

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5263744号
(P5263744)

(45) 発行日 平成25年8月14日(2013.8.14)

(24) 登録日 平成25年5月10日(2013.5.10)

(51) Int.Cl. F1
A01G 7/00 (2006.01) A01G 7/00 603

請求項の数 5 (全 10 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2009-101126 (P2009-101126) (22) 出願日 平成21年4月17日 (2009.4.17) (65) 公開番号 特開2010-246488 (P2010-246488A) (43) 公開日 平成22年11月4日 (2010.11.4) 審査請求日 平成24年4月15日 (2012.4.15)</p> <p>特許法第30条第1項適用 平成21年2月23日 愛媛大学農学部施設生産システム学専門教育コース発行の「生物環境情報システム学(学部) 施設生産システム学(修士) 研究発表論文集(12巻2009年)」に発表</p>	<p>(73) 特許権者 504147254 国立大学法人愛媛大学 愛媛県松山市道後樋又10番13号 (74) 代理人 100119367 弁理士 松島 理 (74) 代理人 100142217 弁理士 小笠原 宜紀 (72) 発明者 高山 弘太郎 愛媛県松山市樽味3丁目5番7号 国立大学法人愛媛大学農学部内 (72) 発明者 仁科 弘重 愛媛県松山市樽味3丁目5番7号 国立大学法人愛媛大学農学部内</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光合成活性評価プログラムおよび光合成活性評価装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

コンピュータを光合成活性評価装置として作用させるためのプログラムであり、
コンピュータに光を照射された植物体より発せられた蛍光強度データを取得させる手順と
 、
コンピュータに異なる測定時間 t においてこの蛍光強度データ d (t) を取得して記憶装置に記憶させる手順と、
コンピュータに蛍光強度データ d (t) を時系列に並べたときの最大値となる点 P における最大蛍光強度 P = データ d (t) を求めさせる手順と、
コンピュータに点 P の後に現れる極小点 S とさらにその後に現れる極大点 M の間の平均蛍光強度 a v e (S : M) を求めさせる手順と、
コンピュータに最大蛍光強度 P と平均蛍光強度 a v e (S : M) の比 P / a v e (S : M) を求めさせる手順とを実行させることを特徴とする光合成活性評価プログラム。

【請求項2】

前記平均蛍光強度 a v e (S : M) を求めるために、その時間範囲の開始時間 t s と終了時間 t e が定められており、コンピュータにこの開始時間 t s と終了時間 t e の間の時間に対応する蛍光強度データ d (t) の平均値を平均蛍光強度 a v e (S : M) として求めさせる手順とを実行させる請求項1に記載の光合成活性評価プログラム。

【請求項3】

前記最大蛍光強度 P を求めるために、最大値となる点 P を想定する時間 P が定められてお

10

20

り、

コンピュータに時間 P における蛍光強度データ $d(P)$ を最大蛍光強度 P として求めさせる手順とを実行させる請求項 1 または請求項 2 に記載の光合成活性評価プログラム。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれかに記載の光合成活性評価プログラムを有する光合成活性評価装置であり、

光合成活性評価プログラムを作動させるコンピュータと、

植物体に光を照射する面光源と、

植物体からの反射光より蛍光成分のみを通過させるロングパスフィルタと、

ロングパスフィルタを通して植物体を撮影する撮影装置と、を有し、

撮影装置で取得した画像データがコンピュータに蛍光強度データとして送信されるようになした光合成活性評価装置。

10

【請求項 5】

コンピュータと面光源とロングパスフィルタと撮影装置を搭載する移動台車を有する請求項 4 に記載の光合成活性評価装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、植物に光を照射して、植物が発する蛍光を経時的に測定することによって、植物の状態を診断することに関する。

20

【背景技術】

【0002】

近年、さまざまなセンサを用いて植物の生体情報を計測して生育状態を診断し、それに基づいて生育環境を適切に制御するという S P A (Speaking Plant Approach) 技術の植物工場への導入が検討されている。たとえば、特許文献 1 には葉の投影面積を測定することによって植物の水ストレスを診断することが記載されている。

【0003】

また、これ以外にもクロロフィル(以下、Chl と略して表記する。)蛍光画像計測技術が、非破壊かつ非接触で植物体の光合成機能を評価できる手法であるため、S P A に利用可能な植物診断技術として特に注目されている。

30

【0004】

図 1 は Chl 蛍光の発光メカニズムを示す模式図である。葉に光が入射すると、クロロフィルはこれを吸収して励起状態となる。この励起エネルギーのすべてが光合成に使用されるわけではなく、使用されなかったエネルギーは、熱エネルギーや光エネルギーとして放散される。この光エネルギーとして放散されたものが Chl 蛍光である。暗処理した葉に一定強度の励起光を照射する(暗期条件から明期条件にする)と、Chl 蛍光強度が経時的に変化する現象が確認される。この Chl 蛍光強度の経時変化を対数時間軸に沿ってプロットした曲線をインダクションカーブとよぶ(非特許文献 1、非特許文献 2)。図 2 はインダクションカーブの例を示す模式図である。インダクションカーブの形状は、光合成能力の高低や種々のストレスの影響を受けて大きく変化する。そのため、インダクションカーブの形状の変化を解析することで植物診断が可能となる(非特許文献 3)。そして、特許文献 2 および特許文献 3 には Chl 蛍光強度の経時変化測定を植物診断に適用した例が記載されている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】特開 2007 - 306846

【特許文献 2】特開 2001 - 299090

【特許文献 3】特開平 11 - 332375

50

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Govindjee. 1995: Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence. Aust. J. Plant Physiol. 22: 131-160.

【非特許文献2】高山弘太郎、仁科弘重、大政謙次著「農業・環境分野における先端的画像情報利用」、社団法人農業電化協会、P 23 - 34

【非特許文献3】大泉喬子、愛媛大学農学部生物環境情報システム学(学部)施設生産システム学(修士)研究発表論文集、2008

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0007】

非特許文献1～3に記載されたインダクションカーブの形状の変化を解析は、植物の光合成の研究に有用なものと思われる。しかし、インダクションカーブの形状の変化を研究者が目で見つけて解釈するのではなく、植物工場などで応用できるように大量の情報を自動的に処理できるプログラムや装置が望まれる。

【0008】

特許文献2、3には、インダクションカーブをコンピュータにより解析して植物を診断することが記載されている。しかし、これらの診断方法は、植物より葉を採取して測定するものである。したがって、その分、植物は損傷される。また、このような測定を、植物栽培の現場で自動的かつ大規模に行うことはできない。

20

【0009】

しかし、特許文献2、3に記載の発明は、育成中の植物体に直接適用することができない。これらの発明における診断プログラム(たとえば特許文献2では蛍光量を時間積分する)では、測定対処の葉面の向きが一定にそろっている必要がある。しかし、育成対象の植物では葉の着き方はさまざまであり、葉の着く位置や葉面の向きなどは定まっていない。

【0010】

この発明は、植物の蛍光の経時変化測定による光合成活性の自動的で正確な診断を育成中の植物に対して行うことができる光合成活性評価プログラムおよび光合成活性評価装置を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

30

【0011】

上記の目的を解決するために、この発明の光合成活性評価プログラムは、コンピュータを光合成活性評価装置として作用させるためのプログラムであり、光を照射された植物体より発せられた蛍光強度データを取得するものであり、異なる測定時間 t においてこの蛍光強度データ $d(t)$ を取得して記憶装置に記憶させ、蛍光強度データ $d(t)$ を時系列に並べたときの最大値となる点 P における最大蛍光強度 $P = \text{データ } d(t)$ を求め、点 P の後に現れる極小点 S とさらにその後に現れる極大点 M の間の平均蛍光強度 $ave(S : M)$ を求め、最大蛍光強度 P と平均蛍光強度 $ave(S : M)$ の比 $P / ave(S : M)$ を求めることを特徴とする。

40

【0012】

平均蛍光強度 $ave(S : M)$ を求めるためには、その時間範囲の開始時間 t_s と終了時間 t_e を定めておき、この開始時間 t_s と終了時間 t_e の間の時間に対応する蛍光強度データ $d(t)$ の平均値を平均蛍光強度 $ave(S : M)$ とすることができる。

【0013】

また、最大蛍光強度 P を求めるためには、最大値となる点 P を想定する時間 P を定めておき、この時間 P における蛍光強度データ $d(P)$ を最大蛍光強度 P とすることができる。

【0014】

さらに、この発明の光合成活性評価装置は、上述の光合成活性評価プログラムと、光合成

50

活性評価プログラムを作動させるコンピュータと、植物体に光を照射する面光源と、植物体からの反射光より蛍光成分のみを通過させるロングパスフィルタと、ロングパスフィルタを通して植物体を撮影する撮影装置と、を有し、撮影装置で取得した画像データがコンピュータに蛍光強度データとして送信されるようになしたものである。これに加えて、コンピュータと面光源とロングパスフィルタと撮影装置を搭載する移動台車を備えてもよい。

【発明の効果】

【0015】

この発明の光合成活性評価プログラムおよび光合成活性評価装置は、最大蛍光強度 P と平均蛍光強度 $ave(S:M)$ の比 $P/ave(S:M)$ を求めることによりインダクションカーブの特徴を抽出することができる。この $P/ave(S:M)$ は、葉面の向きや葉の位置などに影響を受けないので、育成対象の植物の状態の診断に適用できるという効果を有する。特に、予め設定された開始時間 t_s と終了時間 t_e の間の時間に対応する蛍光強度データ $d(t)$ の平均値を平均蛍光強度 $ave(S:M)$ とすることにより、点 S や点 M が明瞭な極値として現れない場合でも、簡易かつ正確に妥当な指標を導き出すことができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】Chl 蛍光の発光メカニズムを示す模式図である。

【図2】インダクションカーブの例を示す模式図である。

20

【図3】光合成活性評価装置の例を示す模式図である。

【図4】LEDパネル光源の発光スペクトルとロングパスフィルタの透過スペクトルを示すグラフである。

【図5】光量子センサを用いて測定したLEDパネル光源の照射光強度分布を示すグラフである。

【図6】画像解析プログラムの表示画面の例を示す模式図である。

【図7】植物工場内の測定対象個体の配置を模式的に示す平面図である。

【図8】植物工場内のトマト個体を対象として計測されたインダクションカーブを示すグラフである。

【図9】インダクションカーブの測定例を示すグラフである。

30

【図10】Chl a/b比と $P/ave(S:M)$ の関係を示すグラフである。

【図11】植物工場内全域に分布する個体の $P/ave(S:M)$ の分布を示すヒストグラムである。

【図12】植物工場内での $P/ave(S:M)$ が高い個体と低い個体の位置を模式的に示す平面図である。

【図13】植物工場内を東西方向の各区分に含まれる個体の $P/ave(S:M)$ を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0017】

この発明を実施するための形態について図面に基づいて説明する。

40

図3は光合成活性評価装置の例を示す模式図である。この光合成活性評価装置1は、コンピュータ2と、植物体に光を照射する面光源3と、植物体からの反射光より蛍光成分のみを通過させるロングパスフィルタ(図示省略)と、ロングパスフィルタを通して植物体を撮影する撮影装置として赤外線領域に感度を有するCCDカメラ4とを有する。また、コンピュータ2と面光源3とロングパスフィルタと赤外線領域に感度を有するCCDカメラ4を搭載する移動台車5を備えている。

【0018】

コンピュータ1は、特に限定はなく、市販のパーソナルコンピュータなどが使用できる。光合成活性評価プログラムがインストールされている。この光合成活性評価プログラムでは、さほど大きな情報処理を必要としないので、小型のコンピュータで十分であり、ノー

50

ト型PCやモバイルと呼ばれるような種類のものが、移動のために便利である。

【0019】

植物のクロロフィル蛍光を励起する面光源3として65cm×65cmのLEDパネル光源((株)セネコム, M5510A)を用いた。この例では、ロングパスフィルタ(富士フィルム(株)、SC 70)を装着した赤外線領域に感度を有するCCDカメラ4(Allied Vision Technologies GmbH, Stingray F145B ASG)を用いてChl蛍光画像を撮像する。図4に、LEDパネル光源(面光源3)の発光スペクトルとロングパスフィルタの透過スペクトルを示す。面光源3の直接光成分はほとんどロングパスフィルタによって遮断され、長波長である蛍光成分のみがロングパスフィルタを通して赤外線領域に感度を有するCCDカメラ4に検知される。

【0020】

図5は、光量子センサ(LI-COR, LI-250A)を用いて測定した面光源3の照射光強度分布を示す。光源からの距離によらず、比較的均一(±11%)に照射されていることが確認された。この面光源3により、近距離から広範囲に均一な光を投射することができる。

【0021】

CCDカメラ4はIEEE1394bケーブルにてコンピュータ2に接続されている。CCDカメラ4により撮影された映像の画像データは、IEEE1394bケーブルによってコンピュータ2に送信される。

【0022】

ここで、光合成活性評価プログラムについて説明する。この光合成活性評価プログラムはコンピュータ2にインストールされており、コンピュータ2やCCDカメラ4を光合成活性評価装置として作用させるものである。

【0023】

光合成活性評価プログラムにより、コンピュータ2はCCDカメラ4に所定の時間間隔で撮影し、その画像データをコンピュータ2に送信するように指令する。

【0024】

画像を構成する画素データは、それぞれがインダクションカーブを得るためのデータとして使用できるものではあるが、この例では、一つの画像データより1個の蛍光強度データを抽出する。そのために、各画像データについて、植物体領域の抽出を行う。植物体以外の領域にあるものは、照射された光と同じ波長の光を反射するのみなので、ロングパスフィルタを通して撮影された画像上では、強度はほとんどゼロである。したがって、比較的低い閾値と比較すれば、植物体領域とそれ以外の領域は簡単に区別できる。各画素の値と閾値を比較し、これを超える画素を数えるとともに、その画素の値を積算する。合計値を画素数で割ることによって、その画像における平均の蛍光強度を算出することができる。

【0025】

得られた蛍光強度データdを時間の順に $d_1, d_2, d_3 \dots d_n, \dots$ と蓄積していくことにより、インダクションカーブの情報データが形成される。撮影間隔を t とすれば、 d_n は時間 $t = n \cdot t$ における蛍光強度データ $d(t)$ ということになる。

【0026】

一連の撮影が終了すれば、その撮影対象の植物体のインダクションカーブを決定する蛍光強度データ $d(t)$ が得られる。この一連の蛍光強度データ $d(t)$ より、最大値となる点Pにおける最大蛍光強度 $P = \text{データ } d(t)$ を求める。また、点Pの後に現れる極小点Sとさらにその後に現れる極大点Mの間の平均蛍光強度 $ave(S : M)$ を求める。そして、最大蛍光強度Pと平均蛍光強度 $ave(S : M)$ の比 $P / ave(S : M)$ を求めることによって、その撮影対象の植物体の光合成活性を評価する値が算出される。

【0027】

ここで、平均蛍光強度 $ave(S : M)$ を求める方法として、極小値Sと極大値Mを探ることが考えられる。しかし、インダクションカーブの形状は常に一定ではなく、明瞭な極大・極小が現れないときもある。そこで、ここでは次のような簡便で実用性の高いアルゴリズムを用いた。

【0028】

10

20

30

40

50

あらかじめ、測定対象の植物や環境におけるインダクションカーブを測定しておく。そうすると、共通した植物・環境においては、ほぼ、同じ時間に最大値P、極小値S、極大値Mが現れることがわかる。そこで、極小値Sが現れる付近の時間を所定の時間範囲の開始時間 t_s とし、極大値Mが現れる付近の時間を終了時間 t_e としてこれらの値を保存しておく。そして、開始時間 t_s と終了時間 t_e の間の時間に対応する蛍光強度データ $d(t)$ の平均値を平均蛍光強度 $ave(S:M)$ として求める。

【0029】

一方、最大値Pは比較的明瞭に現れることが多いので、一連の蛍光強度データ $d(t)$ の最大値をPとして採用してもよい。また、予め測定したインダクションカーブより最大値となる点Pが現れると想定される時間Pを決定し、この時間Pにおける蛍光強度データ $d(P)$ を最大蛍光強度Pとしてもよい。

10

【実施例1】

【0030】

この発明の実施例について説明する。蛍光画像計測は、日没後1時間以上経過した後、暗期条件下にて行った。計測対象となる個体の成長点が画像に収まるように手動でCCDカメラ4の位置を調節した後、LEDパネル光源(面光源3)を作動させ、30秒間励起光を照射し、この間のインダクション現象をノート型PCの内蔵ハードディスクに記録した。成長点とCCDカメラの距離は約60cmであり、カメラのシャッタースピードは0.06秒、フレームレートは15枚/秒であった。

【0031】

20

記録されたChl蛍光画像は、Visual Basic6.0にて作成した画像解析プログラムを用いて解析した。図6は画像解析プログラムの表示画面の例を示す模式図である。画像解析プログラムでは、植物体領域の抽出および画像毎の平均蛍光強度の算出を自動的に行い、1個体毎にインダクションカーブを出力する。

【0032】

LEDパネル光源、CCDカメラおよびノート型PCを手動式台車に搭載し、植物工場内の作業通路を移動しながらChl蛍光画像計測を行い、群落全体を対象とした光合成機能診断を行う。計測は、愛媛大学農学部内の太陽光利用型知的植物工場で栽培されているトマト(*Solanum lycopersicum* L., 品種: 桃太郎ファイト)群落を対象に、2008年12月17日に開始した。Chl蛍光画像計測の対象個体は、植物工場内に均一に分布するように60個体を選択した。図7は植物工場内の測定対象個体の配置を模式的に示す平面図である。

30

【0033】

また、この発明により得られる診断値の妥当性を確認するために、測定対象の植物のChl濃度およびChl a/b比の測定を行った。Chl蛍光画像計測の対象となる個体の中から18個体(図7の 個体)を対象とし、Chl濃度およびChl a/b比の測定を行った。各個体から採取した3枚の葉からそれぞれコルクボーラーで直径1.15cmの葉片を切り抜き、これらを試験管に入れ、冷暗所にてDMFに24時間浸して得られたChl抽出液をセルに分注し、分光光度計((株)日立製作所, U-1100)を用いて646.8nm, 663.8nm, 750.0nmの吸光度 $A_{646.8}$, $A_{663.8}$, A_{750} を測定し、Porra et al.(1989)の式を用いてChl aおよびb濃度を算出した。この式は、次の通りである。

40

$$\text{Chl a 量} (\mu\text{g ml}^{-1}) = 12.00 \times (A_{663.8} - A_{750}) - 3.11 \times (A_{646.8} - A_{750})$$

$$\text{Chl b 量} (\mu\text{g ml}^{-1}) = 20.78 \times (A_{646.8} - A_{750}) - 4.88 \times (A_{663.8} - A_{750})$$

【0034】

図8に植物工場内のトマト個体を対象として計測されたインダクションカーブを示す。インダクションカーブの形状の変化を数値評価するために、S~Mの間のChl蛍光強度の平均値に対するPのChl蛍光強度の比を算出することとし、これを $P/ave(S:M)$ と定義した。励起光照射開始からSおよびMの出現までにかかる時間を調べるために、20個体を対象としてインダクションカーブを測定したところ、Sは励起光照射開始から約13.5秒後(開始時間 t_s)、Mは約20.7秒後(終了時間 t_e)に出現することがわかった。図9はこのインダクションカーブの測定例を示すグラフである。この結果に基づき、 $ave(S:M)$

50

は、励起光照射開始から13.5秒後から20.7秒後のChl 蛍光強度の平均値とした。

【 0 0 3 5 】

図 1 0 はChl a/b比とP/ave(S:M)の関係を示すグラフである。両者には有意な相関($R=0.82$, $p<0.05$)が確認された。すなわち、この発明で得られる値P/ave(S:M)は植物の光合成活性評価の指標となりうる根拠が確認された。Chl aおよびChl bの作用によるメカニズムは光合成を行う他の植物にも共通であるので、この発明は、さまざまな栽培植物に適用できることが示された。

【 0 0 3 6 】

図 1 1 に植物工場内全域に均一に分布する60個体のP/ave(S:M)のヒストグラムを示す。植物工場内のトマト群落のP/ave(S:M)は正規分布しているとみなせる。図 1 1 においてP/ave(S:M)が高いもしくは低い個体を抽出するため、平均値(1.195)と標準偏差(0.059)を用いて、P/ave(S:M)が1.31以上の個体を特にP/ave(S:M)が高い個体、1.25~1.31の個体をP/ave(S:M)が比較的高い個体、1.08~1.14の個体をP/ave(S:M)が比較的低い個体、P/ave(S:M)が1.08以下の個体を特にP/ave(S:M)が低い個体とし、図 1 2 にこれらの個体の植物工場内での位置を示した。植物工場内の東側にP/ave(S:M)が高い個体が集中し、西側にP/ave(S:M)が低い個体が集中する傾向がみられた。図 1 3 に、植物工場内を東西方向に3区分したときの各区分に含まれる20個体のP/ave(S:M)の平均値を示す。東から西にかけてP/ave(S:M)の有意な低下が確認された。このことは、東西方向にChl a/b比の勾配があることに対応している。この結果は、環境的な要因により植物工場内の東西方向に光合成機能の勾配が生じていることを検知したことを示している。

【 符号の説明 】

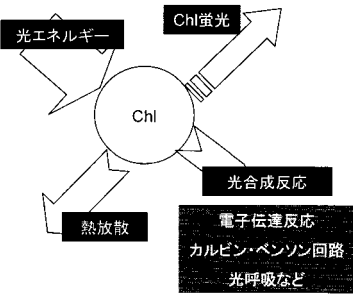
【 0 0 3 7 】

- 1 . 光合成活性評価装置
- 2 . コンピュータ
- 3 . 面光源 (L E D パネル光源)
- 4 . 撮影装置 (赤外線領域に感度を有する)
- 5 . 移動台車

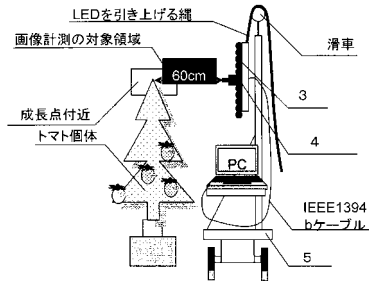
10

20

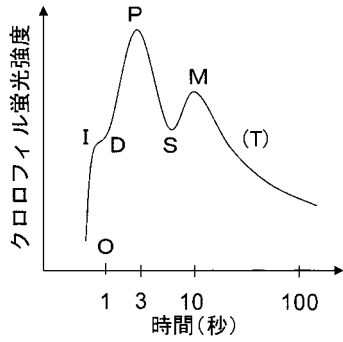
【図1】



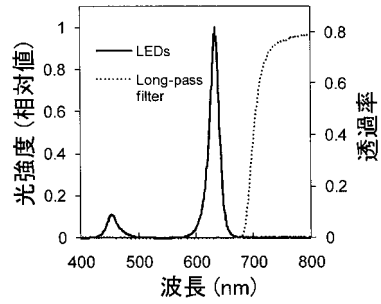
【図3】



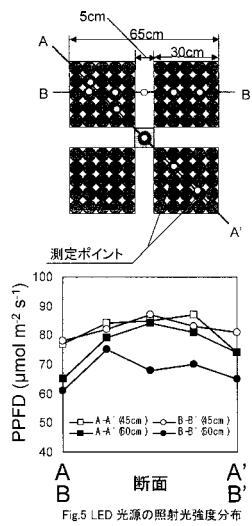
【図2】



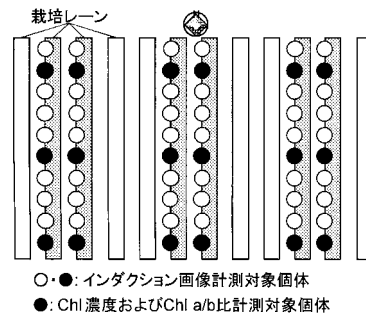
【図4】



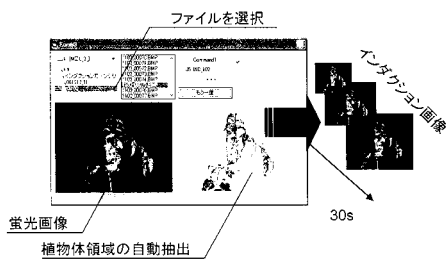
【図5】



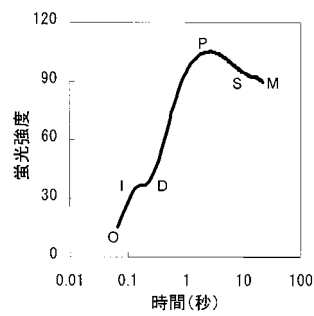
【図7】



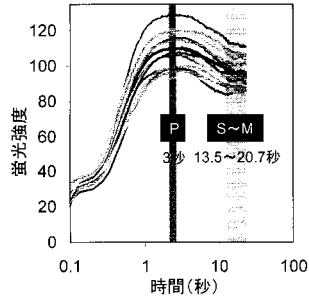
【図6】



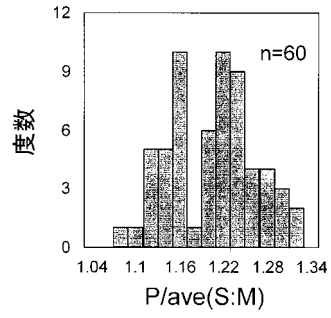
【図8】



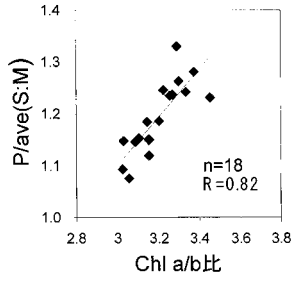
【図9】



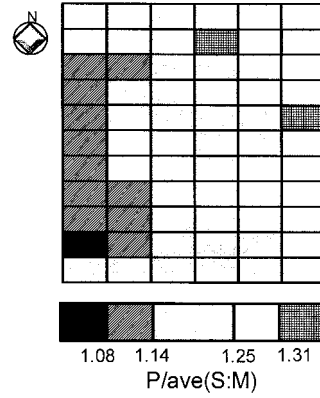
【図11】



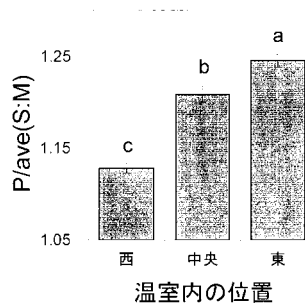
【図10】



【図12】



【図13】



フロントページの続き

- (72)発明者 水谷 一裕
愛媛県松山市樽味3丁目5番7号 国立大学法人愛媛大学農学部内
- (72)発明者 有馬 誠一
愛媛県松山市樽味3丁目5番7号 国立大学法人愛媛大学農学部内
- (72)発明者 羽藤 堅治
愛媛県松山市樽味3丁目5番7号 国立大学法人愛媛大学農学部内
- (72)発明者 三好 謙
愛媛県松山市樽味3丁目5番7号 国立大学法人愛媛大学農学部内

審査官 坂田 誠

- (56)参考文献 特開平11-332375(JP,A)
特表2006-504956(JP,A)
特開2005-308733(JP,A)
特表平7-502408(JP,A)
特開2006-317195(JP,A)
特開2002-214141(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- | | |
|------|-------|
| A01G | 7/00 |
| G01N | 21/63 |