

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07673

研究課題名(和文) 葉面の滑らかさとその波長特性(新概念)の定量化により水ストレスを早期検出する研究

研究課題名(英文) A New Method of Early Detection of Water Stress with Optical Measurement of Smoothness on Leaf Surface

研究代表者

庄野 浩資 (Shono, Hiroshi)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：90235721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物表面の滑らかさの変化として視認可能な組織の内部構造の変化は、水ストレス等の影響を敏感に反映する可能性があるが、その定量化は困難である。本研究では偏光角度を一定に調整した光が植物体内で反射(透過)する際にその偏光性がどう変わるかを広い波長域で高精度に測定可能とする分光・偏光特性の同時測定システムを開発した。さらに、同システムを用いて、人為的に組織の内部構造を変化させた植物の分光・偏光特性を測定し、両者の関連性を検討した。その結果、乾燥実験では原形質分離に至るまでの細胞破壊の過程を、また光合成実験では光合成産物の蓄積による組織構造の変化の状況を本特性から測定できることを確認した。

研究成果の概要(英文)： It is difficult to quantify the smoothness of the plant surface caused by environmental stresses, such as water stress. However, there is a possibility that features may be detectable through both the spectroscopic and polarized characteristics at wide range of wavelength. In this research, we first developed a simultaneous measurement system of spectroscopic and polarized characteristics. In addition, we measured the spectroscopic and polarized characteristics of plants with various stresses using the same system and examined the relationship with the change of the internal structure of plant tissues.

The results showed that in water stress stress experiments, it was confirmed that the process of cell destruction up to plasmolysis can be measured. Besides, in the experiment of photosynthesis experiment, the change of the structure of the tissue due to the accumulation of photosynthetic products such as starch granules can be measured from these characteristic.

研究分野：農業環境工学

キーワード：分光・偏光特性の同時測定 葉の内部構造の非破壊測定 光合成産物の非破壊測定 水ストレスの早期検出

### 1. 研究開始当初の背景

植物は環境変動に遭遇すると自らの身体を変化させて新たな環境に順応する。体内の含有色素濃度組成や組織の内部構造はその変化の主な主体であり、前者は色の変化として、また後者は表面の“滑らかさ”の変化として視認できる場合が多い。本研究では、逆に、“滑らかさ”の定量化を実現し内部構造の変化を非破壊的に検知できれば、植物が環境から受ける様々なストレスを早期検出することが可能となり、有用な栽培管理情報が得られる可能性に着目した。

植物葉に含まれる色素濃度は分光反射（透過）特性から推定可能であり、例えば、葉緑素濃度は、NDVI（正規化植生指標）等の分光指標から一定の精度で推定することが可能である。しかし、植物組織の内部構造に関しては、現状では非破壊かつ非接触的に測定することは難しく、その手法は確立されていない。分光反射（透過）特性に組織の内部構造が外乱的に影響することは多いが、逆にそれを直接測定することは容易ではない。

そこで本研究では、光の分光反射（透過）特性に「偏光特性」を加えることで組織の内部構造の測定の実現を試みる。すなわち、分光特性の測定光に、予め一定の直線偏光性を与えて葉面に入射させ、反射（透過）光の偏光性が植物内部構造の影響をどの様に受けて変化するか、仔細に観察して検討する。これまで、植物表面で反射した光にどのような偏光性の変化が生じるかについての検討例はあるが（例えば庄野ら、2012）、少なくとも分光と偏光特性を同時に測定し、それらと組織の内部構造との関係性について総合的に検討した例はほとんどない。例えば、各波長域の反射（透過）率が測定光の偏光角度を変えるとどの様に変わるか、その情報には単なる分光特性には含まれない内部構造に関する情報が含まれている可能性が十分考えられる。以上の着想に基づき、本研究は、分光反射（透過）特性と偏光特性の同時測定により“滑らかさ”、すなわち組織の内部構造を非破壊的に測定する手法の確立を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず最初に、測定光の偏光角度を任意に変更しつつ、近紫外から近赤外域までの広い波長域において分光反射（透過）特性を高精度に測定するシステムを確立する。本システムにより、波長と偏光角度の2変数をパラメータとする「分光反射（透過）・偏光特性」の測定が実現可能となる。

さらに、人為的に内部構造を変化させた植物葉を実際に本システムを用いて測定し、得られた情報の解析を通じて、従来の分光測定では困難であった、植物組織の内部構造の変化の非破壊的測定の実現可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

植物組織の内部構造に人為的な変化を生

じさせるため、植物葉を徐々に乾燥させて水ストレスを負荷する「乾燥実験」と、温度を一定に保った人工気象器内で12時間、光を連続照射して光合成をさせる「光合成実験」を行った。ここで、乾燥実験ではRWC（相対含水率）の変化と分光・偏光特性の関係について、また光合成実験では、光照射葉と非光照射葉の分光・偏光特性を処理前後で比較した。尚、今回、すべての実験において、分光反射・偏光特性と分光透過・偏光特性の両方を測定し、両者の結果を比較検討した。また、以下の実験に使用した植物材料は全て市販の岩手県産コマツナ葉である。

#### (1) 分光反射・偏光特性の測定方法

主な実験装置は、分光計測器（Edmund optics, U.S.A）、ハロゲン光源、直線偏光フィルター（有効波長域400~800nm）である。これらの装置は後述する分光透過特性の測定でも共通に使用する。

まず最初に、サンプル葉を確実に固定する測定葉固定治具と、光源、分光計測器および受光センサーで構成される一般的な分光反射特性測定システムを製作した。さらに本システムの光源前と、分光計測器の受光センサー前の双方に直線偏光フィルターを設置し、分光反射・偏光特性測定システムを完成させた（図1）。

本システムの受光センサー側の偏光フィルターは偏光角度が固定されているが、光源側のフィルターを任意に回転可能とすることで測定光の偏光角度を自由に換えられるようにした。測定時は光源側の偏光フィルターを0°から90°まで10°刻みで回転させながら分光反射特性を測定した。

#### (2) 分光透過・偏光特性の測定方法

分光反射・偏光特性の場合と同様に、まず最初に一般的な分光透過特性測定システムを製作し、次に、光源前に偏光フィルターを固定した。さらに分光計測器に導光する積分球の受光部にも偏光フィルターを設置し、分光透過・偏光特性測定システムを構築した。測定時には、分光反射特性の場合とは逆に、受光センサーである積分球を0°から90°まで10°刻みで回転させながら分光透過特性を測定した。

#### (3) 乾燥実験の実施方法

コマツナ葉を円形に切り抜きサンプルを作成し（n=5）、SPAD値（葉緑素濃度指標）を測定した後、遮光したウォーターバス内で約3時間飽水処理を行った。飽水後、生体重、光合成活性（F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>:光化学系IIの最大量子収率、例えば園池、2008）等を測り、その後、分光反射（透過）・偏光特性を測定した。実験中は、デシケーター内で乾燥させながら1時間毎にサンプルを取り出し、上記項目を繰り返して測定した。これらの作業を乾燥開始から4時間後まで行った後、最終的に乾燥機で

絶乾して乾物重を測定し、RWC等を算出した。尚、RWCは飽水時の含水量を100とした場合の各測定時の含水量(%)である。一般に、植物体内の水の状態を適切に表す水ポテンシャルと比較的良好な相関関係にあるとされる(例えば野並, 2001)。

#### (4) 光合成実験の実施方法

乾燥実験と同様にコマツナ葉を円形に切り抜き、SPAD値を測定した後、遮光したウォーターバス内で約3時間飽水処理を行った。飽水後、生体重、光合成活性、分光反射特性、分光反射(透過)・偏光特性を測定した。その後、サンプルを暗区と明区に分け(両区ともn=5)、それぞれを純水で満たしたビーカー内に裏面を表にして浮かべた。さらに、気温25°C一定の人工気象器内で、暗区は暗黒下、明区は光照射下(PPFD: 約500  $\mu\text{mol}(\text{photons})\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )で約12時間静置した。上記処理後、最初の測定項目を再度測定し、乾燥機で絶乾して乾物重を測定し、乾物率等を算出した。

#### 4. 研究成果

今回、分光反射・偏光特性と分光透過・偏光特性の測定結果の間に顕著な違いが見られなかったため、以下では、分光反射・偏光特性の結果のみを報告する。

##### (1) 乾燥実験

乾燥過程における可視域の反射率の変化を図2に示す(全サンプル平均)。本図は波長を横軸に、偏光角度を縦軸(各等高線画像とも下端が0°)とした等高線画像を乾燥過程の順に縦に並べたものである。RWCは下から順に100%, 90%, 80%, 70%, 60%である。

図2において注目すべき点は、RWCが70%の時に反射率のピークが“一部の波長域で”一時的に低下し、偏光性の低下が見られた点である。これは乾燥の進行に伴って組織の内部構造が徐々に変化し、原形質分離に至る状況とよく対応している。すなわち、繊維状に剥離した細胞膜が(例えばMunns, 2002)、測定光をランダムに散乱させ、偏光性が低下する状況を反映したものと解釈できる。

さらに興味深い点は、その後更にRWCが60%まで下がると、一時的に低下していた偏光性が元に戻る状況である。偏光性が再上昇した原因はまだ定かではないが、例えば、原形質分離で細胞膜が破壊された後、細胞構造を辛うじて支えていた細胞壁にも破壊が始まり、最終的に組織全体が扁平化することで偏光性が復元した可能性が考えられる。

以上のように、分光反射・偏光特性は乾燥過程における植物組織の内部構造の変化をモニタリングすることが可能であることが本結果により示唆された。この結果は、本研究の着眼点であった「植物体表面の“滑らかさ”の測定を通じて組織の内部構造の変化を把握すること」が、実際に可能であることを具

体的に示すものであり、極めて重要な成果と考えられる。今後は測定システムや解析システムの精度の向上により、より早く組織の構造変化を捉えることも可能となると見込めるため、水ストレスの早期検出手法への発展が十分期待できる。

##### (2) 光合成実験

図3に示すように、暗区、明区の乾物率は明区の方が約2ポイント高い結果となった(t検定で5%有意差有り)。このため、明区では実際に光合成が行われ、光合成産物が細胞質や葉緑体内部に蓄積したものと判断できる。

さらに、ほぼ“近赤外域”である750nmにおける暗区と明区の反射率を偏光角度別に見ると、明区においては、0°では処理後に反射率が減少したのに対し、90°では大きく増加している(図4, 図5および図6)。これは、暗区と比較すると、明区の偏光性が処理後に顕著に低下した状況を示すものである。この原因としては様々なものが考えられるが、一つの可能性として、明区のサンプルの細胞内により多く蓄積したであろう光合成産物のデンプンが、測定光をよりランダムに散乱させたことが偏光性を低下させた大きな原因として考えられる。

さらに、詳細に光合成処理の効果と偏光性との関係を検討するために、処理前後の偏光性の変化を定量化する指標として、(偏光角度90°における処理前後の反射率の差÷偏光角度0°における処理前後の反射率の差)なる指標を新たに定義した。尚、本指標がより高いほど、光合成処理後に偏光性がより低下したことを表す。

さらに、各波長域毎に、本指標と処理後の乾物率との間の相関係数を波長毎に計算した結果を図7に示す。本図で注目すべきは、800nm近辺の色素吸収のない近赤外域域において、乾物率と本指標間に明瞭な正の相関性が認められる点である。これは、乾物率が高く内部にデンプンなどの散乱性の高い物質を多く含む可能性の高いサンプルほど偏光性が低下したことを明確に示している。可視光域でも基本的に同様の傾向を示したが、近赤外域の方がより明瞭な結果であった。

以上の様に、広い波長域において乾物率と本指標の間に一定の傾向が見られた理由は、デンプンが基本的に「白色」であり、少なくとも今回の測定波長域においてフラットな分光反射特性を持つため、波長間で類似の傾向を示したと理解できる。また、近赤外域の方が安定した相関性を示した理由は、可視光域では色素吸収の外乱的影響を強く受けるのに対し、近赤外域ではその影響がほとんどないためと考えられる。

今回の結果は、細胞内に存在する光合成産物、すなわちデンプンの蓄積が偏光性に影響を与えたことを示していると理解するのが自然である。すなわち、乾燥実験と同様に、組織の内部構造の変化(ここではデンプンの

蓄積) と分光反射・偏光特性との間に密接な関係性があることを示唆している。

まとめ

本研究の結果から、植物体の“滑らかさ”，すなわち分光反射（透過）・偏光特性は、植物体の乾燥の進行や、デンプンなどの光合成産物の蓄積によってもたらされる「植物組織の内部構造の変化」を非破壊的に定量化することが可能であることが示唆された。これらの結果は、同特性の測定方法および解析方法のさらなる発展により、植物体の水ストレスの進行状況や、植物葉の光合成産物の蓄積の状況を非破壊的に測定することが可能であることを示唆する重要な成果と考えられる。

<引用および参考文献>

- ①庄野浩資, 芹沢和洋, 山口香子, 牛草貴行, 松嶋卯月, 小出章二, 立澤文見, 武田純一, ダブル偏光フィルタ法による切り花リンドウ花冠の“光沢”の定量化と生育レベルとの関係, 農業情報研究, 21 巻, 2012, 95-105
- ②園池公毅, クロロフィル蛍光と吸収による光合成測定, 低温科学, 67 巻, 2008, 507-524
- ③野並浩, 植物水分生理学, 養賢堂, 2001, 263pp
- ④R. Munns, Comparative physiology of salt and water stress, Plant, Cell and Environment, 25, 2002, 239-250

【附図】

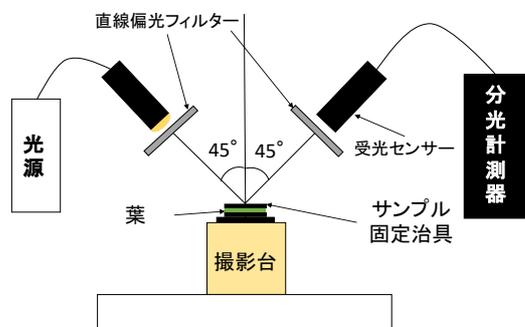


図1 分光反射・偏光測定システムの概要

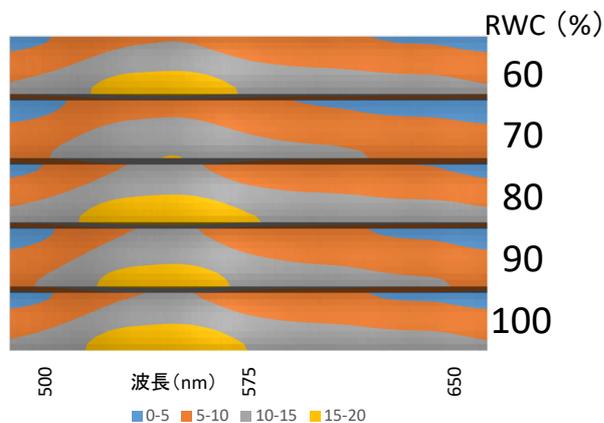


図2 乾燥過程における分光反射・偏光特性の推移

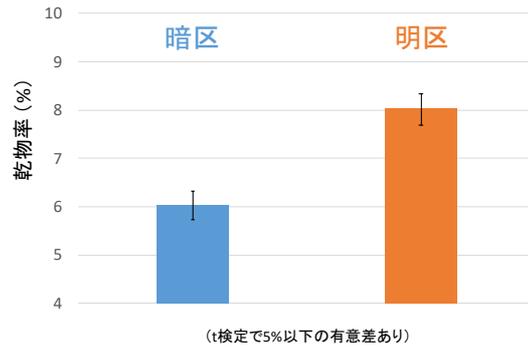


図3 暗区（左）と明区（右）の乾物率

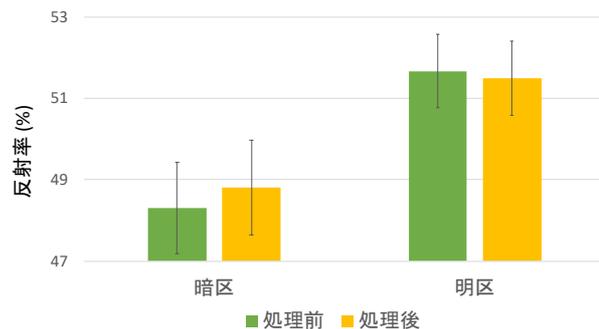


図4 処理前後の反射率（偏光角度 0°）

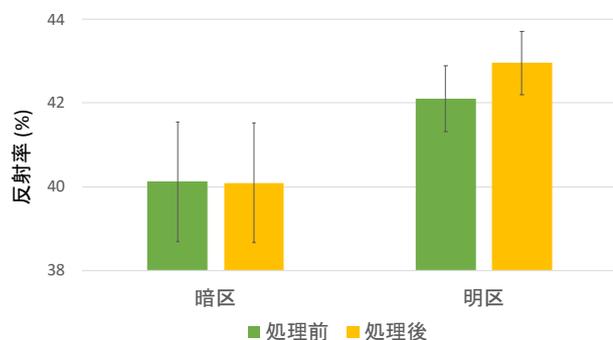


図5 処理前後の反射率(偏光角度 90°)

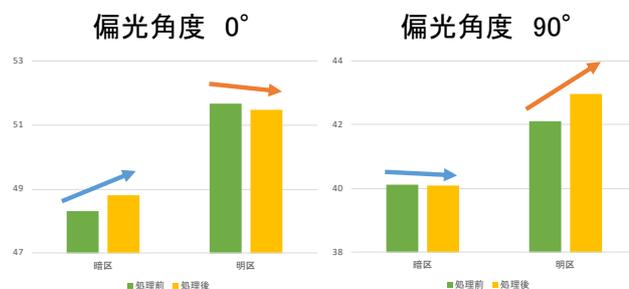


図6 処理前後の反射率の変化の違い

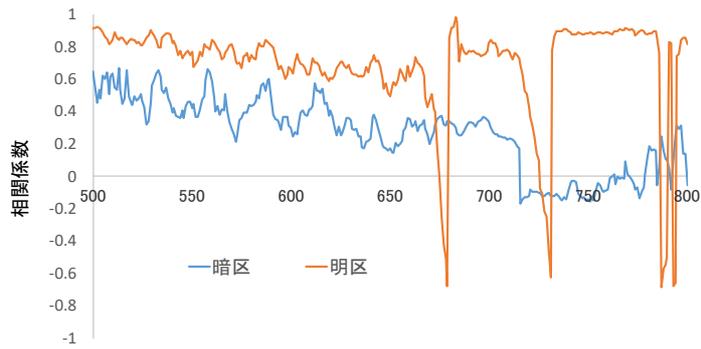


図7 各波長域における偏光性指標と  
乾物率間の相関性

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

①福田崇人, 庄野浩資, 分光および偏光特性の同時測定による植物葉内組織の状態変化の非破壊測定, 日本農業気象学会 2018 年度東北支部大会

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~agrbsc/environment/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

庄野 浩資 (SHONO, Hiroshi)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：90235721

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし