

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658219

研究課題名(和文) FANOVAを援用した野菜の硝酸代謝応答変動の非破壊検出法開発

研究課題名(英文) Non-destructive detection of variations in nitrate metabolism within vegetables by FANOVA

研究代表者

伊藤 博通 (ITO, Hiromichi)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00258063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：人工気象器内でレタス(Lactuca sativa L., cv. "Greenwave")を2週間栽培し、栽培株の可視近赤外吸光スペクトルを20分毎に連続計測した。吸光スペクトルから株内硝酸濃度を計測し、硝酸濃度の経日変化を計測した。硝酸濃度は経過日数と共に増加するが、ある期日を境に減少した。計測したスペクトルをFAVOVA法によって解析したところ硝酸濃度効果関数は978 nmにおいて経日変化が顕著であることがわかり、その変化のピークが発生した期日は硝酸濃度が減少し始める期日と一致した。硝酸濃度効果関数の経日変化を調べることにより硝酸代謝変動が発生する期日を非破壊で特定することが可能であった。

研究成果の概要(英文)：Lettuces (Lactuca sativa L., cv. "Greenwave") were cultivated in a growth chamber and visible-near infrared absorption spectra were measured from each lettuce at every 20 minutes continuously for 14 days. The time course of the nitrate concentration of the lettuces could be measured by substituting the absorption spectra into a developed mathematical model. It was shown that at first the nitrate concentration increased with the increase of the days after planting and then decreased at a certain date. Analyzing the spectra by FANOVA, the functional effect of the nitrate concentration at 978 nm showed the noticeable daily variation. The date, which the peak of variation occurred in the functional effect, coincided with the date at which the nitrate concentration began to decrease. It was found that the date, which the variations in nitrate metabolism began, could be detected non-destructively by analyzing the daily variation of the functional effect of the nitrate concentration.

研究分野：生物環境調節、画像処理、ケモメトリックス

科研費の分科・細目：農業工学・農業情報工学

キーワード：生体計測 近赤外線分光法 FANOVA レタス 硝酸代謝 硝酸イオン濃度 非破壊計測

1. 研究開始当初の背景

光環境制御による野菜葉内硝酸濃度低減化技術開発を 2002 年から継続しており、レタス硝酸代謝の光環境応答を解析している<sup>1)</sup>。人工気象器内で光環境を設定し一定期間栽培して収穫したレタスの硝酸イオン濃度を測定することにより収穫時硝酸濃度に与える光環境の影響を解析している。硝酸代謝についてより詳しく解析するためには、収穫時の硝酸濃度に至るにどのような経日変化を経たのかを知る必要がある。そこで近赤外線分光法による葉内硝酸濃度非破壊連続計測法の開発を行ってきた。この測定の問題点が明確になった<sup>2)</sup>。苗の段階で差はなくても光環境を変えて栽培すると収穫時には硝酸濃度に有意差が生じるが、硝酸濃度の大きな変化が栽培期間中のどの時点で生じるかを検出可能であればその時点から濃度変化を促進したり逆に抑えるための環境制御が可能になり、より有効な環境制御法を開発できる。

- 1) 松本拓也、伊藤博通、白居祐希、白石齊聖、宇野雄一 (2010): 光質がレタス成長と野菜中硝酸イオン濃度に及ぼす影響、植物環境工学、Vol. 22、No. 3、140-147
- 2) 伊藤博通、濱田佳代、野村耕太、綾田晃土、白石齊聖、宇野雄一(2011): 光環境制御による葉菜中硝酸イオン濃度低減化技術の開発-近赤外線分光法による葉内硝酸濃度非破壊計測法の開発-、農業機械学会関西支部報第 110 号、47

2. 研究の目的

植物工場における低硝酸野菜生産のための光環境制御技術開発に資することを目的とし、Functional Analysis of Variance (FANOVA)法を近赤外線吸光スペクトルに適用して野菜の硝酸代謝変動の検出法を開発する。現状の植物工場における生産効率を格段に向上させるためには野菜の生育状態をフィードバックして環境設定値を決定する次世代の環境制御技術が必要である。このためには植物生体の環境応答変化を非破壊連続計測により検出しなければならない。本研究では生体情報を近赤外線スペクトルから取得し、FANOVA で解析することにより体内硝酸代謝の変化を検出する手法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 近赤外分光法による葉菜中硝酸イオン濃度経時計測システムの開発

供試作物はレタス (*Lactuca sativa* L., cv. "Greenwave")である。人工気象器 ((株)日本医科器械製作所製 NC200SC) 内で 3 週間育苗した後、別の人工気象器内に定植した。栽培光源には LED ((株)製 ISL-150×150-RB) と蛍光灯 (NEC 製 FL40SEX-N-HG, FL20SEX-N-HG) を使用した。LED 区は三洋電機 (株) 製インキュベータ MIR-553 を、蛍光灯区は三洋電機 (株) 製イン

表 1. 環境設定値

環境項目	育苗	栽培
光源	蛍光灯	蛍光灯, LED
温度( )	23	22
湿度(%)	60	非制御
光量子束密度 ( $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ )	175	80~85
CO <sub>2</sub> 濃度(ppm)	600	非制御

キュベータ MLR-350 を使用した。育苗及び栽培実験の環境条件を表 1 に示す。明期/暗期設定を 1 h/1 h, 3 h/3 h, 6 h/6 h, 12 h/12 h, R/B 比(赤色光の青色光に対する光量子束密度比)を 5 および 10 に設定し、栽培を行った。栽培期間は 1 週間および 2 週間とした。育苗後直ちに収穫したサンプルも解析に加えた。スペクトル測定の概要図を図 1 に示す。栽培後サンプルを収穫し、MERCK 社製 RQflex plus10 によって硝酸イオン濃度を測定した。校正に使用するスペクトルの測定は各サンプルの収穫時に行った。近赤外分光計には FUNTEC 社製 FRUIT QUALITY ANALYZER (波長分解能 1.97 nm, 測定波長領域 588.2 nm から 1092 nm) を使用した。積算時間を 50 ms に設定し、それぞれの積算時間で 15 秒おきに 3 回測定し、平均スペクトルを解析に使用した。図 2 に取得した生スペクトルを示す。収穫時に測定したスペクトルと硝酸イオン濃度実測値でキャリブレーションを行った。まず各サンプル群を校正用データと評価用データに 2 対 1 に分割した。解析は PLS 法を使用した。前処理は標準化及び二次微分とした。使用波長領域は 610.91 nm から 1050.3 nm とし、

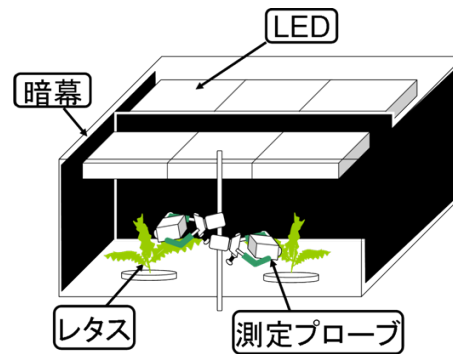


図 1. スペクトル測定概要図

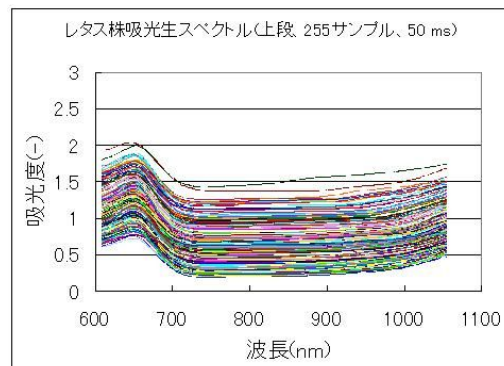


図 2. レタス株生スペクトル

最大主成分数は 30 とした。検量線の精度を表す指標として、 $WSE$  (Weighted mean of  $SEC$  and  $SEP$ ) を採用した。地上部生体重が 1.5 g を超えた 210 サンプルを解析に使用した。この他に栽培期間中 20 分毎に積算時間 50 ms で各株の吸光スペクトルを連続計測した。

(2) 硝酸濃度と明暗周期を因子とした FANOVA 解析

(1) で述べた計測・解析により各株の 20 分毎の吸光スペクトルおよび硝酸濃度が得られる。取得されたスペクトルを標準化変換後に明暗周期 4 水準 (1 h/1 h, 3 h/3 h, 6 h/6 h, 12 h/12 h)、硝酸濃度 6 水準 (0-999, 1000-1999, 2000-2999, 3000-3999, 4000-4999, 5000-5999 mg/L) の 2 因子 24 水準で分類した。この分類後に全水準のスペクトルを FANOVA で解析すると各スペクトルは (1) 式のような連続関数に変換できる。

$$A_{ijk}(I) = m(I) + a_i(I) + b_j(I) + ab_{ij}(I) + e_{ijk}(I) \quad (1)$$

ただし、 $A_{ijk}(I)$  は硝酸濃度因子第  $i$  水準、明暗周期因子第  $j$  水準の吸光スペクトル第  $k$  観測値を、 $\mu(I)$  は全スペクトルの総平均スペクトルを、 $a_i(I)$  は第  $i$  水準の硝酸濃度効果関数を、 $b_j(I)$  は第  $j$  水準の明暗周期効果関数を、 $ab_{ij}(I)$  は 2 因子の相互作用関数を、 $e_{ijk}(I)$  は残差関数を、 $I$  は波長をそれぞれ表す。離散データの連続関数化には B-Spline 法 (Basis function 数 100、Order of spline 4) を用いた。なお、(1) 式の導出には (2) 式に示す拘束条件を使用した。

$$\sum_i a_i(I) = 0, \quad \sum_j b_j(I) = 0, \quad \sum_i \sum_j a_i(I) b_j(I) = 0 \quad (2)$$

本解析は R/B 比 5 で栽培されたレタスから取得したスペクトルのみを使用した。1 試験区で 4 株のレタスを栽培し、繰り返し数が 2 である。暗期に測定したスペクトルのみを使用したので 1 日で得られるスペクトル数は 1152 となった (ただし欠損がある場合もある)。2 週間の栽培期間で得られたスペクトルを各期日毎に解析すると 6 水準の  $a_i(I)$  が 14 日分得られた。 $a_i(I)$  は硝酸代謝が大きく変動した期日に急激に変動すると予想され、逆に  $a_i(I)$  の変動から硝酸代謝変動を検出することを試みた。FANOVA の計算には Functional Data Analysis (FDA) Toolbox (coded by Prof. Ramsay, McGill Univ.) for MATLAB を使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 硝酸濃度の経時計測

生スペクトルに標準化変換と 2 次微分 (Savitzky-Golay 法による平滑点数 25) の前処理を適用し主成分数を 15 とした検量線

の推定精度は評価用データの相関係数が 0.77126、 $SEP$  が 1005.4 mg/L、 $WSE$  が 1100.4 mg/L となった。栽培期間中 20 分毎に積算時間 50 ms で測定した近赤外線吸光スペクトルにこの検量線を適用し、生育中の硝酸イオン濃度の経時変化を測定した。ただし、暗期中のみ測定した。図 3 に明暗周期 1 h 及び 3 h の経時計測結果を示す。全明暗周期区において栽培 2 週間で硝酸イオン濃度増加傾向が見られた。この増加傾向の傾きは、1 h/1 h を最大とし、12 h/12 h, 6 h/6 h, 3 h/3 h の順に小さくなった。明暗周期毎に硝酸イオン濃度の増減の推移を解析すると、ある日を境にして増加傾向が減少傾向に変化することが分かった。傾きの変化は収穫時硝酸イオン濃度が低い試験区ほど早くかつ、定植後の生体重増加量が一定の値を上回った日に生じていた。レタスの成長と共に光合成能力が増加し硝酸代謝量が硝酸吸収量を上回ったと考えられる。また、明暗周期間で傾きの変化が生じる日に差が生じた理由は、光合成産物蓄積によるフィードバック作用<sup>3)</sup>の影響が明暗周期によって異なるためであると考えられる。低硝酸化のためには成長を促進させ、硝酸代謝量を増加させることが重要であることが分かった。

3) 山谷知行：代謝，朝倉書店，pp.45-102, 2001

##### (2) FANOVA 解析

6 水準の硝酸濃度効果関数を解析すると 14 日間の変動は第 1, 第 2, 第 5 および第 6 水準で大きかった。硝酸濃度の水準別度数の経日変化を調べると次のようになった。10 日目までは硝酸濃度が上昇し、度数分布は低濃度から高濃度へ移行した。11 日目以降は硝酸濃度が低下し、度数分布は高濃度から低濃度へ移行した。水準 2 と水準 5 で含まれるサンプル数の変化が顕著であった。水準 3 と水準 4 はサンプル個体の構成は変化するが度数

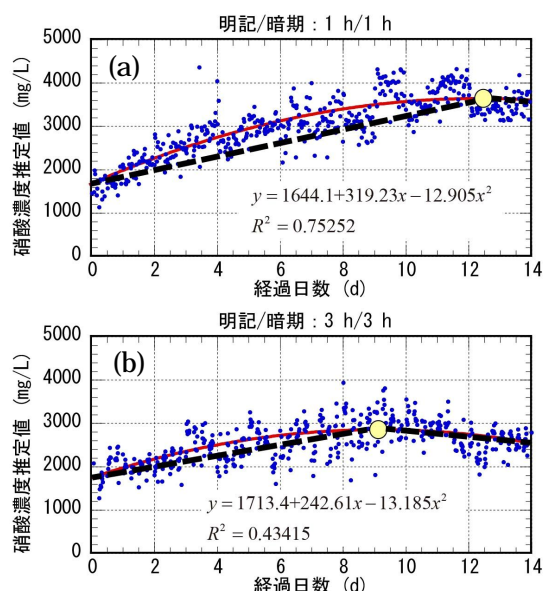


図 3. 硝酸濃度経時計測結果 (a) 1 h/1 h, (b) 3 h/3 h



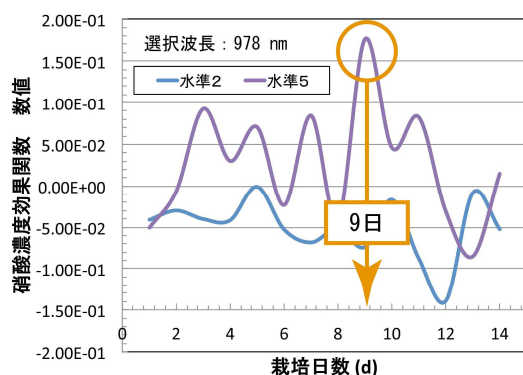


図4 978 nmにおける硝酸濃度効果関数第2および第5水準の経日変化

の変化は小さかった。水準1と水準6ではサンプル数が少なかった。そこで第2および第5水準を対象に硝酸濃度効果関数の14日間の経日変化が大きな波長を調べたところ688 nmと978 nmで関数値の変動が大きくなった。図4に示すように第5水準の978 nmの関数値が栽培日数9日で大きなピークを示した。9日目は硝酸濃度因子の第5水準の度数が最大となった期日であり、代謝変動が発生した期日と一致した。このことからFANOVA法により硝酸代謝変動の期日を特定することが可能であることがわかった。

図3に示したように硝酸濃度の非破壊連続計測によっても硝酸代謝が大きく変動する期日を検出可能であるが、この方法では全栽培日程を終えてからでなければこの期日を特定できない。FANOVA法を適用することによりリアルタイムで硝酸代謝変動の期日を特定することが可能である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Hirumichi Itoh, Josse De Baerdemaeker, Wouter Saeys, Regression Models to Estimate Nitrate Ion Concentration in Vegetable Leaves, Proceedings of NIR2013, 285-290, 2013, 査読有

藤田裕子、伊藤博通、白石齊聖、宇野雄一、葉面内硝酸濃度分布計測法を援用した硝酸還元酵素遺伝子発現を誘導する細胞間シグナル伝達に関する研究、農業機械学会関西支部報第114号、7、2013、査読無

伊藤博通、宇野雄一、綾田晃士、野村耕太、林美緒、光条件によるレタス葉内硝酸濃度低減化技術の開発 -光質と明暗周期が及ぼす影響-、農業機械学会関西支部報第114号、4、2013、査読無

伊藤博通、友田小百合、八田朋子、白石齊聖、宇野雄一、ホウレンソウカルスの硝酸イオン濃度推定のためのハイパースペクトルイメージングシステムの開発、植物環境工学、Vol. 24, No. 4, 233-243, 2012、査

読無

伊藤博通、白石齊聖、宇野雄一、藤田裕子、宮地大樹、葉面内硝酸濃度分布計測法を援用した硝酸還元酵素遺伝子発現を誘導するシグナル伝達物質同定、農業機械学会関西支部報、第112号、16、2012、査読無

伊藤博通、白石齊聖、宇野雄一、友田小百合、八田朋子、ハイパースペクトルカメラによる遺伝子組換え成功判別法の開発、農業機械学会関西支部報第112号、24、2012、査読無

[学会発表](計13件)

伊藤博通、藤田裕子、白石齊聖、宇野雄一、ハイパースペクトルカメラを援用したホウレンソウのNR遺伝子発現を誘導する細胞間シグナル伝達に関する研究、第72回(平成25年度)農業食料工学会年次大会、2013年9月11日、帯広市、帯広畜産大学

伊藤博通、野村耕太、綾田晃士、林美緒、宇野雄一、FANOVAを援用した野菜の硝酸代謝応答変動の非破壊検出法開発(第1報)-近赤外分光法による葉菜中硝酸イオン濃度経時計測システムの開発-、日本生物環境工学会2013年高松大会、2013年9月5日、高松市、香川大学

伊藤博通、綾田晃士、野村耕太、林美緒、宇野雄一、FANOVAを援用した野菜の硝酸代謝応答変動の非破壊検出法開発(第2報)-硝酸濃度と明暗周期を因子としたFANOVA解析-、日本生物環境工学会2013年高松大会、2013年9月5日、高松市、香川大学

伊藤博通、硝酸濃度分布計測法を援用したNR遺伝子発現を誘導する細胞間信号伝達に関する研究、日本生物環境工学会西日本支部 海外研修会 国際セミナー、2013年7月16日、韓国、光州市

Hirumichi Itoh, Josse De Baerdemaeker, Wouter Saeys, Regression Models to Estimate Nitrate Ion Concentration in Vegetable Leaves, NIR 2013 - 16th International Conference on Near Infrared Spectroscopy, 2013年6月4日, la Grande-Motte, France

藤田裕子、伊藤博通、白石齊聖、宇野雄一、葉面内硝酸濃度分布計測法を援用した硝酸還元酵素遺伝子発現を誘導する細胞間シグナル伝達に関する研究 農業機械学会関西支部第129回例会、2013年3月5日、神戸市、神戸大学

伊藤博通、宇野雄一、綾田晃士、野村耕太、林美緒、光条件によるレタス葉内硝酸濃度低減化技術の開発 -光質と明暗周期が及ぼす影響-、農業機械学会関西支部第129回例会、2013年3月5日、神戸市、神戸大学

H. Itoh, Measurement of Nitrate Concentration in Spinach Callus by Using a Hyperspectral Imaging System, JSABEES West and NTU Joint Seminar, 2012年9月27日, National Taiwan University,

Taipei, Taiwan

伊藤博通、宮地大樹、白石斉聖、宇野雄一、藤田裕子、ハイパースペクトルカメラを援用した NR 遺伝子発現を誘導する細胞間シグナル伝達に関する研究、農業環境工学関連学会 2012 年合同大会、2012 年 9 月 13 日、宇都宮市、宇都宮大学

野村耕太、伊藤博通、濱田佳代、綾田晃土、白石斉聖、宇野雄一、近赤外分光法による葉菜中硝酸イオン濃度経時計測システムの開発、日本生物環境工学会 2012 年東京大会、2012 年 9 月 5 日、東京都文京区、東京大学

宮地大樹、伊藤博通、藤田裕子、白石斉聖、宇野雄一、葉面内硝酸濃度分布計測法を援用した硝酸還元酵素遺伝子発現を誘導する細胞間シグナル伝達に関する研究、日本生物環境工学会 2012 年東京大会、2012 年 9 月 5 日、東京都文京区、東京大学

綾田晃土、伊藤博通、濱田佳代、野村耕太、白石斉聖、宇野雄一、光環境制御による葉菜中硝酸イオン濃度低減化技術の開発 - 光質と明暗周期が及ぼす影響 -、日本生物環境工学会 2012 年東京大会、2012 年 9 月 5 日、東京都文京区、東京大学

伊藤博通、植物生産における非破壊計測、中国持続的農業技術研究開発計画 (II) 農業機械及び非破壊計測シンポジウム (招待講演) 2012 年 06 月 26 日、北京、日中農業技術研究開発センター

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 博通 (ITOH Hiromichi)

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：00258063

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：