

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850163

研究課題名(和文) 可視・近赤外およびテラヘルツ分光とそのイメージングによる葉内水分子の動態解明

研究課題名(英文) Analysis of water state in leaf by using visible, NIR and THz spectroscopy and imaging

研究代表者

石川 大太郎 (ISHIKAWA, DAITARO)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：20610869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、農作物や植生の水ストレス評価法開発のための基礎的研究として、可視・近赤外およびテラヘルツスペクトルの解析およびイメージングに関する検討を行いストレス過程での水分子の動態の明確化に取り組んだ。近赤外スペクトルおよびそのイメージングからは、乾燥過程にともなって長波長シフトがみられ乾燥中の不均一性が存在する可能性が示された。テラヘルツスペクトルにおいてもベースラインシフトからストレス評価が可能であることが確かめられた。さらに水分活性を同時にモニタリングすることで表面水分状態の明確化の可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：This study presents a method for evaluating water content change in a leaf by using visible, NIR and THz spectral analysis. The spectral behaviors corresponding to the drought of water in the sample leaves were investigated. The band in the 1400-1460 nm were shifted to longer wavelength during water drought and the imaging showed the inhomogeneity of drying of leaf. Baseline shifted of THz spectra corresponded to the water contents in leaf. Thus the fundamental result of the band behavior under water stress was provided by this study, moreover water activity might enhanced the evaluation of stress by using non-descriptive methods.

研究分野：農業環境情報工学

キーワード：水ストレス 可視・近赤外スペクトル イメージング

1. 研究開始当初の背景

農作物や植物も環境変化による影響を大きく受けるため、生態系維持、環境保全の観点から環境変化によって植生がうけるストレスの評価・把握は、喫緊の課題である。

農作物がうけるストレスには、さまざまなものがあるが特にリモートセンシング分野では、可視域のクロロフィル吸収帯(660nm付近)と近赤外(短波長赤外)領域の750nm付近の正規化植生指標(NDVI)を用いて水ストレスをはじめ種々のストレスが評価されてきた。さらに、水ストレスに関してはより直接的に近赤外域の水分吸収波長帯(960,1400,1700,1900や2250nm)と可視域、もしくは水分吸収帯同士を組み合わせた指標も数多く提案されている。

しかし、これまで提案された可視・近赤外分光による非破壊的なストレス指標は、スペクトル変化の意味づけに関してははまだ研究途上にあり、さらに、サンプルのモニタリング手法に関しても改善の余地を残している。

2. 研究の目的

本研究では、分光学的手法を用いた農作物や植生のストレス診断手法構築のための基礎的研究として、クロロフィル吸収に敏感な可視スペクトル(特に660nm付近)、水分子内の相互作用に敏感な近赤外スペクトル(700-2500nm)とそのイメージングを用い、含水率とスペクトル変化の関係から意味づけが可能かについて検討を行う。さらに、近年マイクロ波領域(テラヘルツ領域)のスペクトルは、水分子の変化に鋭敏であることからその利用拡大が注目されている。そこで、乾燥葉のテラヘルツスペクトル(1-7THz)の測定を試みることで、水ストレス評価法としての有用性を見極める。

3. 研究の方法

分光測定および解析

サンプルは、樹冠部から取得し、即座にスペクトル測定に供した。400-1000nm付近の可視・近赤外スペクトルは、Field Spec(ASD製、波長間隔:1nm)を用いて0~24h程度連続測定を実施した。テラヘルツスペクトルは、1~10THz領域をTSA7500(Advantest)および、FTIR6300(Jasco)を用いて測定し、それぞれ24h程度の連続測定を実施した。

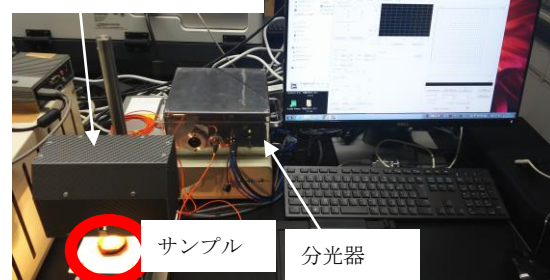
サンプルの含水率は、スペクトル測定前に重量測定を実施し、24h程度経過後に、減圧乾燥器を用いて絶乾後の重さを測定し、元の重さを差し引くことで算出した。

クロロフィル濃度は、ジメチルホルムアミド1ml溶液に測定前・測定後のサンプルの葉片を入れ、それらを紫外・可視分光器によって透過法で測定し定量した。

近赤外分光およびイメージング

乾燥過程の近赤外イメージングは、DNIRS(横河電機製)を用いて図のように実施した。サンプルは図の位置にセットし、拡散反射エネルギーを1000-2000nmの領域で取得した。本装置では、ポイントのスペクトルデータも約1nm間隔で取得されており、それらのデータをGraphRによってマップ化することでイメージングを行った。

イメージングユニット



近赤外測定およびイメージング

4. 研究成果

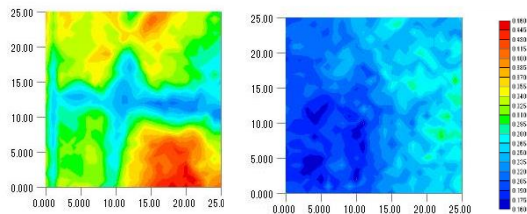
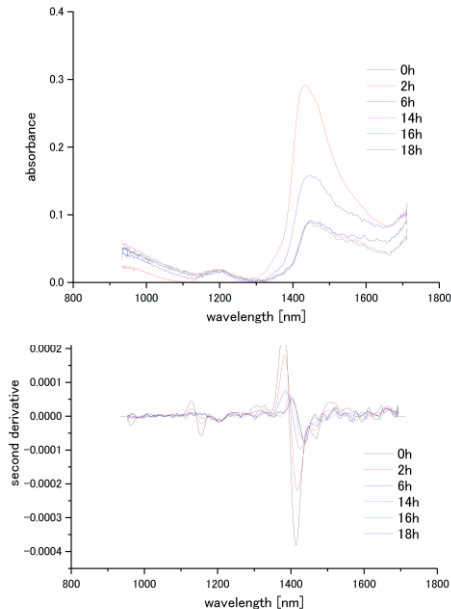
(1)可視・近赤外スペクトルによる水ストレスモニタリング

可視・近赤外スペクトルによる水分変化モニタリングとして、1100-1700nmの近赤外スペクトルの時間変化およびその二次微分を示す。1200nm付近、および1400nm付近に水のOHに起因するブロードなピークが認められる。近赤外スペクトルは通常測定中の誤差の影響などを受けるため、何らかの前処理をする必要がある。今回は二次微分を用いているが、図のように乾燥がある程度以上になると、ノイズが大きくなる傾向がある。これは、表面の凹凸等の影響を受けた可能性が示唆されるが、ストレス評価という観点からは、通常のスเปクトル観察を行い、図のような誤差が乗ってしまう状態では乾燥ストレスが強くなっていることを示すことが可能である。

さらに、二次微分を行った結果、1400nm付近のスペクトルには、強度を下げながら、ピーク値が長波長シフトする傾向を確認した。これは、この付近に、自由水のピークおよび結合水のピークが存在することが知られている。乾燥に伴って自由水が欠乏し、結合状態が強っていくことで、長波長側にピークがシフトしていくと考えられる。興味深いことに、乾燥がすすんだ、16時間経過後以降では、わずかにピーク強度の上昇が認められるが、ピーク波長はさらに長波長側にシフトする傾向が認められる。すなわち、強度から乾燥を見積もるには、乾燥後期には精度的な制約があると考えられる。

近赤外イメージングの結果を図に示す。図は、乾燥前の二次微分値から各時間の強度比をとった相対的な含水率である。また、イメージングに対してはピーク値がシフトしていることから、それぞれの時間帯でピーク値

をずらしてマッピングした。乾燥6時間では、数値にばらつきがあることが見て取れる。すなわち乾燥状態の進行にむらがある可能性がある。さらに、ピークシフトによってさらに乾燥が進んだ過程を定量可能であると考えられることから、本研究を拡張しピーク波長の位置に注目したマッピングを実施する必要がある。



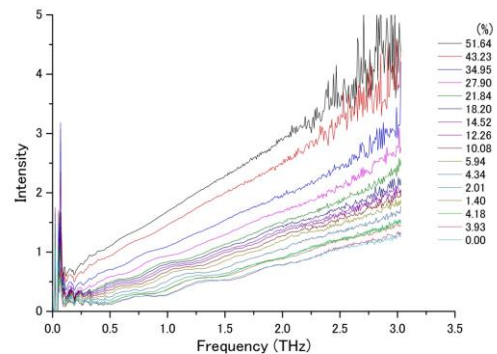
葉の乾燥過程の近赤外スペクトル、二次微分とそのイメージング

(2) テラヘルツ・スペクトルによる葉のストレス診断手法開発の可能性

テラヘルツスペクトルは、葉の乾燥過程において、ベースラインの変化を示した、ピークとしては 100 cm^{-1} 付近にシフトをとともなうわずかな変化が検出された。ベースライン変動からピーク等がない 3 THz 付近を取り出し、含水率変化との関係を調査した結果、 $R^2=0.97$ 程度の高い相関を示した。すなわち、テラヘルツ領域の乾燥過程におけるベースライン変動を利用すれば、含水率のモニタリングが可能であることが、確かめられた。しかし、可視の場合変化が大きいと判断された含水

率 0.48 付近でも定量的に値が減少していることから、ストレス診断には、さらに詳細な検討が必要であることが考えられた。

ここで、先に述べたとおり、葉のテラヘルツスペクトルでは、 100 cm^{-1} - 200 cm^{-1} 付近にわずかなピークが確認されている。ピーク出現は、 45% 程度から顕著になることから、可視・近赤外スペクトルから得られた主成分分析値の変化と連動している可能性があるが、この領域では、スペクトル変化が、サンプル状態に依存している可能性が高い。すなわち、見た目では判断できない程度のわずかな歪曲等で干渉が起こってしまったものと推察される。マイクロ波領域については、広域性



葉の乾燥過程のテラヘルツ領域のスペクトル

など地上植生にスケールアップするためには、さらに詳細にスペクトルの測定方法などを検討する必要があるが、乾燥ストレスによるわずかな変化を検出できる可能性を見出した。

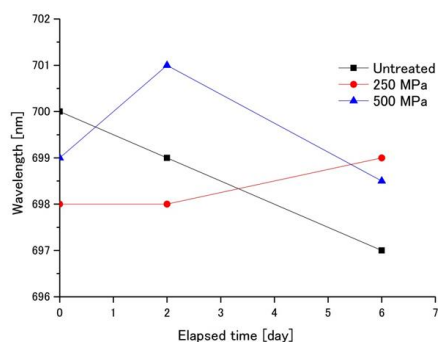
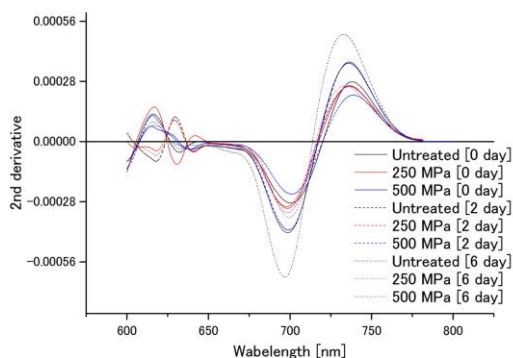
(3) 種々のストレス状態におけるスペクトル変化

葉の水ストレスを評価する手法として、数 MPa の圧力を加える水ポテンシャルは、有効であることは示されている。しかし、その際の植物体のスペクトル変化について検討はされていない。またそれ以上の高圧ストレスに対する応答は、ストレス指標構築にあらたな知見を与える可能性がある。

250 、 500 MPa の高圧処理を施された葉と未処理の葉の二次微分のデータを示す。未処理は通常の乾燥過程であることから短波長シフトする傾向は同様であった。これはこれまでの研究結果のとおり、会合状態が弱まっていることに由来する可能性がある。しかし、高圧処理を経ることでシフトの傾向が弱まり、むしろわずかに会合状態が強まる可能性を示唆している。

(4) 表面水分活性のモニタリング手法検討

さらに、本研究では、乾燥ストレス状態にある対象の物理化学的意味づけを行い、水分変動の非破壊評価法を構築するための検討を実施した。すなわち水分子同士の相互作用をより明確に表す可能性がある水分活性について、モデル的に解析するため、テトラピロール環をヘムとして牛肉の乾燥過程を解析した。



葉の高圧ストレス下での可視スペクトルとクロロフィルバンドのシフト

乾燥過程における 2 mm 厚のサンプルの可視・近赤外スペクトルを測定した。同時に水分活性の測定も行った。可視部分では、これまでのクロロフィルと同様 650nm 付近に吸収極大を示した。さらに、水分活性の低下とともに、0.95 付近までは、短波長シフトし、その後、横ばいとなった。この傾向は、含水率に対しても類似していたが、このバンドシフトは、含水率変化より水分活性の変化に対する対応が顕著であった。すなわち、乾燥過程での自由水の減少にともなう相互作用の変化がバンドシフトを追跡することで評価可能であることを示している。

さらに、含水率と水分活性は、GAB 式で高い相関でフィットされた。含水率と近赤外 970nm 付近のスペクトルの二次微分を用いた PLS 回帰分析は、高い精度($R^2=0.96$)をしめたことから、表面の水分状態のみを抽出するため、10 mm 厚のサンプルに対して、まず測定距離、インテグレーションタイム等の最適化を実施した。近赤外スペクトルから推定された水分活性の変化を図に示す。本研究により水分活性の直線的な減少すなわち恒率水分活性挙動がサンプル表面近傍において示唆

された。

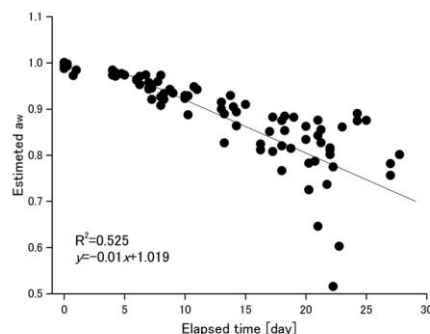
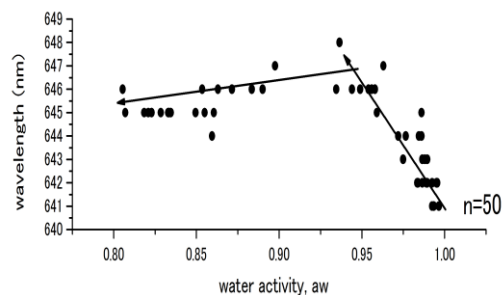


図 水分活性と 660nm 付近のピークシフトと乾燥過程における水分活性の推定

<今後の展望>本研究では、乾燥ストレス下にある植物体にのみ着目して研究を実施した。しかし、実際に生育している途中では、水ストレスが単独で発生することはもちろん多くのストレスが併発して植物体に影響する。その中でも温度環境変化は、生育中の植物に常に影響していると考えられるので、今回水分欠乏状態単独での研究をさらに拡張させ生育温度環境下でのストレス状態の把握につなげていく予定である。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 石川大太郎, 2015. 分光分析化学的手法の農学分野への応用, 日本分析化学会東北支部会若手交流会(招待講演), パルセ飯坂(福島), 2015 年 7 月 17 日
- ② Ishikawa D., Ozaki Y., and Fujii T., 2014. A study on evaluation of water contents change in leaves by using non-destructive method, International symposium on frontier of THz science, 沖縄科学技術大学(沖縄), 2014 年 8 月 4 日-8 月 6 日
- ③ 石川大太郎・藤井智幸, 2015. 分光分析化学的手法を用いた葉のストレス評価法に関する研究, 農業環境工学 5 学会 2015 年合同大会, 岩手大学(岩手), 2015 年 9 月 15 日
- ④ Ishikawa D., Ozaki Y., and Fujii T., 2014. Development of evaluation method for leaf water contents by using spectroscopic

technology, FACSS2014, Nevada, USA,
2014年9月28日-10月3日

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 大太郎 (ISHIKAWA, Daitaro)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：20610869