

<論文>

花粉の画像計測に基づく植生観察の提案

尾崎 功一¹, 瀬下 真弓², 鹿内 佳人², 山本 純雄²

宇都宮大学大学院 工学研究科(〒321-8585 宇都宮市陽東 7-1-2 E-mail:ozaki@cc.utsunomiya-u.ac.jp)
宇都宮大学大学院 工学研究科(〒321-8585 宇都宮市陽東 7-1-2)

概要

近年, 外来種等の流入により, 亜種・交雑種等の生物環境の汚染が問題視されている。これについては植物でも同様の問題が指摘されている。これまで著者らは, 花粉学で定められている花粉の外観的特徴を画像計測することによって, 植物の遺伝的な特徴を把握することが可能であることを示してきた。このことから本論文では, 花粉の画像計測を植生観察に適用することを提案する。本研究では, 植生観察の可能性をさぐるモデルとしてタンポポに注目した。現在日本に育成しているタンポポのほとんどは雑種化した状況であり, また, 花の外観の観察によって, それが, 在来由来の雑種か外来由来の雑種かを判断することが可能である。このことから, タンポポを対象とした植生観察を試験的に実施した。その結果, タンポポの外観的特徴と花粉計測の解析とがほぼ一致することがわかった。本論文では, 花粉の画像計測による植生観察の可能性について考察する。

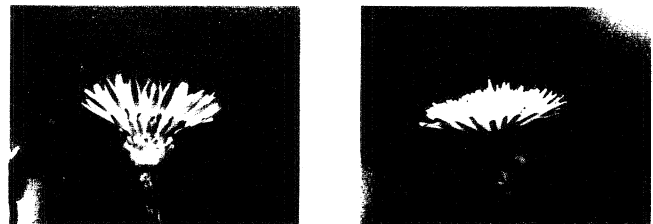
キーワード: 環境計測, 植生観察, 画像計測, 花粉, 在来種・外来種

1. はじめに

現在, 生態系の変化を把握することを目的に, 全国で植生調査が盛んに行われている。調査対象になっている植物は主に海外から入ってきた外来種である。たとえば, 開拓などによる環境の変化は, 在来種にとって生育範囲が奪われることになり, この逆に, 外来種にとって育成範囲が広がるきっかけとなる。また, 自然のままの環境であっても, その環境に適し, 在来種よりも強い繁殖力を有する外来種であれば, 在来種が淘汰されることとなる。このように外来種の拡大は, 生物多様性, 農林水産業, 生活環境変化による身体への影響など, さまざまな問題が生じると考えられている¹⁾。しかし, 外来植物が与える影響や被害など一般的には知られていない。また, 問題は認識されていても, 外来植物の知識を持った専門家は限られていることから, 対策の遅れが指摘されている。この対策の遅れは, 外来種を見つけること, 外来種と在来種との雑種を見つけることの難しさに起因する。そこで本研究では, 花粉の外観的な特徴を定量化することによって, その植物の特徴を分類できる方法に着目した。

これまで我々は, 花粉の画像から外観的な特徴を定量化し, これによって花粉の遺伝的な特徴の解析を行う方法を提案した^{2)~4)}。この提案手法は, 交雑育種によって育成された雑種植物のかけ合わせの評価をねらったものであるが, 栽培種, 野生種のような遺伝的に安定な植物の花粉と, 亜種, 雑種のような遺伝的に不安定な植物を比較的簡単に判定することが可能である。そこで, 本研究では, この方法を適用し, 野草がどの程度, 雑種化しているかの評価実験を試みた。

本研究では, 専門家でなくても比較的遺伝的な特徴を見分けられる植物として, タンポポに注目した。タンポポには,



(a) Native cross-breed

(b) Introduced cross-breed

Fig. 1 crossbred taraxacum

日本独自の在来種であるタンポポと, 外来種のタンポポがあり, 現在では互いに交雑し合い, 雑種化した植物がほとんどとなっている。そこで, 在来種に近い雑種と外来に近い雑種のタンポポの花粉を観察し, 両者の違いを判別できるかを試みることにした。

本論文では, まず, タンポポの植生についてふれ, これをモデルとすることの有用性について説明する。そして, これまで我々が提案してきた花粉の計測量について紹介し, 花粉計測に基づく解析から植生観察を行うことを提案する。タンポポをモデルとした植生観察の例として, 宇都宮大学陽東キャンパスに育成しているタンポポとした。大学に育成しているタンポポは, 関東地域で広く観察される「カントウタンポポ」と「セイヨウタンポポ」の2つの系統の雑種といわれている。当キャンパスにおいて観察されるタンポポを2年観察し, 花粉計測による解析から, 在来種に近い雑種か, あるいは外来種に近い雑種かを調査した。この結果, 花の外観と花粉計測による解析の結果がほぼ一致することがわかった。本論文では, この結果に基づき植生観察の可能性について考察する。

2. 調査対象の植物

本研究では, 植生観察の可能性を実験的に探るために,

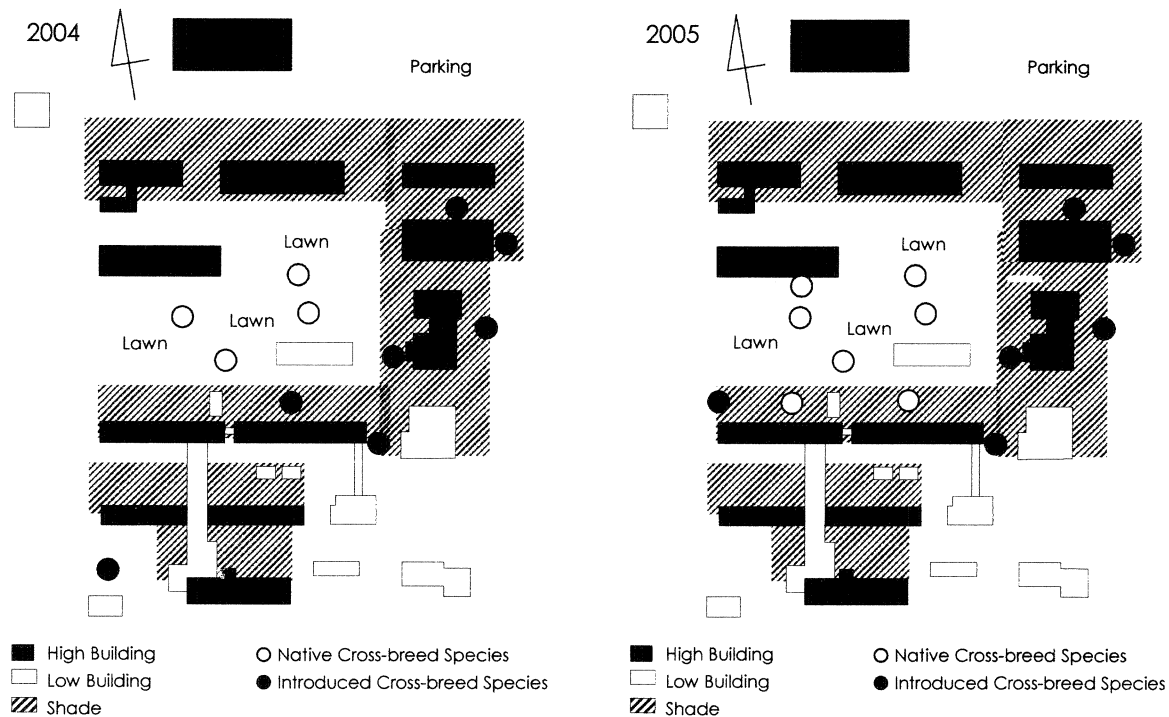


Fig. 2 Model environment for a plant monitoring (Yoto Campus, Utsunomiya Univ.)

試料となりうる植物としてタンポポ(*taraxacum*)に注目した。タンポポは大きく分けて、日本独自の在来種と、海外から入ってきた外来種に分けることができる。しかし、自然には起こらないと考えられてきた在来種と外来種との自然交雑が起こり、雑種が広まり、現在ではほとんどが雑種といわれている⁵⁾。関東地域で広く観察されるのは、「セイヨウタンポポ」と「カントウタンポポ」の2つの系統の雑種といわれている。Fig. 1に採取したタンポポを示す。Fig. 1(a)は在来種に近い雑種(native cross-breed: 以下「在来雑種」と呼ぶ)であり、このタンポポの多くは外総苞片が直立した状態となる。一方、Fig. 1(b)は外来種に近い雑種(introduced cross-breed: 以下「外来雑種」と呼ぶ)であり、このタンポポの多くは外総苞片が反曲した状態となる。このように、ほとんどの場合、見かけだけでいずれかの傾向にあるかを容易に判断することができる。

本研究では、見かけ上の特徴と花粉計測による解析とが対応するかを調査することを目的としている。したがって、タンポポの例では、在来雑種と外来雑種との違いを外総苞片によるものとする。

3. 遺伝的特徴を把握するための花粉計測量

本研究では、これまでに育種等による雑種植物の遺伝的特徴を把握するために、花粉学に基づいた計測量の提案を行った^{2)~4)}。主に、アブラナ科の植物を対象とした試験的な計測を続けており、本計測量の妥当性を確認している。

花粉計測量について述べる。花粉学では、花粉の外観的な特徴を体系化し、その特徴からの植物の対応付けがなされている。これによれば、(1)「寸法」、(2)「形態」、(3)「色」、そして(4)「花粉外壁の模様」などが注目すべき概観の特徴とさ

れている。これらの外観的な特徴を表す情報の中で、花粉学で定量的に求められているのは、寸法、あるいは、長径と短径の比など、大きさに関連した量だけである。これ以外の、形態、色、外壁の模様に関しては、スケッチなどや感覚的な表現によって表されている⁶⁾。

このような状況から、これまで我々は先に述べた注目すべき花粉の特徴と対応する以下の計測量を提案している^{2)~4)}。(1)花粉の寸法を表す計測量として「円相当径(Heywood diameter)」,(2)花粉の形態を表す計測量として「距離分散(Distance dispersion)」あるいは「縦横比(Crosswise ratio)」,そして、(3)花粉の外壁の模様を表す量として「密集指標 AI(Aggregation Index)⁷⁾」,そして、(4)色を表す指標として「色指標(Color Index Diagram)」,の5項目からなる計測量である。

4. 花粉の計測と植生観察

4.1 植生観察のモデル

本研究では、植生観察のモデルとして宇都宮大学陽東キャンパスを敷地としたモデル実験を行うこととした。カントウタンポポは2月~5月、セイヨウタンポポはほぼ1年中で比較的暖かい日が開花時期である。そこで、観察の期間は2004年4月~2005年11月とした。ただし、1年後の植生状態を比較できるようにし、本論文では比較的条件的に近い観察日に採取したタンポポの計測結果を示すこととする。

本論文では、2004年5月(月平均気温 17.8℃, 観察日の平均気温 21.4℃)および2005年5月(月平均気温 16.2℃, 観察日の平均気温 11.9℃)とした。本キャンパスにおいて観

Table 1 Sampled pollen grains (May, 2004)

Sample No.	Type	Number of pollen
N-04-1	Native	75
I-04-1	Introduced	141
I-04-2	Introduced	137
I-04-3	Introduced	97

Table 2 Sampled pollen grains (May, 2005)

Sample No.	Type	Number of pollen
N-05-1	Native	168
I-05-1	Introduced	148
I-05-2	Introduced	159
I-05-3	Introduced	150

察したタンポポの位置を示したのが Fig. 2 である。なお、図中の矢印は北の方向を示している。この図において、○は在来雑種、●は外来雑種を意味する。なお、在来雑種および外来雑種の判断は第2章で述べたように外総苞片の特徴をその基準とした。

本敷地では、日当たりにあまり関係なく広い範囲にタンポポが多く分布していることを確認した。傾向的には、日当たりのいいところで、見た目の大きい外来雑種が多く分布し、やや日当たりの悪いところで、比較的多く在来雑種が分布していることがわかった。たとえば、図中の斜線は、高い建物や樹木により日陰になっている場所であり、ここでもタンポポを観察することができた。

Fig. 2 の構内でのタンポポの育成範囲を見ると、基本的には育成範囲に大きな変化は見られなかった。ただし、わずかなではあるが、在来雑種が建物の北側に位置するやや日陰の場所に育成範囲を広げていた。

4.2 花粉の観察

Fig. 2 に示したように、タンポポの外総苞片の形状から、在来雑種であるか外来雑種であるか外観的な特徴を確認した後、その領域にある花をいくつか摘み取り花粉を計測した。花粉の計測にあたって、光学顕微鏡、顕微鏡用デジタルカメラ、および計算機から構成される画像計測システムを利用した。まず、3%の砂糖水をプレパラート上に浸し、ここに花に

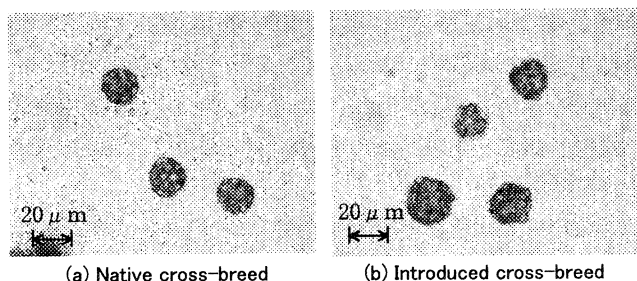


Fig. 3 Pollen grains

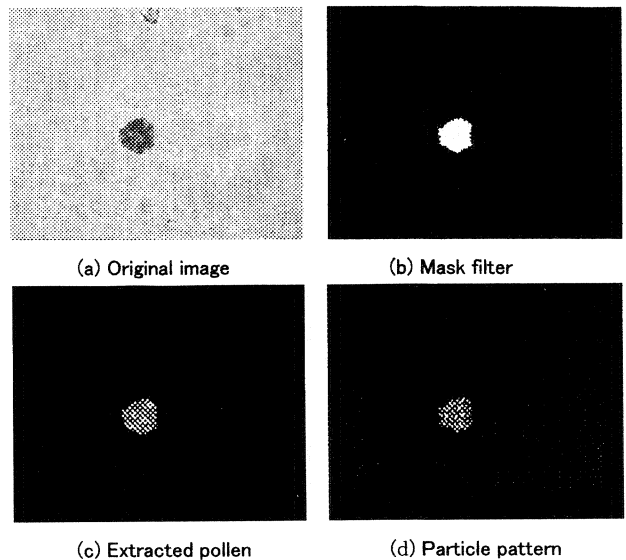


Fig. 4 Image processing

付着している花粉を落とした。落ちた花粉は、水分を吸収し、膨潤した状態となった。これによって明確に花粉を観察することができた。このようにしてプレパラート上に採取できた花粉は、一つの花から数十から200個以上を確認することができた。

現在の画像計測システムには、画像上から花粉を自動的に認識し、計測に適した画像まで加工する機能を有している。ただし、花粉とゴミとの誤認識、あるいは花粉が重なった状態で計測を行ってしまう場合がある。このため、計測用画像の要否を確認した後、正しく計測できる試料のみを選抜した。その結果、2004年では在来雑種1および外来雑種3の合計4つの試料、2005年では在来雑種4および外来雑種5の合計9つの試料を得ることができた。本論文では、2004年との比較のため Table 1 および Table 2 のように代表的な試料として在来雑種を1つ、外来雑種を3つ挙げることにした。表中の試料番号は採取した花と対応する。なお、試料の比率は大学キャンパス内で観察される在来種と外来種の比率とほぼ対応している。

なお、Fig. 3 に顕微鏡から観察される花粉の画像を示す。同(a)は在来雑種(Native cross-breed)、同(b)は外来雑種(Introduced cross-breed)である。

花粉の撮像には、顕微鏡専用のデジタルカメラを接続した。デジタルカメラは単板RGB原色フィルタを有するCCDカメラで、撮影解像度は1713×1368画素である。カメラのホワイトバランスは自動とし、顕微鏡付属のハロゲンランプ(12V100W)を6Vで調光して撮影を行った。顕微鏡の倍率を100倍で撮影した場合、画像解像上の1画素は0.35 μmとなる。Fig. 3 に採取した花粉の顕微鏡画像を示す。この図からもわかるように、(a)の在来雑種ではそれぞれの花粉の形状と寸法が比較的類似であることを確認した。一方、(b)の外来雑種では花粉の形状と寸法にばらつきが見られた。花粉は外来雑種の方がやや大きめであった。

5. 花粉の計測と雑種の判別

5.1 花粉の計測

これまでに提案した花粉の計測量において、植物の特徴が明確に表れる計測量は植物によってさまざまである。タンポポの場合では、花粉の円相当径(大きさ)およびAI(外壁の模様)から特徴的な計測値が得られ、距離分散、縦横比および色指標では特徴的な計測値が得られなかった。そこで本論文では、「円相当径²⁾」および「密集指標 AI⁷⁾」の計測結果について述べる。まず、花粉を計測するために、対象花粉を抽出するための画像処理を行った。Fig. 4 に画像処理の流れを示す。また、画像処理の手順を以下に述べる。

- (1) Fig. 3 のように、花粉の画像を取り込む(Fig. 4 (a))。
- (2) 花粉と背景との濃度差を利用して閾値を定め、二値化画像を作成する。さらに、穴埋め、ノイズ除去を行い、マスクフィルタを作成する(Fig. 4 (b))。なお、マスクフィルタによって花粉の外周と面積を求めることができる。
- (3) 原画像とマスクフィルタを合成することによって、計測対象の花粉のみを抽出することができる(Fig. 4 (c))。この画像より色指標を作成し、最も指標の高い領域の色のみを抽出する。これによって、花粉内部の特徴的な輝度を有する色彩の画素が粒子パターンとして抽出できる(Fig. 4 (d))。

以上の画像処理によって得られたマスクフィルタ画像(Fig. 4 (b))および粒子パターン画像(Fig. 4 (d))より、花粉計測量を算出する。

まず、円相当径(Heywood diameter)の算出方法について述べる。これを図 5 に示す。円相当径とは、図形の面積 A と同一の面積を有する真円の直径 D を指す。円相当系は(1)式より算出される。

$$D = \sqrt{\frac{4}{\pi} A} \quad (1)$$

次に、AI の算出方法について述べる。AI とは粗視化から求められるフラクタル次元を指標として表したものである⁷⁾。Fig. 6 は AI の求め方を表したもので、一辺 r に区分した目目のうち、計測対象(たとえば、パターンを構成する粒子、以下「粒子 (particle)」と呼ぶ)の存在する領域数 $N(r)$ を数える。そして、 r の値を変え、同様に粒子の存在する領域数 $N(r)$ を数える。このように、 r の値を変え $N(r)$ を求めたとき、(2)式より AI が求められる⁷⁾。

$$N(r) \propto r^{AI} \quad (2)$$

この式によって求められる AI の値は 0~2 の範囲となる。一般にフラクタル次元は、計測対象の複雑さを表す指標として利用されている。しかし、AI のように領域分割の過程で粒

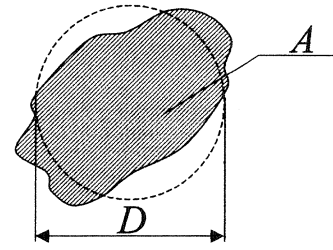


Fig. 5 Heywood diameter

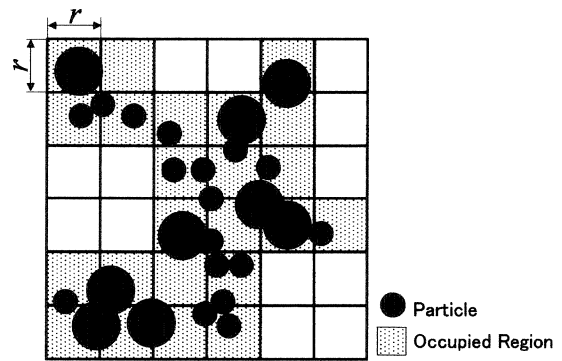


Fig. 6 Aggregation index

子がカウントされるかどうかは、その粒子の配置によって決まる。すなわち、粒子の配置が計測値に反映されていることから、粒子の密集度合いが表されているといえる。なお、この詳細は文献⁷⁾に譲る。

本画像計測システムでは、Fig. 4 (d)のように、画像上の花粉からパターンを構成する要素として複数の画素が抽出される。この画素の密集度合いを指標として利用することによって、花粉のパターンを特徴量として定量的に表現することができる。

5.2 計測結果と考察

Fig. 7 および Fig. 8 に花粉の計測結果を示す。図は、円相当径(Heywood diameter)および AI (Aggregation Index) について花粉の個数を度数で表している。花粉は一つの花から数十から数百までを採取することができた。このため、度数に関してはこれを正規化して表すこととした。Fig. 7 は 2004 年 5 月に採取した試料(Table 1)の計測結果であり、Fig. 8 は 2005 年 5 月に採取した試料(Table 2)の計測結果である。Fig. 7(a)および Fig. 8(a)は在来雑種であり、Fig. 7(b)~(d)および Fig. 8(b)~(d)は外来雑種である。

これまで交雑育種(かけあわせ)によって育成された栽培種等の植物の場合、親の系統に近い計測値にプロットが集中する傾向にあることが知られている²⁾。このため、プロットの集中が2箇所以上となる場合がある。しかし、タンポポの雑種の場合、特に、外来雑種の場合はプロットが広く分散することが確認された。

全体的には、花粉の円相当径は 15~28 μm の範囲に分布し、AI は 1.2~1.5 の範囲に広く分布した。ただし在来雑種に関しては、Fig. 7(a)では、円相当系が 16~23 μm 、AI が 1.2~1.4 の範囲に、Fig. 8(a)では、円相当系が 19~23 μm 、

AIが1.4~1.6の範囲にプロットが比較的集中した。また、在来雑種の場合では、一極に集中する傾向が確認されたので、変動係数(Coefficient of variation)を求めることとした。その結果をTable 3およびTable 4に示す。この結果、在来雑種の円相当系において、2004年の試料では変動係数が16.1%、2005年の試料では変動係数が3.8%と、外来雑種と比較して明らかにプロットが集中することがわかった。このことから、

タンポポの場合では、円相当系のばらつきの状態から在来雑種と外来雑種を見分けることが可能であるといえる。

AIに関しては、在来雑種と外来雑種のばらつきの違いに大きな差は見られなかった。2004年の試料では約0.5%、2005年の試料では約0.2%であった。

以下に考察を述べる。これまでの経験から、在来種、野生種等の花粉は、花粉計測のプロットが集中し、遠縁どうしの

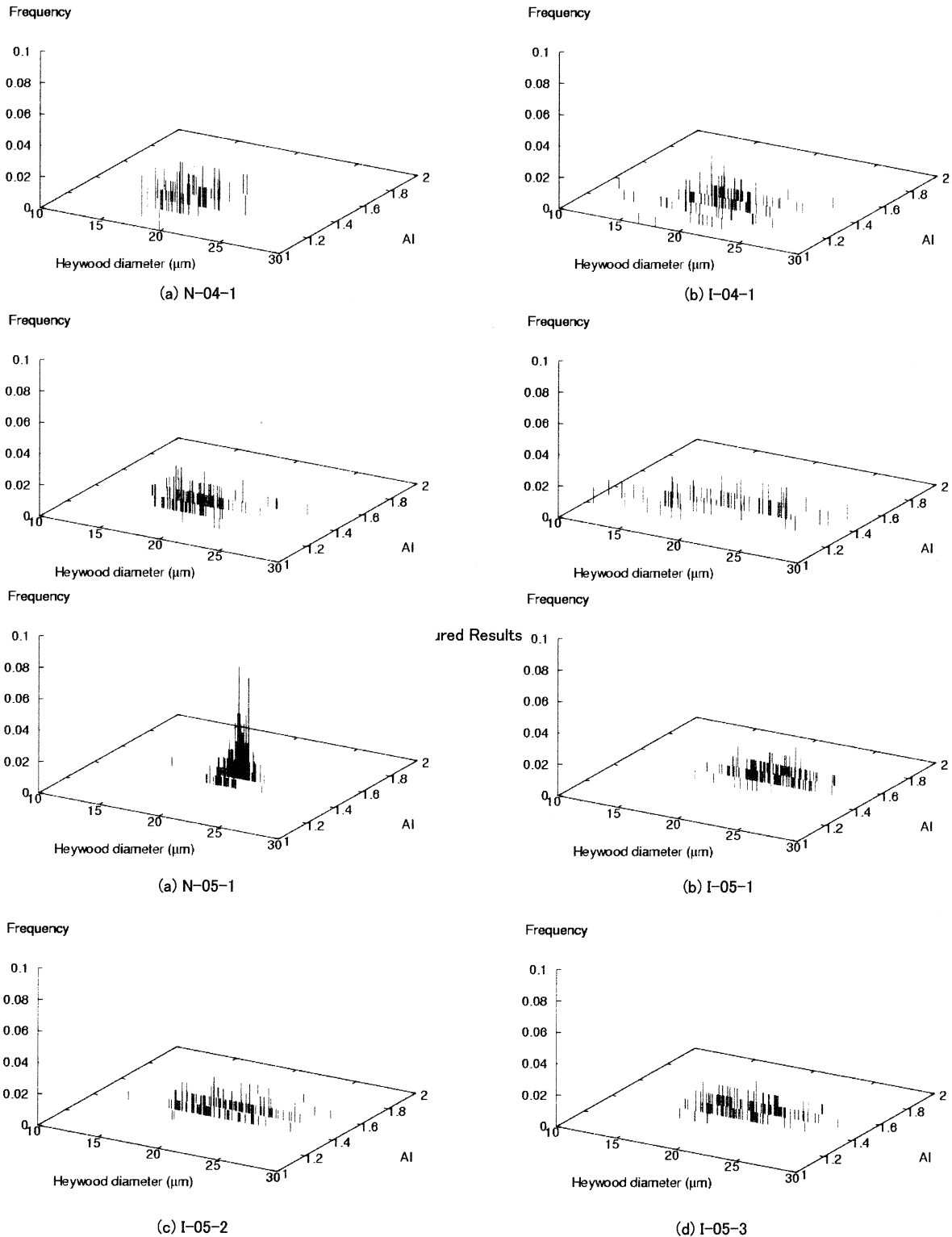


Fig. 8 Measured Results (May 2005)

Table 3 Coefficient of variation (%) (May, 2004)

	N-04-1	I-04-1	I-04-2	I-04-3
H.Diameter	16.1	35.3	34.0	88.1
AI	0.5	0.6	0.7	0.4

Table 4 Coefficient of variation (%) (May, 2005)

	N-05-1	I-05-1	I-05-2	I-05-3
H.Diameter	3.8	26.7	.1	31.4
AI	0.2	0.2	0.2	0.3

交雑による雑種の花粉は、花粉計測の結果にばらつきが生じることがわかっている²⁾。タンポポは在来と外来の2系統の雑種ではなく、実際には数種類の系統からなる雑種であり、その系統を整理するのは難しい⁵⁾。しかし、本計測結果においては、在来雑種の場合に花粉計測のプロットが集中した。このことは、在来雑種が外来種の影響を強く受けていないことを意味し、外観的な特徴 (Fig. 1(a)を参照)も在来種であるカントウタンポポに類似であった。このことから、花粉計測でプロットが集中する場合には、在来雑種と判断できる。

次に、気温の違いについて考察する。本研究では2004年5月の採取日の平均気温が21.4℃、2005年5月の採取日の平均気温が11.9℃であった。4.1節でも述べたように在来雑種は比較的気温が低めで、多少日陰であった方が育成条件としてよいといえる。このことはFig. 2より、在来雑種の繁殖が広がっていることから、そのことを知ることができる。

最後に、植生観察の可能性について述べる。以上のとおり、野生種、在来種の特徴は花粉計測のプロットが集中することがわかった。したがって、対象とする植物の開花の時期に合わせて花粉を採取し、これを計測することによって、その植物が雑種化しているかどうかを見極めることは可能であると考えられる。ただし、気候や環境の変化等による育成条件によっては花粉が正常に成長しない場合もある。この点に注意し、花粉を観察することによって植生観察が実現されると考えられる。

6. おわりに

本論文では、近年問題視されている外来種流入による在来種の交雑化を監視することを目的に、我々が提案してきた花粉の計測量^{2)~4)}について紹介し、花粉計測に基づく解析か

ら植生観察を行うことを提案した。この提案の有用性を示すために、外総苞片の特徴から在来種に近い雑種と、外来種に近い雑種とを容易に判別できるタンポポに注目し、宇都宮大学陽東キャンパスに生息しているタンポポを実際に2年間観察し、花粉計測による解析を行った。その結果、在来あるいは外来に近い雑種を花粉計測による解析から判別することができた。

このように、野生種、在来種は花粉計測のプロットが集中し、雑種はプロットが分散することから、定期的に花粉を計測することによって、植生観察が可能になると考えられる。今後は、より詳細に計測を行うことによって、環境の変化と花粉計測の関連性について調査する予定である。

現在、本研究に関連して、科学研究補助金(若手研究(A)課題番号17680026)を受け、花粉の画像計測を自動的に行うシステムを開発している。

[謝辞]

本研究で野生種、在来種および育種による雑種等に関する植物と花粉の知見は、宇都宮大学農学部育種研究室 松澤康男教授、房相佑助教授のご指導によるものである。この場にて謝意を表す。

[参考文献]

- 1) 中央環境審議会・野生生物部会・移入種対策小委員会、移入種対策に関する措置の在り方について、中央環境審議会 (2003)。
- 2) 尾崎功一、稲川伶司、横田和隆、山本純雄、房相佑、金子幸雄、松澤康男、交雑育種法における花粉の画像計測量の提案、精密工学会誌、67巻6号、pp. 982-986 (2001)。
- 3) 尾崎功一、木下武治、山本純雄、貝賀信保、石川 信、房相佑、金子幸雄、松澤康男、雑種花粉評価のための色指標の提案、精密工学会誌、69巻10号、pp. 1439-1443 (2003)。
- 4) 特開 2004-239794 (2003)。
- 5) 小川 潔、日本タンポポと西洋タンポポ、どうぶつ社、(2001)。
- 6) 幾瀬マサ、花粉形態観測法、日本花粉学会会誌、36巻1号、pp. 77-84 (1990)。
- 7) 呉 勇周、尾崎功一、山本純雄、粒子群の密集パターンの評価、精密工学会誌、70巻1号、pp. 81-85 (2004)。