

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580355

研究課題名(和文) 近赤外分光イメージングによる植物内水移動可視化システムの開発

研究課題名(英文) A development of near infrared imaging spectroscopy with heavy water to visualise water movement in plants

研究代表者

松嶋 卯月 (MATSUSHIMA, Uzuki)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：70315464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：重水は水と化学的性質が似ており植物体の根から良く吸収されるため、植物水分生理を研究するとき良くトレーサとして用いられる。一方、近赤外線には、水に吸収されるが重水にほとんど吸収されない波長帯があり、それを利用し、近赤外分光イメージングと重水トレーサを組み合わせることで、葉、茎、根など植物体内における水移動を可視化できる。本研究では、植物体内における水移動を巨視的、微視的に可視化する方法を確立し、あわせて、本イメージング法用のユーザーインターフェイスを開発した。

研究成果の概要(英文)：Because the chemical characteristics is similar to water, deuterium oxide (D2O) we ll up-taken in plants can be a good tracer to study plant water relations. At a specific near infrared waveband, near-infrared is absorbed not by D2O but by water. Therefore, a combination of near-infrared imaging and D2O tracer provides a method observing water movement in plants. In this study, we established macroscopic and microscopic visualization methods to investigate water movement in plants. We also developed an user interface for this novel method.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学，農業情報工学

キーワード：植物水分生理 蒸散 可視化情報

### 1. 研究開始当初の背景

植物生理学や園芸学分野において、ほ場や実験室で使えて簡易に扱える水移動可視化装置の需要は高い。植物内における水移動可視化の研究は、MR イメージング (Manzら 2005 他) および中性子イメージング (松嶋ら 2009 他) を用いて行われているが、それら方法は特殊かつ高価な機材を必要とするため植物水分生理分野に広く応用されるには至っていないのが現状である。すなわち、汎用性が高く小型、かつ簡易に水移動を可視化できる装置が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、近赤外分光イメージングおよび重水トレーサを用いて、ミクロレベルからマクロレベルにおける植物体内の水の流れを可視化することとした。まず、植物の根、茎、葉各部位における水の流れの可視化技術を確立し、さらに、既存の中性子イメージングや MR イメージングの空間分解能では観察することが難しい植物細胞内への水の流れの可視化を試みた。また、新たな水移動可視化ツールとして提供することをふまえ、ユーザーインターフェイスの開発もあわせて目的とした。

### 3. 研究の方法

重水 ( $D_2O$ ) は水 ( $H_2O$ ) と化学的性質が似ており植物体の根から良く吸収されるため、トレーサ等として用いられる。一方 1450 nm 付近の近赤外線は、水に吸収されるが重水にほとんど吸収されない。すなわち、近赤外分光イメージングと重水トレーサを組み合わせることで、葉、茎、根など植物体内における水移動を可視化することができる。

#### (1) 根系による重水、水の吸収速度

水と重水、例えば、モル質量において水は 18 g/mol、重水は 20 g/mol と 2 g/mol の差がある。重水を植物内水移動のトレーサとして用いるためには、質量や結合角など重水と水の化学的性質の差が、植物の根系による水あるいは重水の吸収にどのような差となって現れるのかを、あらかじめ明らかにしておく必要がある。そこで、イネによる水および重水の吸収速度の差について検討した。

供試植物として、イネ (*Oryza sativa*)、'ひとめぼれ' を用いた。個体差をなくすため、根を 2 本のみ残して栽培したイネのそれぞれ左右の根を水および重水を充填した内径 3.6 mm、長さ 17.5 cm のガラス管に浸漬した。1 時間ごとに 4 回、ガラス管の水および重水の水位を測定した。その後試料を 2 つの処理区に分け、試料の片方を直ちに、もう片方を 12 時間後に、根を浸漬した液体を逆にした。この過程を以下反転と呼ぶ。その後は 1 時間ごとに 4 回、ガラス管の水および重水の水位を測定した。実験中には、

室温、湿度を測定し、実験終了後には根の質量を測定した。

#### (2) マクロレベルにおける水移動可視化

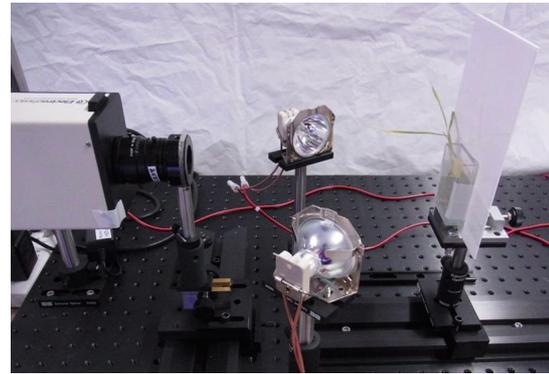


図 1: 明視野照明系における器材の配置。

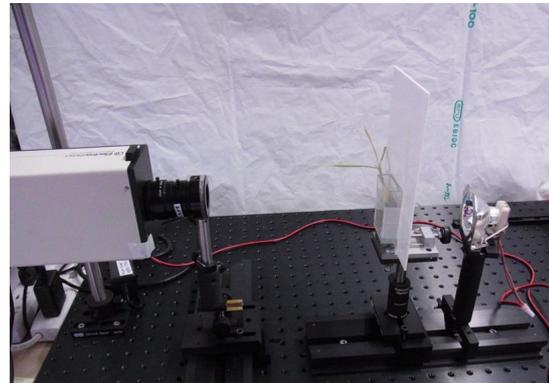


図 2: 暗視野照明系における器材の配置。

400 nm から 1700 nm の波長帯に感度を持つビジコンカメラ (Micron Viewer, MODEL 7290A) には、近赤外域に透過性があるレンズを組み合わせ近赤外線画像を撮影した。水の吸収帯である 1450 nm 付近の画像を撮影するために、カメラ撮像素子とレンズの間に近赤外バンドパスフィルタ (Cheshire Optical, 1450.0 IF 12) を挿入した。光源には 100W の近赤外光源 2 灯を用いた。本研究では、明視野照明、暗視野照明の 2 種類の照明系における画像を比較検討した。明視野照明系では、近赤外光源から照射された光は植物で反射し、1450 nm の光のみ通す近赤外線バンドパスフィルタを介して、近赤外線カメラに入射する。光源と植物試料の距離を 16 cm、光源と植物試料の角度を 45° とした。また、カメラと植物試料の距離は 24 cm とした。図 1 に明視野照明系における器材の配置を示す。

暗視野照明系は、光源から試料の距離を 8 cm、植物試料からカメラの距離を 22.5 cm に設定した。近赤外光源から照射された光は植物を透過し、1450 nm の光のみ通す近赤外線バンドパスフィルタを介して、近赤外線カメラに入射する。光源を直接植物試料に照射した画像は、光の照度が著しく不均一で一部でコントラストが高すぎた。そこで、光の照度を均一にするためにディフ

ユーザを設置した．図 2 に暗視野照明系の器材の配置を示す．

供試植物として，イネ(*Oryza sativa*)，'ひとめぼれ'を用い，栽培培地には近赤外線を透過するガラスビーズを用いた．ガラスビーズは高さ 6 cm，幅 4 cm，奥行 1.5 cm の透明アクリル容器に充填し，その中でイネを栽培した．

### (3)ミクロレベルにおける水移動可視化

400 nm から 1700 nm の波長帯に感度を持つビジコンカメラに近赤外域に透過性がある 10 倍対物レンズを接続した．光源には 100W の近赤外光源 1 灯を用い，暗視野照明はフライアイレンズ 2 枚からなるインテグレート光学系とした．植物試料としてシロイヌナズナを用いた．シロイヌナズナの根系は，試料ステージに固定したプレパラート上に載せ，側部からさらにプレパラートで固定した．図 3 に顕微観察用の暗視野照明系における器材の配置を示す．

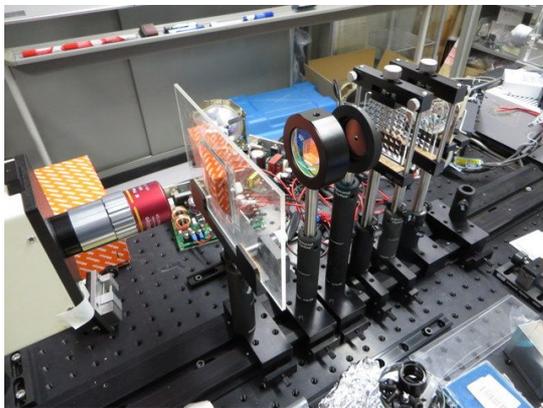


図 3：顕微観察用の暗視野照明系における器材の配置．

## 4．研究成果

### (1)根系による重水，水の吸収速度

反転を行う前における根による平均の吸収速度は，水は  $0.077 \text{ ml/root h}^{-1}$  であり，重水は  $0.054 \text{ ml/root h}^{-1}$  であり，水は重水の約 1.4 倍の吸収速度を示した．一対標本  $t$  検定を行った結果， $p$  値は約 0.005 となり，1% の棄却域で水および重水の吸収速度には有意な差があった．また，初回の実験の 12 時間後に反転した実験区における植物の平均吸収速度は，水が  $0.055 \text{ ml/root h}^{-1}$ ，重水は  $0.034 \text{ ml/root h}^{-1}$  となり，水は重水の約 1.6 倍の吸収速度を示した．一対標本  $t$  検定を行った結果， $p$  値は約 0.017 となり，5% の棄却域で水および重水の吸収速度には有意な差があった．初回の実験直後に反転した区における平均の吸収速度は，水は  $0.058 \text{ ml/root h}^{-1}$ ，重水は  $0.064 \text{ ml/root h}^{-1}$  であった．一対標本  $t$  検定を行った結果， $p$  値は約 0.353 となり，有意な差は見られなかった．以上のことから，植物による重水の吸収速度は，水を吸収する場合の速度より遅いことが明らかになった．この植物における水と重水の吸収速度の差は，重水トレーサを

用いるときに考慮する必要がある．

### (2)マクロレベルにおける水移動可視化

試作した明視野照明系および暗視野照明系で撮影した画像には，時間経過に伴って植物が重水を吸収することで，各葉および根に輝度値の増加が見られた．すなわち，近赤外分光イメージングと重水トレーサを用いて植物内部の水移動を可視化することが可能であった．

本撮像系で 1951 USAF テストターゲットを撮影し，得られた画像の解像度を評価した．明視野照明系による撮影で得られた画像の空間周波数は 1.26 本/mm となり，グループ数 0，ライン数 2 まで判別可能な空間分解能があった．その波長を求めると，約 0.8 となり，0.8 mm 程度の大きさの物体を判別可能であった．

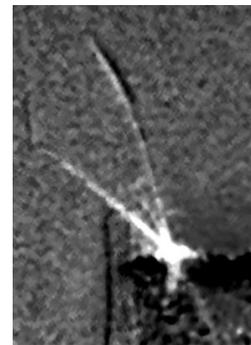


図 4：輝度値の比を表す画像の例．

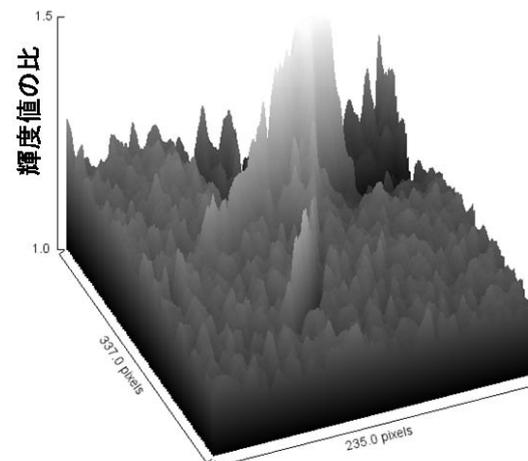


図 5：輝度値の比を 3 次元で表した画像．

吸収された重水を可視化および評価する方法として，重水吸収前の輝度値を，重水吸収後の輝度値で除した輝度値の比を用いた．植物に重水トレーサを供給したとき，重水吸収前の植物は吸光度が高く，植物を透過する光量は少なく，重水吸収後は逆に透過する光量が多くなる．すなわち輝度値の比は，重水吸収による吸光度の変化を表す値である．図 4 に輝度値の比を表した画像を示す．画像中における灰色の濃度は重水吸収前から重水吸収後における輝度値の比の変化を示す．靱や葉や根など，白色が強い部分は，植物に重水が吸収されたこと

で赤外線透過度が増加し、輝度値が増加したことを表す。図5に図4の輝度値の比を3次元で表したグラフを示す。重水を吸収し、吸光度が低くなったところは、比の値が1より大きくなった。

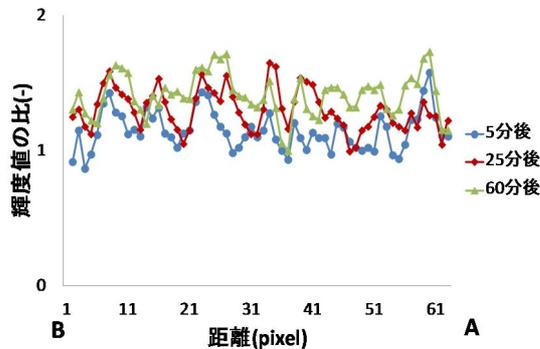


図6：明視野照明系画像における根の輝度値プロファイル

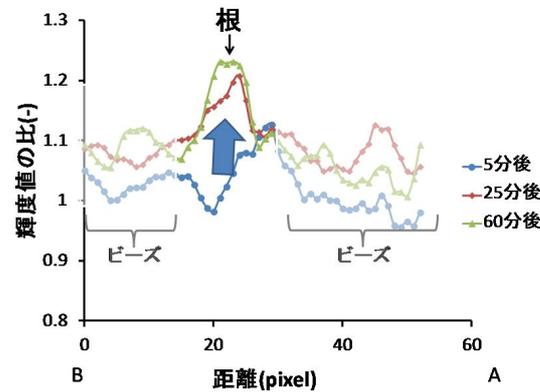


図7：暗視野照明系画像における根の輝度値プロファイル

図6、図7にそれぞれ、明視野照明系、暗視野照明系における根の輝度値プロファイルを示す。明視野照明系画像では、根における輝度値の比は、5分後、25分後、60分後と全て1から2程度であった。時間経過に伴った輝度値の比が上昇する様子は見られず、イネ根系における重水吸収の様子を観察することは困難であった。それに対して、暗視野照明系画像では根における輝度値の比は、5分後は約1だったが、25分後、60分後は約1.2に上昇し、時間経過に伴い輝度値の比の上昇が確認された。すなわち、根系における重水吸収を観察するには、暗視野照明系を用いた方が透過度の差が明確に示された。

図8、図9にそれぞれ、明視野照明系画像、暗視野照明系画像における主茎葉鞘の輝度値プロファイルを示す。明視野照明系画像では、葉の時間経過における輝度値の比は5分後で約1、25分後で約2、60分後で約4に増加した、葉の任意断面における輝度値の比は最も初側に近い断面において

葉に相当する部位の輝度値の比が約3、最も葉の先端側に近い断面における葉に相当する部位の輝度値の比は約0であった。それに対して、暗視野照明系画像では、葉の時間経過における輝度値の比は5分後で約1、25分後で約1.5、60分後で約2であり、葉の複数断面における輝度値の比は、最も初側に近い断面における葉に相当する部位の輝度値の比が約2.3、最も葉の先端側に近い断面において葉に相当する部位の輝度値の比は約1.2となった。以上のことから、暗視野照明系画像と比較して、明視野照明系画像は輝度値の比の変化の差が大きく、明視野照明系での撮像の方が葉における重水吸収の様子や、葉の中における輝度値の比の勾配を観察することが容易であった。

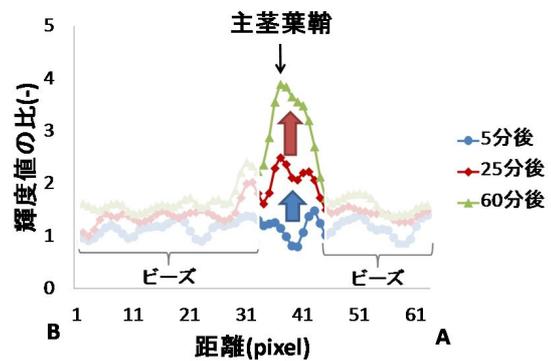


図8：明視野照明系画像における主茎葉鞘の輝度値プロファイル

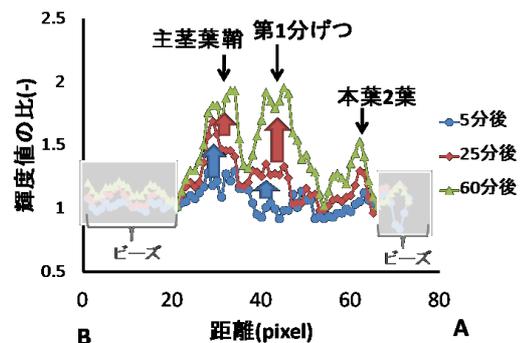


図9：暗視野照明系画像における主茎葉鞘の輝度値プロファイル

(3)ミクロレベルにおける水移動可視化  
構成した照明光学系では均一な照明、および、試料の透過画像を観察するために十分な視野の明るさが得られた。本撮像系で1951 USAF テストターゲットを撮影し、得られた画像の解像度を評価した結果、空間周波数は16本/mm程度となり、根の直径が0.1mm程度であるシロイヌナズナ根系を観察するのに十分な空間分解能を得た。その根系の中央を観察領域として約100分間連続画像を撮影したところ、その連続画像間に大きな変化は現れなかった。続いて、根系下部の約1/3をトレーサ供給域として

重水を供給し、それより上部に位置する観察領域における連続画像を撮影した。図 10 にシロイヌナズナ根系における重水吸収による画素値増加を示す。観察領域内の上の根における画素値は時間の経過と共に上昇し、根が重水トレーサを吸収したことで根系を透過する近赤外線が増加したことが確認された。すなわち、重水をトレーサとすることでシロイヌナズナ根系における水移動を可視化することが可能であった。前述の方法に加えてトレーサ供給域のみを温度約 9℃ に冷却する実験を行った。観察領域内では、根周囲の領域のみで画素値が徐々に上昇し、根の領域における画素値は変化しなかった。これは、近赤外線を透過する重水トレーサは観察領域の根には到達せず、観察領域における根周囲の水が減少し近赤外線の透過度が増したことを示す。すなわち、低温下にあるトレーサ供給域では根の活動が低下し重水の吸収が妨げられたが、一方、観察領域では常温に置かれたことで、活動を続ける根系が周囲の水を吸収したと考えられた。

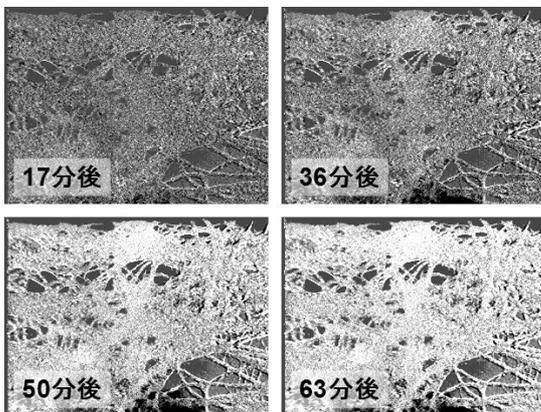


図 10: シロイヌナズナ根系における重水吸収による画素値増加

#### (4) ユーザーインターフェースの開発

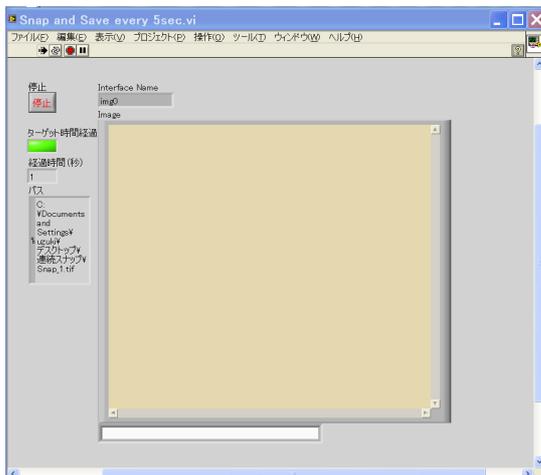


図 11: 連続撮影用ソフトウェア

ユーザー用の画像取得ソフトウェア開発は、近赤外カメラの画像をユーザー任意の

間隔で連続的に撮影するソフトウェア(図 11), および、撮影した画像にコンポジット等の画像処理を加えるソフトウェアを開発した(図 12)。両ソフトウェアを使用することで、ビジコンカメラでの撮影や画像処理に不慣れな実験者でも、容易に近赤外イメージングを行うことが可能であった。

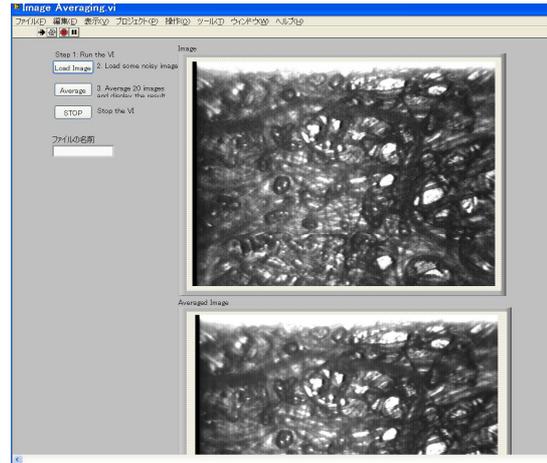


図 12: 画像処理用ソフトウェア

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

松嶋卯月, 庄野浩資, 温度が植物内水移動に与える影響を可視化する新技術 - 重水トレーサを用いた近赤外分光イメージング - , 第 59 回低温生物工学会大会 2014.6.28-6.29 日, 九州大学

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松嶋卯月 (MATSUSHIMA, Uzuki)  
岩手大学・農学部・准教授  
研究者番号: 70315464

##### (2) 研究分担者

庄野浩資 (SHONO, Hiroshi)  
岩手大学・農学部・准教授  
研究者番号: 90235721