

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06314

研究課題名（和文）可視-テラヘルツ広帯域分光を用いた植物葉のイオン誘起水ストレス評価に関する研究

研究課題名（英文）Evaluation of ion induced water stress of a leaf by spectroscopy with visible-THz region

研究代表者

石川 大太郎（Ishikawa, Daitaro）

福島大学・食農学類・准教授

研究者番号：20610869

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、水 塩ストレスが併発する環境下での非破壊的なストレス評価法開発のための基礎的研究である。実験は、個葉を対象として、可視から赤外領域に至る広帯域分光データを取得し、イオンによる個葉の影響を評価可能な分光マーカーを探索し、その動態を把握することを目的に実施された。3000-2800 cm^{-1} 付近の赤外スペクトルを用いることで、植物葉のセルロース水間の相互作用から、ストレス程度によって波数位置にシフトが生じる可能性を示唆した。さらに、1000-100 cm^{-1} の赤外/遠赤外スペクトルの植物葉のストレス評価への利用可能性を見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において提案した赤外領域のスペクトル挙動を追跡することで、イオンによるストレス度合いの評価が可能となり、科学的根拠を持ったストレス評価指標の開発に結びつくと考えられる。また本研究によって提案した1000 cm^{-1} 以下の遠赤外/赤外スペクトルによる評価法は、水の状態を通して対象を理解しようとするもので、葉のみならず水を含む多くの対象に対して拡張が可能である。したがって、データの取得法にさらなる改良が必要であるが、実用的な有用性を秘めている。さらに、学術的にも様々な対象における本領域のデータの蓄積により、新たな分光領域の確立に結びつくと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study is a fundamental research for the development of a non-destructive stress assessment method in an environment of concurrent water-salt stress. The experiments were conducted on individual leaves to obtain spectral data with wide range from the visible to far infrared region, to search for spectral markers that can assess the effects of ions on individual leaves. It is possibility that a shift in wavenumber position depending on the degree of stress occurs by interaction between cellulose-water in leaves. Furthermore, we succeeded in finding the potential use of the infrared/far-infrared spectra at 1000-100 cm^{-1} for the assessment of plant leaf stress.

研究分野：非破壊計測

キーワード：水ストレス 塩ストレス 赤外/遠赤外スペクトル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

山腹の植生が水ストレスを受けることが予想されることから、植生の水分状態をリアルタイムで把握できるリモートセンシングなどの非破壊計測技術を用いて水ストレス評価法を構築する試みが、これまで盛んにおこなわれてきた。代表的なものとして、660nm 付近と 770nm 付近の近赤外領域を利用した正規化植生指数(NDVI)があり、ハイパースペクトルカメラを利用した広域なストレスマップの提案なども行われている。とりわけ、近年では、ドローンによる観測技術の進歩により、非破壊的手法による植生のストレス評価はその有用性が強く支持されているが、これまでの研究では、植物葉から得られた分光データ(以下スペクトル)の物理化学的意味付けが明確化されていないことから、非破壊計測技術を最大限に活かすに至っていない。さらに、とりわけ東北地方では、東日本大震災以降、土壌中の塩類集積等により葉内のイオン過剰が水ストレスを併発することが大きな問題となっている。したがって、塩ストレスと水ストレスの非破壊な評価法の開発は農作物の生産性向上や生態系の保全の観点に加え、科学的手法による被災地復興の一助としても期待される。

2. 研究の目的

本研究は、個葉を対象として、広帯域分光データを用い、水 イオンストレスが併発する環境下でのストレス評価が可能な分光マーカーを探索し、その動態を把握することを目的に実施した。イオンが葉内のクロロフィル 水分子間やセルロース水間および、水分子同士の相互作用に与える影響評価として、可視-赤外領域の広帯域スペクトル取得を実施した。特に、私たちの研究グループで提案している 1000-100 cm^{-1} の赤外/遠赤外スペクトルの植物葉ストレス評価への利用可能性を把握することで、ストレス評価を通し、新たな分光領域開拓にも取り組んだ。

3. 研究の方法

モデル植物として、カイワレダイコンをサンプルとした。サンプルは、外乱の影響を少なくするように栽培を行った。本研究では、NaCl、KCl 溶液に加えて、LiCl、MgCl₂ および、CaCl₂ の溶液を 2% から 20% の段階まで加えて、ストレスが顕在化する条件で、栽培したサンプルに対する測定を実施した。また、植物体を乾燥させ、水ストレスのみを与えた場合のサンプルに加え、水分を供給したコントロールを同時に栽培した。

栽培過程における個葉を摘葉し、可視・近赤外スペクトル(400-2500nm)は、V670(Jasco.Co)を用いて測定した。測定は、波長分解能 1nm で、金蒸着したリファレンスをベースラインとして、反射測定を行った。また、本研究では溶液に対する基礎的なスペクトル挙動の解析として、近赤外領域(1100-2500nm)の測定を別個に、Luminer5030(Brimrose.Co)を用いて行った。赤外領域の 4000-100 cm^{-1} のスペクトルは、FT/IR-6300(Jasco. Co)を用いて行った。赤外領域のスペクトルは、1 回反射の ATR 法によって実施した。装置は、100 cm^{-1} までの一括スキャンが可能で、波数分解能は、4 cm^{-1} で測定を実施した。取得したスペクトルは、Savitzky-Goley 法によるスムージングと二次微分を施すことでバンドの抽出を行った。1000-100 cm^{-1} 付近のバンドでは、二次微分すると誤差が大きくなってしまふことから、カーブフィッティングによりバンドの分離を行うことを試みた。フィッティングは、ガウス関数とローレンツ関数の合成関数として算出し、中心波数位置、半値幅を決定した。

4. 研究成果

<中赤外領域を用いた塩ストレス状態の評価>

中赤外領域のスペクトルから、3000-2800 cm^{-1} 付近のバンドについての検討を行った。この付近には、CH 伸縮振動に帰属されるモードが観測されると考えられる。したがって、植物葉の場合、細胞壁を形成する主たる成分であるセルロースの CH に由来する可能性が高いと考えられる。NaCl に対する結果を図 1 に示す。塩ストレスを与えるため 2-20% の濃度の NaCl 溶液で栽培した植物葉のこの領域のバンドは、新鮮葉に比べて、わずかであるが、高波数側に存在する傾向を示した。カリウム溶液を 2-20% の濃度として同様にスペクトルを取得したところバンドの強度は強くなったがシフトは明確には観測されなかった。別実験として乾燥のみを与えた場合にこのバンドのシフトを検討したところ、乾燥ストレスを与えた植物葉でもわずかなバンドシフトを生じることが認められた。このバンドはセルロースの CH に由来していると考えられることから、水分が欠乏することで、水分子間との相互作用に変化が生じてシフトが発生した可能性が考えられる。ナトリウムイオンの場合も、相互作用の変化を起こす要因となったと考えられる。しかも、KCl 溶液では、水ストレスと同様のシフトは検出されなかったことから、このバンドは植物葉がストレスを感じた場合に变化する可能性が考えられた。すなわち、

葉のセルロースと水の状態が葉のストレスを評価するマーカーバンドとなりえる可能性が示唆された。今回の結果では、水ストレスと塩ストレスの分離をすることは難しいことから、併発した条件下でのより詳細なバンド挙動の解明が必要であると考えられた。このバンドがマーカーとして利用可能であると仮定し、ナトリウム、カリウムに加え、リチウム、マグネシウムおよびカルシウムをカチオンとして添加して塩化物溶液 20% で栽培したカイワレダイコン葉のこのバンドのスペクトル挙動について、調査したところ、ナトリウムと同様に、マグネシウムを添加した場合もわずかな高波数シフトを生じた。マグネシウムはクロロフィルと錯体を形成していることからクロロフィルと水との相互作用の変化がストレスとして検出された可能性がある。いずれにしても結果として、塩化物によってシフトが検出されるものとされないものがあることを確認した。

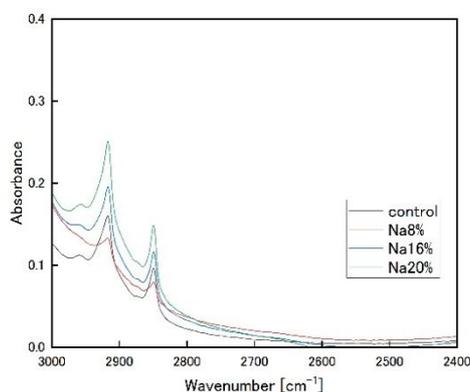


図1 NaCl 濃度 8~20% 溶液およびコントロールでの植物葉の 3000-2400 cm^{-1} のスペクトル挙動

<赤外/遠赤外(IR/FIR)スペクトルのストレス評価法への応用>

我々の研究グループでは、種々の塩溶液を調査し、濃度に対して 1000-100 cm^{-1} 領域が高波数シフトし、さらに、塩濃度の差によって等吸光度点を生じることを示してきた。しかも、等吸光度点は、イオン自体の半径およびイオンが影響を与える水和領域に対応している可能性を示してきた。すなわち、イオンを添加した結果水の状態が変化することをこの領域のスペクトル挙動から見出してきた。この結果は、水分が強く関与する食品、材料はもちろん植物体においてもこの分光領域の把握が有効であることを示唆している。しかし、この領域は、これまで精度良く、一スキャンで測定することが困難であったため、データの蓄積はほとんどなく、溶液系以外では、その詳細な解析もほとんどなされていない。

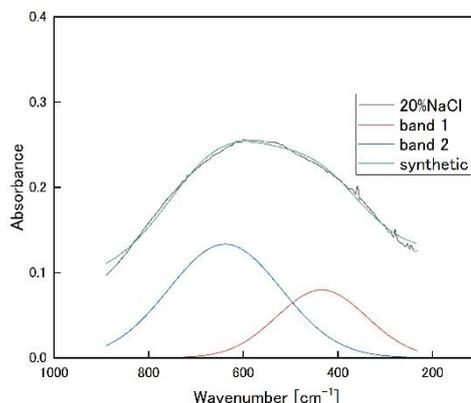


図2 NaCl 濃度 20% 溶液で栽培した葉の赤外/遠赤外スペクトル、分離バンドおよび合成スペクトル

そこで、我々は、この 1000-100 cm^{-1} の赤外/遠赤外領域と新たに定義して解析を行うことを提案している。今回の実験では、植物葉のストレス評価へのこのバンドの有効性に関する検証を行った。この領域では、二次微分は誤差が大きくなってしまふことからカーブフィッティングによりバンドの分離を行った(図2)。その結果、NaCl 溶液で栽培したカイワレダイコン葉では、高波数 700-600 cm^{-1} と低波数 500-400 cm^{-1} にバンドが存在する可能性が示された。さらに、生育中の塩溶液の濃度が上昇すると、どちらのバンドも強度が増加したものの、波数位置の変化は認められなかった。一方、KCl 溶液によって栽培した場合では、強度はあまりかわらず、バンド位置がわずかに変化する傾向を示した。比較として、乾燥のみを与えた場合もこのバンドの変化を調査したところ、乾燥のみでも

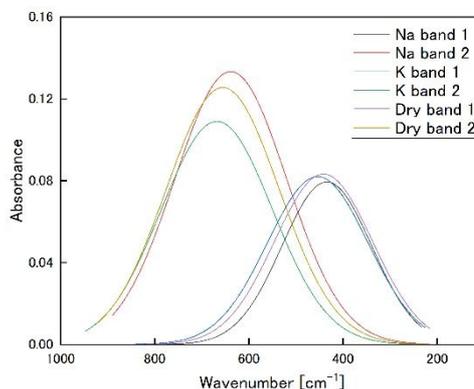


図3 NaCl、KCl 濃度 20% 溶液および乾燥のみを与えた葉の赤外/遠赤外領域のバンド挙動

NaCl 溶液の葉に対して算出した値と近かった。この結果、ストレス評価としては、この二つのバンドの強度比を追跡することで、可能であると考えられた。我々のこれまでの水溶液に対する研究で、この2つのバンドは、構造化している水と結合がゆるいだ水分子を反映している可能性を示してきた。植物葉に対しても、追跡しているのは、葉内および葉表面の水分状態であると考えられるが、強度が上昇したことは、乾燥による測定しやすさが変わったことである可能性がある。さらに、今回の結果で、低波数側のバンドはほとんど強度も波数位置も変わらなかったが、高波数側 600 700 cm^{-1} に生じたバンドでは、塩ストレスを生じていると考えられる植物葉では、バンド位置が低波数側にシフトする傾向を示した。

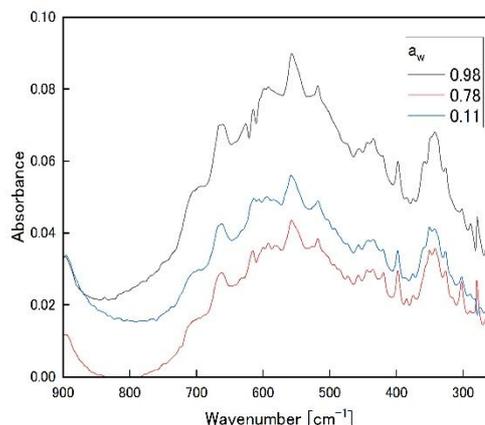


図4 調湿したセルロースの赤外/遠赤外領域のバンド挙動

これは塩ストレスによって、水ストレスのみの場合と少し異なった状態になっている可能性を示していることが考えられた。したがって、植物葉の水ストレス、塩ストレスの新しい評価法として、赤外/遠赤外スペクトルが有効に活用できる可能性があると考えられた。さらに、水ストレスと塩ストレスの分離にもこのバンドの解析で言及できる可能性を示した。植物体の細胞壁の主成分であるセルロースの変化が重要な役割を示していることが中赤外域の結果から示唆されたが、本領域ではセルロース自体のスペクトル挙動も例があまりない。そこで、基礎的にセルロース自体のスペクと挙動の解析も実施した。セルロースを水分活性、0.11-0.98 となるように調湿し、赤外/遠赤外スペクトルの測定を実施した。葉のサンプルでは、この領域は、ブロードなバンドとして確認されたが、セルロースを直接測定した結果では、複数のバンドが存在することが確かめられた。これらのバンドは、骨格部分に由来すると考えられるが、葉上では微小であると考えられた。強度はATRの押さえつけにも起因しているが、すべてのサンプルのベースライン上に水に由来するブロードなバンドが存在した。さらに、このバンドは、水分活性の増加によって強度が増している結果となった。したがって、植物葉の場合も水分状態を評価している可能性が示された。セルロースにおいて検出された微小なバンドは、調湿によって強度の変化をあまり生じなかった。また波数位置の変化も明確ではなかった。これらは、水ストレスによっても骨格部分はあまり影響を受けていないことを示唆していると考えられた。したがって、この領域を用いた水ストレス、塩ストレスの非破壊的な評価では、水とC-H、水分子同士などの相互作用の追跡が有効であると考えられる。

この結果をさらに実用的にしていくために、まず、今回の実験では、ATR法によって植物葉の測定を行ってきた。固体に対して、ATR法は最も優れた手法であるが、波数依存性が存在することから、強度変化が、実験方法に依存してしまう可能性に加えて、わずかな波数シフトに対して間違った結論を導く可能性がある。まず、ATR補正を正確に実施することが前提であるが、透過法などより直接的な方法で水とイオン等の相互作用変化を明確化し今回の結果に根拠をつけていく必要があると考えられた。

<近赤外スペクトルのイオン添加による挙動の基礎的解析>

近赤外領域(1000-2500nm)は、植物葉の水の状態を評価するうえで、有効な領域であり、これまでにフィールド研究において様々な指標が提案されている。しかし、塩ストレスを与えるイオンによるスペクトル変化は必ずしも明確化されたとはいえない。本研究では、将来的な塩ストレス評価への適用を念頭に、イオンを与えた場合の近赤外領域のスペクトル挙動の基礎的な把握を実施した。まず、塩添加による水の状態を把握するため、イオン濃度毎に水分活性を取得した。低イオン濃度と水分活性のプロットは、ラウールの法則にしたがい直線的な関係にあったが、高イオン濃度では直線から外れる結果となった。イオン濃度と水分活性の関係が直線である領域の近似式から、直線から外れる濃度を算出したところ、イオン毎に異なる結果となった。すなわち、それぞれの塩が水に与える影響が異なる可能性があると考えられる。近赤外スペクトルでは、1900 1950nm 付近に水に由来するバンドが出現することから、このバンドの二次微分強度、波長位置について検討を行った。今回供試した塩溶液では、おおむねイオン濃度のバンド強度には直線的な関係が認められた。波長位置は、今回供試したすべての塩溶液で、濃度が高くなるにつれて長波長側にシフトする結果となった。LiCl 溶液以外は波長位置とシフト量に大きな違いを生じなかった。以上の結果は、近赤外スペクトルの水のバンドは、塩添加による水の状態の変化を追跡可能であることから、塩ストレスに対してもマーカーとなりうるが、塩ごとの差異に言及することは困難であることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名	Daitaro Ishikawa, Yuka Nakajima, Mao Suganami, Naoto Nihei, Hidekazu Takahashi, Makoto Matsuoka, Tsukasa Matsuda
2. 発表標題	Prediction of major constituent content of seeds based on NIR spectra using a panel of genetically diverse soybean varieties
3. 学会等名	International Symposium on Agricultural Meteorology 2023 (国際学会)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	石川大太郎
2. 発表標題	可視・近赤外リモートセンシングの概要
3. 学会等名	第51回近赤外講習会（招待講演）
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	中島侑香, 石川大太郎
2. 発表標題	近赤外分光分析を用いた在来種大豆および豆乳の特性評価
3. 学会等名	第38回近赤外フォーラム
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	ISHIKAWA D., UENO G. and FUJII T
2. 発表標題	Development of Monitoring Method for Water Activity of Beef Cut during Drying Process by Short Wavelength NIR Spectroscopy
3. 学会等名	ICNIRS2021 (国際学会)
4. 発表年	2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------