雑種花粉評価のための色指標の提案*

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†

Proposal of Color Index for Estimation of Pollen Grains in Hybrid Plants

Koichi OZAKI, Takeharu KINOSHITA, Sumio YAMAMOTO, Nobuyasu KAIGA,
Shin ISHIKAWA, Sang Woo BANG, Yukio KANEKO and Yasuo MATSUZAWA

In the cross-breeding to develop a new genotype plant, it is more important to distinguish fertile pollen grains from sterile ones for the research. The genetic feature in the plant is related with the appearance of the pollen. The proposed quantities of shape and pattern on the pollen by the image processing are insufficient for distinction between the former and the latter, since appearance of hybrid pollen grains by the cross-breeding can not be estimated previously. The paper proposes the color index and the color index diagram as a new quantities for the estimation of the pollen grains. The color index shows a quantity of the feature color of the every pollen by using the xy color chromaticity diagram. The color index diagram shows an area of distribution on all of the color indexes. By the color index and the color index diagram, it can be measured that the pollen grains are fertile or sterile as the genetic trends of the plants. In the paper, it is shown that the color index and the color index diagram are more effective to distinguish between fertile and sterile pollen grains in some samples from the new genotype plants.

Key words: measurement, color index diagram, pollen grains, genetic estimation, hybrid plants

1. 緒 言

人間にとって望ましい植物を得るために「品種改良」、すなわち「育種」と呼ばれる技術が発達してきた。その育種技術の一つとして、異なる品種を交配し互いの長所を合わせもつ雑種植物（新種）を作り出す交雑育種法が挙げられる。交雑育種法では、得られた雑種植物を育成し、有用な種（遺伝子型）を選抜する作業が必要である。一般的に育種学では、交雑によって育成した雑種植物と花粉との関係に注目し、生殖能力を有する正常な花粉（稔性）と細胞分裂の段階においての異常により生殖能力が欠如している花粉（不稔性）との比率を調査し、さらに外観的な特徴を観察している。そして、このような観察によって能率的な交雑育種法を試みている。しかし花粉の観察と評価は、計測者の熟練度に依存し、多数の試料を観察することによる疲労度が激く、かつ正確性に欠けるなどの問題点が挙げられる。

そこで我々は、画像計測手法を適用し、花粉の外観的な特徴である形状や表面模様の計測を自動化することにより、より定量的なデータを迅速に獲得し、体系的かつ統計的な評価を行うことを試みた。育種学においては、個々の花粉の特徴を全体的に把握することが要求されることから、数百個の花粉を採取し、光学顕微鏡で採取した大量の花粉を計測する必要がある。これまで我々は、花粉の外観的な特徴である形状に相当する計測量として「円相当径」、「距離分散」、「縦横比」、外壁の模様に対応する計測量として「フラクタル次元」を適用することを提案した¹⁾。そして、実際に花粉を計測し、交雑による雑種植物の花粉の稔性・不稔性の判別や遺伝的な差異を調べ、提案の計測量が有用であることを示した¹⁾。

画像計測を育種へ利用した研究報告として、福岡らの画像濃度値からのオオムギの精麦品質の定量化²⁾や、生出らのニューラルネットワークに基づく雑種子粒径による種判別³⁾、また、

三中らの画像解析システムからのオオムギ種子形態分析⁴⁾が挙げられる。これらの研究では、植物の一部に注目し、その形状や色の濃度を定量化することによって、判別、分析などの自動化を行った。以上の研究では、あらかじめ予測可能な植物の特徴的な部分に注目している。これに対し、本研究での課題においては、交雑によって得られた雑種であるため、特徴的な部分を予測することができない。さらに、観察上の花粉の違いは微妙であり、この微小な差異を定量的に表現するには従来の方法には限界がある。

育種学および花粉学においては、花粉の色については、ほとんどの花粉が同系色であるためにあまり重視されていない。しかしながら本研究では、交雑による雑種花粉に微妙ながらも色に違いが生じることを確認した。そこで、花粉の色情報を定量的に扱うための「色指標」、および計測対象の種における色指標を全体的に把握するための「色指標分布図」を提案する。そして、遺伝的に安定な種（栽培種および野生種）と遺伝的に不安定な種（雑種）について色指標分布図を求め、各々の花粉の稔・不稔を判定することによって、本提案の効果を示す。

2. 雑種植物花粉の外観的な特徴評価

2.1 育種学における雑種植物花粉の評価

育種学においての花粉の評価法として、交雑育種の成否を判定する手法の一つである稔性花粉の割合（稔性率）を調べる事が重要とされている。その際、花粉を染色液などで着色するのが一般的であるが、花粉自体の色について考慮することはあまりない。また、育種の専門家は染色してない状態の花粉でも稔性・不稔性の判別を行うことが可能であるが、その場合は花粉の外観的な特徴の中でも特に寸法と花粉の外壁に着目する。染色液としてはアレキサンダー染色液を用いることが多く、稔性花粉を紫色系、不稔性花粉を薄緑系に染めるので、色の違いから容易に花粉の稔性・不稔性を判別することができる⁵⁾。しかし、染色による判別の問題点として、染色された花粉はすべて生殖能力を失い、供試した花粉そのものをを用いた後代植物を育

* 原稿受付 平成 15 年 3 月 18 日

** 正 会 員 宇都宮大学工学研究科（宇都宮市陽東 7-1-2）

*** 宇都宮大学工学研究科

† 宇都宮大学農学部（宇都宮市峰町 350）

Fig.1 Pollen of hybrid plants, “F” and “S” mean fertility and sterility, respectively

成することができない。このため、染色液を用いずに稔性・不稔性を判別することが要求されている。

2.2 外観的特徴からの雑種植物花粉の評価

図 1 に光学顕微鏡を通しデジタルカメラにより撮像した雑種植物花粉の画像を示す。顕微鏡の倍率は 100 倍である。この図において F-1, F-2 は稔性花粉, S-1, S-2, S-3 は不稔性花粉である。S-1 は花粉の外壁異常から形状において F-1, F-2 などの稔性花粉との違いがみられ, S-3 は花粉の細胞質の異常が寸法, 色などに表れている。しかし, S-2 においては稔性花粉との違いが寸法や形状, 模様ではなく, 特に色に大きく表れている。このように花粉の外観的特徴が表れる部位は様々であり, 形状や模様を定量化した計測のみでは全ての花粉の特徴を捉えることは難しい。以上の理由から我々は花粉の色に着目した。

3. 画像計測における花粉の色指標

3.1 花粉の色による評価法の提案

育種学および花粉学においては, ほとんどの種の花粉の色は黄あるいは黄緑とされており⁶⁾ 花粉の色については品種ごとに識別する程度で, 個体間の比較などに用いることはあまりない。これまで我々は形状と粒状感を定量化した計測を提案した¹⁾。この方法の利点は, 採取した種の花粉をすべて計測し, 形状・模様の特徴を統計的に表したことによって, これまで個々の花粉に注目していた観察から種としての全体的な傾向を把握できるようにした点である。これによって遺伝的に安定した種であれば計測値はほぼ同一の値に集中し, 遺伝的に不安定な種であれば計測値は分散する。ただし以上のように傾向をみることができるのは, 遺伝的な特徴が形状・模様を表れている種に限定される。また, 花粉の形態が複粒 (花粉学上の分類で, 複数の花粉の粒が一かたまりになった花粉) である場合には, 形状的な定量化は困難な場合も考えられる。このことから, 色に注目した計測も必要である。

3.2 xy 色度図

本研究では, 花粉の画像を撮像する際に光学顕微鏡を使用しているため, 明るさを一定に保つことができる。このため, 色を定量化するために, 明るさよりも色彩を把握することができる xy 色度図 (図 2) を適用することにした。 xy 色度図とは CIE (国際照明委員会) が定める XYZ 表色系を二次元で表したものであり, 本来の使い方としては定量的な色の見本として用い

Fig.2 The xy chromaticity diagram

Fig.3 The measurement of the color index

Fig.4 The measurement of the color index diagram

られる表色系である。 xy 色度図における x, y の値は色の三刺激値である R, G, B より, 次式から求められる⁷⁾。

$$\begin{aligned} X &= 2.7689R + 1.7517G + 1.1302B \\ Y &= 1.0000R + 4.5907G + 0.0601B \\ Z &= 0.0565G + 5.5943B \end{aligned} \quad (1)$$

$$x = \frac{X}{X + Y + Z} \quad y = \frac{Y}{X + Y + Z} \quad (2)$$

また xy 色度図は, x と y の二つの値で色を表すことができるため, 色の度数をカウントした際, 度数を z 軸に示すことにより人間による花粉の色の評価が容易にできる。

以上の理由から, 本手法では xy 色度図を用いて花粉の色を定量化する。

3.3 色指標と色指標分布図の提案

本研究では, 花粉の色を定量的に扱うために, xy 色度図に基づいた「色指標 (Color Index)」を提案する。図 3 にその方法を示す。まず, 前処理によって計測対象の花粉の形状のみを抽出する。その形状からマスク・フィルタを作成し, 計測対象の

Fig. 5 The system configuration

Table 1 Samples of the pollen in genetic stability

Plant type	Genetic symbol	Number of samples
Cultivated plant	CC	97
Wild plant	DtDt	101

花粉だけを抽出する (図 3(a)). 次に、花粉を表す画素の RGB 値から式 (1) および (2) を適用して、 xy 色度図に変換する (図 3(b)). このとき図 3(c) のように、任意の領域 Δx_m , Δy_n に区分し、 m , n の区分にプロットされる色彩 (x_i , y_j) の度数を求める。これによって、図 3(c) のように xy 色度図上で、最も配分の多い色がピークとして表れる。この色の領域 Δx_m , Δy_n をその花粉の色指標と定義する。

育種においては、一つの種について全体的な傾向を把握する必要がある。そこで、花粉全体の特徴を表す方法として、「色指標分布図 (Color Index Diagram)」を提案する。図 4 にその求め方を示す。図 4 のように、まず採取した花粉の画像から、図 3 のとおりに色指標を求め、 xy 色度図上にすべての色指標の度数を表すことにした。

4. 色指標を用いた画像計測実験

4.1 実験環境

花粉の寸法や形状、色を自動的に計測するために、図 5 に示すシステムを組み立て利用した。本システムは、顕微鏡、デジタルカメラ、計算機から構成される。本研究では、色彩の再現性が高く、分解能の粗さによる計測誤差を避けるために、RGB 原色フィルタと単板 CCD を有す 211 万画素の顕微鏡用デジタルカメラを適用した。照明条件としては、顕微鏡に備え付けの 12V100W のハロゲンランプを 6V で調光し、光量調整用フィルタを介して照らすことにした。さらに撮像時には、ホワイトバランスを自動とし、1600×1200 画素の画像を取得することとした。そして、顕微鏡の倍率を 100 倍とし、撮像した画像を計算機に取り込み計測を行った。本開発環境では、C 言語を用いてプログラムを構築した。なお、画像と実際の寸法の縮尺は、1 画素 = 0.196 μm である。

4.2 遺伝的に安定した種の花粉の計測

4.2.1 試料花粉

色指標分布図によって花粉のどのような特徴が捉えられるかを調べるため、まず、遺伝的に安定した種の色指標分布図を求めた。試料として栽培種 CC (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*. DC) と野生種 DtDt (*Diplotaxis tenuifolia*) の二種類を用いた。これらの花粉のゲノム記号およびサンプル数を表 1 に示す。

4.2.2 遺伝的に安定した種の色指標分布図

図 6 に CC および DtDt の色指標分布図を示す。本色指標分布図では、200×200 に分割して行うこととした。その結果、

Fig. 6 The color index diagram on the cultivated/wild plants

CC および DtDt は同様の傾向を示した。さらに、両者の結果から、度数が高い座標については稔性花粉に対応し、著しく度数の低い座標はすべて不稔性花粉に対応していた。このように、ある特定の領域にプロットが集中するという傾向は、遺伝的に安定した種を計測した場合にみられる特徴であり、この特徴が色指標分布図においても示されることを確認した。また、図中の xy 平面において、稔性花粉に対応するプロットで占められる領域が存在することから、色指標分布図は花粉の稔性・不稔性の判別に効果的であることを確認した。以下、稔性花粉が占める領域を「稔性領域 (Fertility area)」と呼ぶことにする。

複粒に分類される花粉は複数の花粉粒子から構成されるため、その形状を定量化するのは困難である。そのような花粉には、色の評価を積極的に行うことで種の遺伝的な傾向を把握することの可能性がある。その点で本論文で提案する色指標は、有用な計測量であるといえる。

4.3 遺伝的に不安定な花粉の計測

4.3.1 試料花粉

本実験に用いた花粉のゲノム記号およびサンプル数を表 2 に示す。CCDtDt は、安定した種との違いを明確に示すために選んだ種の花粉であり、種子親を CC、花粉親を DtDt とする交雑によって得られた植物である。また、MM+CC は *Moricandia arvensis* と *Brassica oleracea* からの体細胞交雑により作り出した雑種植物である。体細胞交雑とは、異なる植物どうしにおいて細胞壁を除去したプロトプラストを融合することにより新植物を作り出す手法である。一般的な交雑は近縁間では容易に可能であるが、異なる種属間では不可能であるのに対し、体細胞交雑では異なる種間植物どうしの特性を合わせ持つ新種が得られる。

本計測では、色指標が遺伝的に不安定な雑種植物花粉を計測する上でどのような特徴を捉えるかを検証するため、異なる二

Table 2 Samples of the pollen in genetic instability

plant type	Genetic symbol	Number of samples
Cross breeding	CCDtDt	108
Cell fusion	MM+CC	110

Fig.7 The color index diagram on the CCDtDt

種類の雑種植物花粉を試料として用いた。

4.3.2 CCDtDt における稔性・不稔性の判別評価

(1) 色指標分布図

CCDtDt の色指標分布図（分割数は 200×200 ）を図 7 に示す。プロットが稔性領域に集中する安定した種の色指標分布図（図 6）とは明らかに異なり、プロットが広い領域に分散した。これは雑種植物特有の傾向であり、遺伝的組合せによる多様性と変異性とに起因する。すなわち、遺伝的組合せによって生み出される花粉の比率が決まっているため、この場合、CC 由来の種と DtDt 由来の種、さらには若干の垂種が含まれた花粉となる。育種学では、このような遺伝的な傾向は花粉の外観にも表れることが知られている。これまで我々が提案した花粉の形状と外壁模様に基づく計測量（以下、「外観計測」と呼ぶ）を求めることで、その傾向を把握することができる¹⁾。以上のことから、遺伝的な不安定な種、すなわち育種による雑種花粉であっても、本提案の色指標分布図が有用な指標となることを確認した。

次に、図 6 より稔性領域を特定した。育種の専門家によって実際の花粉画像から稔性である花粉を判定した。その結果、稔性領域が $0.336 < x < 0.352$, $0.378 < y < 0.405$ と定めることができた。

(2) 外観計測

前節の色指標分布図の花の画像から同様に花粉の外観計測を行った。本計測では、花粉の形状のみを抽出し、花粉の形状的な特徴として「円相当径 (Heywood diameter)」および「縦横比 (Crosswise ratio)」を計測した。そして、花粉の形状をマスク・フィルタとし、これを介して外壁模様を抽出し、その模様（粒子パターン）の「フラクタル次元 (Fractal dimension)」を計測した。その結果を図 8 に示す。この図においては、図 7 における稔性領域にある花粉を白いプロットとし、それ以外の領域にある花粉を黒いプロットとして表現した。すなわち、色指標分布図の結果を併せて表現すると、白いプロットが稔性花粉、黒いプロットが不稔性花粉となる。

図 8 において、CCDtDt の不稔性花粉（黒いプロット）は細胞分裂の異常などによる萎縮がみられた。この図では、稔性

(a) Crosswise ratio

(b) Fractal dimension

Fig.8 The measured results on the CCDtDt

花粉に対応するプロットは円相当径において $30 \sim 40 \mu\text{m}$ の範囲に分布し、不稔性に対応するプロットは $12 \sim 25 \mu\text{m}$ の範囲に分布していることから、CCDtDt には稔性・不稔性の違いが寸法に表れているといえる。この傾向は、縦横比およびフラクタル次元と合わせてみることによって、より明確にプロットの集中として把握することができる。

(3) 色指標分布図と外観計測との比較

図 8 の稔性花粉（白のプロット）と不稔性花粉（黒のプロット）は色指標分布図における稔性領域より定めたことものであるが、外観計測では円相当径がおおよそ $30 \sim 40 \mu\text{m}$ にあるプロットが稔性花粉であることが読み取れる。そこで、プロットした花粉の画像から育種専門家の目視による観察によって稔性・不稔性の判定を行った。その結果、図 8 のプロット a および b を除いたすべてのプロットが目視による観察の結果と一致した。以上のことから、花粉の外観計測量¹⁾と本論文で提案する色指標分布図はともに花粉の稔性・不稔性の判定に有用な指標であることを確認した。

4.3.3 MM+CC における稔性・不稔性の判別評価

(1) 色指標分布図

MM+CC の色指標分布図（分割数は 200×200 ）を図 9 に示す。MM+CC についても、CCDtDt と同様にプロットは広く分布したことから、雑種植物の特徴を反映していることを確認した。そして、同様に、育種専門家による花粉の画像からの稔性・不稔性の判定を行った結果、稔性領域を $0.332 < x < 0.352$, $0.378 < y < 0.409$ と定めた。

(2) 外観計測

MM+CC の外観計測の結果を図 10 に示す。なお、図 9 に

Fig.9 The color index diagram on the MM+CC

における稔性領域の判定に基づき、白と黒のプロットにわけて表す。この図10から、MM+CCの稔性花粉は、円相当径では25~35 μm の範囲に分布し、縦横比では0.6~1.0、フラクタル次元では1.8付近に存在していた。円相当径とフラクタル次元については稔性花粉と不稔性花粉が領域により分けられていることからMM+CCにおいても同様に、寸法をはじめとする花粉の外観計測によって、稔性・不稔性の違いを捉えてたことを確認した。

この結果では、縦横比で0.7~1.0付近において稔性および不稔性花粉のプロットが混在していた。このことは、交雑の組合せや交雑種の育成過程によっては、その種の遺伝的な傾向が外観計測で測れない場合があることを意味する。したがって、色指標分布図など多様な側面での計測量は必要であるといえる。

(3) 色指標分布図と外観計測との比較

MM+CCにおいて、色指標分布図と外観計測による花粉の稔性・不稔性の判定について考察する。育種学では花粉の遺伝的な傾向(稔性・不稔性など)が外観的な特徴に表れるとしており、各計測量のプロットの集まりになんらかの遺伝的な特徴が秘められている。仮に、形状と模様による計測量だけで稔性を判定するのであれば、円相当径で25~30 μm に分布する花粉が稔性となる。しかし、e, f, gのプロットの花粉は色指標分布における稔性領域外にあるため、不稔性花粉の黒プロットとなった。これらのプロットを育種専門家の目視によって判定したところ、実際には不稔性であることが確認された。すなわち、この場合では、色指標分布図の方が正確に不稔性の判定を行えたことを意味する。このような結果になった理由は、模様や形状などには表れない細胞質内の偏りが色の濃さに表れ、この違いを色指標により捉えることができたと考えられる。

図10におけるプロットc, dは、色指標分布上では稔性花粉と判定されたプロットである。しかし、これも同様に専門家による判定を行った結果、不稔性花粉であることが確認された。この理由は同様に細胞質内の偏りによるもので、遺伝的な組合せ上と同様に花粉の色指標が広く分散してしまったためである。このことから、正確な判定を行うためには、色指標分布図および外観計測量¹⁾を総合的に判断する必要がある。

4.3.4 色指標分布図の有用性

本論文では、色指標分布図の有用性を主張する。本実験では、遺伝的に不安定な花粉二つを挙げ、CCDtDtでは約98% (108サンプル中2つを誤り)、MM+CCでは約95% (110サンプル中5つを誤り)の高い識別率を得ることができた。さらに、色指標分布図の結果と外観計測を合わせることで、特異な状態にある花粉(本実験では、a~f)を見つけやすいため、必要

(a) Crosswise ratio

(b) Fractal dimension

Fig.10 The measured results on the MM+CC

に応じて特異な花粉に注目してより詳細な観察を行い、花粉を評価することができる。

5. 結 言

本論文では、花粉の遺伝的な傾向を調査するために、花粉の色を定量化する「色指標」および全体的な傾向を表す「色指標分布図」を提案した。そして、実際に交雑実験中の雑種花粉を用いて実験を行い、本提案の効果を実証した。本実験では、色指標分布図上で、採取した花粉全体の傾向を把握した上で、いくつかの花粉を採取し、評価することで稔性領域を定め、稔性花粉を特定するだけで、花粉の稔性・不稔性を容易に判定することができた。また、すでに提案した外観計測¹⁾と併用することにより、より正確に稔性花粉を特定することができた。

今後、我々が提案してきた指標・計測量を統合的に扱い稔性・不稔性を判定できるような自動化手法に着手する。

参 考 文 献

- 1) 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**, 6, (2001), 981.
- 2) 福岡忠彦, 福井希一: 画像解析法によるオオムギの精麦品質の数量化について, 日本育種学雑誌, 科学技術編 **40**, 6, (1991), 223.
- 3) 生出真里, 浅井元朗, 二宮正士: 画像及び形状特徴量解析による雑草種子粒徑判別, 農業情報学, **2**, (2000), 69.
- 4) 三中信宏, 堀田光生: 画像解析システムによるオオムギ種子の形態分析, 日本育種学雑誌, **41**, 別1, (1991), 262.
- 5) Y. Matsuzawa, Y. Kaneko and S. W. Bang: Prospects of the Wide Cross for Genetics and Plant Breeding in *Brassicaceae*, Bull. College of Agriculture Utsunomiya Univ., **16**, 2 (1996), 5.
- 6) 幾瀬マサ: 花粉形態観測法, 日本花粉学会会誌, **36**, 1, (1990), 77.
- 7) 日本色彩学会: 色彩科学ハンドブック, 東京大学出版会, (1980), 403.