

画像解析によるカラマツ針葉のクロロフィル定量の可能性と課題

森林総合研究所林木育種センター北海道育種場 花岡 創・福田陽子・今井啓二

はじめに

カラマツ(*Larix kaempferi*)は北海道における主要な造林樹種の一つであり、第二世代精英樹の選抜など、育種改良等も積極的に取り組まれている(2,4,8)。カラマツは落葉針葉樹であり、秋に黄葉化して落葉することに加え、乾燥や高温などストレス条件下においても葉の褐色化が見られた後に落葉することなどが確認されている。それゆえ、環境条件の異なる複数試験地で個々の個体(品種)の葉色の変化を簡易かつ定量的に測定することができれば、多様な気象条件に対するカラマツ品種の適応性やフェノロジーの変異等の検証に有効と考えられ、このような技術開発が望まれる。本研究では、葉色の変化および生理情報との関連がある一つの指標としてクロロフィル a, b 量およびクロロフィル a/b 比に着目し、カラマツ針葉の写真から取得した赤(R)、緑(G)、青(B)値からクロロフィル a, b の総量やクロロフィル a/b 比を推定する精度と課題について検証することを目的とした。

材料と方法

1. 供試材料

合計 27 個体のカラマツポット苗(4年生、樹高 1.5~2m 程度)を供試材料とした。2016 年 4 月に、自然光条件のガラス温室に 10 個体、天井に寒冷紗(遮光率 60%)がかけられたガラス温室に 10 個体、屋外に 7 個体を配置し、2 つのガラス温室に配置された個体は乾燥ストレスを与えることで葉に軽度の障害が見られるものが含まれるようにした。屋外に配置された個体については、適宜冠水して乾燥ストレスが少ないように配慮した。

2. 画像解析

写真の撮影は 2016 年 9 月 15 日の晴天時に各個体 1 枝を対象に行った。写真撮影には、デジタルカメラを用いた非破壊的な手法と、枝を採取してスキャナでスキャンする破壊的な手法の 2 つを実施した。デジタルカメラ(OLYMPUS SP-100EE)での撮影では、対象とする枝の背後に白板を配置し、近傍に 18%標準反射板を配置して撮影を行なった。なお、撮影毎に 18%標準反射板でカメラの露出を自動調整するようにした。また、自然光条件のガラス温室、天井に寒冷紗をかけたガラス温室、屋外のそれぞれの場所で 1 個体を選び、カメラの露出設定を -1 から 2 まで 1 ずつ 4 段階に変化させて写真を撮影した。次に、デジタルカメラで撮影を行なった枝を採取し、ス

キャナ(Canon MG6530;解像度を 400dpi に設定)を用いて枝および 18%標準反射板を同時にスキャンした。

撮影された針葉の写真からの色情報の取得には、LIA32(9)を用いた。なるべく葉の陰が含まれないように葉部分を 1~3 箇所程度選択し、選択部分の赤(R)、緑(G)、青(B)の平均値を記録し、写真の複数箇所を選択した場合は色ごとにその平均値を算出した。また、それぞれの写真における 18%標準反射板の R, G, B 値も合わせて記録し、葉部分の R, G, B 値と、標準反射板部分の R, G, B 値との比についても算出した。

3. クロロフィル量の推定

スキャンが完了した枝からランダムに 0.1g 程度の葉を採取し、電子天秤で葉重量を測定した上でプラスチックチューブにつめた。また、1 サンプル(1 枝)については、葉を詰める量を 5 段階にわけて、抽出されるクロロフィル量の違いが確認できるようにした。葉サンプルが詰められたチューブに 3ml のジメチルホルムアミドを加え、遮光された冷蔵庫(4°C)で約 12 時間静置し、クロロフィルを抽出した。分光光度計(BECKMAN COULTER DU730)を用いて、クロロフィル抽出溶液の 646.8nm および 636.8nm における吸光度を測定し、次式を用いてクロロフィル a, b およびその合計を推定した(7)。

$$\text{Chl a} = 13.43 * A_{663.8} - 3.47 * A_{646.8}$$

$$\text{Chl b} = 22.90 * A_{646.8} - 5.38 * A_{663.8}$$

$$\text{Chls a+b} (\mu\text{M}) = 19.43 * A_{646.8} + 8.05 * A_{636.8}$$

$A_{646.8}$: 646.8nm における吸光度

$A_{636.8}$: 636.8nm における吸光度

なお、クロロフィル量については、葉重量 1g あたりのクロロフィル量に換算して以降の解析に用いた。

4. 画像からのクロロフィル量の推定

上記 2. において推定した葉部分の R, G, B 値を説明変数に、3. において推定したクロロフィル量、あるいは、クロロフィル a, b 量から算出した a/b 比を応答変数とする重回帰分析を行なった。R, G, B 全てを説明変数としたモデル、いずれか 2 色を説明変数としたモデルおよび、いずれか 1 色を説明変数としたモデルの合計 7 モデルを検討し、赤池情報量基準(AIC)を参考にして最適なモデルを判断した。また、最適モデルから予測されたクロロフィル量あるいはクロロフィル a/b 比と、3. で観察されたクロロフィル量あるいはクロロフィル a/b 比との相関を確認し、予測の妥当性を考察した。

結果と考察

1. 画像解析

デジタルカメラの露出設定を-1 から 2 まで 4 段階に変化させて撮影した写真から測定した葉部分の R, G, B 値は、露出を上げるにつれて値が高くなる傾向があり (図 1a), 撮影した光環境や露出設定によって値が大きく変動してしまうことが示された。一方、葉部分の R, G, B 値を 18% 標準反射板部分の R, G, B 値との比として補正した場合は、露出設定に関わらず概ね同程度の値となった (図 1b)。この補正手法の有効性は過去の研究事例 (6) においても報告されており、撮影毎の光環境の不均一性による R, G, B 値の変動は、標準反射板を用いることで一定程度補正できると考えられた。

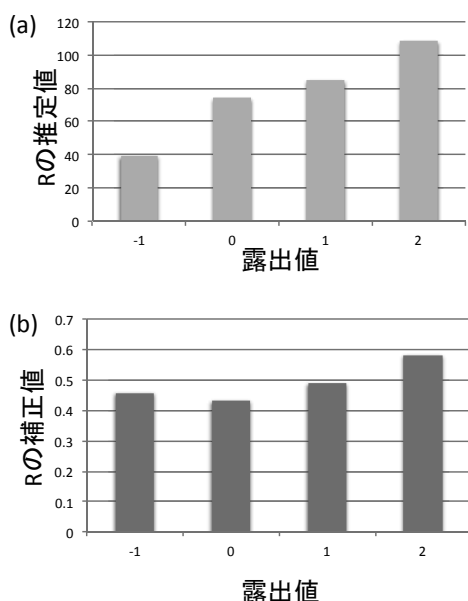


図 1. 屋外にある 1 個体の枝で露出値を変更して撮影した場合の葉の R 値平均(a)と、標準反射板の R 値平均で補正した場合の補正値(b)の例

一方、スキャナ写真において 18% 標準反射板部分の R, G, B 値を確認したところ、今回使用したスキャナの特徴として B 値だけがやや高くなる傾向があったものの、撮影毎の R, G, B 値の変動はほとんどなく (図 2), 安定した撮影環境であることが示唆された。それゆえ、スキャナ写真ではサンプル間の色情報の比較精度は高いと考えられた。デジタルカメラ写真から推定した葉の R, G, B の補正値とスキャナ写真から推定した葉の R, G, B の補正値を比較したところ、全の色において有意な相関関係が見られた (無相関検定, $p < 0.05$)。

2. クロロフィルの定量

1 つの枝から葉を採取し、葉重量を 5 段階に変化させて 3ml のジメチルホルムアミドでクロロフィルを抽出した結果を図 3 に示す。投入する葉の重量が増加することに伴って、抽出されたクロロフィル量が増加する線形の関係が導かれた。なお、葉重 0.2g 以上の場合には抽出でき

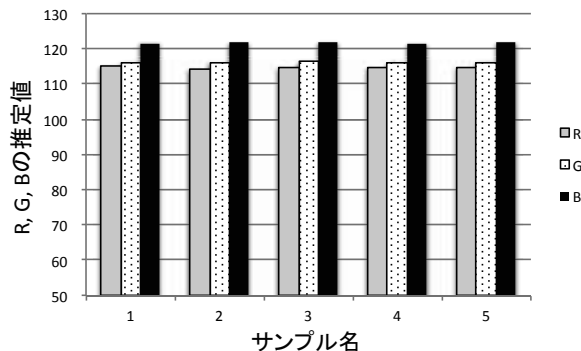


図 2. スキャナ写真における 18% 標準反射板の R, G, B 値の推定値の例

たクロロフィル量が頭打ち (過小評価) となっている可能性もあり、この点には注意が必要であると思われた。しかし、本研究では各サンプルとも 0.1g 程度としたため、ジメチルホルムアミドを用いたカラマツ針葉からのクロロフィル抽出は有効であり、その定量も可能であると判断した。

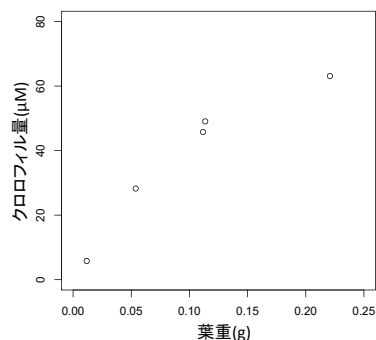


図 3. 葉重と抽出されたクロロフィル量との関係

3. 画像からのクロロフィル量の推定

モデル選択の結果、デジタルカメラ写真では R, G, B 全てを説明変数としたモデルと、R と G を説明変数としたモデルの AIC 値がほぼ同じで最小となった (表 1)。

表 1. 各モデルの AIC 値(クロロフィル量)

| 説明変数 | AIC 値 | |
|-------|---------|--------|
| | デジタルカメラ | スキャナ |
| R+G+B | 280.57 | 281.93 |
| R+G | 280.97 | 283.02 |
| R+B | 284.38 | 281.55 |
| B+G | 290.51 | 288.23 |
| R | 291.26 | 286.51 |
| G | 290.73 | 290.87 |
| B | 289.19 | 289.9 |

一方、スキャナ写真の場合は、R, G, B および R と B を説明変数としたモデルで AIC 値がほぼ同じで最小となった (表 1)。本研究では、どちらの撮影手法においても 3 色全てを説明変数としたモデル (表 2) を採用することとし、以

降の解析を進めた。

表 2. 重回帰分析の結果 (クロロフィル量)

| a) デジタルカメラ写真 | | | | |
|--------------|---------|--------|-------|----------|
| パラメータ | 係数 | 標準誤差 | t値 | p値 |
| 切片 | 350.87 | 45.32 | 7.74 | 7.48E-08 |
| R | -552.17 | 154.42 | -3.57 | 0.0016 |
| G | 506.56 | 215.62 | 2.35 | 0.0278 |
| B | 189.81 | 129.84 | 1.46 | 0.1573 |

| b) スキャナ写真 | | | | |
|-----------|--------|-------|--------|---------|
| パラメータ | 係数 | 標準誤差 | t値 | p値 |
| 切片 | 377.6 | 111.9 | 3.373 | 0.00262 |
| R | -453.8 | 157.7 | -2.877 | 0.00852 |
| G | 346.5 | 290.7 | 1.192 | 0.24547 |
| B | 204.1 | 122.2 | 1.669 | 0.10861 |

R, G, B それぞれの係数推定値を見ると、デジタルカメラとスキャナ写真どちらにおいても、赤(R)の絶対値が高くなっていましたが、今回用いた試料には傷害を受けて部分的に褐色化した葉を含んでいたことなどが影響したのではないかと考えられる。モデルからの予測値と実測値との相関を確認したところ(図 4)、デジタルカメラとスキャナのどちらを用いた場合でも、実測値と予測値の間には有意な相関関係が導かれ(無相関検定; $p < 0.01$)、今回のクロロフィル量の測定範囲内では一定の予測が可能であると考えられた。しかし、デジタルカメラ写真を用いた場合には予測値と実測値との関係についてやや外れ値が多くなる傾向にあった。本研究では、寒冷紗が設置された温室という直射光がほとんどあたっていなかったような環境であっても、デジタルカメラで撮影した標準反射板部分の R, G, B 値の変動が見られた。デジタルカメラ写真では 18%標準反射板を用いた補正を行なったとしても光環境の不均一性の影響を完全に排除することは難しく、それが誤差を大きくしていることが考えられる。撮影環境を均一にできるような工夫を考えることは今後の課題であろう。また、カメラ自体の特性を詳細に把握して補正項を加えることで、より推定精度を上げることができる可能性もあるが(3)、カメラメーカーが設定の詳細を公開していないことが多いことや、解析が複雑となり本手法の汎用性を低下させること等も考えられ、有効性と手間のバランスを考える必要があるであろう。この検討も今後の課題である。

4. 画像からのクロロフィル a/b 比の推定

モデル選択の結果、デジタルカメラおよびスキャナ写真どちらにおいても、R, G, B 全てを説明変数としたモデルと、R と G、あるいは R と B を説明変数としたモデルの AIC 値がほぼ同じで最小となった(表 3)。そこで、クロロフィル a/b 比についても、クロロフィル量の推定時と同様に R, G, B 全てを説明変数としたモデルを用いて以降の解析を行うこととした(表 4)。

デジタルカメラとスキャナ写真のそれぞれのモデルを用いて導いた予測値と実測値との相関を確認したところ(図 5)、どちらにおいても予測値と実測値との有意な相関関係が確認された(無相関検定; $p < 0.01$)。しかしなが

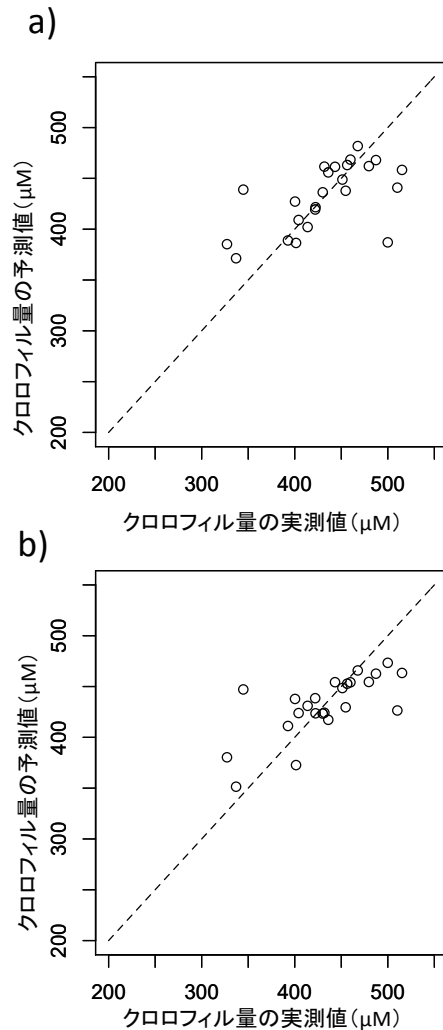


図 4. クロロフィル量の実測値とデジタルカメラ写真からの予測値(a)およびスキャナ写真からの予測値(b)の関係。破線は実測値と予測値が一致する場合の線。

ら、デジタルカメラ写真については、クロロフィル量の推定の場合よりも実測値と予測値の相関が悪いように見受けられ、クロロフィル a 量の過小評価、あるいはクロロフィル b 量の過大評価が生じていたことが疑われた。クロロフィル a/b 比についても、画像からの推定が一定程度可能であるが、クロロフィル量を推定する場合と同様に撮影条件の均一化に関する課題があることが認識された。

表 3. 各モデルの AIC 値 (クロロフィル a/b 比)

| 説明変数 | AIC値 | |
|-------|---------|-------|
| | デジタルカメラ | スキャナ |
| R+G+B | 30.08 | 22.30 |
| R+G | 30.15 | 22.16 |
| R+B | 31.7 | 22.58 |
| B+G | 39.06 | 34.33 |
| R | 36.93 | 26.03 |
| G | 39.05 | 35.76 |
| B | 39.04 | 39.13 |

表 5. 重回帰分析の結果 (クロロフィル a/b 比)

| a)デジタルカメラ写真 | | | | |
|-------------|--------|-------|--------|---------|
| パラメータ | 係数 | 標準誤差 | t値 | p値 |
| 切片 | 1.535 | 0.438 | 3.501 | 0.00192 |
| R | 5.071 | 1.493 | 3.396 | 0.00248 |
| G | -3.781 | 2.085 | -1.813 | 0.08289 |
| B | -1.697 | 1.256 | -1.352 | 0.18964 |

| b)スキャナ写真 | | | | |
|----------|--------|-------|--------|----------|
| パラメータ | 係数 | 標準誤差 | t値 | p値 |
| 切片 | 1.059 | 0.914 | 1.158 | 0.258612 |
| R | 5.099 | 1.288 | 3.959 | 0.000623 |
| G | -3.376 | 2.374 | -1.423 | 0.168297 |
| B | -1.279 | 0.998 | -1.281 | 0.212889 |

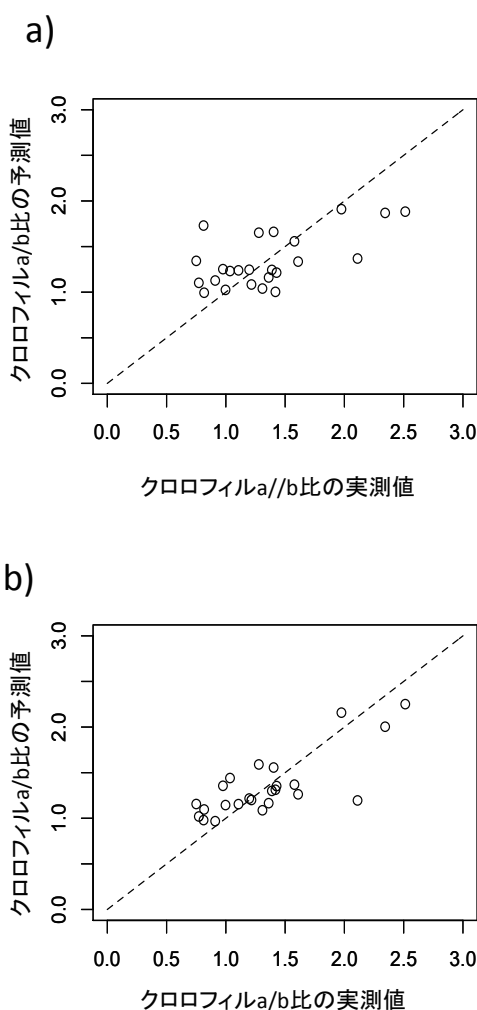


図 5. クロロフィル a/b 比の実測値とデジタルカメラ写真からの予測値(a)とスキャナ写真からの予測値(b)。破線は実測と予測が一致する場合の線。

まとめ

ハイパースペクトルカメラやマルチスペクトルカメラなど、高価な機器を用いて測定した分光反射特性からクロロフィル量その他の推定が可能であることは多くの研究

が示している(1,5)。本研究では、安価なデジタルカメラで撮影した写真から抽出した色情報のみを用いて、カラマツ針葉のクロロフィル a, b の総量およびクロロフィル a/b 比を推定することが一定程度可能であることを示すことができた。ただし、屋外でのデジタルカメラ撮影では、予測のはずれ値が多くなるなどの傾向もあったため、求める精度によって用いる撮影手法には注意を払うべきであろう。屋外での非破壊測定に際して、USB 電源供給タイプのスキャナを利用することなども、一つの解決策となり得るであろう。また、デジタルカメラやスキャナの機種が変わると、今回推定した重回帰式の係数推定値が変化する点については注意が必要である。

謝辞

本研究の解析を行うにあたっては森林総合研究所林木育種センターの高島佑哉氏に助言をいただいた。厚く御礼申し上げる。本研究は生研支援センター、革新的技術開発・緊急展開事業(うち地域戦略プロジェクト)「カラマツ種苗 安定供給 ため 技術開発」の支援を受けた。

引用文献

- (1)韓慶民 (2005) 葉の光合成機能と分光反射特性による近接リモートセンシングへの応用. 日林誌. 87: 364-372
- (2)黒丸亮 (2015) カラマツ林業と今後の育種の展望. 森林遺伝育種. 4: 167-172
- (3)松田真典・大澤昭一・保坂幸男・金田和文・山下英生 (2003) 近接リモートセンシングによる水稻の生育診断-デジタルカメラによる葉身窒素含有率の測定- 日本リモートセンシング学会誌. 5: 506-515
- (4)宮下久哉・平岡裕一郎・三浦真弘・小野雅子・星比呂志 (2013) 関東育種基本区におけるカラマツ第2世代精英樹候補木の選抜. 林木育種センター年報 H26 年度版: 24-36
- (5)中路達郎 (2009) 2. 分光測定法 g. 葉群の分光反射と分光植生指数. 低温科学. 67: 497-505
- (6)尾崎英樹・山田龍太郎・田宮誠司・三浦秀穂・杉浦綾 (2014) スマートフォンカメラによるパレイショ表皮のクロロフィル含有量及びアントシアニン含有量の推定. 農業情報研究 23: 132-139
- (7)Porra RJ・Thompson WA・Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Bioch. Biophys. Acta 975: 384-394
- (8)田村明・山田浩雄・福田陽子・矢野慶介・竹田典明ら (2014) 北海道育種基本区における第2世代精英樹候補木と優良木の選抜. 林木育種センター年報. H26 年度版: 112-121
- (9)山本 一清 (2010) LIA for Win32. Version0.378 (<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~shinkan/LIA32/download.html>)