

紫外励起蛍光画像を用いた大豆生育初期における  
微小傷の検出

新潟大学 自然科学系 農学部

斎藤 嘉人

令和4年4月より京都大学から新潟大学へ異動になりました。

農作物の病害は食料の安定生産を妨げる主要な要因の一つであり、病害による生産ロスを削減する手段の一つとして病害抵抗性を持つ農作物品種の育種が行われている。現在育種で行われている抵抗性の試験は、実際に菌株が存在する条件下で病害の発生有無を観測するものであり、時間や作業者の技術を要するため簡便な手法が望まれている。これまでのように直接的に病原菌に対する抵抗性を評価する手法とは別に、当研究グループでは、植物が病原菌に感染する一つの経路として「傷」に着目している。植物は傷害を受けた際に防御機構として癒傷組織を形成することが知られており<sup>1</sup>、品種ごとの「癒傷能力」を評価することにより病気に感染しにくい品種を選抜できる可能性がある。そこで本研究では、植物の癒傷能力を簡便かつ非破壊的に計測する技術を最終目標とし、微量物質に対し高感度な測定が可能で、カンキツでの傷検出にも用いられている「蛍光」<sup>2</sup>を利用した癒傷の評価を目的とした。代表的な作物の一つであるダイズの幼苗に傷処理を施し、傷処理部分の励起蛍光マトリクス（EEM）による蛍光特性の把握、ならびに波長 365 nm の紫外 LED を光源に用いた蛍光画像による経時変化の検証を行った。

## 実験方法

### <材料および栽培条件>

播種後 7 日のダイズ (*Glycine max (L.) Merr.*) を供試試料とした。品種にはエンレイを用いた。播種の際にはパーミキュライト、育苗用ポットもしくは 50 穴セルトレイを用いた。播種後、白色 LED を用いた室内で 7 日間の栽培を行った。栽培条件は平均温度 28.9 度、±6.7 度、平均湿度 76.0 %±21.0 %であった。栽培室では 13 時間明期で栽培した。

### <傷処理>

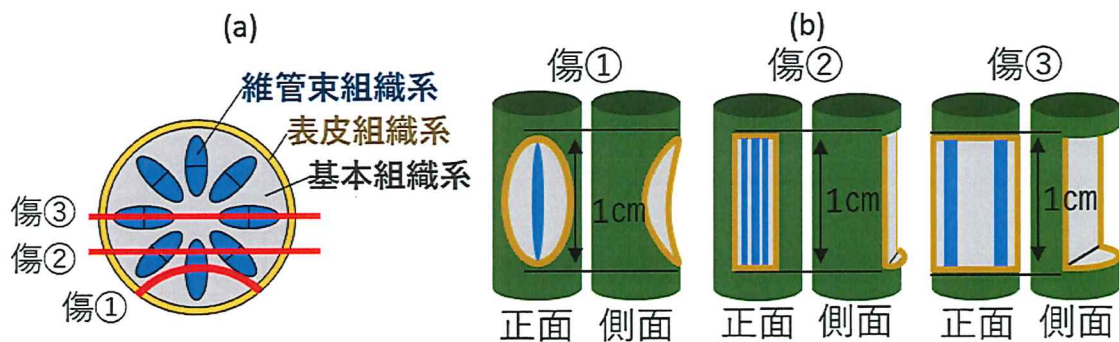


図 1 傷の深さと見られる組織系の対応図。

(a) 茎の断面図，(b) 茎の傷処理部分全体を示す。

本研究では、大豆の茎（胚軸部）に傷処理を施し、癒傷の過程を計測した。傷処理を受けた組織の違いによる癒傷過程の違いを確認するため、図 1 に示すように深さの異なる傷①-傷③の 3 種類の傷処理を施した。図 1 (a) は茎の傷処理部分の断面図を示しており、

赤色の実線が傷処理受けた深さを表す。図 1 (b) では茎の傷処理部分の正面図と側面図を模式的に示している。また (a) (b) 両方の図において青色が維管束組織系，黄色が表皮組織系，灰色が基本組織系を表している。傷①，傷②，傷③はそれぞれ，表皮組織系，維管束組織系，基本組織系を観察することを目的とした。なお，傷部分の深さはそれぞれ約 0.35 mm，約 0.43 mm，約 1.2 mm であった。

#### <測定方法>

まず傷処理部分の蛍光特性の経時変化を検証するため，分光蛍光光度計（FP-8300，日本分光）を用いて EEM の測定を行った。EEM は，励起波長・蛍光波長・蛍光強度の 3 次元データであり，対象物の基本的な蛍光特性を把握するために計測されるものである。EEM の測定後，白色 LED（LDL2-80X16SW2, CCS）とカラーカメラ（EOS Kiss X7, Canon）を用いてカラー画像を撮り，波長 365 nm の紫外 LED（LDL-71X12UV2-365, CCS）と前述のカラーカメラを用いて蛍光画像を取得し傷処理部分の時系列モニタリングを行った。傷処理直後を 0 時間後とし，96 時間後まで測定を行った。

#### <画像処理>

画像解析には MATLAB2020a（MathWorks, Inc.）を使用した。カラー画像の傷処理部分のみを選択しマスク画像を作成した。これを蛍光画像に適用することで傷処理部分のみを切り出した。画像解析領域の決定後，傷処理部分の R 値，B 値，G 値の比率を算出した。

### 実験結果および考察

#### <EEM 測定>

図 2 に EEM 測定の結果を示す。

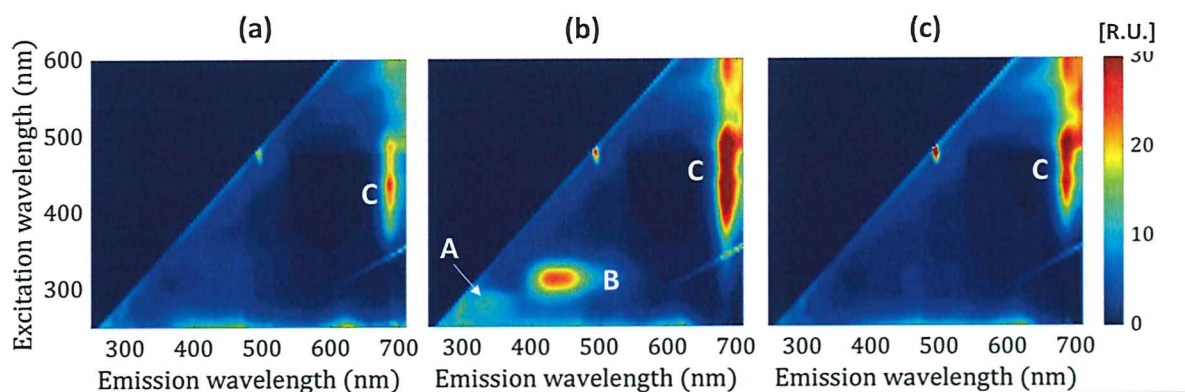


図 2 得られた EEM の結果の抜粋。

(a) 傷処理を行わなかった試料 (b) 傷処理①から 0 時間後の試料

(c) 傷処理①から 96 時間後の試料の EEM をそれぞれ表す。

図 2 で、(a) は傷処理を施さなかった試料、(b) は傷処理①を行った直後の傷部分、(c) は傷処理①を行ってから 96 時間経過後の傷部分の EEM である。縦軸は励起波長、横軸は蛍光波長、色は蛍光強度であり、単位は水のラマン散乱強度で補正した値であるラマンユニット (R.U.) である。図 2 より、3 つのピーク (A, B, C) が見られ、先行研究からそれぞれアミノ酸、桂皮酸等、クロロフィルに由来するピークと考えられる<sup>3-5</sup>。図 2 (b) と (c) の比較から、ピーク A や B は傷処理から時間が経過すると観測されなくなり、クロロフィル由来の赤色蛍光も強度が小さくなる傾向が得られた。このことから、傷の有無や傷処理からの時間経過により蛍光特性が変化することが分かった。

また、各ピーク強度の時間変化を図 3 (a) に示す。横軸は傷処理からの経過時間 (h)、縦軸は蛍光強度 (R.U.) である。図 3 (a) から、傷処理から時間が経過するほど、ピーク A, B, C の蛍光強度が弱くなる結果が得られた。さらに、クロロフィルに由来するピーク C の形状の変化を考察するため、蛍光波長 685 nm における励起スペクトルを図 3(b) に示した。図 3(b) で、横軸は励起波長、縦軸は蛍光波長 685 nm における蛍光強度であり、傷処理後 0, 5, 24, 96 時間後のスペクトルを凡例に示した。図 3 (b) から、傷処理から時間が経過するほどクロロフィル蛍光の励起波長の下限が長波長側にシフトすることが分かった。即ち、励起波長 350~360 nm 付近で蛍光画像を撮ることで、傷処理から時間が経過するに伴い、ピーク C の蛍光が弱くなっていく蛍光画像が得られると考えられる。そのため、蛍光画像の撮像の際には励起波長 365 nm の紫外 LED を光源として用いた。

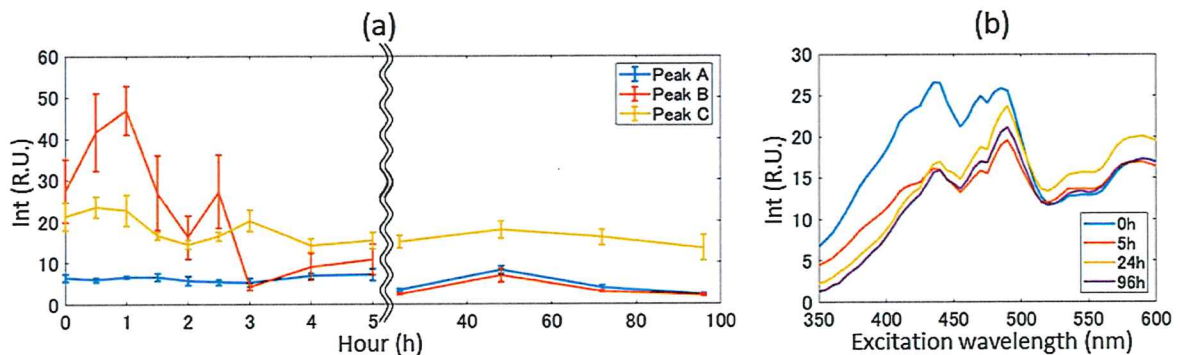


図 3 (a) 各蛍光ピーク強度の経時変化, (b) 蛍光波長 685nm における励起スペクトル。

#### <カラー画像および蛍光画像>

撮影したダイズの茎の傷処理部分のカラー画像の一部を図 4 に示す。(a) : 傷①, (b) : 傷②, (c) : 傷③の順であり、縦に傷処理からの経過時間 (h) の順で示した。傷③は茎の強度が弱く栽培中は爪楊枝で補強したため (c) の画像に白く映っている。図 4 から、カラー画像では時間がたつにつれて傷処理を受けた部分がやや茶色に変化していた。



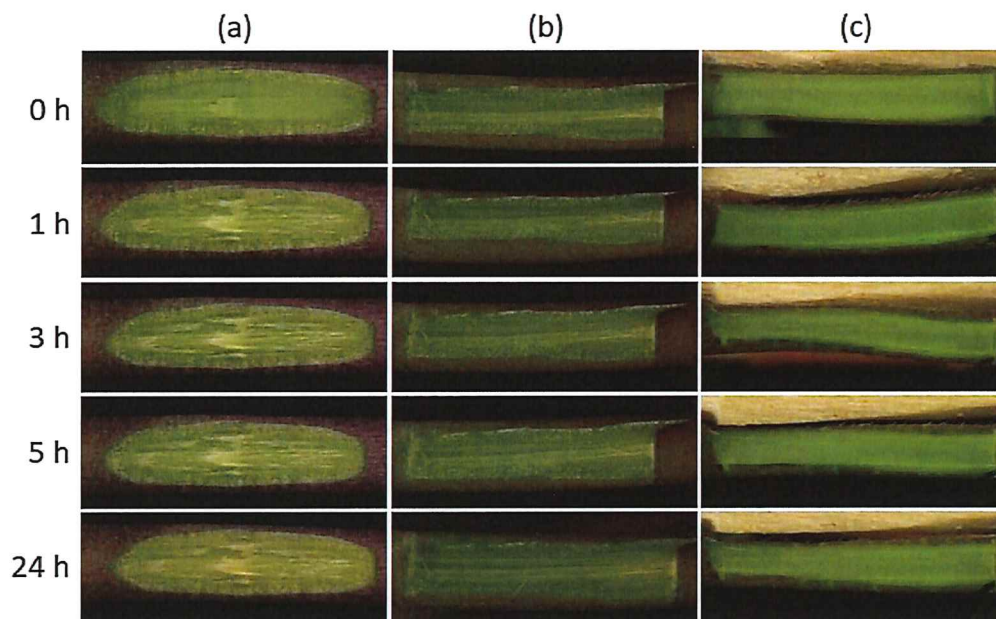


図 4 傷処理部分の時系列的なカラー画像。

(a) 傷①, (b) 傷②, (c) 傷③の傷処理を行った時のカラー画像を示す。

図 4 と同一試料の蛍光画像を図 5 に示す。図 5 (c) 上部に見られる青白い蛍光は、茎を補強するために利用した爪楊枝の蛍光である。図 5 (b) では蛍光色の変化は見られなかったものの、図 5 (a), (c) では、傷処理部分において時間経過とともに全体的に赤色が減少し緑、青が増加する傾向が見られた。

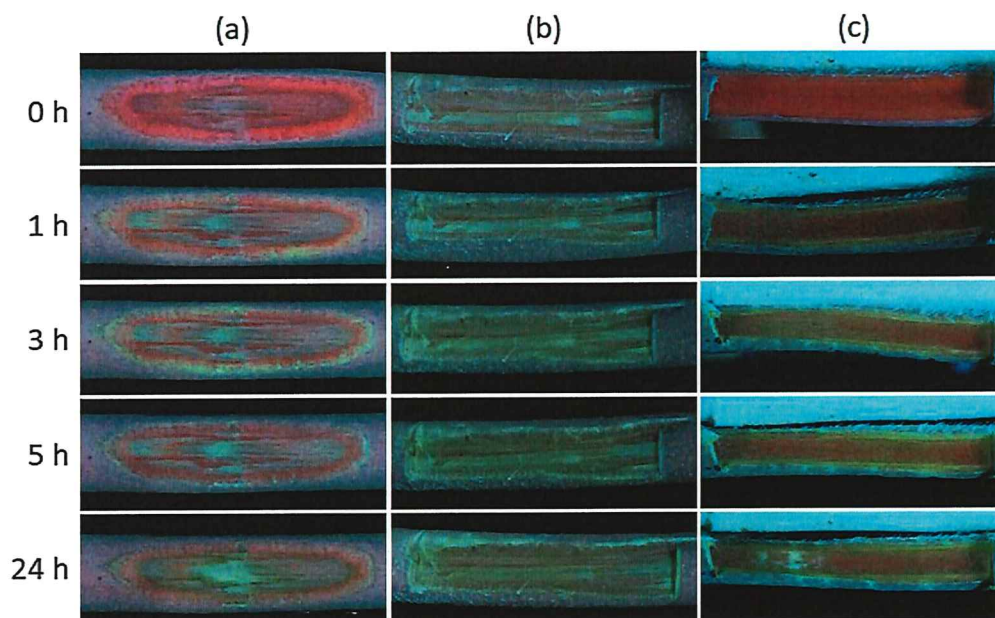


図 5 傷処理部分の時系列的な蛍光画像。

(a) 傷①, (b) 傷②, (c) 傷③の傷処理を行った時の蛍光画像を示す。

図 5 (a) の傷① (表皮組織系), 図 5 (b) の傷② (維管束組織系), 図 5 (c) の傷③ (基本組織系) それぞれについて, 各組織系の発する蛍光色変化を定量的に調べるため, 傷部分の色比率 (各色値/RGB 合算値) を算出した結果を図 6 に示した。縦軸が色比率, 横軸が経過時間を表す。

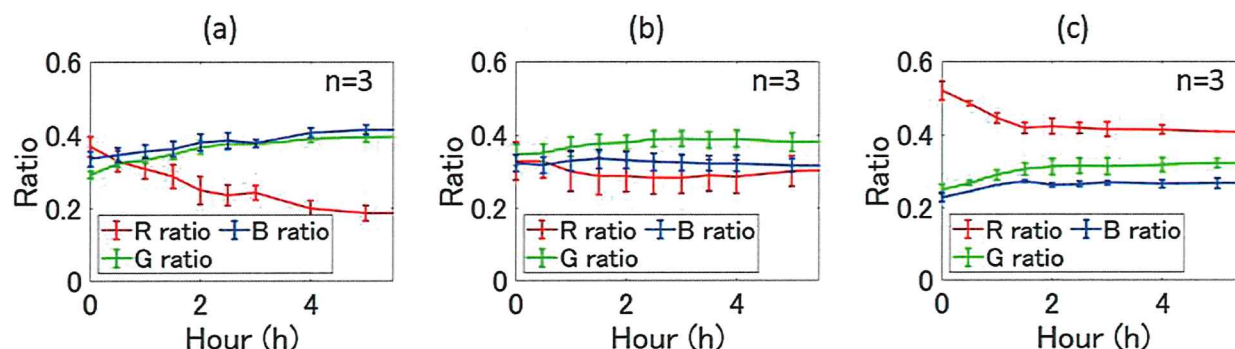


図 6 組織系ごとの色比率の変化。

(a) 傷①の表皮組織系, (b) 傷②の維管束組織系,  
(c) 傷③の基本組織系の色比率の時間変化

図 6 (a), (c) に示したように表皮組織系と基本組織系では時間経過とともに R 値が減少し G 値, B 値が増加したが, 一方で図 6 (b) に示した維管束組織系では時間経過に関わらず色比率の変化が小さかった。赤色の蛍光を発するクロロフィルは基本組織系と表皮組織系に含まれるが維管束組織系には含まれないため, 組織系による蛍光特性の経時変化の違いを生む要因の一つとしてクロロフィル含量が考えられる。

表皮組織系と基本組織系で創傷部のクロロフィル蛍光が弱くなっていく要因の一つとして, 傷表面の自己修復効果が考えられる。そこで, 癒傷により形成されるリグニンの観察を目的として, 傷①によって傷処理を受けた箇所の断面を共焦点レーザー型顕微鏡 (FV-1200, Olympus) により観察を行った結果を図 7 に示す。傷部分を含む茎を 1 mm 厚の輪切り状に切り出し, その断面を観測したため, 図中の 2 つの矢印間で挟まれた部分が傷処理部分を表している。なお, 癒傷組織に含まれているとされるリグニンは励起波長 488 nm のときに蛍光波長 510-550 nm の蛍光を発することが報告されているため<sup>6,7</sup>, 顕微鏡は励起波長 473 nm, 受光側のフィルタを 490-590 nm に設定した。図中のスケールバーは 1000  $\mu\text{m}$  である。

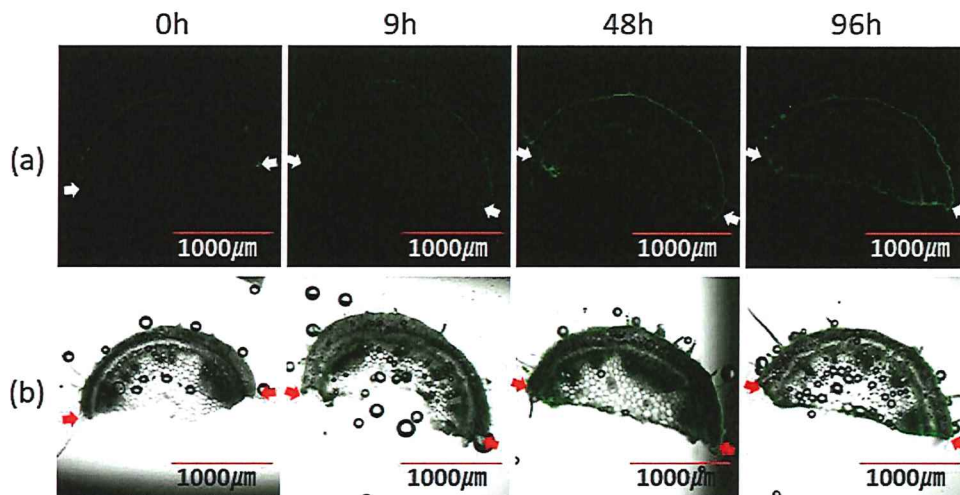


図 7 共焦点型レーザー顕微鏡を用いて得られた蛍光顕微画像。

(a) 蛍光画像，(b) 蛍光画像と透過画像を合成した画像を表す。左から順に傷処理から 0, 9, 48, 96 時間経過後の画像。

図 7 より，傷処理後からの時間経過とともに癒傷組織に含まれるリグニンに由来すると考えられる緑色蛍光が強くなっていた。植物の癒傷に関し，植物は創傷後の自己修復機能としてリグニンやスベリンといった物質を含む癒傷組織を形成することが知られている<sup>1</sup>。植物は紫外線による傷害，水分蒸散，外部からの病原体や物質の侵入といった要因への防御機構としてのクチクラの発達が知られている。例えばミニトマトではクチクラの薄い，あるいは剥がれた部位において内部組織の蛍光が強く観測され，クチクラの厚い部位では蛍光が弱いことが報告されている<sup>8</sup>。これと同様に，図 5 で見られたように癒傷とともに傷処理部分のクロロフィル蛍光が小さくなったのは，癒傷の過程で傷表面がリグニンを含む癒傷組織により覆われ，紫外励起光に対する防御効果を生んだことが一因と考えられる。癒傷組織の形成に伴い励起光が吸収されることですべてのピークの蛍光強度が減衰したことが推測される。

以上の結果から，蛍光画像で見られた傷処理部分の蛍光特性の経時的変化は，主にクロロフィルに由来する蛍光強度の変化によるものであることが分かった。また，蛍光顕微画像の撮像から，時間経過とともに傷処理部分にリグニン由来と考えられる緑色蛍光が強くなることが分かった。リグニンは紫外光を吸収することが知られており，癒傷組織の形成に伴いクロロフィル由来の蛍光強度が低下した可能性が考えられる。

癒傷組織の形成以外に傷部分の蛍光特性が変化の要因として，傷処理部分の乾燥や蛍光物質の変性等も考えられる。乾燥の可能性については本紙面では割愛したが，創傷後の栽培時の湿度を変えた場合であっても同様の蛍光色の変化が観測されたことから，乾燥状態



に関係なく観測されることも明らかとなっている。

蛍光物質の化学的変性については今回検証を行うことができなかった。EEM や共焦点レーザー型顕微鏡から得られた蛍光の測定の結果からのみでは、物質の定性・定量評価を行うことは難しい。今後はクロマトグラフィー等の化学分析により、傷処理部分の蛍光特性の変化と癒傷の関係を明らかにする必要がある。

## 要約

植物の癒傷能力の簡便かつ非破壊的な計測手法の確立を目指し、播種後 7 日後のダイズ幼苗の茎上に傷処理を施し、傷処理部分の励起蛍光マトリクス (EEM) による蛍光特性の測定、ならびに波長 365 nm を励起波長とした蛍光画像による経時変化の検証を行った。

ダイズ幼苗の茎の創傷部において、EEM から主に 3 種類の蛍光ピークの存在が確認された。また各蛍光ピークの強度は時間経過とともに減衰していくことが確認された。特に変化の大きかったクロロフィル由来の蛍光ピークに着目し、365 nm の励起光源を用いた蛍光画像を取得した結果、茎の表皮組織系および基本組織系においてクロロフィルによる蛍光が観測され、その蛍光強度は傷処理後の時間経過に応じて減少した。また癒傷組織に含まれるリグニンの観察を目的とし、共焦点レーザー型顕微鏡を用いて傷処理部分を観察したところ、傷処理から時間が経過するにつれてリグニン由来と考えられる緑色蛍光の強度が大きくなる結果が得られた。

以上の結果から、癒傷組織が励起光を吸収することでクロロフィル由来の蛍光強度が低下した可能性が示唆され、クロロフィル由来の蛍光強度から癒傷の程度や癒傷能力を画像で簡便に評価できる可能性が示された。

## 参考文献

1. Bostock, R. M. & Stermer, B. A. Perspectives on wound healing in resistance to pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **27**, 343–371 (1989).
2. Momin, A. *et al.* Identification of UV -Fluorescence Components. *Eng. Agric. Environ. Food* **6**, 165–171 (2013).
3. Coble, P. G., Green, S. A., Blough, N. V. & Gagosian, R. B. Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy. *Nature* **348**, 432–435 (1990).
4. 長尾誠也, 岩月輝希. 三次元蛍光分光光度法による深部地下水溶存腐植物質の簡易特性分析. *分析化学* **56**, 143–150 (2007).
5. Krause, G. H. & Weis, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 313–349 (1991).
6. Tao, X. *et al.* Abscisic acid mediates wound-healing in harvested tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **118**, 128–133 (2016).
7. Donaldson, L. Autofluorescence in plants. *Molecules* **25**, (2020).
8. Cho, B. K. *et al.* Detection of cuticle defects on cherry tomatoes using hyperspectral fluorescence imagery. *Postharvest Biol. Technol.* **76**, 40–49 (2013).