

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：11601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K15353
研究課題名（和文）可視・近赤外およびテラヘルツスペクトルによる植物葉の温度環境ストレス状態の把握

研究課題名（英文）Evaluation of stress state in leaves induced by different environmental condition using spectroscopic technology from visible/NIR to terahertz 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、様々に併発する環境条件に対応した非破壊的な水ストレス評価法の開発の可能性を検討したものである。可視領域(400-1100nm)では、主成分分析を用いることで温度環境が異なる場合の水ストレス状態がある程度評価可能であることが示された。近赤外領域(1100-2500nm)のスペクトルのうち水分由来である1450nm、1920nmの比は、低温にさらされた場合葉内水分状態が異なる可能性があることを示唆した。さらに、1000cm⁻¹以下のスペクトルには、葉内水分状態を反映したバンドの存在が示唆され、低波数帯のスペクトル利用の新たな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

分光分析による乾燥過程のスペクトル変化の意味付けは、植物葉の水ストレスのみでなく、食品高分子、医薬原料製造プロセス等種々の対象に対する応用を可能にすると考えられる。とりわけ1000cm⁻¹以下の低波数帯による水分動態把握は、これまで農業環境工学分野ではあまり利用されていないことから、新たな応用の可能性に結び付くと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study carried out to evaluate water stress induced under different environmental condition by wide area spectrum from visible to terahertz region. The stress level was roughly indicated in different condition by two dimensional plot of PC1 and PC2 calculated by principal component analysis of visible spectra. The bands at 1450 and 1920 nm was identified as marker bands in NIR spectra, and the ratio of these bands had different slope between different condition. The broad band due to libration mode of water was confirmed under 1000cm⁻¹ and the band behavior reflected by water state during water drought process. Thus, it was demonstrated that this band in low wavenumber region may be effective to evaluate water stress in leaves.

研究分野：農業環境情報工学

キーワード：水ストレス 広帯域スペクトル 主成分分析 MCR解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物葉は、生育中や貯蔵中に様々なストレスにさらされる。乾燥ストレスは、その代表的なもので分光分析による非破壊評価手法は、これまで様々に提案されてきた。とりわけ、農業環境工学分野では、可視スペクトルと近赤外スペクトルの比を利用した正規化植生指数などが提案されてきた。しかし、提案された水ストレス指標は葉内の水分子のどのような変化に対応しているのかの化学的根拠に乏しく、例えば水分何%のとき葉はストレスを感じるか等は明確化出来ていない。そこで個葉ベースで、得られたスペクトル情報から葉内クロロフィルや水分子の動態を化学的に理解し、詳細に調査する必要がある。

2. 研究の目的

これまでの科学研究費研究(研究課題番号:26850163、研究期間 2014-2016)において、乾燥条件下での葉のスペクトル挙動を調査し、可視・近赤外スペクトルでは、主成分分析がストレス評価に有効であること、テラヘルツ領域では 1THz ~ 10 THz ベースライン変動が含水率の変化に対応していることに加え、近赤外イメージングにより乾燥プロセスの不均一性を報告してきた。しかし、作物や植物体では、生育(貯蔵も含む)中に乾燥ストレスが単独で発生する場合は、まれで複数のストレスが併発して起こることが多いと考えられる。そこで本研究では、これまでの研究を拡張し、併発するストレスの非破壊的評価のための基礎的研究として、温度環境の異なる条件にさらした植物体を乾燥条件下におき、可視・近赤外(400-2500nm)および赤外・テラヘルツ帯(4000-100 cm^{-1})にわたる広帯域スペクトルデータを連続して取得し、植物の複合ストレス状態評価のための分光マーカーを見出すことを目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

本研究では、通常の乾燥プロセスと環境変化を与えたのち乾燥プロセスを行う場合の葉のスペクトルを取得した。葉内クロロフィル・葉内水分子の動態を調査するため、携帯型可視・近赤外分光装置(Filtered spec, ASD 社製、測定波長領域: 400 ~ 1100nm、波長分解能: 1nm、視野角 3 度)を用いて、個葉に対して測定を行った。また、水分子間の相互作用を調査するため、研究代表者らが、開発した高速近赤外分光装置(D-NIRs: 横河電機製、測定波長領域 1000 ~ 1700nm、波長分解能: 1.25nm)等を用いて測定した。サンプル治具の部分に摘葉後のサンプルを即座にセットし、拡散反射法によって葉からの反射エネルギーを測定した。さらに、紫外・可視および近赤外域(400-2500nm)に関しては、MSV-5200(日本分光社製)も利用して測定した。赤外・テラヘルツ帯(4000-100 cm^{-1})に関しては、FT/IR-6300、FT/IR-350 を用いて、ATR 法で測定した。波数分解能は 4 cm^{-1} 、積算回数は、16 回以上として測定を実施した。注: テラヘルツ領域については、種々の定義があるが、本研究においては、研究計画調書に記載した通り、1000 cm^{-1} 以下の領域とした。

解析は、スペクトルの強度およびシフト挙動を追跡することで実施した。得られたスペクトルは二次微分を行うことで波長の抽出を行った。可視・近赤外領域において、本研究において注目する波長帯は、クロロフィル吸収バンド=440nm、660nm 付近と水分吸収バンド=970nm 付近と 1450、1920nm 付近である。また、可視域のスペクトル解析では、乾燥時間における二次微分値を利用した主成分分析を、1000 cm^{-1} 以下の波数帯のバンドに対しては、スペクトル分離のため、MCR 法を解析に用いた。それぞれ、結果の項目に処理方法を記載した。

乾燥過程にある葉の水分状態を観測するため含水率と水分活性の測定を実施した。水分活性は、摘葉を乾燥過程中に水分活性測定装置(ノバジーナ)によって測定することで算出した。測定は、25 条件下で実施し、平衡に達した時点の水分活性をその時間での値とした。乾燥過程で、平衡に達するまでの時間はそれぞれおおむね 1 時間半から 2 時間であった。水分活性と対応させる含水率は、水分活性測定が終了した時点で即座に測定することとした。最終的にサンプルは、120 2 時間、減圧乾燥させることで、絶乾状態の重量を測定し、固体基準の含水率を算出した。

4. 研究成果

< 含水率と水分活性 >

水分活性は、乾燥過程では、0.92 から 0.8 程度まで序々に変化することが確かめられたが、低温条件を与えた場合の変化とあまり違いはなかった。水分状態を評価するため、水分活性と含水率の水分脱着等温線の作成を行った。水分活性が 0.85 程度まで急激に減少しその後中間水分活性領域では緩やかになる全体としては、指数的な変化の挙動を示した。葉の場合では、含水率 0% を規定するのが難しいが、全体的に 型の等温線であったことから、葉周辺の水分状態を最もよく評価可能であると考えられる GAB 式でフィットすることで乾燥挙動の調査を実施した。図 1 には、今回の実験における水分挙動の変化と GAB 式によるフィット結果を示す。図のように GAB 式によって葉の乾燥過程がよく説明できる可能性が示された。GAB パラメータ K は 0.97 程度の値となった。理想状態が 1 とするとほぼ相互作用の影響なく純粋な水としてふるまっていると考えられた。また、単層吸着のパラメータである c も値が小さく表層との相互作用はあまり存在していないことが考えられる。したがって、水分活性 0.9 以下では、減率乾燥期間が存在しているので、2.0g-water/d-d.s 付近が限界含水率であると考えられたが、温度変化を与えた後の

測定でもあまり大きな差異が見られなかった。

<可視・近赤外スペクトルによる水ストレス評価>

図 2 に、可視域(400-900nm)の温度変化をかけたのち乾燥過程にさらしたサンプルの経時的な変化を示す。吸光度は、時間とともにベースラインが変動することが確かめられたが、二次微分をすることでピークを示す波長が明確された。可視域では、400-500nm 付近、550nm 付近および、660nm 付近のバンドが抽出された。また、660nm 付近のスペクトル強度は、乾燥にともなって増加した。しかし、400-500nm と 660nm 付近のバンドはクロロフィルの吸収帯に帰属されるが、葉のクロロフィル濃度自体はあまり変わらなかった。したがって強度の上昇は、水分欠乏にともなう視野角内の濃度の上昇によるものであると考えられる。また、低温にさらされたサンプルと通常乾燥を行ったサンプルの可視領域のバンドシフトについて検討を行った。研究代表者は、樹木葉の通常の乾燥状態のモニタリングから、可視領域のピークが短波長にシフトする傾向を以前報告している。660nm 付近のシフトは小さかったが、その他のピークについては樹木葉の場合と同様に短波長シフトする傾向があった。450nm 付近にもクロロフィル吸収帯があることからクロロフィル吸収帯によるとする変化はおおむね連動しているはずである。したがって、今回の乾燥状態では、クロロフィルの寄与より、他の葉内成分が変動している可能性が示唆された。

低温下条件にさらされたサンプルと、通常の乾燥状態のサンプルの可視域(400-700nm)までのスペクトルを利用した主成分分析を実施した。第一主成分と第二主成分の二次元プロットを図 3 に示す。その結果、含水率が高い場合は、どちらの主成分とも正の値となり、ストレスが進むにつれて第 3 象限にプロットが集まる結果が得られた。図は、緑から赤になるに従いストレスが高くなる様子を示しているが、温度変化を与えたのちに測定したサンプルでは、おおむね、網掛けで示した領域にプロットが分布した。すなわち、温度変化にさらしたのち乾燥させた場合、むしろややストレスは小さくなる傾向にあった。

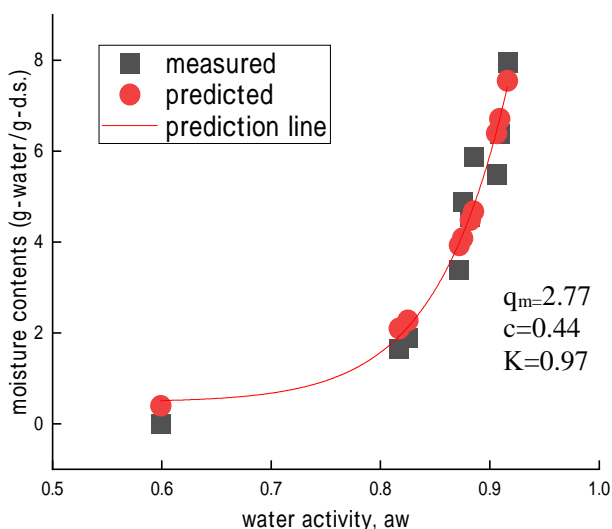


図 1 乾燥過程中の植物葉の水分活性と含水率の変化と GAB 式によるフィッティング

近赤外領域のスペクトルを解析した。近赤外領域の水ストレス変化は、これまでイメージングなどで 1700nm までのスペクトルを取得してきた。本研究はさらに温度環境条件を追加し、波長帯も 800-2250nm の領域に拡張して解析を実施した。サンプルは、3 度条件下で 72 時間の処理にさらしたものと通常栽培で、その後通常乾燥をしたもので比較を実施した。実験初期に水分が葉の表面にあると正確な拡散反射が取れなかったため、通常乾燥のデータは、摘葉後 1 時間後から 20 時間のデータとした。低温環境にさら

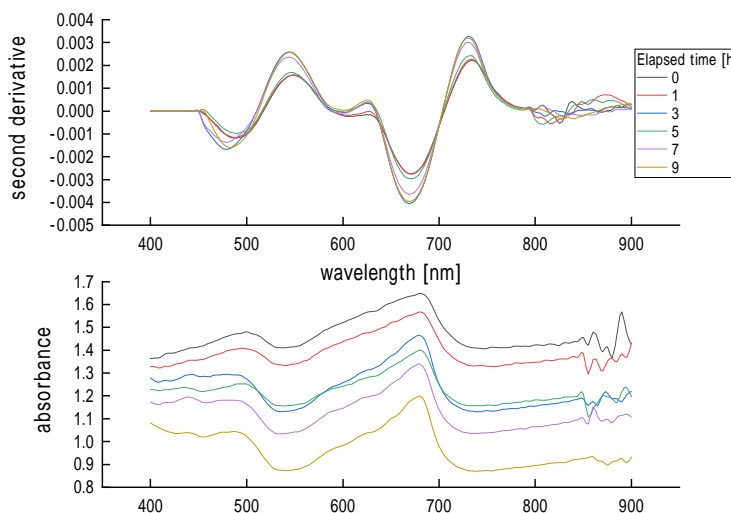


図 2 葉の乾燥における吸光度(下)およびその二次微分スペクトル(上)

したサンプルは、同様に 10 時間程度の乾燥過程をモニタリングした。

近赤外領域のデータは、ノイズを軽減するため、30 ポイント程度のスムージング幅でスムージングを実施したのち二次微分を行った。二次微分を行った結果、1450nm 付近を中心とするバンドと 1920nm を中心とする 2 つのバンドが顕著な変化を示した。これらは、水の伸縮振動に帰属される。どちらのバンドとも含水率の低下とともに強度が減少していることから、水分変化に敏感であることが示唆される。また、2060nm 付近には、小さな肩バンドが生じた。このバンドは、高含水率の場合には存在するが、その後消失した。このバンドは、水素結合していないフリーバンドである可能性が高く、まず、フリーの水が蒸発し、その後束縛された水が減少していくことが示唆される。

低温にさらされた葉の水分状態と通常の乾燥過程での変化を比較するため、水のバンドである 1450nm と 1920nm の二次微分スペクトルの比をとって検討を行った。経過時間にもなう比の変化を図 4 に示す。この図からわかるとおり、通常乾燥過程では、強度は、当初ほぼ 1 対 1 で変化しその後 1450nm の強度がかなり小さくなることから、1920nm の比率が高くなる結果となった。一方低温にさらされたサンプルでは、1920nm の比率が 2.9 程度と高い結果であった。このことから低温状態にさらされたサンプルでは、束縛された水の比率が高い可能性があり、また、1920nm と 1450nm ではそれぞれ評価される水の状態が異なっている可能性が示された。

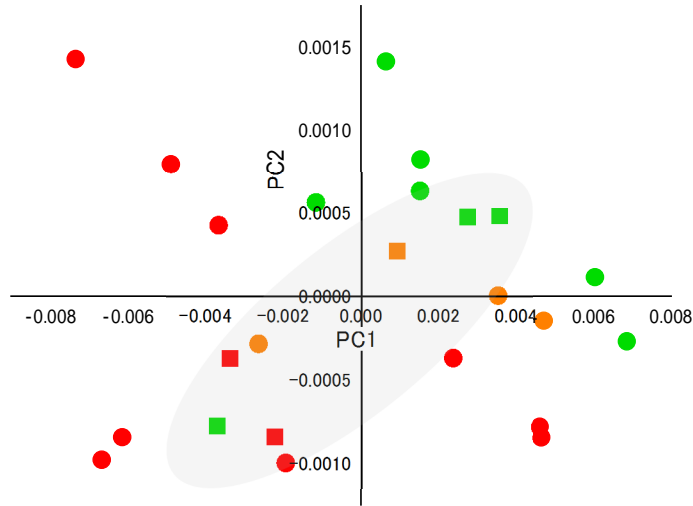


図 3 可視スペクトルの主成分分析によるストレス評価の可能性

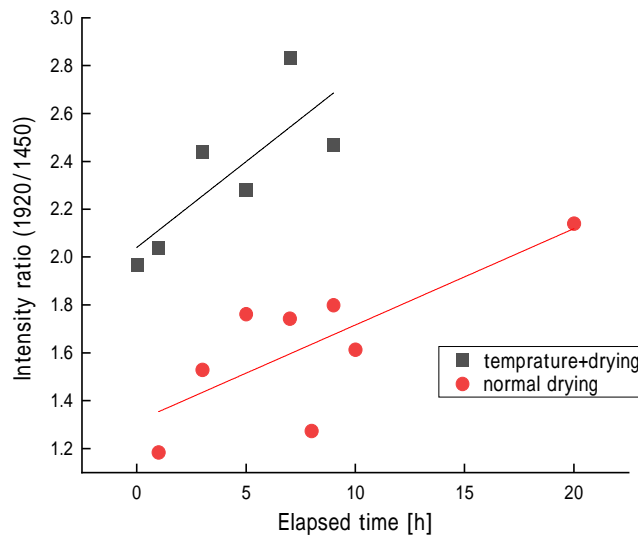


図 4 乾燥過程における水由来バンド(1450、1920nm)の強度比の変化

< 赤外・テラヘルツ領域を用いた水ストレス評価 >

図 5 に本研究にて取得した赤外・テラヘルツ領域(4000-200 cm^{-1})のマルチスペクトルを示す。中赤外域の乾燥過程におけるスペクトル変化は、3300 cm^{-1} -3000 cm^{-1} 付近の OH 伸縮振動に由来するバンドが徐々に小さくなり、さらに、2900 cm^{-1} 付近の CH 伸縮振動に由来すると考えられる特徴的なバンドが出現した。また 1400 cm^{-1} 付近や指紋領域にも表面のセルロース層に由来すると考えられる特徴的なスペクトルが出現した。これらのピーク挙動については、現在も帰属等を解析中である。さらに、これまで科学研究費(研究課題番号:26850163)において、1THz 10THz 付近のベースラインの変動から含水率を見積もれることをすでに報告してきたが、1000 cm^{-1} 以下の赤外 テラヘルツ領域はまだスペクトルの帰属が明確でなく、葉などに利用した例もほとんどない。したがって、本研究では、乾燥過程における葉の 1000 cm^{-1} から 100 cm^{-1} 付近のスペクトル挙動の追跡からストレス評価法開発の可能性を検討した。乾燥過程にもなう 1000-100 cm^{-1} 付近のスペクトル変化を図に示す。図より、1022 cm^{-1} 付近に小さいピークがみられる以外

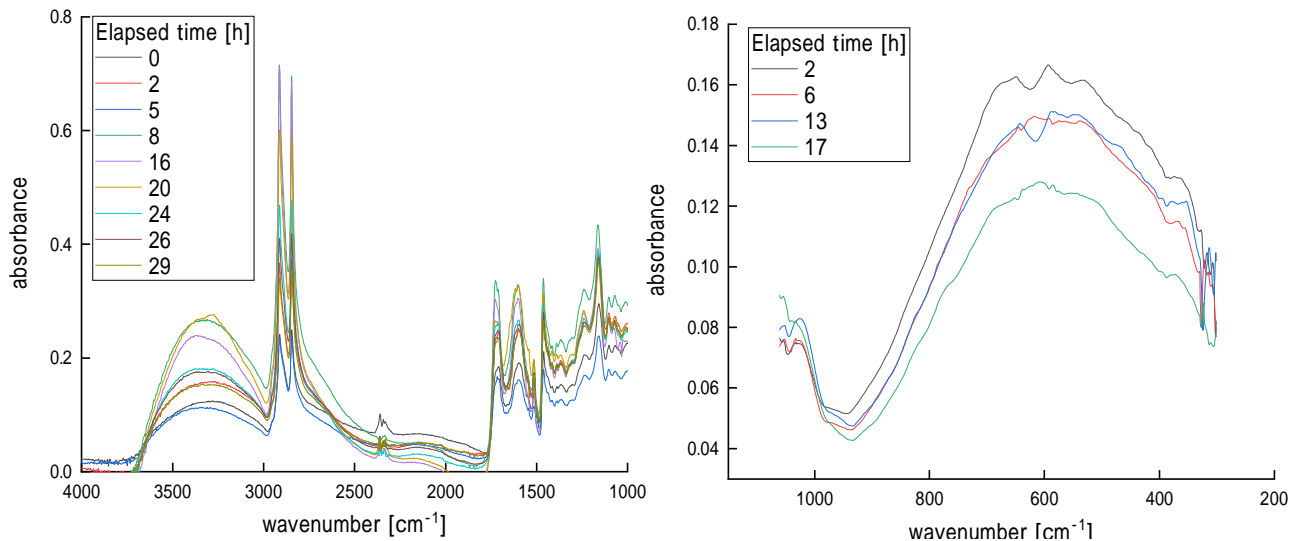


図5 乾燥過程における赤外-テラヘルツ領域のスペクトル挙動

は、 $1000-100\text{cm}^{-1}$ エリアにはブロードなバンドが確認された。このバンドは、水の束縛回転に由来するピークであると水溶液系での実験で帰属されており、序々に強度が下がる傾向にあった。従ってこの領域ではほぼ水分変化のみの追跡が可能であることが示唆された。しかし低温処理サンプルと挙動に大きな差異は認められなかった。そこで、このバンドの変化をさらに詳細に検討するため、純水-塩溶液で取得したこの領域のバンド変化との比較を行った。

図6に、多変量スペクトル分離手法(MCR)によってこの領域を分離した水-塩溶液スペクトルと葉の乾燥過程におけるスペクトルを示した。図のように、水-塩溶液系では、明確に2つのバンドが確認され、葉の乾燥過程のスペクトルにおいても、全体強度が低く、判別しづらいものの、ほぼ同様の位置にピークをもつ2つのバンドに分離可能であることが示唆された。それぞれのスペクトル強度を調査すると、乾燥直後に一度減少し、その後ほぼ横ばい、20時間程度でさらに勾配が変化するという結果となった。すなわち最初の変曲点は、表面の水分が蒸発し、その後葉内部の水分移動によってスペクトル自体があまり変化せず、最終的に水分欠乏が生じる過程がスペクトルによって追跡できる可能性が示唆された。しかし、本研究データは、 630cm^{-1} 付近などに外乱の影響が大きく存在する。これは水の場合も同様であり測定精度の向上が必要であると考えられる。また、水-塩溶液との比較は、水ストレスに加えて、塩ストレスの評価の可能性も示唆している。研究代表者らは、次年度以降、本研究をさらに発展させ、塩を添加して栽培した植物葉のスペクトル解析を実施し、イオンの存在がこの領域のスペクトル挙動に与える影響の把握を試みる予定である。

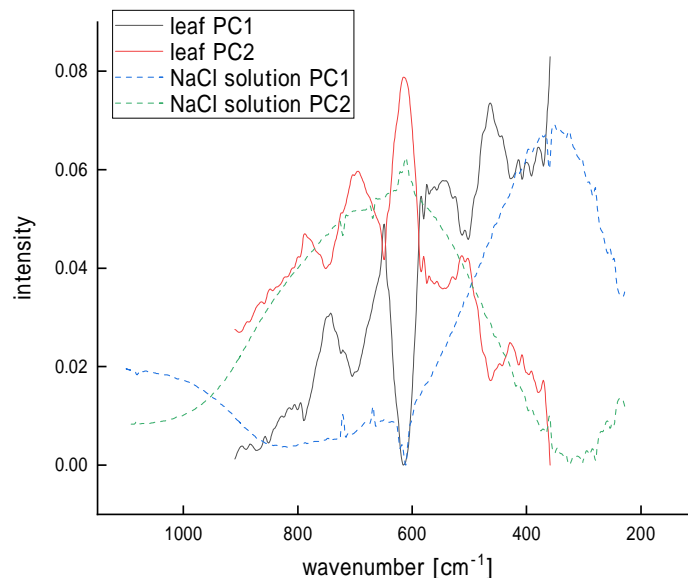


図6 MCR 分析による低波数帯のスペクトルの波数分離とNaCl 溶液との比較

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 Ishikawa Daitaro and Miyama Yoko
2. 発表標題 Study on the evaluation method of water stress for leaf by using spectroscopic technology
3. 学会等名 International Symposium on Agricultural Meteorology2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川大太郎
2. 発表標題 可視分光と主成分分析による個葉の水分ストレス評価の可能性
3. 学会等名 日本農業気象学会東北支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川大太郎
2. 発表標題 農業分野での非破壊センシングデータの実利用～圃場から分子まで～
3. 学会等名 沖縄農業研究会 生産技術セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daitaro Ishikawa
2. 発表標題 Study on estimation of growth stage for paddy rice by spectra in the 400-1100 nm region
3. 学会等名 ISAM2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----