

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19166

研究課題名(和文)コヒーレント光の散乱・反射特性を利用した植物体の水ストレス診断

研究課題名(英文)Diagnostic of plant water stress applying diffusion and reflection properties of coherent light

研究代表者

福島 崇志(Fukushima, Takashi)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：00452227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ストレスに対する応答などの植物生理情報の取得のため、レーザ光に代表される干渉性の強い光を利用したレーザスペckル法による計測方法の開発に取り組んだ。偏光を利用したレーザスペckル法を提案し、植物の水ストレスに対する応答を早期に検出することができた。提案手法では、1枚のスペckル画像により植物の構造を評価でき、現場向きの計測方法として特長がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、1枚のスペckル画像の解析による容易さと、偏光を利用することで複雑な植物体構造を分離できかつ、先駆的現象として現れる内部構造変化を早期に評価できる特徴を持つ。既存の植物生理情報では、内容成分やその濃度に依存した計測が実施されてきたが、本解析では植物体の構造に着目した生理情報であり、これまでの植物生理情報とは異なり、構造に依存する受光効率やガス交換効率などの新たな植物生理情報を非破壊で評価できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, laser speckle analysis that uses light with strong interference was developed to obtain the information of plant physiology such as response to stress. We proposed a laser speckle method using polarized light and could detect plant responses to water stress at an early stage. This proposed method could evaluate plant surface and inner structure with a single speckle image and would be suitable for usage on the field.

研究分野：農業情報学

キーワード：バイオスペckル 偏光 水ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物体における組織構造変化

データ駆動型農業が具現化されつつある中、栽培植物の環境・生育情報センシングにおいては、植物成長および生産品質向上を強く支配する植物体内での水の動態を把握する必要がある。葉の蒸散と根の吸水の関係より生体内の水分状態は決定され、細胞内膨圧や気孔開度などの植物葉表面の組織構造変化を誘発する。さらに水ストレスが進行すると、原形質剥離や生理活性低下による老化などが起こる。

(2) コヒーレント光による対象の構造把握

研究代表者は、数年来、コヒーレント光の干渉現象を利用するレーザスペckル法による植物生理状態の把握に関する研究を実施している。後述するが、現在進行する研究の副産物として、レーザ光の反射強度が水ストレスの進行と関係することを見出した。光の反射成分は、対象表面が完全な平面の場合は、正反射成分のみ観察されるが、一般の素材表面は必ずミクロな凹凸を有しており、表面粗さを反映する拡散成分が観察される。この理論はすべてコヒーレント光を前提としており、ハロゲンやLEDのインコヒーレント光を光源とする反射や色情報よりも、レーザ光などのコヒーレント光の散乱・反射特性を利用すべきである。

(3) 提案手法の特色

植物の水分状態の計測には、同化箱やポロメータによる蒸散量測定や、プレッシャーチャンバ法による水ポテンシャル計測が一般的である。しかし、前者は設置範囲や環境条件に制限があり、植物体の蒸散反応を計測結果に反映させるには高度な技術を要する。後者は破壊計測が前提となるため現場対応型としては実用性に欠ける。また、代表者が先に取り組みレーザスペckル法では、複数枚の動画をを用いて解析するが、本研究課題の解析は、レーザ光の散乱・反射による干渉画像が1枚あれば解析可能であり、高速処理に適している。また、カメラ画像にて非破壊・非侵襲でとらえるため広範な情報を一括取得可能である。ただし、表面粗さの光計測においては、光源、対象面、受光面の位置、とりわけ角度が重要となる。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題では、植物生理・生育情報において現場要求度が最も高い植物体の水分状態を非破壊・非侵襲かつ広範な2次元画像により把握するため、レーザ光に代表されるコヒーレント光の散乱・反射特性を利用した計測原理の構築に挑戦する。

3. 研究の方法

(1) ダイズ(フクユタカ)を試料とした。計測前日に植物インキュベータから実験室に移動させ順応させた。また、試料移動後から計測終了までメタルハライドランプ(MF400DL/BUDP, 出力400W, 岩倉電気株式会社)を6~18時に点灯させ、室温はエアコンにより25°C前後に保った。実験開始日の9時に灌水し、その後断水することで水ストレスを与えた。

(2) 実験1では、一枚のスペckル画像から植物生理応答を評価するため、スペckルのパターンに着目した画像解析手法を用い、その適用性を評価した。スペckル撮影システムは、半導体レーザ(CPS520, Thorlabs Inc.), CCDカメラ(DCU223C, Thorlabs Inc.), レーザ照射範囲に均一に光を拡散させるためのディファイザ(D1-C20-MD, Thorlabs Inc.)で構成される。スペckル画像は、露光時間100ms, 画像サイズ1024×768pxの設定で1枚撮影した。スペckル画像は濃度共起行列(GLCM)を用いて解析した。

(3) 実験2では、偏光を利用したレーザスペckル法の有効性を評価した。図1に実験系の模式図を示す。光源に半導体レーザ(出力:4.5mW、波長:520nm、CPS520, Thorlabs Inc.)レーザの直後にNDフィルタ、偏光フィルタを設置し入射角10°でS偏光を照射した。撮影には、

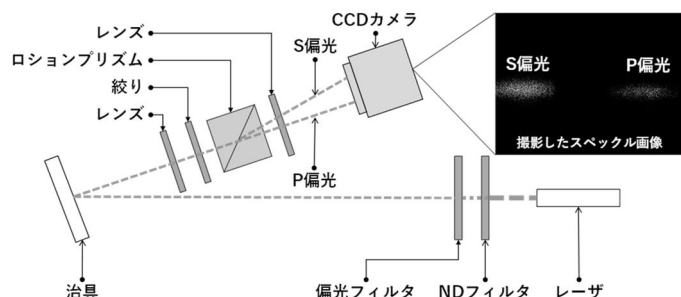


図1 実験系模式図

レンズ (FL:250 mm、100 mm、Thorlabs Inc.) とロシオンプリズム (RPM10、Thorlabs Inc.) を装着した CCD カメラ (DCU223C、Thorlabs Inc.) を用い、治具の法線方向に設置した。ロシオンプリズムで分離した S 偏光 (表面反射光) と P 偏光 (内部拡散光) を露光時間 5 ms で同じ CCD 素子上の異なる領域で同時に撮影した。撮影は 9 時、12 時、15 時に行い、3 日間継続した。

(4) 試料の状態を把握するために、クロロフィル蛍光と水ポテンシャルの植物生理情報を計測した。クロロフィル蛍光は FluorPen (E-FP110/D、PHOTON SYSTEMS INSTRUMENTS) を用いて光化学系 II の実効量子収率である ϕ_{PSII} をスペックル撮影と同時に計測した。葉の水ポテンシャル測定にはプレッシャーチャンバ方式の装置 (Model1505D、PMS instrument company) を用いた。水ポテンシャルの測定は破壊試験となるため、スペックル、クロロフィル蛍光とは別個体で計測した。試料は計測直前まで植物インキュベータもしくは自作の植物工場にて栽培し、葉柄を切断後、装置のチャンバに素早くセットし計測した。

(5) 取得した画像から、S 偏光と P 偏光の領域をそれぞれ 50×50 px でトリミングし解析した。解析には、テクスチャ解析の 1 手法である濃度共起行列 (GLCM) を用いた。まず、特定の位置関係にある 2 つの画素値 i, j の組み合わせが発生した回数 $p(i, j)$ を全画素にわたってカウントし、行列を作成した。その後、GLCM 特徴量として提案されるいくつかの指標を算出した。なお、GLCM 作成時に輝度階調数を 32 に変換し、行列の要素を行列の総和で割り正規化した。

4. 研究成果

(1) 図 2 に水ストレスによる水ポテンシャルの変化と、day0 と day3 の時点でのダイズの様子を示す。水ポテンシャルは day0 から day2 まで変化せず、day3 より減少傾向が確認された。また、day0 から day2 の水ポテンシャルが変化しない期間は外観の変化も見られず、day3 以降は水ポテンシャル低下に伴う萎れなどが確認された。day4 では乾燥によって葉が砕ける個体も観察された。これら、水ポテンシャルの低下および外観の変化より、本実験の手法による水ストレスは適切に付与されたと考えられる。

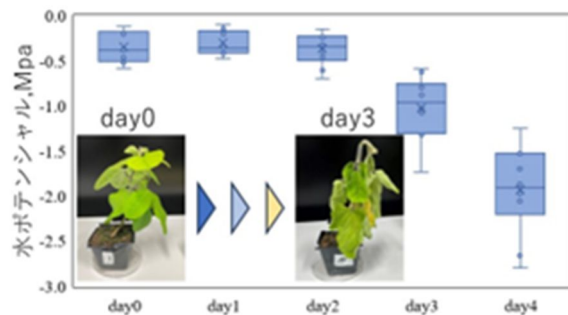


図 2 水ポテンシャルの計測結果

(2) 実験 1 の GLCM の解析では、GLCM 特徴量の f_4 にて、ストレスの進行とともに増加する傾向が確認された。これは、スペックル画像の輝度の組み合わせが多様になっていることを示している。植物葉の表面が平滑化したため表面で反射した光の反射方向は表面が粗い場合に比べて一定になる。そのためカメラの撮像面に入射する光量が増加し、撮像面上で光の干渉が起こる確率が高まることで、複雑なスペックルを形成したと考えられた。

また、クロロフィル蛍光指標と f_4 の相関係数を算出した。量子収率や電子伝達系の状態を反映する指標であるクロロフィル蛍光指標は水ストレスがかかると減少する。 f_4 との相関係数は Fv/Fm では -0.452 、 ϕ_{PS} では -0.678 (それぞれ有意水準 5、1% 以下で有意な相関) となり ϕ_{PS} との方が高い相関を示した。従前の研究によりストレスに対する反応速度が早く、変動しやすいことが示されている ϕ_{PS} との方が高い相関を示したことから f_4 も水ストレスに対して反応しやすい指標であることが示された。また ϕ_{PS} は水ポテンシャルとの相関関係が示されており、 ϕ_{PS} と f_4 の間に水ポテンシャルを第 3 の要因とした間接相関が発生した可能性がある。このことからスペックルはストレスに伴う電子伝達効率の低下などは直接評価できず、水ポテンシャルに強く影響を受ける指標であることが示唆された。

(3) 実験 2 の結果を図 3 に示す。図は、水ストレス区と対照区のクロロフィル蛍光 ϕ_{PSII} とスペックル特徴量 f_2 の結果を示す。 f_2 は day0 の 9 時を 1 として、それぞれ正規化した。水ストレス区は 3 個体の平均値と標準誤差、対照区は 2 個体の平均値を示している。 ϕ_{PSII} は正常な個体で 0.5 程度の値を示し、環境ストレスなどによって光合成電子伝達に異常が生じた場合に減少する指標である¹⁾。 ϕ_{PSII} は day2 より減少し、day3 では急激に減少した。水ストレスが与えられた植物は、体内の水の損失を防ぐために気孔を閉じるため、それに伴う光合成抑制が ϕ_{PSII} 低下の 1 つの要因である²⁾。なお、day3 の 12 時以降は葉が乾燥により割れてしまったため、クロロフィル蛍光の計測は実施できなかった。 f_2 はストレスの進行に伴い増加したが、増加開始のタイミングには違いが見られた。表面反射の f_2 は day3 の 9 時から増加したのに対し、内部拡散の f_2 は day2

の9時と約1日先行していた。このことから、偏光選択によって反射光を分離する本手法を用いることで、水ストレスによる表面および内部の植物生理応答を、それぞれスペックルで検出することができたと考えられる。

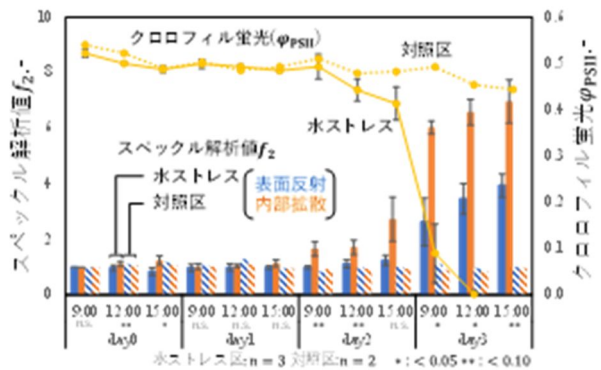


図3 スペックル解析とクロロフィル蛍光の測定結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inagaki Y., S. Nagata, K. Nagasuga, K. Takisawa and T. Fukushima	4. 巻 85(1)
2. 論文標題 Detection of Salinity Stress of Soybean Utilizing the Laser Speckle Method	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. JSAM	6. 最初と最後の頁 41-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inagaki Yohsuke, Akune Rina, Matsuda Ayano, Kuroki Shinichiro, Takisawa Kenji, Fukushima Takashi	4. 巻 64
2. 論文標題 Effect of Chloroplast Movement on Laser Speckle Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transactions of the ASABE	6. 最初と最後の頁 1747 ~ 1754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.13031/trans.14397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲垣陽介, 長田紳, 滝沢憲治, 福島崇志
2. 発表標題 植物葉における水ストレス応答のバイオスペckル解析
3. 学会等名 日本生物環境工学会2022年福岡大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長田紳, 稲垣陽介, 宮田亮介, 滝沢憲治, 福島崇志
2. 発表標題 偏光を選択したレーザスペckルによる植物葉の表面構造評価
3. 学会等名 第80回農業食料工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川雄大, 稲垣陽介, 長田紳, 宮田亮介, 滝沢憲治, 福島崇志
2. 発表標題 ダイズ葉におけるレーザスペックルの波長特性
3. 学会等名 関西農業食料工学会第149回例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮田亮介, 稲垣陽介, 長田紳, 長谷川雄大, 滝沢憲治, 福島崇志
2. 発表標題 GLCMを適用したスペックル画像解析による植物の水ストレス評価
3. 学会等名 関西農業食料工学会第149回例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿久根里奈, 稲垣陽介, 松田綾乃, 滝沢憲治, 福島崇志
2. 発表標題 異なる光干渉下における水ストレス解析方法の検討
3. 学会等名 第79回農業食料工学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田綾乃, 阿久根里奈, 稲垣陽介, 滝沢憲治, 福島崇志
2. 発表標題 ワンショットレーザスペックル法による植物表面構造の評価
3. 学会等名 第79回農業食料工学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長田紳, 稲垣陽介, 松田綾乃, 阿久根里奈, 滝沢憲治, 福島崇志
2. 発表標題 偏光を利用したスペックル画像による水ストレス評価
3. 学会等名 関西農業食料工学会第147回例会
4. 発表年 2022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
---------	---------