

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656256

研究課題名(和文) 超短時間蛍光寿命を指標とする植物生理活性度のレーザー遠隔計測法

研究課題名(英文) Remote monitoring technique of plant activity using laser-induced fluorescence lifetime measurement method

研究代表者

齊藤 保典 (SAITO, Yasunori)

信州大学・工学部・教授

研究者番号：40135166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：植物を短パルスレーザーで照射した時に発する蛍光の時間変化を計測する「蛍光寿命遠隔計測システム」を構築した。有効性確認として、植物葉の「水ストレス」実験、「塩ストレス」実験、「太陽照度変化の蛍光寿命への影響」について、屋外観測実験を行った。

レッドロビン葉では、水ストレスが強くなるほど蛍光寿命が延びた。レタス葉では、塩ストレスの影響が現れなかった。プラタナス葉では、日向生育葉が日陰生育葉よりも蛍光寿命が大きく、太陽照度と逆相関を示した。以上、1) 短時間蛍光寿命は植物生理情報を含む、2) 生育ストレスの種類により蛍光寿命への影響の程度は異なる、3) 開発したシステムは有効である、事を示している。

研究成果の概要(英文)：We have developed a laser-induced fluorescence lifetime (LIFL) monitoring system for getting better understandings of plant's physiological activity. Using this system, fluorescence lifetime measurement of several plant leaves was made. Leaves of RedRobin grown in water-stress condition showed that the fluorescence lifetime was lengthen comparing with that of control leaves. There was no difference of lifetime between lettuce leaves grown in control and salt stress condition. Fluorescence lifetime of plane tree leaves at sunny place was longer than that at shade place, and the lifetime was minimum at 13:00 when the solar radiation was high.

Experiment results confirmed that fluorescence lifetime of plant leaves was a good index to understand plant's physiological activity, and the developed LIFL monitoring system was a powerful apparatus for this purpose.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・計測工学

キーワード：植物計測 生理情報 レーザ誘起蛍光 蛍光寿命 ライダー 遠隔計測

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 位置づけ: 二酸化炭素固定、食糧供給源、生物多様性等、植物が果たす役割の重要性を再認識する時期を迎えている。環境保全型で持続可能な社会を構築していく観点からは、植物機能を積極的に取り入れた技術開発が、将来必ずや必要とされる。そのためにはまず、これらの植物生理情報を精密に計測し評価する手法・技術・システムの開発が必須である。従来のサンプリングや化学的な破壊薬品処理に代わる、生育現場で“生”の情報を直接収集し評価が可能な手法が求められている。

(2) 国内外の研究動向: 植物蛍光スペクトル遠隔計測が、LURE と PHASE( 仏)、LUND( 瑞)、IROE( 伊)、信州大( 申請者ら)で行なわれた。上位機能としての光合成活動評価が可能な蛍光寿命計測技術の開発は、LURE と PHASE が先導的であったが、研究者の移動により現在中止されている。

(3) 着想の経緯: 研究代表者は客員研究員として LURE に滞在する機会を得、ナノ秒以下の短時間蛍光寿命計測技術が、植物生理情報収集において将来の強力な計測ツールになりうることを確信した。実現に向けた研究を新規に提案する時期を迎えた。

## 2. 研究の目的

最終目標を「地球環境要素としての植物機能の役割解明」におき、申請年度内の研究目的を「超短時間蛍光寿命を指標とする植物生理活性度のレーザ遠隔計測法」の提案と実証試験とする。

植物が生命維持に不要な余剰エネルギーの散逸過程により生じる蛍光(寿命)を生理機能の指標とする提案と、蛍光寿命遠隔計測技術の開発によるフィールド観測を通しての提案実証試験を行う。

前者は(環境設定型)室内実験での基礎データ(短時間蛍光寿命と植物生理機能(主として光合成)の関係)の収集とその指標作り、後者ではフィールド計測システムの自主開発と、自然環境下で生育中の樹木を対象としたフィールド計測により、提案手法の実証を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) 提案手法の原理確認実験: 植物固有の生理機能である光合成を特に取り上げ「実時間蛍光寿命が光合成活性度の情報を含むか?」の原理確認室内実験を行う。植物生葉をピコ秒レーザで励起し、光合成分子クロロフィルからの蛍光スペクトルをストリークカメラで計測する。生育環境変化による蛍光寿命への影響を調査する。

(2) フィールド観測による提案手法の有効性・実用性評価実験: 「蛍光寿命レーザ遠隔計測システム」を自主製作し「屋外生育植物を対象とする光合成活性度観測実験」を行う。特に盛夏時の太陽天頂高度時刻、晩秋から初冬にかけての乾燥時期でのフィールド観測を実行し、本研究提案手法の優位性と、開発システムの有効性・実用性・将来性を評価する。

## 4. 研究成果

(1) 平成 24 年度(初年度)課題「提案手法の原理確認実験: 実時間蛍光寿命が光合成活性度の情報を含むか?」

### 原理検証のための実験装置の構築

500ps-1ns 程度と推定される植物葉クロロフィル蛍光寿命を、確実に計測可能な高速応答特性を有する実験装置の構築を目標とした。

ハードウェア構成は、パルス YAG レーザ(40ps、532nm、1mJ、20Hz)、ストリークスコープ受光分光器(時間分解能 30ps、検出波長域 200-850nm、波長分解能 3.6nm)からなる。測定系の理論的時間分解能は  $50\text{ps} = \left( (\text{信号源のパルス幅})^2 + (\text{受信系の時間分解能})^2 \right)^{1/2} = (40^2 + 30^2)^{1/2}$  と見積もられ、推定蛍光寿命よりも十分短い。蛍光寿命算出には、ストリークスコープに付随のプログラム TA-Fit を用いた。

### 植物生葉を用いた原理検証実験

学内に自生しているレッドロビン葉を採取して実験に用いた。レッドロビンは、新芽時期には葉が真っ赤で成長すると緑色に変化することから、葉の色層変化に伴う光合成活動変化の情報が得られる可能性がある事、生垣用の植栽中として人気があり、私達の生活環境構成の一要素として受け入れられていること、そのため入手が可能であること、などの理由で選ばれた。

自生しているレッドロビン葉(4枚)を採集した後、温湿度ほぼ一定の室内に放置し、自然枯死過程で蛍光寿命に変化が生じるかの実験を試みた。レーザ遠隔計測のシミュレーションとするため、レーザを反射ミラーで折り返すことで、(室内に置かれた)葉までの距離を約 40m 確保した。

結果を図 1 に示す。採集後の放置時間が長いほど蛍光寿命が長くなった(採取直後の 2~4 倍)。また日数の経過と共に計測値にばらつきが大きくなった。前者は(次年度の実験で明らかになることではあるが)水ストレス(脱水)の影響と思われる。蛍光強度は、大まかに指数関数で変化しており、吸収の逆の表現でモデリングできる。植物短時間蛍光寿命を指標として、植物枯死過程の推定ができると思われる。後者は同時期に生育した同種の葉でもストレスの出方が異なることを意味

しており、蛍光寿命を指標として、植物個々の生理情報取得の可能性が示された。ちなみに、採集7日後の4枚の葉色が緑黄赤黒へ変化するほど蛍光寿命が長くなった。

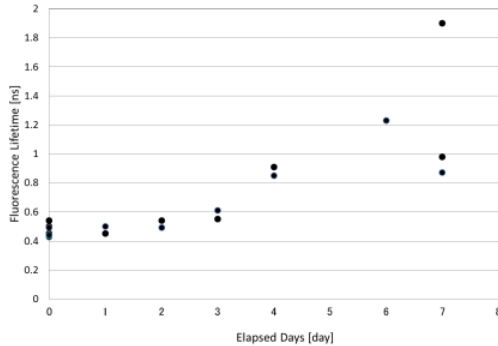


図1 採集後の経過日による蛍光寿命の変化

(2)平成25年度(最終年度)課題「フィールド観測による提案手法の評価実験: 蛍光寿命レーザ遠隔計測結果への指標適応」

蛍光寿命レーザ遠隔計測システムの開発  
開発したシステムを図2に示す。遠隔計測による受信蛍光量の減少を推定して、原理確認実験装置のストリークスコープ受光分光器を、より高感度な光電子増倍管に変更した。光電子増倍管はマルチチャンネルプレート型の高速度応答(立ち上がり時間 185ps)のものを選んで使用した。蛍光収集には直径 11cmの望遠鏡を用いた。光電子増倍管を用いたことで、小型の望遠鏡でも、蛍光信号を捕える事が出来るようになった。蛍光分光部では、平成24年度での実験により、クロロフィル蛍光が 685nm と 740nm にスペクトルのピークを持つことが分かっていたため、両方の蛍光検出が可能で 2チャンネル同時分光光学系を組んだ。さらに、測定系の装置関数の蛍光波形への補正を行うため、励起レーザ波形の計測も可能にした。光電子増倍管からの信号は高速オシロスコープ(帯域 8GHz)で計測される。測定系の理論的時間分解能は  $227\text{ps} = \sqrt{((\text{信号源のパルス幅})^2 + (\text{検出器の立ち上がり時間})^2 + (\text{処理器の立ち上がり時間})^2)} = \sqrt{(40^2 + 185^2 + 125^2)}$  と見積もられ、原理確認実験で得られた蛍光寿命よりも短いものが開発された。

蛍光寿命計測ソフトウェアを新たに作成した。励起パルスが有限の時間幅を持つ事を考慮して、ガウス・デザイル法による畳込み積分とシステムの装置応答関数の補正が可能なアルゴリズムを導入した。真の蛍光波形は蛍光寿命を  $\tau_f$  とすると次式で表される。

$$I(t) = \int_{t'=0}^t P(t')e^{-(t-t')/\tau_f} dt'$$

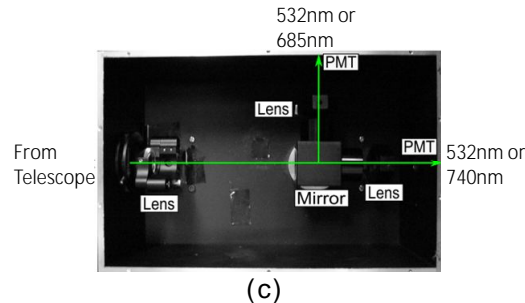
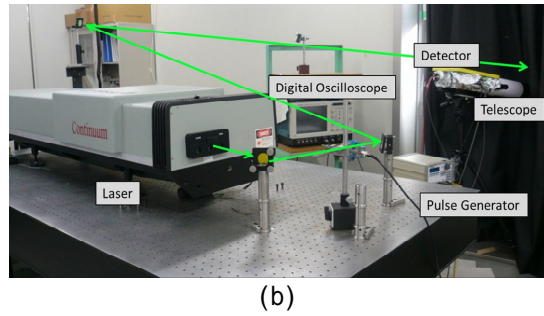
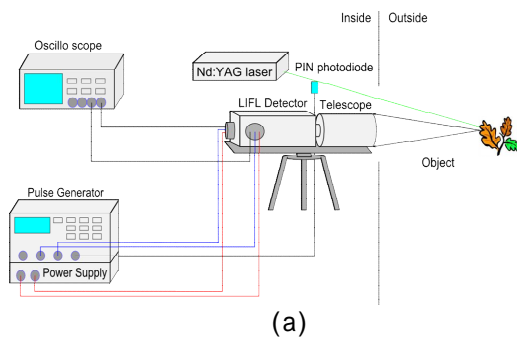


図2 開発した蛍光寿命レーザ遠隔計測システム: (a)構成図、(b)システム全形写真、(c)2チャンネル同時分光光学系の写真

ここで  $I(t)$  と  $P(t)$  は装置応答関数を含んでおり、装置応答関数は励起パルスの葉からの反射光より実験値として求める(図2の 532nm)。式において未知のパラメータは  $\tau_f$  のみであるため、 $\tau_f$  を変化させて右辺を計算し、計測された蛍光波形を最も良く再現した  $\tau_f$  を蛍光寿命とした。

各種生育条件が蛍光寿命へ及ぼす影響の屋外計測実験

-1 水分条件が植物蛍光寿命に及ぼす影響  
原理検証実験と同様の実験を行った。採集したレッドロビン葉で、水分供給の(コントロール)生葉と水分供給しない(水ストレス)葉を、システムから 20m 離れた屋外に配置し、蛍光寿命の違いのレーザ遠隔計測を行った。

実験結果を図3に示す。コントロール生葉の蛍光寿命は採取日から8日経過しても変化がなかった。一方水ストレス葉は、4日までは変化が見られなかったが8日経過後には、685nm と 740nm どちらの蛍光波長においても

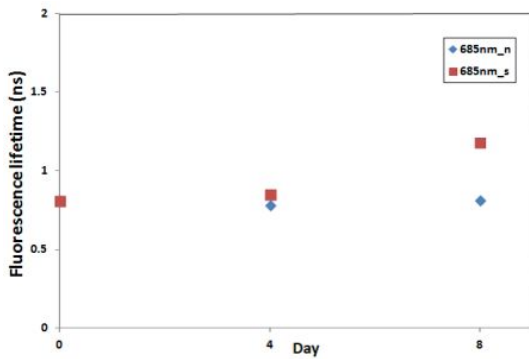


図 3 水ストレスの及ぼす蛍光寿命への影響 (685nm の例); (コントロール葉) (水ストレス葉)

増加した。それぞれ増加率は 46%、30%であった。

考察として、4 日目から水ストレスの影響が現れたこと、および経過日数による形状変化が図 1 と似たようになったことから、脱水による自然枯死過程が現れたものと考えている。740nm 蛍光は 685nm 蛍光の再吸収による蛍光であるため、クロロフィル蛍光における直接的な光化学反応系の 685nm で、その効果が大きかったものと思われる。このように、植物蛍光寿命には光合成に関する生理情報が含まれる事がわかった。

#### -2 栽培条件 (塩ストレス) が植物蛍光寿命に及ぼす影響

通常水で栽培した (コントロール) レタス生葉と塩分水中で栽培した (塩ストレス) レタス生葉を、システムから 20m 離れた屋外に配置し、蛍光寿命のレーザ遠隔計測を行った。レタスは、水耕栽培と LED 照明からなる野菜栽培器を用いた。

実験結果を図 4 に示す。塩ストレス以前 (1 月 24 日、27 日) には全く差が見られない。塩ストレスは 1 月 27 日から与えたが、直後の実験と 1 日後では、蛍光寿命に差は見られなかった。塩ストレス付加 4 日目では、コン

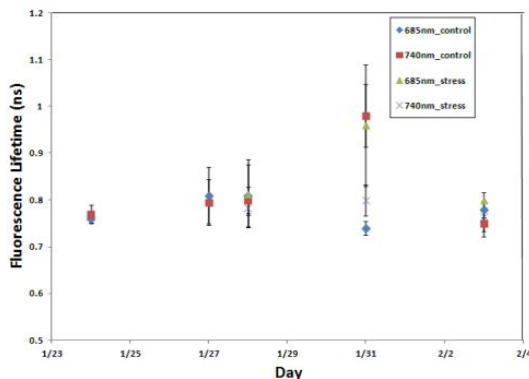


図 4 塩ストレスの及ぼす蛍光寿命への影響; (コントロール葉) × (水ストレス葉)

トロール生葉での蛍光寿命が増大したが標準偏差が大きく、その範囲内では差が見られなかった。8 日後においても差が見られなかった。クロロフィル濃度と相関を持つとされる SPAD 値は、コントロール生葉で 20% の増加、塩ストレス生葉では 32% の増加であったが、増加の影響は蛍光寿命に反映されなかった。

考察として、レタス葉はレッドロビン葉と比較して肉厚が薄くまた色 (クロロフィル濃度を反映する) も薄いことから、蛍光寿命変化の計測が困難な種類ではないかと思われる。計測値の標準偏差が大きい事に関しては、屋外計測時の風の影響と推察している。蛍光波形は 100 パルスの平均値として与えられるが、風の影響で葉が動く (しなる) と蛍光波形のピーク時間が異なる。例えば、1cm の距離の変化は時間変化として 33ps に対応する。この確認のため比較的強い風の状況下で行った時の、蛍光パルス 1 個毎の波計を図 5 に示す。ピーク位置が時間的にばらついているのが確認された。ピーク値の異なる波形の平均は、測定される蛍光パルス波形の時間波幅を増大させることになり、解析後の蛍光寿命は大きく (長く) なる。

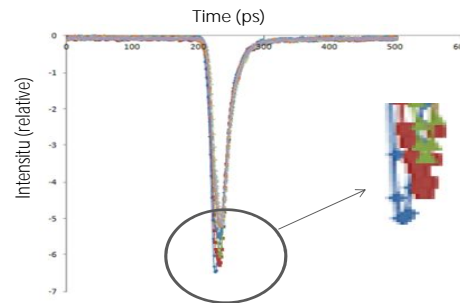


図 5 蛍光寿命波計例 (拡大図では波形毎にピーク時間が変わっている)

塩ストレス検出は農業において関心が高く、蛍光寿命計測法の実用的な展開においては大変興味のある分野である。現時点では、期待したほどの成果が出ていないが、課題点を明確にして継続していく予定である。

#### -3 太陽光照度の植物蛍光寿命に及ぼす影響

光合成活動にとって太陽光の存在は必須項目である。光照度状況に応じて光合成活動が変化するのであれば、光合成反応を担うクロロフィル分子の蛍光反応も光照度により影響を受けるはずである。蛍光現象は直接的な光合成情報を提供する事が期待される。計測は、システムから 20m 離れた自然生育のプラタナス生葉を対象に行われた。太陽光照度の直接的な影響を調査するため、プラタナス上部の太陽光を直接受ける (日向) 生葉と、下部の日陰生葉を選んだ。

結果を図6に示す。クロロフィル蛍光の685nmと740nmのどちらの蛍光寿命も、日向生葉が高い値を示した。また時間変化に注目すると、特に日向葉では太陽照度が最も強い13:00時に蛍光寿命が最小値となった(逆相関)。日陰生葉の685nmでもその傾向が伺える。日向・日陰であることや太陽光照射度の変化が、蛍光寿命に反映されることが実証された。蛍光寿命計測が、光合成活動に関する情報を遠隔的に非接触・非破壊で取得できる意味は非常に大きい。

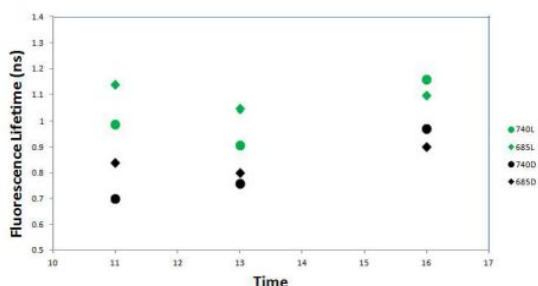


図6 日向生葉と日陰生葉の蛍光寿命の比較結果

#### -4 蛍光寿命の日中変化計測

日向生葉の蛍光寿命変化が顕著であったことから、プラタナス日向生葉の一日における蛍光寿命変化の観測を行った。結果を図7に示す。図6と比較して、蛍光寿命が短い、太陽照度との関係性が低い(変化が少ない)、という結果となった。光合成の照度条件である「補償点」と「光飽和点」が関与していると考えているが、事例をさらに増やす必要があり、今後も継続する予定である。

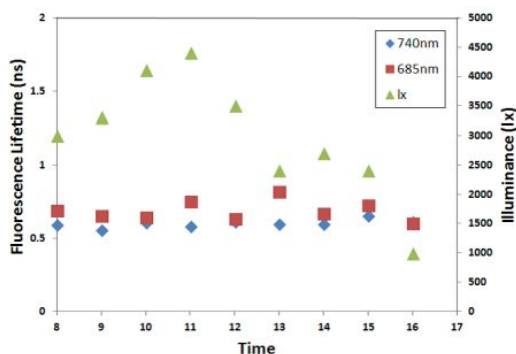


図7 日向生葉蛍光寿命の日中変化

### (3)まとめ

提案手法の原理確認室内実験を行った。

1. 理論時間分解能が50psの高速応答特性を有する、短時間蛍光寿命計測装置を開発した。
2. 採取したレッドロビン葉を用いて室内実験を行った。
  - ・クロロフィル蛍光スペクトルは685nmと740nmに特徴的なピーク値を持つ。
  - ・クロロフィル蛍光寿命は、枯死過程の進行につれて値が大きくなる。
3. 植物の短時間蛍光寿命には植物生理情報

が含まれる事を実証した。

フィールド観測による提案手法の評価実験を行った。

1. 蛍光寿命レーザ遠隔計測システムの開発を行った。

- ・理論的時間分解能227psの応答特性を有し、クロロフィル蛍光の685nmと740nmの蛍光寿命計測が可能な短時間蛍光寿命装置を開発した。

- ・蛍光寿命解析のために、真の蛍光減衰関数とインパルス入力の畳み込み積分が可能なプログラム、および装置関数の補正を行うプログラムを作成した。

- ・市販のストリークスコープを用いた比較実験により、開発したシステムの有効性を確認した。

2. 各種条件が異なる植物を用いて、フィールド蛍光寿命計測を実施した。

- ・レッドロビン葉では、水分ストレスの影響を受け、蛍光寿命が30-46%長くなった。

- ・レタス生葉では、塩ストレスによる蛍光寿命変化を検知することはできなかった。

- ・プラタナス生葉では、日向生葉が日陰生葉よりも蛍光寿命が長かった。また日照条件と逆相関の関係を示した。

- ・プラタナス生葉では、日中における蛍光寿命の時間変化を検知できなかった。

以上の研究成果を総合的に判断すると、申請年度内の研究目的である「超短時間蛍光寿命を指標とする植物生理活性度のレーザ遠隔計測法の提案と実証試験」は、確実に達成されたと考えている。

今後の課題は、観測事例を蓄積し、蛍光寿命をより実用性の高い指標として利用可能にすることである。

本研究の継続により、最終目標である「地球環境要素としての植物機能の役割解明」が達成できる見通しを得た。

### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計6件)

梅田 隼、石田純也、大谷武志、小林一樹、斉藤保典、クロロフィル蛍光寿命計測ライダーの性能評価実験、22p-D-1、平成25年度応用物理学会 北陸・信越支部学術講演会、2013年11月22日~23日、金沢工業大学扇が丘キャンパス(野々市市)  
斉藤保典、小林一樹、オプティカルファームिंगのためのICT融合型光センシングシステム、2A3-2、SICE第30回センシングフォーラム、2013年8月29日~30日、信州大学繊維学部(上田市)  
Yasunori Saito, Kazuki Kobayashi, Proposal of Optical Farming -Development of several optical sensing

instruments for agricultural use-,  
SeTB2-6, SeTBio, April 23-24, 2013,  
Pacifico Yokohama (Yokohama City)

大竹隆平、石田純也、大谷武志、小林一樹、齋藤保典、クロロフィル蛍光寿命計測  
ライダーの植物診断への有用性調査実験、  
17a-D-7、平成 24 年度応用物理学会 北  
陸・信越支部学術講演会、2012 年 11 月 16  
日～17 日、富山県民会館（富山市）  
石田純也、大竹隆平、大谷武志、小林一樹、齋藤保典、植物生育診断用蛍光寿命計  
測ライダーの動作評価、PB-3、第 30 回レ  
ーザセンシングシンポジウム、2012 年 9  
月 6 日～7 日、オリビアン小豆島（香川県  
小豆郡）

Yasunori Saito, Kazuki Kobayashi,  
Takeshi Ootani, Multi-Element  
Monitoring of Livingsphere with  
Laser-induced Fluorescence Spectrum  
(LIFS) Lidar, S1P-58, 26th ILRC, June  
25-29, 2012, Porto Heli, Greece

〔図書〕(計 1 件)

Yasunori Saito, Plant and Vegetation  
Monitoring Using Laser-Induced  
Fluorescence Spectroscopy, Chapter 6,  
in Industrial Application of Laser  
Remote Sensing, edited T. Fukuchi and T.  
Shiina, Bentham Science Publishers, pp.  
94-114, 2012

〔その他〕

齋藤・小林・富田研究室ホームページ・生葉  
植物生理活性診断のための蛍光寿命計測ラ  
イダーの開発 [http://kankyuu.cs.shinshu-u  
.ac.jp/](http://kankyuu.cs.shinshu-u.ac.jp/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 保典 (SAITO, Yasunori)  
信州大学・工学部・教授  
研究者番号：4 0 1 3 5 1 6 6

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小林 一樹 (KOBAYASHI, Kazuki)  
信州大学・工学部・准教授  
研究者番号：0 0 4 3 4 8 9 5