The Japan Society of Mechanical Engineers

413 画像計測による正逆交雑花粉の状態評価

Evaluation of Reciprocal Crossing Pollen by Image Processing

○ 木下武治（宇都宮大・工）　正 尾崎功一（宇都宮大・工）
正 横田和隆（宇都宮大・工）　正 山本純雄（宇都宮大・工）

Takeharu KINOSHITA, Utsunomiya University,Yoto7-1-2,Utsunomiya, Tochigi
Koichi OZAKI, Kazutaka YOKOTA and Sumio YAMAMOTO

It will be beneficial for the plant breeding technology, if we find relationship between the genetic feature of the pollen and the shape of the pollen. In our previous studies, we proposed quantities to measure the shape and the pattern on the surface of the pollen based on image processing, and measured these quantities for agricultural species and hybrid species by breeding. In this report, we mesured these quantities for reciprocal crossing pollen and found that the proposed quantities can be useful tools to investigate genetic feature of the pollen

Key words: Reciprocal Crossig Pollen, Image Processing Measurement, Genetic Feature

1. 緒言

植物の新品種を育成するための育種技術として交雑が行われてきた．その成否を判定する方法の一つとして花粉の観察による稔性・不稔性の判別 (花粉の生殖能力の有無) や遺伝的な評価をしてきたが[1]，これまでの花粉の観察手法では，染色液によって花粉が不稔性になる，結果が計測者の熟練度に依存する，などの問題点があった．これまでに我々は花粉の計測に画像計測の手法を適用し，花粉学に基づいた計測量を提案し[2]，さらにその計測量を用いて雑種花粉とその両親ならびに次世代の花粉を計測・比較して稔性・不稔性の判別[3] などを行ってきた．本稿ではさらに正逆交雑による雑種花粉同士を計測し考察することによって，本計測量の有用性を示す．

2. 交雑育種

2.1 正逆交雑

正逆交雑とは交雑育種法の一つで，Fig.1に示すように種子親と花粉親を交互に組み換えた一組の交雑をいう．花粉学においては，どちらの雑種も遺伝子の組み合わせは変わらないので似た形質を示すといわれるが，掛け合わせ方により微妙な違いが表れることがわかっている．そこで本報告では，これまでの研究より提案した計測量を用いることにより，正逆交雑花粉の遺伝的な傾向の違いを花粉の形状より捉えることができるかについて注目した．

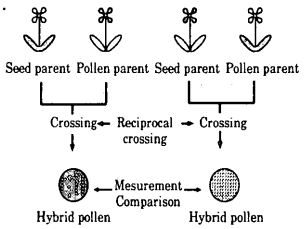

Fig. 1 Reciprocal crossing

2.2 栽培種と雑種

栽培種とは一つの種の中で他と明らかに区別できる形態的，あるいは生理的な特性を持ち，その特性によって分類することができる個体群を指す．遺伝的に安定 (形状が一定) しており，稔性花粉の形状も整い不稔性花粉との差異も明確である．これに対し雑種花粉は遺伝的に不安定であり，稔性・不稔性の判別も栽培種と比べ難しい．

3. 画像処理に基づく花粉の計測

3.1 花粉の計測

これまでに我々は花粉の特徴を定量化し計測するために以下の計測量を提案し，実際に花粉を計測することで有用性を示してきた[2][3]．

1. 円相当径：図形の面積と同等の面積を持つ真円を仮定した場合，仮定した円の直径を円相当径と呼び，次式より求められる．

$$\text{円相当径} = \sqrt{\frac{4}{\pi} \times \text{面積}}$$

2. 距離分散：花粉の外壁の凸凹などの表面形状の特徴を表現する計測量で次式より求められる．

$$D = \sum (L_i - \bar{L})^2 / S$$

ただし，D は距離分散，L_i は重心からエッジまでの距離，$\bar{L}$ はその平均距離，S は周囲長．

3. 縦横比：花粉がどの程度球形になっているか表す量で，花粉の見かけ上の形状から求めた最大長 (a) と，それに対して垂直な方向の最大垂直幅 (b) の比 b/a を縦横比として用いる．

4. フラクタル次元：花粉の外壁模様を定量化するための計測量で，花粉の画像から x-y 色度分布図を作成し，最も度数の多い色のみ抽出し二値化する．この画像を一辺の長さ r の正方形によって分割した際の対象物を含んでいる正方形の数を N(r) として，r と N(r) の間に $N(r) \propto r^{-D}$ が成り立つ場合に，r の値を変えていくことで粗視化の度合を変え，指数 D (フラクタル次元) を求める．

3.2 画像計測システムの構成

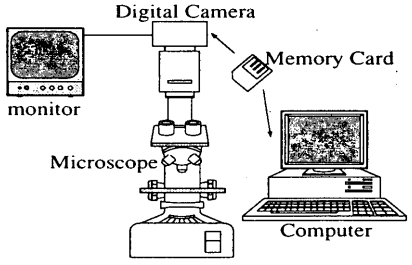

Fig. 2 System Configuration

Fig.2に，顕微鏡，デジタルカメラ，コンピュータから構成される画像計測システムを示す．デジタルカメラは総画素数 211 万画素となっており，1600×1200 画素と 640×480 画素で

NII-Electronic Library Service

The Japan Society of Mechanical Engineers

像が可能である．本実験では顕微鏡の倍率を100倍とし，撮像した画像をメモリカードによりコンピュータに取り込み，Unix OS上のC言語を用いて構築したプログラムを用いて計測を行った．なお，画像と実際の寸法の縮尺は1画素＝0.196 μmである．

3.3 計測手順

本システムを用いた計測処理の手順を述べる．顕微鏡で拡大した花粉画像をコンピュータに取り込む．花粉画像の二値化，穴埋め，ノイズ除去により花粉の形状を背景から抽出し，その円相当径，距離分散，縦横比を計測する．また花粉の外壁の模様を抽出し，花粉模様のフラクタル次元を計算する．

3.4 実験試料

本研究ではTable 1に示す種の花粉について計測を行った．品種名に＊が付されている種は，ハクサイ (AA) とダイコン (RR) を交雑させた雑種であり，AA×RRはハクサイを種子親，ダイコンを花粉親として掛け合わせた雑種，RR×AAはダイコンを種子親，ハクサイを花粉親として掛け合わせた雑種で，互いに正逆交雑である．これらの花粉は遺伝的傾向がほぼ把握されているため，花粉形状の計測量と遺伝的傾向の比較・考察に適した試料であるといえる．

Table 1 Samples of Pollen for Image Measurment

品種名 (ゲノム記号)	試料数	備考
ハクサイ (AA)	104 個	栽培種
ダイコン (RR)	109 個	栽培種
AA×RR*	87 個	雑種
RR×AA*	95 個	雑種

4. 計測結果および考察

4.1 縦横比からみた雑種花粉の遺伝的傾向

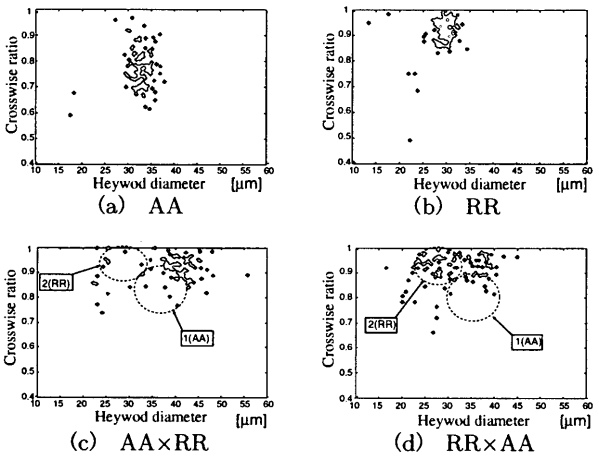

Fig. 3 Measured Results of Pollen

Fig.3に (a)AA(ハクサイ)，(b)RR(ダイコン)，(c)AA×RR，(d)RR×AAについての縦横比と円相当径の関係を示す．AAについてのFig.3(a) は栽培種であるにも関らずプロットが分散しているが，これは画像を撮像する段階での問題とAA花粉の独特な楕円形状のためであり，これに対しRRについてのFig.3(b) は縦横比が1に近いところでプロットの集中がみられる．これはRR花粉が真円に近い形状をして，さらに遺伝的に安定であることを示している．このように縦横比はAAとRRの形状の傾向の違いを捉えていると考えられ，今回の計測においては雑種花粉の遺伝的な傾向をとらえるのに有効な指標であると考えられる．またAA花粉，RR花粉の円相当径を比較してみても大きさに差がみられる．

これらの結果より，AA花粉，RR花粉の集中している領域をFig.3(c)，(d) 上に点線で示した．

Fig.3(c) についてみると種子親であるAAの形状を受け継いでいる雑種花粉の割合が多いことがわかる．Fig.3(d) のほうはさらにその傾向がよく表れ，種子親であるRRの形状を受け継いでいるプロットの数がAAのそれと比べ非常に多いといえる．また，Fig.3(c) については花粉の画像を得る際，時間の経過により花粉が膨潤し肥大することを考慮すると，グラフにおける右上のプロットもある程度はAAの形状を受け継いでいる花粉として考えてもいいといえる．このことから雑種花粉においての形状は花粉親よりも種子親の形状を受け継ぐ場合が多いということがいえる．

4.2 形状特徴からの稔・不稔性判別

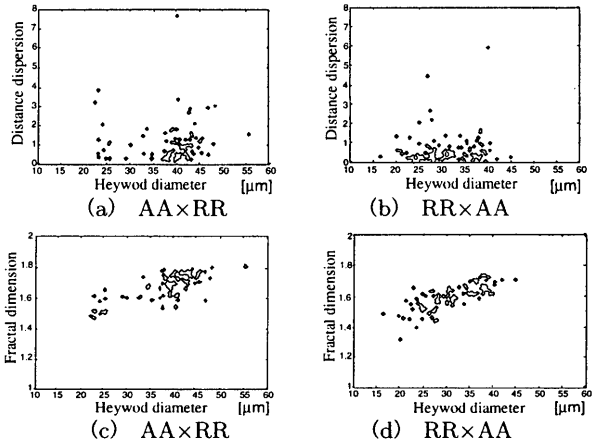

Fig. 4 Measured Results of Reciprodal Crossing Pollen

雑種花粉についてFig.4(a)，(b) では縦軸に距離分散を，Fig.4(c)，(d) は縦軸にフラクタル次元をとって示す．花粉の稔性・不稔性の判別を行うには，計測結果を総合的に分析することが重要である．Fig.4とFig.3(c)，(d) からAA×RR，RR×AAの稔性・不稔性について考察する．これまで様々な花粉を計測した結果から，これらの雑種花粉の形状においては距離分散が低く，縦横比が1に近い，またフラクタル次元が栽培種に近い，などの特徴をもつ花粉は稔性であるといえる．今回の計測結果より，RR×AAのほうがやや稔性率が高いといえるが掛け合わせ方による稔性率の差はほとんどないといえる．

5. 結言

著者らは花粉学に基づいた上で，これまでの研究より提案した計測量を用いて正逆交雑花粉を計測し，掛け合わせ方による遺伝的な違いを形状から観察することにより，本計測手法の有効性を示した．

参考文献

(1) Y.Matuzawa, *et.al.*: Prospects of the Wide Cross for Genetics and Plant Breeding in Brassiceal, Bulletin of the College of Agriculture Utsunomiya Univ. 16, 2(1996), 5.

(2) 柿沼，他．：画像計測に基づく花粉の状態認識，日本機械学会関東支部ブロック合同講演会ー'99 宇都宮ー講演論文集 (1999), 53.

(3) 稲川，他．：画像処理に基づく雑種花粉の計測，日本機械学会関東支部ブロック合同講演会ー'00 桐生ー講演論文集 (2000), 79.

(4) 幾瀬：花粉形態観測法，日本花粉学会会誌，36, 1(1990), 77.

NII-Electronic Library Service