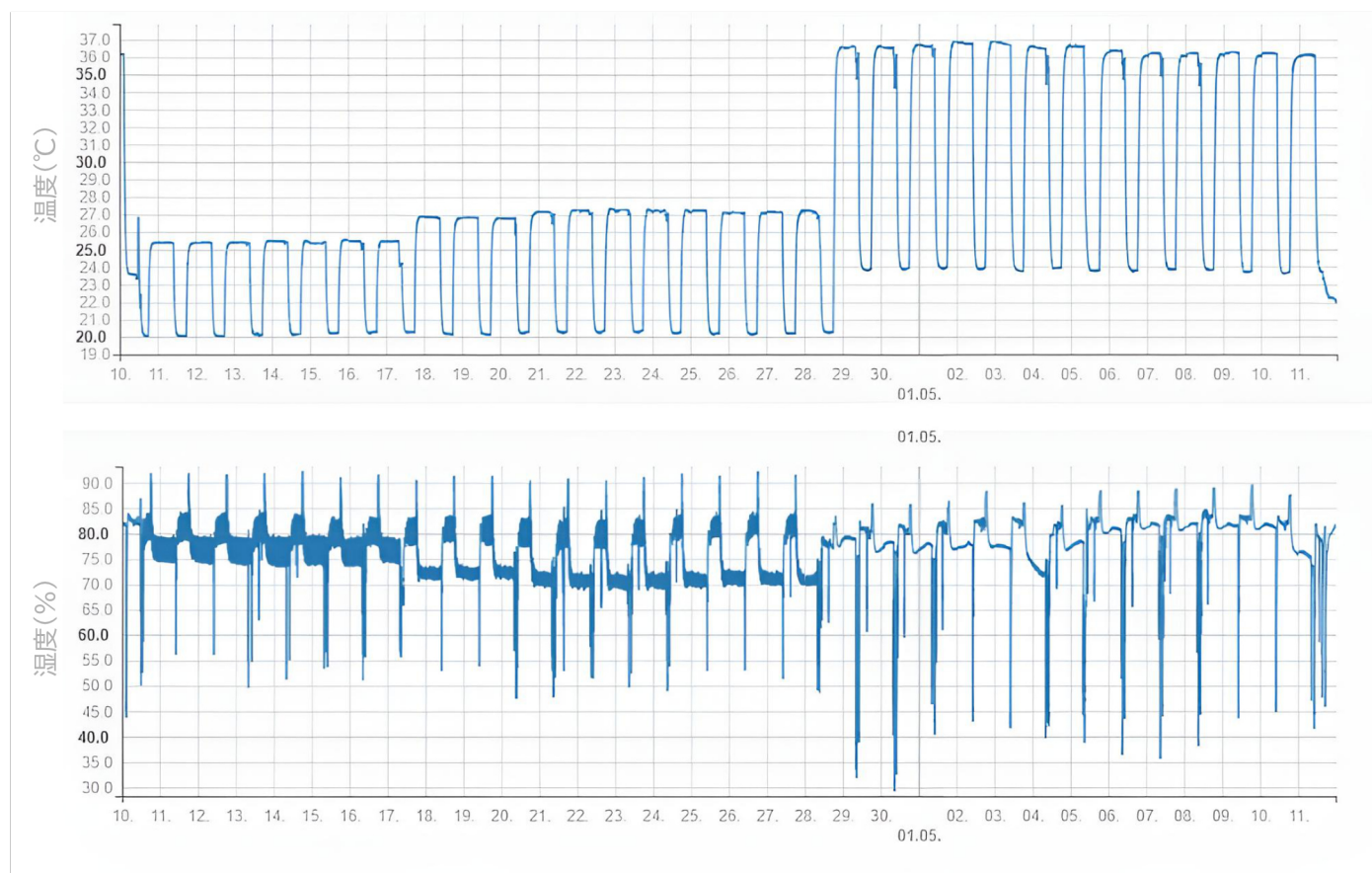


図 A1: Aranet 02DD8 T/RH IP67 センサー (SAF Tehnika JSC、ラトビア) によって測定された植物成長中の相対湿度。

付録 2: 計算されたすべての OJIP パラメーターの完全な表

表 A1: OJIP プロトコルから計算または測定されたパラメーターの完全なリストと、PhenoVation の記載された標準に従って説明および式が記載されています。Arslan (2023)、Strasser et al. (2004)、および Tsimilli-Michael (2020) に基づいています。

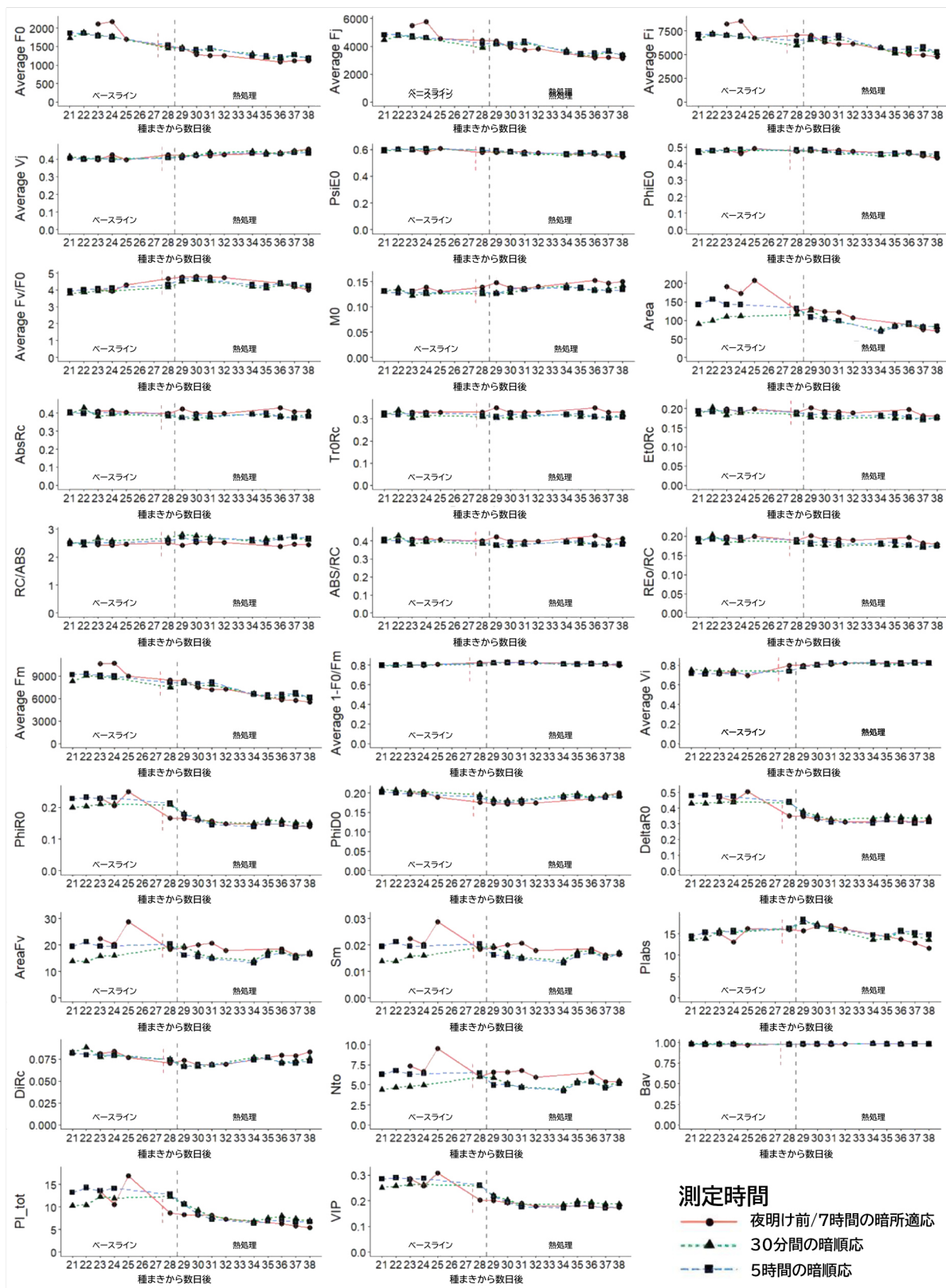
記号	式	説明
F_0		暗順応させた試料において、電子伝達を誘起するには不十分だが、最小蛍光を誘起するには十分な光強度で測定される、クロロフィル蛍光の最小値
F_j		Jプラトー(3ms)における蛍光収率
F_i		Iプラトー(33ms)における蛍光収率
F_m		暗順応させた試料に飽和パルス照射して測定される、蛍光の最大値
F_v/F_m	$\frac{F_m - F_0}{F_m}$	PSII光化学反応の最大量子効率
PI_{ABS}	$\frac{\gamma RC}{1 - \gamma RC} * \frac{\phi P_0}{1 - \phi P_0} * \frac{\psi E_0}{1 - \psi E_0}$	反応中心の活性、エネルギー変換効率、および最初の電子受容体への電子伝達を反映する、複数の過程を統合した指標
PI_{TOTAL}	$\frac{\gamma RC}{1 - \gamma RC} * \frac{\phi P_0}{1 - \phi P_0} * \frac{\psi E_0}{1 - \psi E_0} * \frac{\delta R_0}{1 - \delta R_0}$	反応中心の活性、エネルギー変換効率、およびPSIの最終電子受容体への電子伝達を反映する指標
V_i	$\frac{F_i - F_0}{F_m - F_0}$	最大可変蛍光に対する比率として算出された、Iプラトーにおける相対可変蛍光
V_j	$\frac{F_j - F_0}{F_m - F_0}$	最大可変蛍光に対する比率として算出された、Jプラトーにおける相対可変蛍光
Mo	$\frac{(\frac{\Delta F}{\Delta t_0})}{F_m - F_0}$	OJIP曲線の初期の傾き。QA終了率を示す
Area		OJIP曲線より上の F_m までの領域。総電子輸送能力を表す
Area/ F_v OR Sm	$\frac{Area}{F_m - F_0}$	OJIP曲線より上側の正規化総面積。蛍光上昇過程で生じる還元サイクルの数を示す指標であり、反応中心あたりの電子伝達体数に比例する
Abs/RC	$\frac{(\frac{M_0}{V_j})}{[1 - (\frac{F_0}{F_m})]}$	反応中心あたりの吸収フラックス。活性型PSIIのアンテナサイズに関連する
DIO/RC	$\frac{Abs}{RC} - \frac{Tr_0}{RC}$ or $(\frac{(\frac{M_0}{V_j})}{[1 - (\frac{F_0}{F_m})]}) - (\frac{M_0}{V_j})$	反応中心あたりの散逸エネルギーフラックス
REO/RC	$(\frac{M_0}{V_j}) * (1 - V_j)$	PSIの末端受容体の電子還元フラックス

著者: アルイエン・テゲルス
 ファイル: クロロフィル蛍光イメージングを用いたトマトの熱ストレスの早期検出
 所有者: PhenoVation B.V., アグロビジネスパーク65A, 6708PV ワーヘニンゲン, オランダ

役職: インターン
 日付: 2026年8月3日
 文書バージョン: 1

ETO/RC	$(\frac{M_0}{V_J}) * (1 - V_J)$	反応中心ごとの電子輸送束(QAからQBおよびPQ プールまで)
TRO/RC	$\frac{M_0}{V_J}$	反応中心あたりのQA還元フラックス(トラップ)
ϕ_{EO}	$[1 - (\frac{F_0}{F_M})] * (1 - V_J)$	電子輸送の量子収率(QAからQBおよびPQ プールへ)。吸収された光子がQAを超えて電子輸送を引き起こす確率
ϕ_{RO}	$[1 - (\frac{F_0}{F_M})] * (1 - V_I)$	PSIでの末端電子受容体の還元の量子収率。吸収された光子によって PSI エンドアクセプターが減少する確率
δ_{RO}	$\frac{1 - V_I}{1 - V_J}$	PSIの末端電子受容体への電子輸送効率
ψ_{EO}	$1 - V_J$	QAを超えて(QBおよびPQプールに) 輸送される電子の効率
γ_{RC}	$\frac{RC}{(ABS+RC)}$	PSII Chl a 分子が反応中心として機能する確率。活性PSII反応中心の密度を反映します
ϕ_{D0}	$1 - (\frac{F_m - F_0}{F_m})$	時間ゼロにおける非光化学エネルギー散逸の量子収量。吸収された光子のエネルギーが熱として放散される確率
F_V/F_0		PSII の最大一次光化学収量の指標。ドナー側(水分解複合体)の効率に影響されやすい。
Nto	$S_M * \frac{M_0}{V_J}$	Fmまでの反応センターごとのQA削減数。OJIP曲線の上昇時のPSII電子受容体のターンオーバーサイクルを反映します

付録3:すべての暗順応時間におけるOJIPプロトコル由来の全測定パラメーター



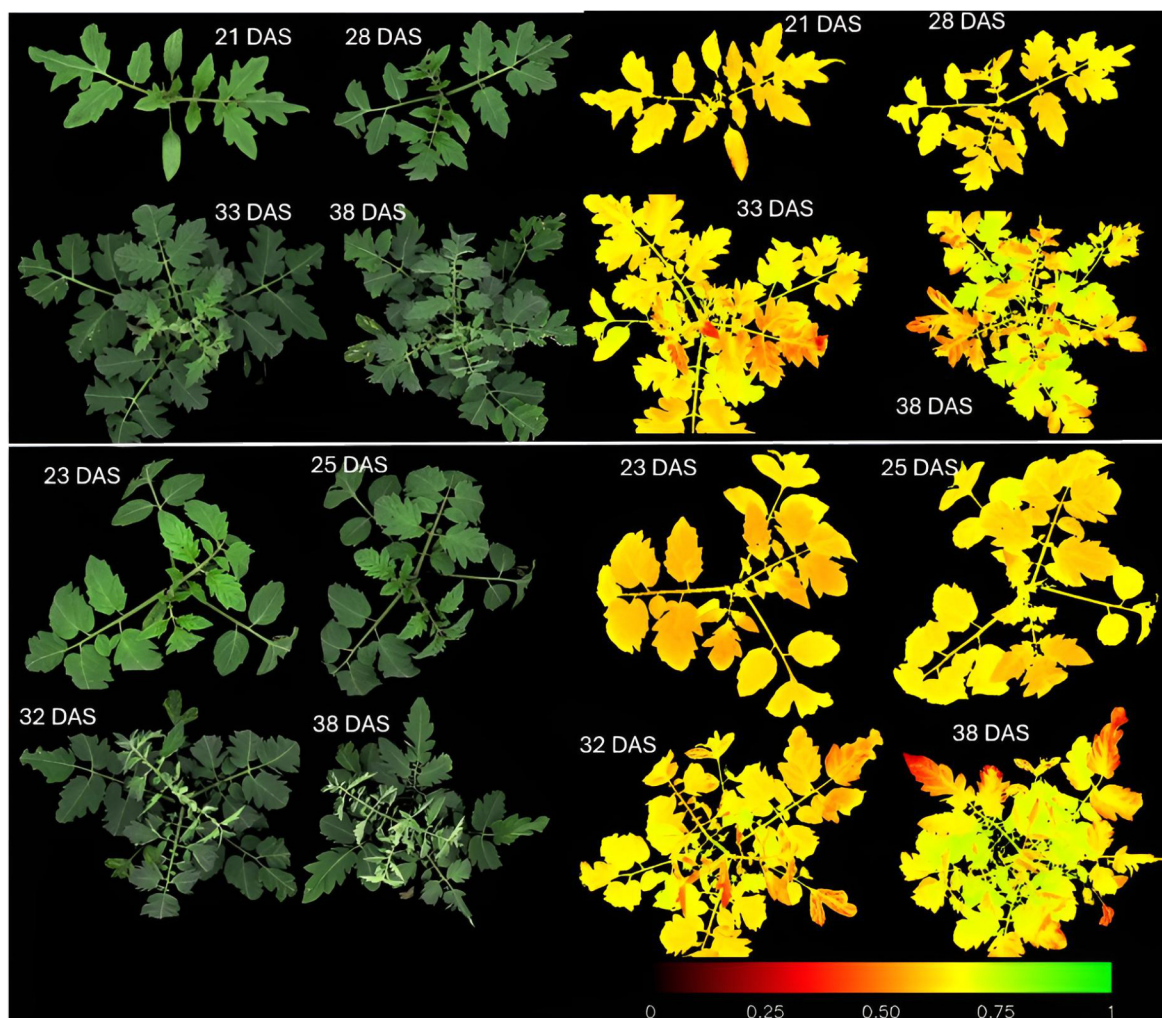
図A2: Moneymaker トマト (*Solanum lycopersicum*) において、1日のうち異なる3つの時間帯に測定された各パラメーター(平均F0、平均Fj、平均Fi、平均Fm、平均1-F0/Fm、平均Vi、平均Vj、PsiE0、PhiE0、PhiR0、PhiD0、DeltaR0、平均Fv/F0、M0、Area、AreaFv、Sm、PIabs、AbsRc、Tr0Rc、Et0Rc、DiRc、Nto、Bav、RC/ABS、ABS/RC、REo/RC、PI tot、VIP)の平均値。植物のクロロフィル蛍光は、数日間にわたり繰り返し測定されました。点は平均値を、エラーバーは平均の標準誤差(n=16、ただし「夜明け前」はn=9)を示します。夜明け前の測定については、27日目以降に熱処理(昼35°C/夜24°C)が開始されました(赤い垂直線で表示)。その他の測定については、28日目以降に熱処理が開始されました(灰色の垂直線で表示)。すべてのパラメーターの計算式は表2に記載されています。

著者: アルエン・テグルス
 ファイル: クロロフィル蛍光イメージングを用いたトマトの熱ストレスの早期検出
 所有者: PhenoVation B.V., アグロビジネスパーク65A, 6708PV ワーヘニンゲン, オランダ

役職: インターン
 日付: 2026年8月3日
 文書バージョン: 1

一日の終わりの測定

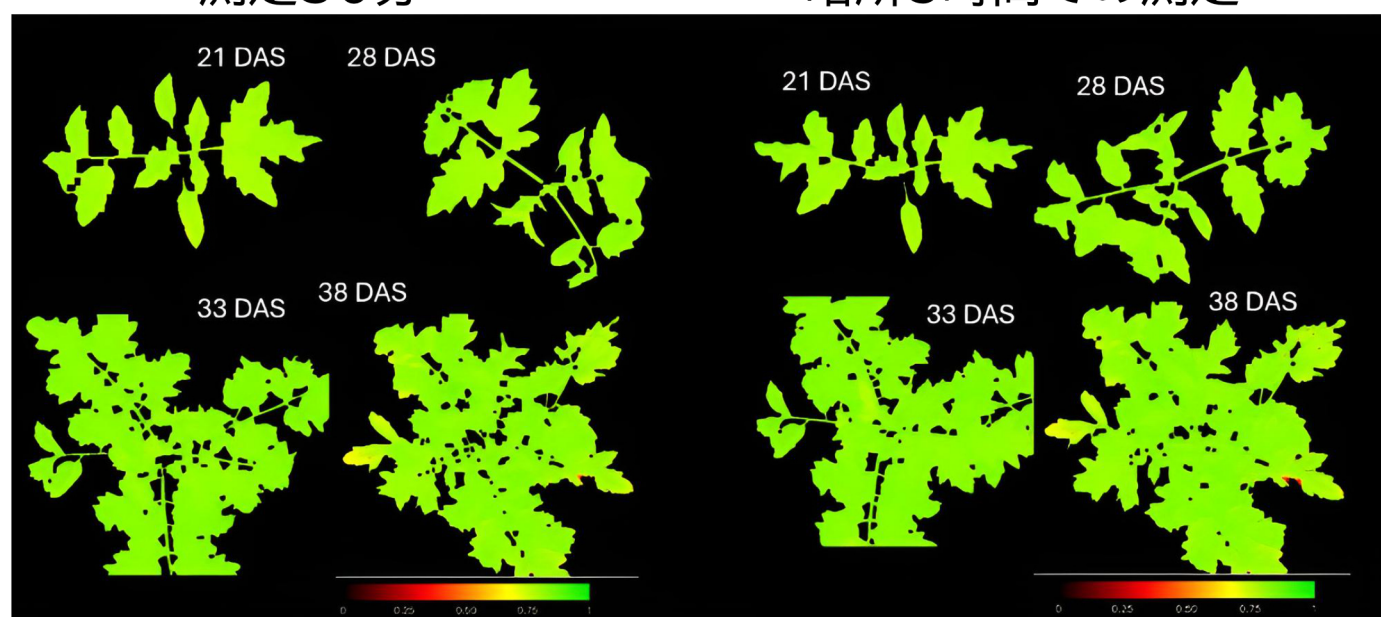
明け方の測定



図A3:夜明けおよび日没時に測定された植物の Fq'/Fm' に関する追加画像。画像内の濃いオレンジ色の部分は、値が低いことを示しています。日没時の測定については播種後28日目(DAS)に、夜明け時の測定については播種後27日目に、それぞれ熱ストレス処理を行いました。

測定30分

暗所5時間での測定



著者: アルイエン・テゲルス
 ファイル: クロロフィル蛍光イメージングを用いたトマトの熱ストレスの早期検出
 所有者: PhenoVation B.V., アグロビジネスパーク65A, 6708PV ワーヘニンゲン, オランダ

役職: インターン
 日付: 2026年8月3日
 文書バージョン: 1

図 A4: 暗闇の中で30分と5時間測定した植物のFv/Fmの追加写真。画像内の濃いオレンジ色のスポットは、値が低いことを示します。播種後28日後に熱ストレスを与えました(DAS)。

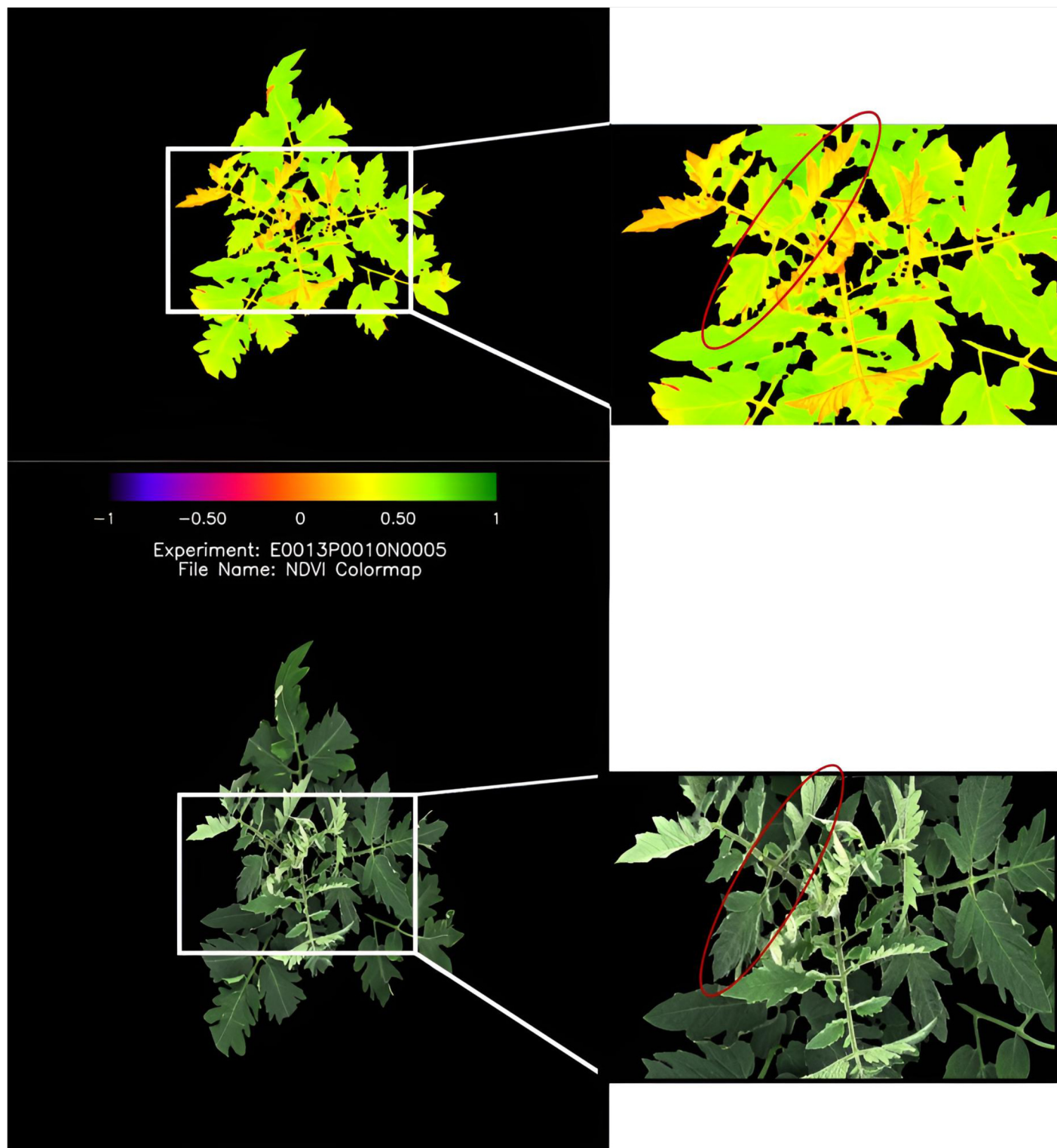
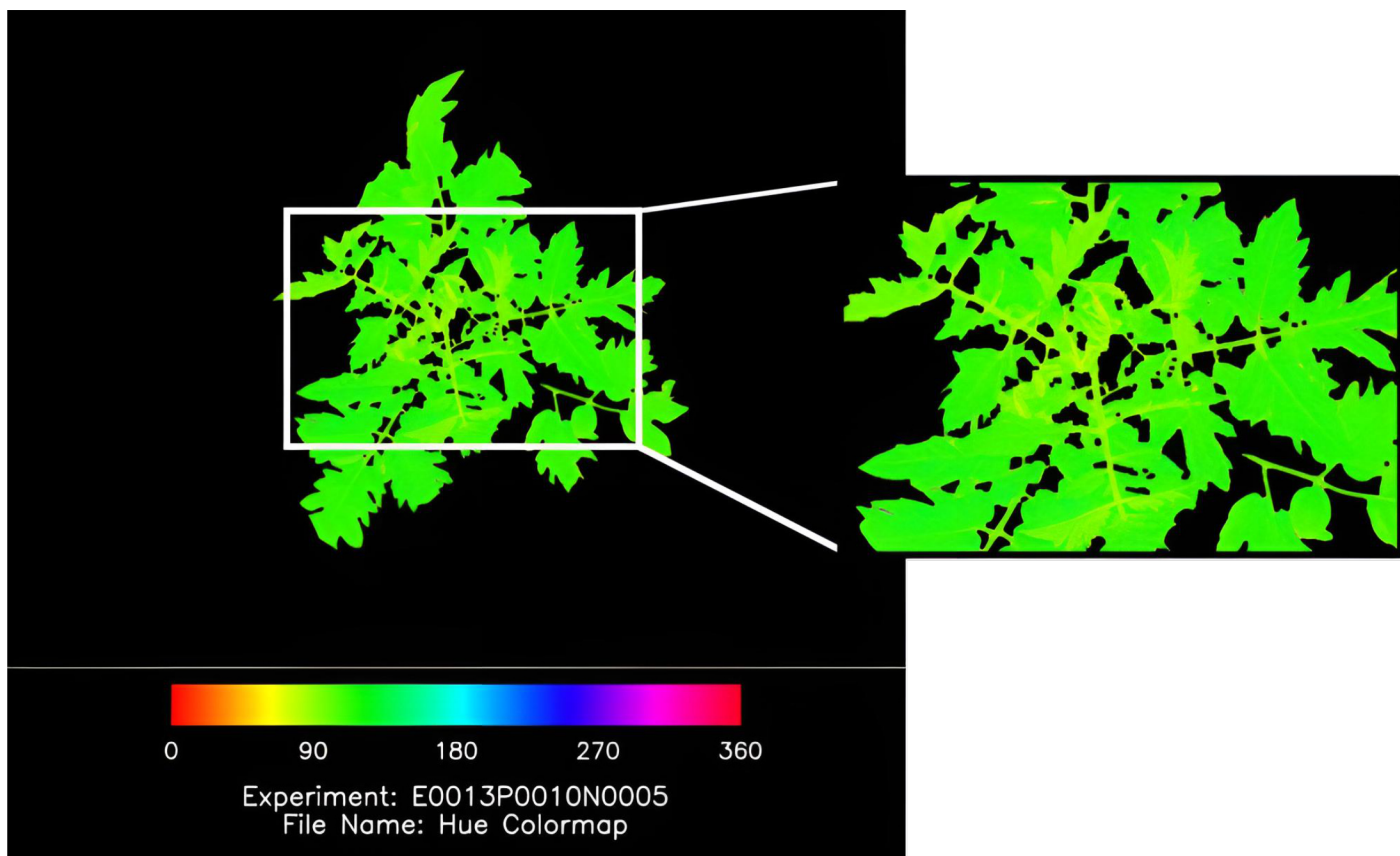
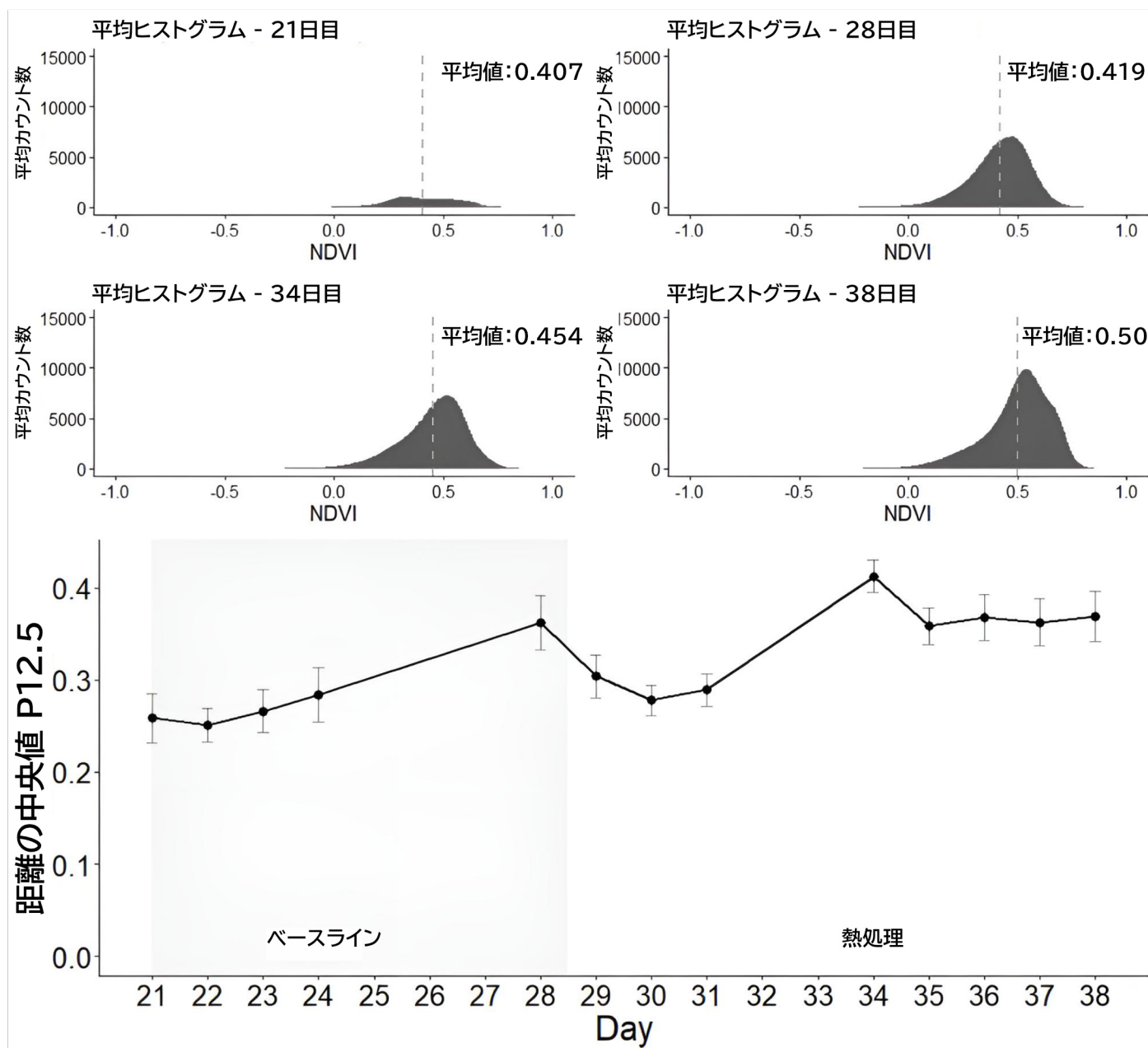


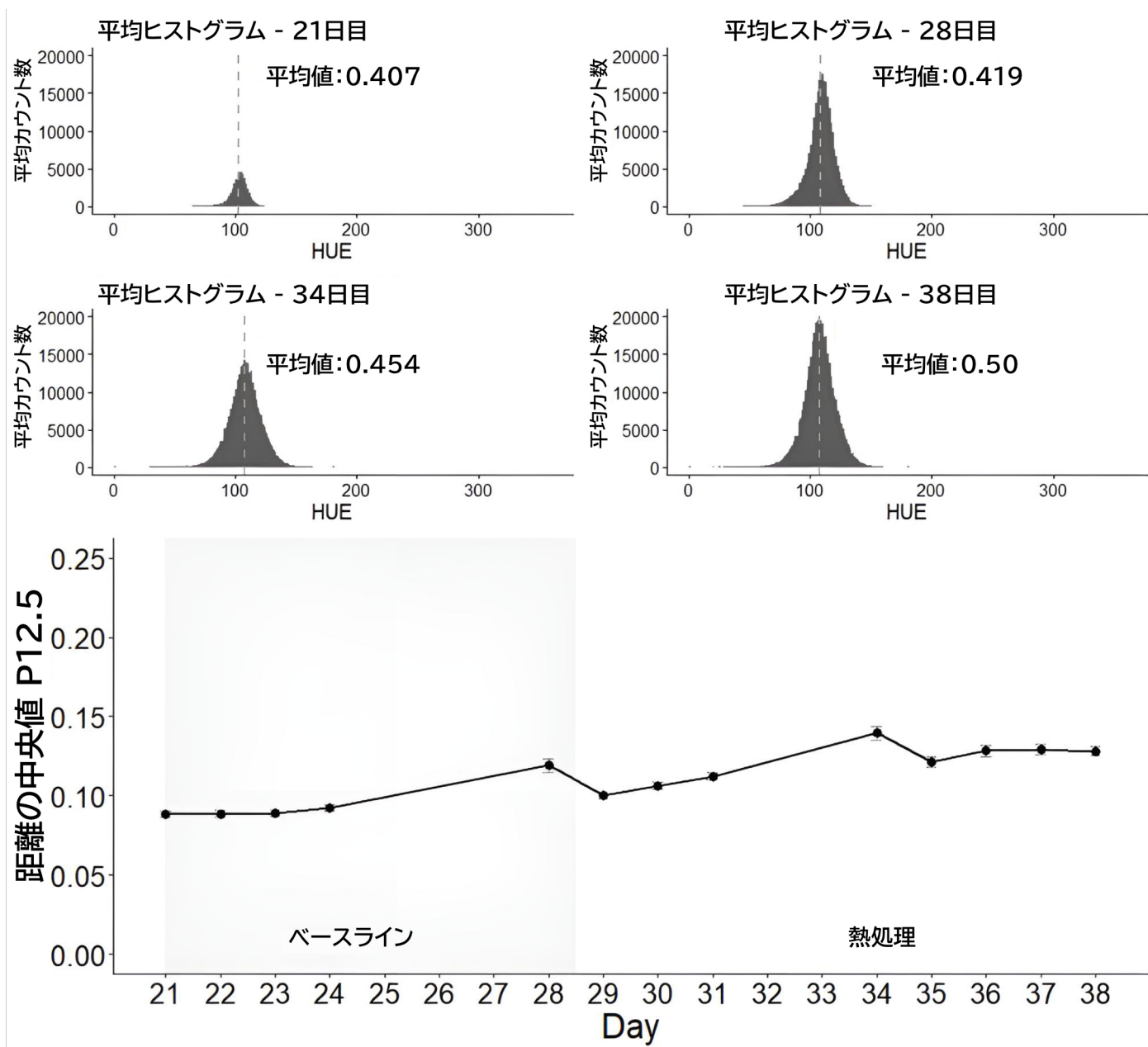
図 A5: 葉がカールしているNDVI、カラー、およびHUE画像の拡大表示の例。赤い円は、密接に関連する2つのリーフの例を強調表示しています。一方のリーフの上部が表示されており、健全な値が含まれており、もう一方のリーフはカールしていて、下部と低い値が表示されています。



付録5:HUEおよびNDVIのばらつきに関するデータ



図A6: マネーメーカートマト (*Solanum lycopersicum*) において、日没時に測定されたNDVIの画素のばらつきを示す平均ヒストグラム、およびそのヒストグラムにおける中央値から第12四分位 (Q12.5) までの相対距離。植物の色およびマルチスペクトル特性は、数日間にわたり繰り返し測定されました。点は平均値を、エラーバーは平均の標準誤差 ($n=16$) を表します。灰色で示した垂直線以降 (28日目以降) に、熱処理 (昼間35°C/夜間24°C) が開始されました。中央値からQ12.5までの相対距離は、式2を用いて算出されました。



図A7: マネーメーカートマト (*Solanum lycopersicum*) において、日没時に測定されたHUE値の画素分布に関する平均ヒストグラム、およびそのヒストグラムにおける中央値から第12四分位点 (Q12.5) までの相対距離。植物の色およびマルチスペクトル特性は、数日間にわたり繰り返し測定されました。点は平均値を、エラーバーは平均標準誤差 ($n=16$) を表します。灰色で示した垂直線の位置 (28日目以降) から、熱処理 (昼間35℃/夜間24℃) が開始されました。中央値からQ12.5までの相対距離は、式2を用いて算出されました。