

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2005～2008  
 課題番号：17360191  
 研究課題名（和文） レーザー誘起蛍光を指標とする植物健康診断・計測法の開発  
 研究課題名（英文） Sensing technique for understanding plant physiological status by laser-induced fluorescence spectroscopy  
 研究代表者  
 斉藤 保典 (SAITO YASUNORI)  
 信州大学・工学部・教授  
 研究者番号：40135166

研究成果の概要：最終目標を「レーザー誘起蛍光法による植物健康診断法の確立」に置き、手法論検討・計測システムの開発・診断アルゴリズムの開発を行った。植物生葉にUVレーザーを照射して得られる蛍光を指標とした。蛍光ライダーを開発し、数10m離れたケヤキ・サクラの生葉からの遠隔蛍光スペクトル計測を実施した。成長変化、病害発生、HPLC分析結果等と蛍光スペクトルの比較を行った結果、本手法が植物健康診断に有用であることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	8,400,000	0	8,400,000
2006年度	2,700,000	0	2,700,000
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
総計	15,100,000	1,200,000	16,300,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：計測工学

キーワード：レーザー 蛍光 植物 健康診断 計測工学

## 1. 研究開始当初の背景

地球環境の維持・変遷に大きく関わってきたもののひとつに植物があげられる。昨今の環境変動は、このような植物機能の健全な活動にも影響を及ぼそうとしている。その状況を的確にかつ迅速に調査し評価することの可能な計測手法・装置・診断技術の開発が緊急の課題として挙げられる。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的を「レーザー誘起蛍光法による植物健康診断の確立」に置き、申請期間内では

(1) レーザー照射により誘起された植物生体

内有機分子からの蛍光検出による、

(2) 植物生理に関する動的な反応情報の取得と理解（生理活性度、ストレス度、生育障害等）の課題を設定し、手法提案、手法実現のためのシステム製作、観測実験による提案手法の有用性の実証を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) 植物生葉の蛍光スペクトル特性把握

植物生葉の蛍光誘起に適した波長の設定（レーザー波長の決定）、検出蛍光波長の設定を行う。波長可変の蛍光分光光度計を用いて、植物生葉蛍光スペクトルの誘起波長依存性を計測する。

## (2) レーザー誘起蛍光スペクトル計測装置の開発

開発すべきシステムには、次の特徴を持たせる。

(従来の)化学分析にありがちな、破壊的手法や薬品処理を行わない。

従来の屋内実験を屋外(植物が生育している場所)に展開することを可能にする。

実時間評価が可能である。

これらの条件を満足する計測手法として、レーザー誘起蛍光を指標とした蛍光ライダー計測装置を提案する。蛍光ライダーにより、植物の非破壊・遠隔(生育した場所)・実時間計測が可能になる。

蛍光ライダーの構成としては、送信系(離れた植物に光を照射)にレーザー、受信系(蛍光の検出)に大口径望遠鏡と多波長スペクトル検出装置、信号処理系に遅延回路などの電子機器やパーソナルコンピュータの使用を検討する。

## (3) 観測実験

屋外に自生するキャンパス内の樹木を対象として、レーザー誘起植物蛍光スペクトルの遠隔検出実験を行う。樹木の生長や病害発生などに対応した蛍光スペクトルの蓄積を行う。

## (4) 化学分析法との比較

観測実験と並行して、計測に用いた樹木葉を分析機関に送り、HPLCによる有機物種の同定・量に関する情報を得る。

## (5) 植物生育診断アルゴリズムの適応・病害発生予測

診断アルゴリズムを完成させ、蓄積データに適応する。病害事例集と蛍光スペクトル形状変化の比較を行う。

## (6) 総括

4年間のまとめを行う。

## 4. 研究成果

3の各課題毎に成果をまとめる。

### (1) 植物生葉の蛍光スペクトル特性把握

植物蛍光は照射した光よりも長波長側に出現した。特に紫外光の照射により、450nmに中心を持ち幅150nmのスペクトルと、685nmに中心を持ち幅50nm、および740nmに中心を持ち幅80nmのスペクトルを得た。

### (2) レーザー誘起蛍光スペクトル計測装置の

## 開発

上記結果を踏まえ、蛍光ライダーシステムを開発した。レーザーにはパルスヤグレーザーの第3高調波である355nmを用いた。出力5mJ、パルス幅6ns、繰り返し10Hzの特性を持つ。望遠鏡は口径25cmのシムツトカセグレン望遠鏡である。多波長スペクトル検出装置は検出波長範囲200nm - 800nm、波長分解能3nmの特性を持つ。さらに、イメージインテンシファイヤ(II)による光増感機能と短時間ゲート動作機能も併せ持つ。

レーザーを望遠鏡の上部に固定することで、レーザー出射方向と望遠鏡受信方向が同一方向となり、操作性が向上した。レーザー出射方向の微調整には二枚の誘電体ミラーを用いて、対象とする植物生葉に確実に照射できる工夫を施した。望遠鏡で集光した生葉蛍光スペクトルを、多波長スペクトル検出器に効率的に導くために、望遠鏡焦点にバンドル型の光ファイバーを配置した。開発した蛍光ライダーの構成と実験風景を図1に示す。

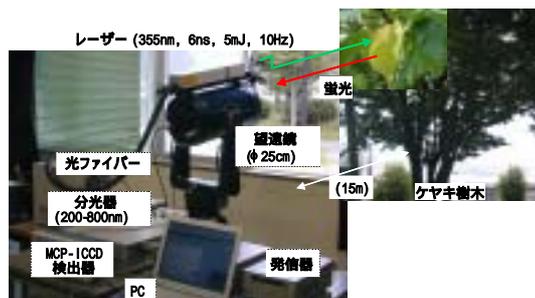


図1 蛍光ライダーシステムおよび実験風景写真

動作試験の結果、生葉からの蛍光は大口径の望遠鏡で集光しても微弱であることが判明した。特に日中の観測実験においては、太陽からの背景光に埋もれてしまい、蛍光検出が困難なことが明らかになった。そのため、新たな試みとして、同期検出法(図2)を試みた。

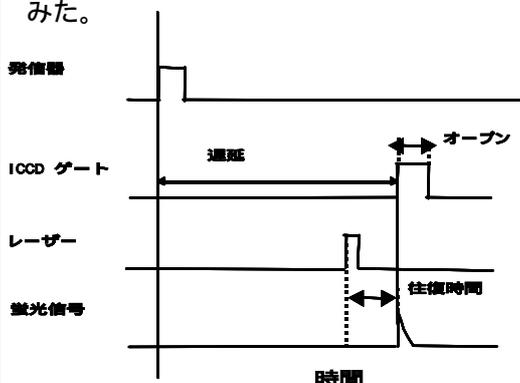


図2 同期検出法のタイミングチャート

パルスレーザーが生葉を照射することにより短時間蛍光が発生する。この蛍光が検出系に入射した時間に同期させて検出系のゲートを短時間(蛍光発光時間程度)開く構成にした。これにより、太陽背景光強度を、標準設定時と比較して約 $1/10^5$ に低減させることが出来た。ライダー計測手法では新しい試みである。以上により、計測装置が完成した。

### (3)観測実験

観測実験は2007年度と2008年度に行われた。対象となった樹木はケヤキ・サクラ・プラタナスである。いずれも計測装置から15m程度離れた場所に自生していた。

#### ケヤキ生葉の蛍光スペクトルの遠隔計測

計測例を図3に示す。蛍光スペクトルは、400~650nmの青・緑蛍光(Blue-Green Fluorescence)と650~800nmの赤・赤外蛍光(Red-Far Red Fluorescence)に大別されることがわかる。前者はフェノール類、特にフェラル酸誘導体の寄与が大きく、さらに代謝二次産物からの蛍光を含んでいると言われている。後者は光合成の主要分子クロロフィルaの蛍光で、685nmと740nm付近にピークを有することがわかる。685nmは、光合成明反応と電子伝達系である光化学反応系、740nmは反応系Iが関与している。また、740nmの強度と685nmの強度比は葉内クロロフィル濃度と相関があることが知られている。

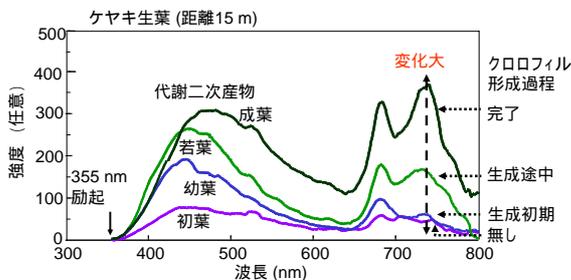


図3 ケヤキ生葉からの遠隔蛍光スペクトル観測結果

これらのことを踏まえて、図3の結果を議論する。成長過程により、蛍光スペクトルの形状が変化するのが示されている。740nmの蛍光強度の変化が最も大きく、これは成長過程に伴うクロロフィル分子の形成過程を表しているものと考えられる。つまり、初葉ではまだその形成を開始していない(740nmの出現が見られない)。成長過程とともにクロロフィル濃度が増加していき(740nm強度が大きくなる)、成熟葉では最大となった(740nm強度が最大)。紅葉時

には740nmの値が減少することも観測されている。葉内部でのクロロフィルの形成(合成と分解)に関する生理情報が捕らえられた。なお、青・緑蛍光は単純増加を示し、代謝二次産物の合成が生育状況にほぼ比例して行われたものと考えられる。

#### 葉色による蛍光スペクトルの違い

葉の健康状態は葉色に表れる。葉色は葉内部の有機色素により変化する。蛍光スペクトルは有機色素の種類と濃度に依存すると考えられるため、葉色の異なるサクラ生葉の遠隔蛍光スペクトル観測を行った。

図4に結果を示す。クロロフィルaの形成情報を担っている赤・赤外蛍光領域では、(濃)緑から黄色へと葉色を変化させるにつれて、その値自体、および740nmの強度と685nmの強度比が小さくなった。光合成活動の減退の様子を反映したのと考えられる。青・緑蛍光は、黄色になると465nmと530nmの二つピークを持つようになった。代謝二次産物の中でも、キサントフィル(黄色)やカロテン(橙色)の濃度情報が得られたものと考えている。

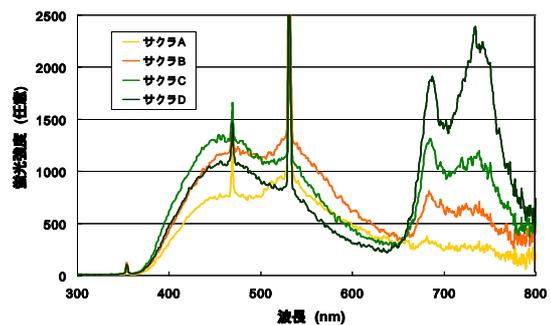


図4 葉色の異なるサクラ生葉の遠隔蛍光スペクトル観測結果(A:黄色、B:黄色と緑混在、C:緑、D:濃い緑)、465nmと630nm付近にみられる鋭いピークは、CCD素子の欠陥(微漏出力)による疑似ピークである。

#### (4)化学分析法との比較

蛍光スペクトル計測と並行してHPLCによるクロロフィル濃度の定量化が行われた(分析会社へ依頼)。当初は、キサントフィルやカロテンについても分析を計画していたが、大量のサンプルが必要なこと、標準分析の範囲を超えるため高額な費用が必要であることから、その分析を断念した。今後の検討課題である。

サクラのクロロフィル濃度と蛍光強度比(760nm強度/685nm)の関係を図5に示す。両者に強い相関が見られる。図4

(または図3)の検討結果を支持するものである。あらかじめこのような検量線を作成しておくことで、蛍光ライダーによりクロロフィル量の絶対値を遠隔的に非破壊で計測することが出来ることになる。

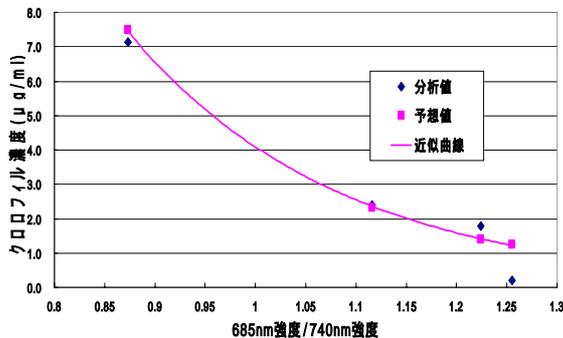


図5 サクラ蛍光スペクトル強度とHPLCによるクロロフィル濃度測定値との比較

#### (5)植物生育診断アルゴリズムの適応・病害発生予測

これまでの報告で、このような可能性について触れてきたので、ここでは簡単にまとめるだけとする。

蛍光スペクトル450nmは光合成代謝二次物質および老化・枯死関連情報を、685nmと740nmはクロロフィル形成・破壊過程関連情報を担うことがわかった。病害発生時には、蛍光スペクトルが変化するため、標準(健康)スペクトルの形状との比較により診断が可能である。種類毎に各値(相対値)の月変化・季節変化を追跡することで、植物を採取することなしに遠隔的に実時間で植物の健康診断が可能なることを示した。

#### (6)総括

「レーザー誘起蛍光法による植物健康診断法の確立」を最終目標として、4年間の研究期間においては「レーザー誘起蛍光を指標とする植物健康診断・計測法の開発」の課題で研究を行った。その結果、本手法が植物健康診断に有用であることが示された。

さらに本研究成果を発展的に応用することを目的として、

蛍光寿命ライダーによる光合成活性度計測

蛍光ライダーによる大気中浮遊花粉の実時間モニタリング  
を継続中である。

#### 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 6件)

1. 齊藤保典, “レーザー誘起蛍光分光法による植物生理情報のセンシング”, 応用物理, 77巻, (査読有), (2008), pp.1328-1331.
2. Yasunori Saito, “Laser-induced fluorescence spectroscopy/technique as a tool for field monitoring of physiological status of living plants”, Proceed. SPIE (Sunny Beach, Bulgaria), (査読有り), Vol. 6604, (2007), pp.66041W1-66041W12.
3. 齊藤, 高野, “光合成と生産性の評価に転用可能なレーザー誘起蛍光分光技術”, 月刊海洋, (査読無し), 38巻, (2006), pp.433-440.
4. Y. Saito, M. Hara, K. Morishita, T. Tempaku, K. Ichihara, F. Kobayashi, and T. D. Kawahara, “Fluorescence lidar for remote sensing of plant living information”, Proceed. Silvilaser (Matsuyama, Japan), (査読有り), (2006), pp.55-59.
5. 齊藤保典, “レーザー光で植物健康診断”, バイオニクス, (査読無し), 3月号, (2006), pp.70-71.
6. Y. Saito, T. Matsubara, T. Koga, F. Kobayashi, T. D. Kawahara, and A. Nomura, “Laser-induced fluorescence imaging of plants using a liquid crystal tunable filter and charge coupled device imaging camera”, Rev. Sci. Instrum., (査読有り), Vol.76, (2005), pp.106103-1 – 106103-3.

[学会発表](計 8件)

1. 村松良亮 他, “蛍光ライダーシステムの植物関連計測への応用研究”, 応用物理学会北陸・信越支部学術講演会(金沢工業大学, 石川県野々市町), (2008年11月), 1C-02.
2. 寺岡仁志 他, “植物生育診断のための同時多波長蛍光画像検出システムの改良”, 応用物理学会北陸・信越支部学術講演会(金沢工業大学, 石川県野々市町), (2008年11月), 1C-04.
3. 市原健太郎 他, “蛍光ライダーによる飛散花粉の検出実験”, 第26回レーザーセンシングシンポジウム(ホテル パーレンス小野屋, 朝倉市), (2008年9月), P-30.
4. 齊藤保典, “レーザー誘起蛍光法による植物生理情報のセンシング”, レーザー学会東京支部・レーザー応用セミナー(慶應義塾大学, 横浜市), (2008年7月).
5. Yasunori Saito, “Feasibility of laser-induced fluorescence spectrum (LIF) lidar for floating pollen detection”, 25th Intl. Laser Radar Conf. (Univ. Colorado, Colorado, Boulder, USA), (June,

2008), S09P-23.

6. 斉藤保典, “レーザ誘起蛍光分光法による植物生理情報のセンシング”, 光産業技術振興協会 第4回研究交流会(東京, 機会振興会館), (2008年1月).

7. 金原和哉 他, “植物生育診断のための同時多波長蛍光画像検出システムの構築”, 第25回レーザセンシングシンポジウム(駒ヶ岳観光ホテル, 仙北市), (2007年9月), P-21.

8. 天白 昶 他, “ピコ秒ライダーによる植物生葉クロロフィル蛍光寿命遠隔計測”, 第25回レーザセンシングシンポジウム(駒ヶ岳観光ホテル, 仙北市), (2007年9月), P-25.

〔図書〕(計 2 件)

1. Yasunori Saito, “Monitoring of raw material by laser-induced fluorescence spectroscopy” chap. 4.3, in *Optical Monitoring of Fresh and Processed Agricultural Crops*, ed. Manuel Zude, CRC Press (Boca Lato, FL, USA), (2009), pp.319-336 (total pages 537).

2. Yasunori Saito, “Laser-induced fluorescence as an index for monitoring plant activity and productivity related to photosynthesis” Chapter 11, in *Recent Progress of Bio/Chemiluminescence and Fluorescence Analysis in Photosynthesis*, ed. N. Wada and M. Mimura, Research Signpost (Kerala, India), (2006), pp.235-251 (total pages 297).

取得状況(計1件)

特許第3807940号, 植物生育の診断方法, 平成18年5月26日.

〔その他〕

ホームページ

<http://kankyoushinsu-u.ac.jp/marukan/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

斉藤 保典 (SAITO YASUNORI)

信州大学・工学部・教授

研究者番号: 40135166

(2)研究分担者

井上 直人 (INOUE NAOTO)

信州大学・農学部・教授

研究者番号: 80232544

川原 琢也 (KAWAHARA TAKUYA) H17-H19

信州大学・工学部・准教授

研究者番号: 40273073

(3)連携研究者

川原 琢也 (KAWAHARA TAKUYA) H20

信州大学・工学部・准教授

研究者番号: 40273073