

초분광 단파적외선 영상 기술을 이용한 고추의 수분스트레스 측정 기술 개발

박은수 · 조병관*

충남대학교 바이오시스템기계공학과

Development of Drought Stress Measurement Method for Red Pepper Leaves using Hyperspectral Short Wave Infrared Imaging Technique

Eunsoo Park and Byoung-Kwan Cho*

Department of Biosystems Machinery Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract. This study was conducted to investigate the responses of red pepper (Hongjinju) leaves under water stress. Hyperspectral short wave infrared (SWIR, 1000~1800 nm) reflectance imaging techniques were used to acquire the spectral images for the red pepper leaves with and without water stress. The acquired spectral data were analyzed with a multivariate analysis method of ANOVA (analysis of variance). The ANOVA model suggested that 1449 nm wavebands was the most effective to determine the stress responses of the red pepper leaves exposed to the water deficiency. The waveband of 1449 nm was closely related to the water absorption band. The processed spectral image of 1449 nm could separate the non-stress, moderate stress (-20 kPa), and severe stress (-50 kPa) groups of red pepper leaves distinctively. Results demonstrated that hyperspectral imaging technique can be applied to monitoring the stress responses of red pepper leaves which are an indicator of physiological and biochemical changes under water deficiency.

Additional key words : red pepper, phenotyping, water stress, infrared, hyperspectral imaging

서 론

국제연합(United nations, UN)은 2050년의 세계인구가 91억까지 증가할 것이며 이를 대비한 식량 생산증가 대책이 미흡할 시 심각한 식량 부족현상이 발생할 것을 예측하고 대책 마련의 필요성을 주장하고 있다. 인구증가와 더불어 지구 온난화로 인한 기상이변의 증가 또한 미래의 안정적인 식량확보에 큰 장애가 될 것으로 예상된다. 따라서 생산성이 향상되고 기후변화에 대응할 수 있는 작물 개발은 세계적으로 중요하고 시급한 사안으로 인식되고 있다(Chang 등, 2011).

최근까지 다양한 육종기술이 연구개발되어 왔으나 생육관련 유전자가 실제생육환경과 결합하여 어떻게 발현되는지에 관한 표현형검정은 매우 복잡하여 기존의 인력에 의존하는 방식으로는 정확한 목표인자의 발현을 정량적으로 확인하기 어려웠다. 이러한 한계를 극복하기 위해 최근에는 첨단 영상계측기술을 기반으로 작물의 유전

자 정보와 표현형 정보를 대량으로 수집하고 분석할 수 있는 피노믹스(Phenomics)라는 학문이 생성되었다(Houle 등, 2010).

피노믹스는 세포, 조직, 생명체 등에서 나타나는 물리적, 형태적, 생리학적, 생화학적 특징을 공학기술과 접목하여 해석하는 생물학의 한 분야로서 식물의 색깔, 길이, 잎 면적, 수분 및 엽록체 상태 등의 생육정보들을 비파괴 자동계측하여 정량화할 수 있는 공학기반의 첨단기술이다(Lee 등, 2011). 실험실에서 얻은 목표유전자의 기능이 생장 환경조건에서 발현되는지 확인하기 위해서는 대량의 개체 수와 반복 측정이 요구되는데 이를 위해서는 생육정보를 고속 자동으로 계측할 수 있는 고속탐색법(High trough-put screening, HTS)이 필요하다. 표현형 고속탐색법으로 시스템을 구성하여 대량의 식물에 대한 표현형을 검정할 수 있다면 목표한 유전자가 발현된 품종을 선발하는데 있어 효율성을 극대화할 수 있어 초고속 육종이 가능하다(Lee 등, 2011). 초고속 육종을 위한 표현형 고속탐색 시스템은 작물의 다양한 생체 정보를 자동으로 획득하고, 이 정보와 식물의 유전자정보 사이의 연관성(Phenomics-genomics pipeline)을 분석하게 된다(Furbank and Tester, 2011). 표현형 고속탐색 시스템

*Corresponding author: chobk@cnu.ac.kr

Received February 7, 2014; Revised February 27, 2014;

Accepted March 11, 2014

에 대한 연구는 바스프(BASF), 몬산토(Monsanto) 및 렘나텍(LemnaTec) 등의 해외기업에서 활발히 수행되고 있으며 일부는 상용화 되어있다.

표현형 고속탐색 시스템에서 일반적으로 사용되는 작물의 생육정보 측정 방법은 칼라영상, 근적외선영상, 열영상, 형광영상 등의 비파괴 영상측정기술이 있다. 특히 근적외선 영역에서 O-H 작용기가 반응하는 셀룰로오스(1200, 1490, 1780 nm)와 물 반응대역(1410, 1450 nm), 그리고 N-H 작용기가 반응하는 단백질 반응대역(1020, 1510, 1690 nm)은 작물의 생육상태를 나타내는 중요한 근적외선영상 파장영역으로 활용되고 있다(Annemarie 등, 2009; Kim, 2004). 열영상은 작물의 온도를 측정하므로 작물의 환경스트레스에 대한 정량적 정보를 제공하며, 형광영상은 광합성 효율과 밀접한 엽록체의 상태를 영상으로 보여줄 수 있다. 따라서 이러한 영상기술을 이용하여 작물의 형태적, 생리적인 특징을 정량화하고 통계적으로 분석하여 식물유전인자의 발현 여부나 작물의 생육상태를 판단할 수 있다.

본 연구에서는 우리나라 대표적인 채소작물 중 하나인 고추를 대상으로 수분스트레스 표현형 검정에 활용될 수 있는 비파괴 영상기술을 개발하고자 하였다. 고추는 우리나라에서 가장 많이 소비되는 채소작물 중 하나이다. 건고추의 경우 2011년 1인당 소비량이 3.3kg로 추정되고 있으며 전세계 고추 소비량인 0.5kg에 비해 6배 이상 많이 소비하고 있다. 일반적으로 고추와 같은 채소작물은 기후변화에 민감하여 가뭄 등의 이상기후에 노출되면 생산에 큰 영향을 받게 된다. 대표적인 사례로 2012년 고창에서 발생한 가뭄을 들 수 있는데 이 때 고추 농가에 많은 피해가 발생하였다.

가뭄에 잘 견디는 작물을 효율적으로 육종하기 위해서는 수분스트레스에 강한 작물을 신속 정확하게 선별해야 하는데 이를 위해서는 작물의 수분스트레스를 비파괴적으로 측정하기 위한 피노믹스 기술이 필요하다(Berger 등, 2010). 해외에서는 작물의 수분스트레스를 비파괴적으로 측정하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있으나 국내에서는 아직 미흡한 실정이다. Grant 등(2006)은 열화상 카메라와 토양수분장력을 이용하여 포도나무, 콩, 루핀(Lupin)의 수분 스트레스를 측정하였다. Eitel 등(2006)은 포플러 나무의 스트레스 증상을 단파적외선(Short wave infrared, SWIR) 영역인 1300 nm~2500 nm 파장을 이용하여 영상을 측정하였고 1500 nm와 1750 nm 영역에서 가장 큰 상관관계를 보인다고 보고하였다.

최근 비파괴적으로 작물의 스트레스를 분석하는 방법으로 초분광 영상기술을 이용한 기술개발이 시도되고 있다. 초분광 영상기술은 기존의 분광기술과 영상기술을 융합하여 가시광선 및 근적외선 또는 형광의 연속적인

분광영상을 획득 할 수 있는 기술로서 대상물의 물리적 특성뿐만 아니라 생화학적 특성까지 종합적으로 분석하는 것이 가능하다. 초분광 영상시스템을 작물의 수분스트레스에 적용한 사례는 Zhou 등(2011)이 토마토 잎의 수분스트레스 반응을 측정한 연구결과가 있다.

본 논문에서는 고추 작물의 영상정보를 획득하고 수분스트레스에 반응하는 작물의 비파괴 영상인자를 구명하고자 하였다. 고춧잎의 수분스트레스 반응에 대한 비파괴적 지표를 구명하기 위해 초분광 단파적외선 영상 시스템을 구축하여 분광영상정보를 획득하고 일원분산분석 방법(Analysis of variance, ANOVA)을 이용하여 수분스트레스 측정을 위한 최적 광파장을 선정하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 고추의 품종은 홍진주이며 모종을 화분에 정식한 후, 10일 동안 충분한 물을 공급하여 환경에 적응시킨 후 실험에 사용 하였다. 충분한 물을 공급한 정상군 9개와 인위적으로 물 공급을 중단한 스트레스군 9개를 나누어 실험을 수행하였다. 물 공급을 중단한 후 시간에 따라 화분의 토양흡착수압을 측정하고 동시에 고춧잎의 초분광 단파적외선 영상을 측정하였다.

2. 실험장치

토양수분량과 밀접한 토양흡착수압(kPa)은 텐시오미터(Tensiometer, Infield7c T5 set, UMS, Germany)를 이용하여 측정하였다. 화분의 수분량 측정을 위해 매일 텐시오미터를 이용하였다. 텐시오미터가 흔들리지 않고, 화분내 토양수분량의 측정 편차를 줄이기 위해 토양표면에서 7cm 깊이에 센서를 위치시켜 3번 측정된 값을 평균하여 사용하였다. 토양흡착수압 측정 이후 해당 화분의 고춧잎을 채취하여 초분광 단파적외선 영상을 촬영하였다.

초분광 단파적외선 영상 시스템의 측정 범위는 1000nm~2500nm이며 본 연구에 사용된 초분광 단파적외선 영상 시스템은 Fig. 1과 같다. 초분광 영상시스템은 mercury cadmium telluride sensor(MCT)센서를 이용하는 단파장 적외선 카메라(Xeva-2.5-320, Xenics, Belgium), Imaging spectrograph(SWIR, Headwall photonics, Fitchburg, MA, USA)와 라인스캔방식으로 초분광 영상을 획득할 수 있는 시료 이송부로 구성하였다. 이송 테이블 위에 고춧잎을 위치시킨 후 스텝모터로 구동되는 이송부를 이동시키며 라인스캔 방식으로 초분광 단파적외선 영상을 획득하였다.

초분광 영상을 촬영한 후 white reference와 dark reference를 촬영하여 각각의 초분광 영상에서 노이즈 값

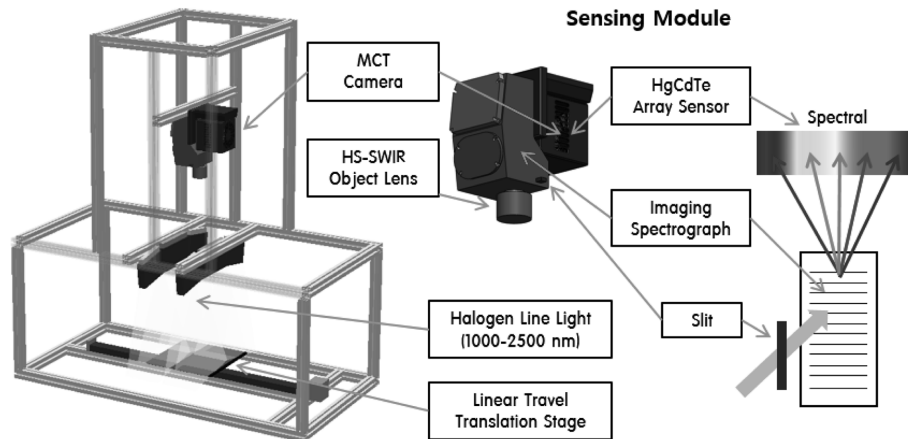


Fig. 1. Principle of the hyperspectral SWIR imaging system.

을 제거하고 white reference의 반사값을 100%로 하는 상대값으로 변환하였다. White reference로는 광 반사율이 99% 이상인 telfon white board를 이용하였고, dark reference는 빛을 완전히 차단한 암실내부에서 조명을 사용하지 않은 상태로 촬영한 영상값을 이용하였다. White reference를 기준으로 산출한 대상물의 상대반사값(%)은 아래의 식(1)과 같은 공식을 이용하였다.

$$R = \frac{R_i - D}{W - D} \times 100(\%) \quad (1)$$

여기서, R은 상대반사값, R_i는 샘플을 측정 한 픽셀값, D는 dark reference값, W는 white reference값이다.

3. 실험방법

각 9개씩의 정상군과 스트레스군의 고추작물에 반복적으로 물을 공급하고 스트레스군을 대상으로 특정시점에서 물공급을 중단하였다. 정상군의 경우 하루에 한 번씩 물을 공급하여 토양수분량을 -4kPa 이상으로 유지하였으며, 물을 공급하지 않은 스트레스군은 하루에 한 번씩 수분흡착수압을 측정하였다. 일반적으로 식물은 토양흡착수의 압력이 -10kPa일 때부터 스트레스를 받기 시작한다고 알려져 있으므로(Kim, 2002), 이를 기준으로 고추의 수분스트레스 시점을 판단하였다. 측정된 데이터를 바탕으로 수분량이 약 -15kPa~-20kPa 감소할 때마다 작물의 잎을 채취하였다. 시료의 생육상태를 일관성있게 모니터링하고 비교적 빠른 수분스트레스 증상을 보이는 지면에서 4번째 잎을 시료로 채취하여 초분광 단파적외선 영상을 촬영하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 활용한 분산분석법은 두 개 이상의 다수

집단을 비교할 때 집단 내의 분산 또는 총 평균과 각 집단 평균의 차이에 의해 생긴 집단 간 분산을 비교하여 계산한 F값을 이용하는 가설 검정방법이다. 특히 일원분산분석은 독립변수가 1개이며 독립변수 내의 집단이 2개 이상인 경우에 사용하는 방법이다. 그룹 간 제곱평균이 커지거나 그룹 내 제곱평균이 작아지면 F값이 커지게 되고 F값이 크다는 것은 그룹 간에 차이가 크고 각 그룹을 구별하기 쉽다는 것을 의미한다. 초분광 단파적외선 영상에서 정상군과 스트레스군의 스펙트럼을 추출한 후 각 파장별로 두 그룹의 반사광값에 대한 ANOVA F값을 계산하여 두 그룹을 가장 잘 구분하는 파장을 분석하였다. 데이터 분석은 MATLAB(Ver. R2013a, Mathworks, Natick, MA, USA) 프로그램을 이용하여 수행하였다.

Fig. 2는 정상군과 스트레스군의 평균 단파적외선 스펙트럼을 나타낸다. 그림에서 정상군과 스트레스군의 평균스펙트럼에서 차이가 보이긴 하나 명확하게 차이가 나는 부분을 판단하기는 어렵다. 따라서 전체 파장에 대한 파장별로 ANOVA 분석을 실시하였다. ANOVA 분석결과 Fig. 3과 같이 1449nm에서 정상군과 스트레스군의 F값이 가장 높게 나타났다.

물체에 적외선을 조사하면 다양한 전자기 복사선이 분자의 진동을 유발 시키는데, 이에 따라 즉각적인 반응을 보인다. 특히 분자의 고유 진동수와 복사선의 에너지 수준이 동일하게 되면 해당 물체에 흡수되어 분자의 에너지 준위가 상승하고, 반사되는 에너지가 감소된다. 따라서 적외선 스펙트럼이 일정 구간에서 흡수될 경우 특정 성분이 존재함을 알 수 있다(Lee, 2004). 이러한 원리로 특정 성분의 함량을 예측할 수 있는데, 단파적외선 영역에서 물 분자의 흡수 영역은 1450nm, 1940nm로 알려져 있다. Carter(1991)는 잎의 수분함량에 따라 단파적외선 영역의 반사광이 감소하며, 특히 1450, 1920, 2500nm의 영역에서 가장 큰 차이를 보인다고 보고 하였다. 본 실

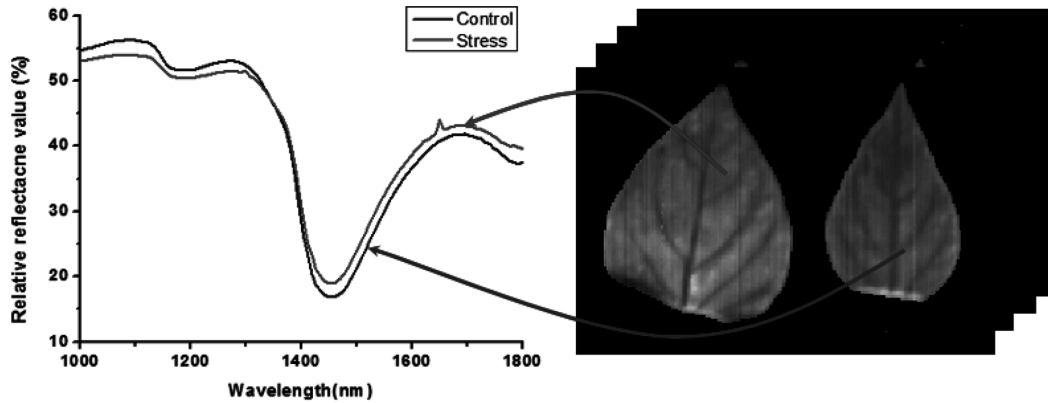


Fig. 2. Mean spectra of controlled and water stressed red pepper leaves and their hyperspectral SWIR image.

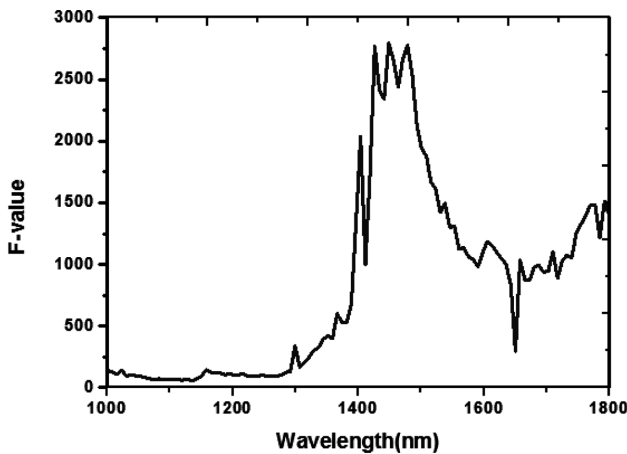


Fig. 3. F-values of one-way ANOVA for the discrimination of controlled and water stressed red pepper leaves.

힘의 경우도 1449nm에서 정상군과 스트레스군이 가장 뚜렷이 구분되는 것으로 분석되어 수분스트레스와 직접적인 연관성이 있는 수분함량 정도를 비파괴적으로 계측

할 수 있음을 보여주었다.

분산분석결과로 획득한 1449nm 영역의 영상을 초분광 영상에서 분리하여 영상처리를 실시하였다. 1449nm의 영역에서 수분스트레스 반응을 나타내는 부분을 구분하기 위해서는 반사 이미지값에 대한 임계값을 알아야 한다. 정상군과 스트레스군의 이미지값의 분포를 확인하기 위하여 정상잎과 토양흡착수압이 -20kPa인 잎(Fig. 4a), 정상잎과 토양흡착수압이 -50kPa인 잎(Fig. 5a)을 히스토그램으로 표현하였다. 서로 다른 히스토그램의 분포에서 정상군과 스트레스군을 나눌 수 있는 적절한 임계값을 찾기 위해 가우시안 회귀식을 사용하여 -20kPa과 -50kPa 히스토그램을 모델링하였고, 두 함수의 그래프가 만나는 부분을 계산하여 임계값으로 선정하였다(Fig. 4b, Fig. 5b). 획득한 임계값을 기준으로 분광영상을 이진화 하였는데 임계값보다 높은 값을 붉은색으로 낮은 값을 흰색으로 표현하였다(Fig. 6, 7). Fig. 6c와 Fig. 7c를 보면, 수분스트레스를 받은 잎의 반사 이미지값이 높은 것을 알 수 있다. Fig. 6c은 수분 스트레스가 -20kPa일 때의

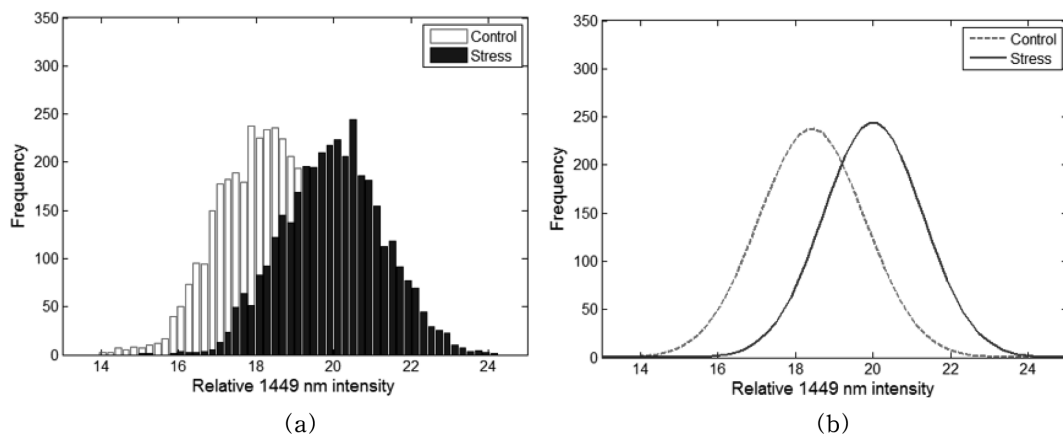


Fig. 4. Histogram (a) and Gaussian model (b) for relative SWIR intensity of controlled and water stressed (-20 kPa) red pepper leaves at the wavelength of 1,449 nm.

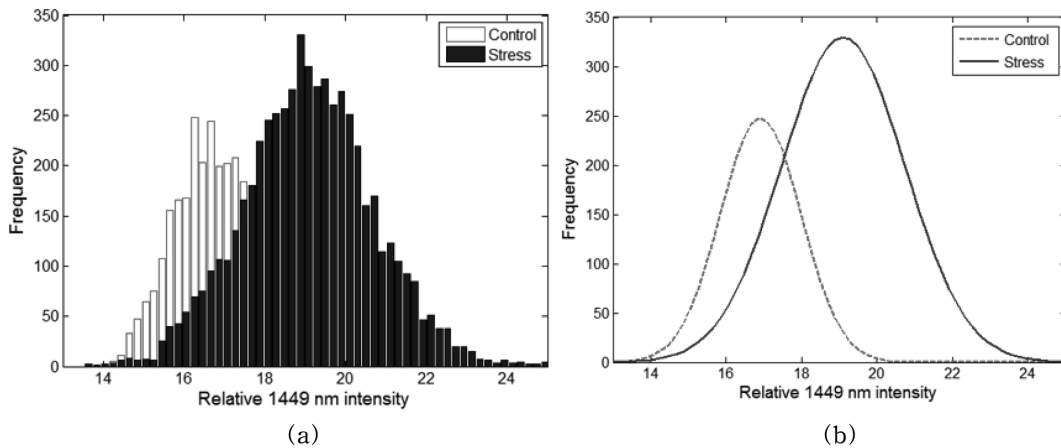


Fig. 5. Histogram (a) and Gaussian model (b) for relative SWIR intensity of controlled and water stressed (-50 kPa) red pepper leaves at the wavelength of 1,449 nm.

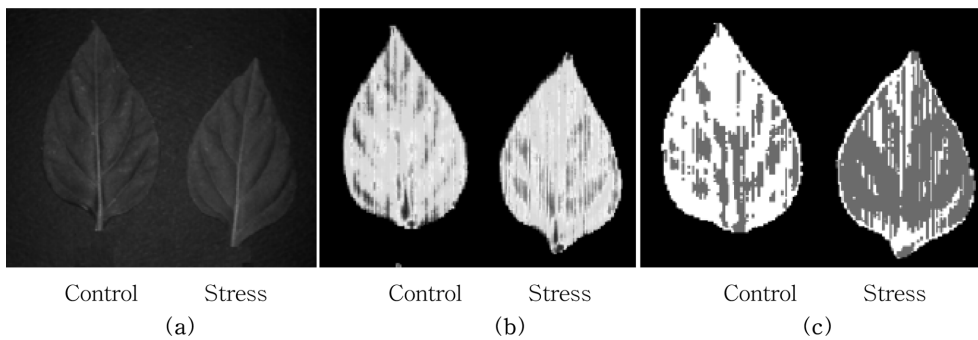


Fig. 6. Original image (a), SWIR image (b) and (c) binary image of representative controlled and water stressed red pepper leaves (-20 kPa), respectively.

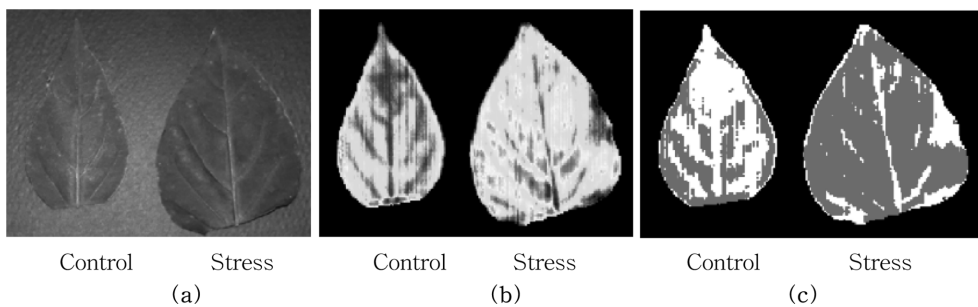


Fig. 7. Original image (a), SWIR image (b) and (c) binary image of representative controlled and water stressed red pepper leaves (-50 kPa), respectively.

고춧잎을 이진화 시킨 이미지이고 Fig. 7c는 수분 스트레스가 -50kPa일 때의 고춧잎을 이진화 시킨 이미지이다. -20kPa과 -50kPa의 스트레스 차이를 보기위해 임계값 이상과 이하의 개수를 파악하여 수치화하였다(Table 1). 정상잎은 전체 픽셀수 3985개 중 1121(28%)개가 임계값 이상인 스트레스 반응을 보였다. 스트레스군의 경우, 토양흡착수압이 -20kPa일 때의 샘플은 전체 픽셀수 3593개 중 2616개(72%)가 임계값 이상인 스트레스 반응을 보였고,

-50kPa일 때의 샘플은 전체 픽셀수 5710개 중 4797개(84%)가 임계값 이상인 스트레스 반응으로 나타났다.

결과에서 알 수 있듯이 정상군과 스트레스군은 최대 56%가 차이가 있어 명확하게 구분이 가능하였다. 토양흡착수압이 -50kPa인 잎이 -20kPa 보다 12% 더 스트레스 반응을 나타내는 임계값 이상의 이미지값을 포함하고 있는 것으로 나타나 본 연구에서 구명한 1449nm에서의 반사 영상값과 스트레스 임계값이 수분스트레스 반

Table 1. Result of classification between controlled and water stressed red pepper leaves using an optimal threshold value.

	Total*	Above threshold*	Below threshold*	Above/Total (%)
Control	3985	1121	2837	28%
Stress (-20 kPa)	3593	2616	926	72%
Stress (-50 kPa)	5710	4797	913	84%

*Number of pixels.

응을 효과적으로 나타내주고 있음을 알 수 있다. 또한 정상군과 스트레스군의 임계값의 범위는 상대반사값이 19~20% 사이에 존재하였는데, 이 범위의 임계값을 적용하였을 때 약 30% 미만의 픽셀이 임계값 이상인 스트레스 반응을 보이고 70% 이상이 정상인 반응으로 나타나면 스트레스를 받지 않은 정상으로 간주할 수 있을 것으로 판단되었다. 결론적으로 ‘홍진주’ 고추의 정식시기 이후에 수분스트레스 반응을 가장 잘 예측할 수 있는 파장영역대는 1449nm이었으며, 이 파장영역대의 상대반사값을 이용하였을 시 전체 잎에 대한 수분스트레스 강도를 정량적으로 분석할 수 있음을 확인할 수 있었다.

적 요

본 연구에서는 고추의 수분스트레스 반응을 최적으로 예측할 수 있는 알고리즘을 개발하기 위해 초분광 단파적외선 영상기술을 적용하였다. 수분스트레스에 노출된 고춧잎의 단파적외선 분광영상을 획득하고 ANOVA 분석을 이용하여 수분스트레스 반응을 가장 잘 반영하는 파장영역을 선정하였다. 고춧잎의 단파적외선 초분광 영상을 이용하여 ANOVA 분석을 수행한 결과 수분스트레스 판별을 위한 최적 파장은 1449nm으로 물분자의 광흡수 영역대와 거의 일치하였다. 최적 파장에서의 고춧잎 상대반사값을 가우시안 회귀분석을 통해 정상군과 토양흡착수압이 -20kPa과 -50kPa일 때의 스트레스군을 구분할 수 있는 임계값을 계산하고 이 값을 기준으로 단파적외선 영상을 이진화하여 수분스트레스 반응을 판단할 수 있는 최종영상을 구축하였다. 결과 영상에서 정상군과 스트레스군의 토양흡착수압이 -20kPa인 잎의 경우 스트레스 반응을 보인 픽셀이 72%이었고, -50kPa인 잎에서는 스트레스 반응을 보인 픽셀이 84%로 12%차이가 났다. 정상군과 스트레스 강도가 다른 시료의 경우 영상의 결과가 명확히 구분되는 것으로 나타나 단파적외선 영상기술이 고춧잎의 수분스트레스 상태를 정량적으로 나타낼 수 있는 기술임을 확인할 수 있었다.

추가 주제어 : 고추, 표현형 검정, 수분스트레스, 단파적외선, 초분광 영상

사 사

본 연구는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청 Golden Seed 프로젝트 사업에 의해 이루어진 것임.

Literature Cited

- Auwerkerken, A., W.W. Verstraeten, B. Somers, R. Valcke, S. Lhermitte, J. Keulemans, and P. Coppin. 2009. Hyperspectral reflectance and fluorescence imaging to detect scab induced stress in apple leaves. *Remote Sens.* 1:858-874.
- Berger, B., B. Parent, and M. Tester. 2010. High-throughput shoot imaging to study drought responses. *Journal of Experimental Botany* 61(13):3519-3528.
- Carter, G.A. 1991. Primary and secondary effects of water content on the spectral reflectance of leaves. *Am. J. Bot.* 78(7):916-924.
- Chang, A., J.Y. Choi, S.W. Lee, D.H. Kim, and S.C. Bae. 2011. Agricultural biotechnology: Opportunities and challenges associated with climate change. *Kor. J Plant Biotechnol.* 38:117-124 (in Korean).
- Eitel, J.U.H., P.E. Gessler, A.M.S. Smith, and R. Robberecht. 2006. Suitability of existing and novel spectral indices to remotely detect water stress in *Populus* spp.. *Forest Ecology and Management* 229(1):170-182.
- Furbank, R.T. and M. Tester. 2011. Phenomics - technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends in Plant Science* 16(12):635-644.
- Grant, O.M., M.M. Chanves, and H.G. Jones. 2006. Optimizing thermal imaging as a technique for detecting stomatal closure induced by drought stress under greenhouse condition. *Physiologia Plantarum.* 127(3):507-518.
- Houle, D., D.R. Govindaraju, and S. Omholt. 2010. Phenomics: the next challenge. *Nature Reviews Genetics* 11(12): 855-866.
- Kim, L.Y. 2002. Standard method of analysis and standardization of horticultural bed soil. *Proceedings of the Korean Society for Bio-Environment Control Conference* 2002 Nov. p. 131-186 (in Korean).
- Kim, Y.H. 2004. Evaluation of seed quality by near infrared spectroscopy analysis. *Korean J. Crop Sci.* 49(1):250-258 (in Korean).
- Lee, S.K., T.R. Kwon, E.J. Suh, and S.C. Bae. 2011. Current status of phenomics and its application for crop improvement: Imaging systems for high-throughput screening. *Kor. J. Breed. Sci.* 43(4):165-172 (in Korean).
- Lee, K.G., S.K. Kang, and K.H. Choi. 2004. Nondestructive quality measure of fruits and vegetable using near-infrared spectroscopy. *Food Engineering Progress.* 8(3):158-169 (in Korean).
- Zhou, Y., H. Mao, and X. Zang. 2011. Hyperspectral imaging technology for detection of moisture content of tomato leaves. *International Congress on Image and Signal Processing* 4(1):167-171.