

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580026

研究課題名(和文) 3次元形状認識に基づく雑草埋土種子の同定技術とその自動化

研究課題名(英文) 3D measurement of weed seeds extracted from soil and its automatization

研究代表者

小林 浩幸 (Kobayashi, Hiroyuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター環境保全型農業研究領域・上席研究員

研究者番号：70355329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：雑草の埋土種子の情報から発生雑草を予察できれば合理的な除草法選択が可能になるが、埋土種子分析は未だに実用化されていない。これは種子の形態だけに基づく同定が困難だからである。私たちは実体顕微鏡とカメラによる3次元計測で、現時点では判別が困難な5種のヒユ属草種の同定を試みた。その結果、3次元画像を容易に得る手法が判明し、数種の同定が可能になったが、3種の3次元データは相当程度重複した。その原因として、一つには3種の自然集団に交雑が生じている可能性が想定される。もう一つは3次元画像の精度不足による測定誤差の影響である。判別困難な3種も、3次元画像のさらなる精度の向上により同定が可能になると考える。

研究成果の概要(英文)：Prior information on amount and species composition of weed soil seedbank enables reasonable choice of weed control methods. Nevertheless weed soilbank analysis is not still put to practical use because of difficulty of identification only by seed morphology extracted from soil. We tried to enable identification of 5 *Amaranthus* species seeds, which are at this time difficult to discriminate each other, by 3D measurement employing an ordinary stereomicroscope and a camera. We succeeded in establishing easy way to get accurate 3D images of the *Amaranthus* seeds, which enabled identification for some species. Among them, 3 species overlapped to a large extent in 3D data. These overlaps probably in part represent the taxonomic situation of the three species natural populations. Another possibility involves measurement errors due to inadequate accuracy of 3D images. We believe we can also identify the three difficult-to-discriminate species by further accuracy enhancement of 3D images.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・作物学・雑草学

キーワード：種子 雑草 3次元形状 ヒユ属 実体顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

効果的で無駄のない除草方法を選択するうえで、雑草の埋土種子の種構成や量を事前に知る技術が役に立つと考えられている。例えば、作物栽培用の除草剤は、ある草種には卓効を示すが、他の草種にはほとんど効かないということがよくある。しかし、発生する草種をあらかじめ知ることができれば、それに応じて雑草防除法を適切に選定することができる。一方、農耕地では発生する雑草と土壌中の埋土種子の構成がよく一致することがわかっており、埋土種子を調べれば発生雑草を推定できると考えられる。

私たちは、発生雑草の事前予測を目的として、主要耕地雑草の埋土種子の土壌からの抽出法の改良を進めてきた。しかし、種子の同定には熟練が必要なうえ、そもそも種子の形態形質は十分に調べられておらず、文献を参照しても困難なことが多い。

近年分布を広げ、全国の大豆栽培で問題となっている雑草にヒユ科ヒユ属の一年生草本があるが、これらの種子は相互に似通い、現時点では同定が不可能な草種が多い。ヒユ属の重要な草種の多くは帰化種で、アメリカの文献には種子の同定に役立つものがいくつかあるが、どれも説明は定性的で曖昧である。例えば、Delorit(1970)によるヒユ科種子の検索表のうち、アオゲイトウとハリビユに関する記述を抜き書くと、次のようである(筆者による和訳)。

1. 種子の周辺部は翼状で、表面はなめらか。
2. ほとんどの種子は 1.0-1.5mm
3. 翼はわずかに粒状か筋がある。縁は臍の部位にわずかに V 字の刻み目があり、内側に向かって短い溝となる。倒卵形から円形。種皮は黒色。長径 1.0-1.4mm, 短径 0.6-0.9mm。(ハリビユ)
3. ハリビユと同様だが、種皮は赤黒色。長径 1.0-1.5mm, 短径 0.6-1.0mm。(アオゲイトウ)

ここには共通の形態形質が定性的にやや詳しく説明されているが、両種の区別点は種皮の微妙な色の違いと、両種でレンジがほとんど重なる長径、短径だけであり、典型例同士でなければ判別は不可能と思われる。

ただ、アオゲイトウとハリビユの形態の説明にあるように、現状では定性的に記述せざるを得ない形態も、3次元の構造まで正確に計測することができれば、種の判別が可能になると推測される。

一方、近年、デジタルカメラや画像解析技術の進展によって、比較的安価な機材とソフトウェアで3次元画像に合成することが可能になっており、写真撮影が可能で実体顕微鏡と組み合わせることで、種子の3次元形状を計測し、同定のための知見を得られる可能性が出てきている。

### 2. 研究の目的

本研究では、雑草の埋土種子の形態だけから確実に同定するための知見を得る前提として、一般的な実体顕微鏡と顕微鏡撮影装置、画像解析用ソフトウェアを活用して雑草種子の3次元形状を観察・計測する簡便で確実な手法を検討した。対象草種は、日本での作物生産上重要なグループで、種子が微細で色彩にも乏しいため近縁草種間の区別が困難なヒユ科雑草とした。

### 3. 研究の方法

芽室、福島、つくば、筑後、ザンビア産のホソアオゲイトウ、アオゲイトウ、イガホビユ(ホナガアオゲイトウ)、イヌビユ、ホナガイヌビユ(以上、ヒユ属)と、対照として福島産のシロザ(アカザ属)の種子を供試した。

第一に、一般的な実体顕微鏡と写真撮影装置を用いて3次元画像を取得し、そこから形態形質データを得る手法を検討した。3次元画像は、自動昇降ステージを用いて相互に50 $\mu$ m前後のピッチで焦点をずらして撮影した10~20枚程度の写真をスタッキングして得た。しかし、一部の草種では後述するように照明の不都合に起因して、安定した3次元画像を取得できなかった。そこで第二に、写真撮影装置、光源の種類や照射の方向、フィルター類の付加など、様々な撮影条件を試行し、最良の方法を試行錯誤的に探索した。使用した主な機材、ソフトウェアは次の通りである。

顕微鏡本体：M205C(ライカ)

撮影装置：DFC295(ライカ)、D3200(ニコン)

対物レンズ：PLANAPO 1 $\times$ 、PLANAPO 0.63 $\times$

光源→照明ライト：LED5000→MEB129(マルチコントラストライト；ライカ)・MEB124(リングライト；ライカ)、CLS150X(ハロゲン冷光源)→ダブルアーム支柱型ライト(ライカ)

フィルター等：MDI-171(散乱版；ライカ)、MPL-30(偏光フィルター；ライカ)、MSS-FC(昇降ステージ；中央精機)

ソフトウェア：Leica Application Suite(ライカ)、Helicon Focus(Helicon Soft)、Sensive Measure(三谷商事)、3Dmeasurement(三谷商事)

このほか、滑らかで光沢のある種皮の反射を軽減させるため、粘土鉱物の微粉末による粉衣を試みた。用いた粘土鉱物は白色~灰白色のタルクとセリサイトである。粉衣は、静電気を除去したプラスチック容器に種子と資材を入れて攪拌することにより行った。

第三に、得られた3次元画像から複数の3次元形状データを得た。計測したのは長径、短径(以上、2次元データ)、厚さ、最凸部から翼のくびれの始まる部位の間の幅、臍付近の嘴状の突起の角度である。これらとは別に、マイクロ電子天秤(SC 2；ザルトリウス)

を用いて、種子の重さを計測した。それらが上述の草種の判別に使えるかどうかを検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 3次元画像の取得

ヒユ属との比較対照のために検討対象に加えたシロザは、直上から撮影した10~15枚程度の画像のスタックで容易に3次元画像が得られ、様々な部位のサイズや角度などのデータを取得できた(図1)。シロザは写真に写りやすい胞がいくらか残存し、また、種皮にも微細な構造があって写真に白飛び、黒つぶれが生じづらいからである。

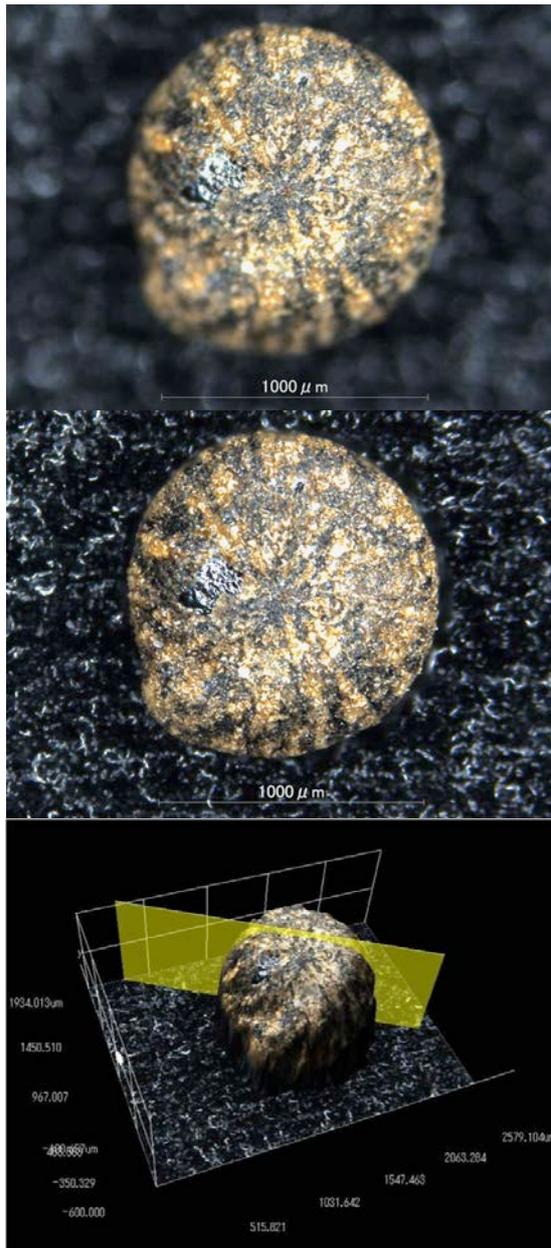


図1 シロザの種子の画像

上：種子の上部にフォーカス。中：フォーカス幅50μmで13枚の画像をスタッキング。下：スタッキング画像から3次元計測。

また、ヒユ属のうちホナガイヌビユも、種皮表面に均一に分布する微細な突起によつ

て光沢が減じられるため、写真撮影に不都合がなかった。このため、シロザと同様に、画像のスタックではっきりとした3次元画像が得られ、計測データの取得も比較的容易だった。

一方、ホソアオゲイトウ、アオゲイトウ、イガホビユ、イヌビユは果皮が漆黒で光沢があり、通常の落射照明では投影像の外形は得られるものの、光源の種類にかかわらず、白飛び、黒つぶれが生じた。このため、これまでも計測されてきた長径、短形などの2次元形状データは得られるものの、3次元形状に関する情報に欠損が生じた(図2上)。

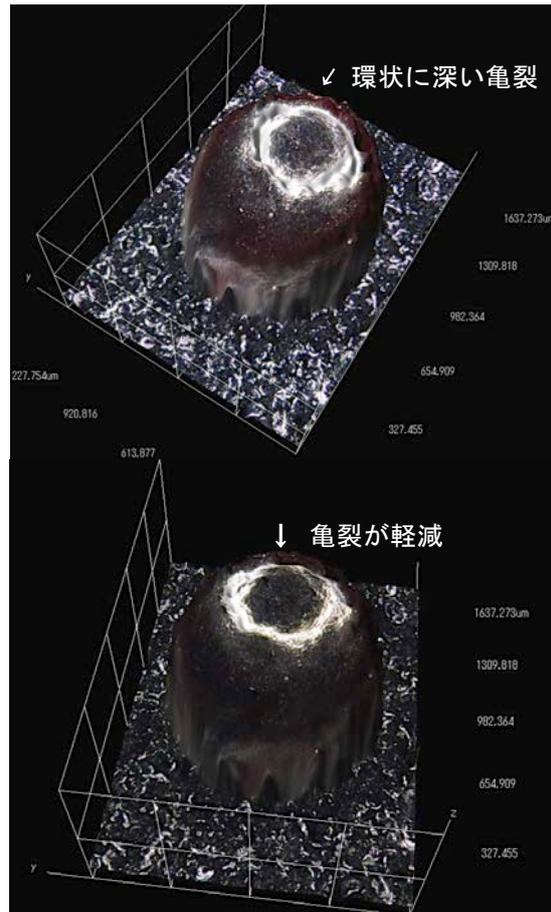


図2 ホソアオゲイトウの種子のスタッキングによる3次元画像

LEDによる落射照明で、(上)フィルター無し、(下)散乱板を付加。

##### (2) 最適な撮影条件の探索

そこで、試行錯誤的にハロゲンランプ、LEDで様々な方向から光を照射し、また、偏光フィルターや散乱板を併用して最適条件を探索した。それらの中で、情報の欠損が最も少ない3次元画像が得られたのは、LEDの落射照明に散乱板を付加した場合だった(図2下)。この照明によれば、種子の凸部の最頂部周辺に画像の乱れが生じるものの、全体的な形状は概ね正確に再現できていると判断された。

一方、LED落射照明に偏光フィルターを併用した場合には白飛びをほぼ完全に除去で

きたが、光強度が著しく低下し、使用した撮影機器で設定可能な最大限の露出を確保してもなお暗く、正確な3次元画像を得ることができなかった。ただし、肉眼では白飛びのない精緻な観察が可能であり(図3)、より高感度耐性の高い機器を用いれば、より正確な3次元画像が得られる可能性がある。

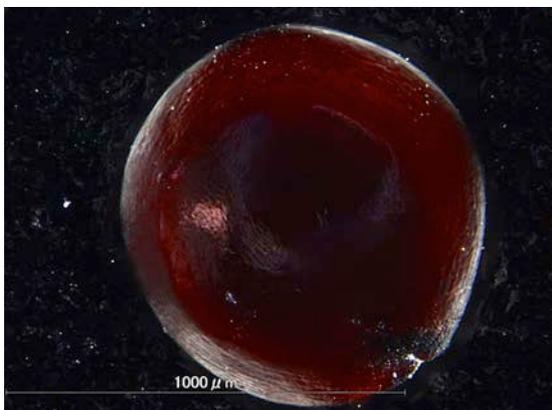


図3 LED 落射照明に偏光フィルターを併用して得たホソアオゲイトウの2次元画像

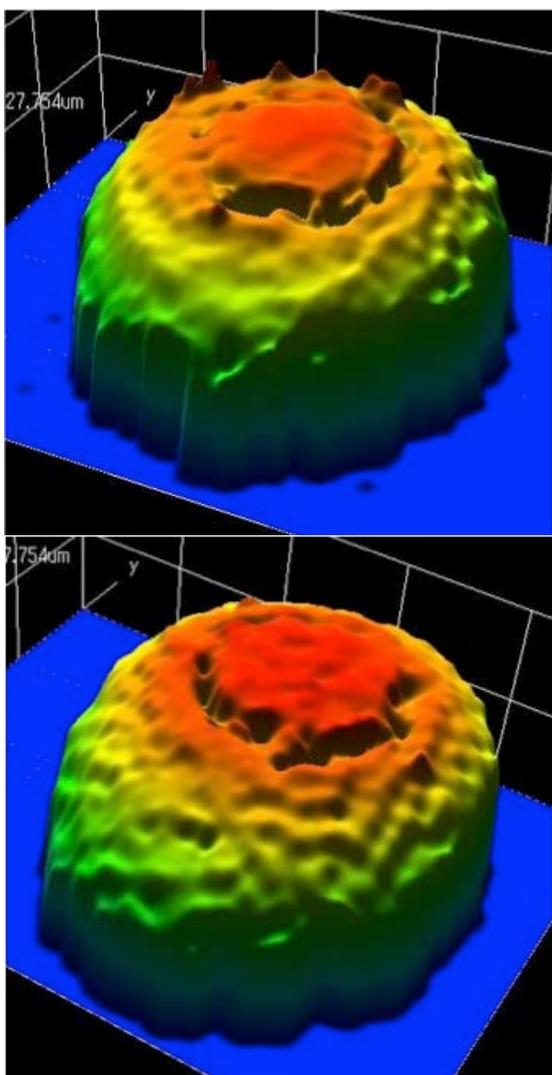


図4 微粉末の粉衣による3次元画像の改善(上)粉衣なし、(下)セリサイトで粉衣。赤が濃いほど標高が高いことを示す。

汎用のフルサイズ一眼レフデジタルカメラでは、近年、高感度耐性は著しく向上しており、今後、これらで使用される画像センサーが顕微鏡撮影で安価に使用できるようになれば、より正確な三次元形状観察が可能になると考えられる(本研究終了後の2014年5月に、ニコンより一眼レフカメラ用のフルサイズ CMOS センサーを用いた初めての顕微鏡用カメラ (ISO200~12800) が発表された。ただし、予定価格は149万円と高価である)。

タルクとセリサイトによる種子の粉衣は、いずれも3次元画像の取得が困難な3草種の白飛びをいくらか軽減した(図4)。しかし、照明の工夫と異なり、粉衣はサンプルごとに施さなくてはならず、顕微鏡のステージも計測のたびに清掃する必要があるなどハンドリング面で難があり、現時点では実用上のメリットは少ないと考えられた。

### (3) 3次元形状データの取得と解析

3次元データのうち、厚さ(レンズ状の種子をステージ上に水平に置いた場合の標高)と、2次元画像だけから得ることができる長径の関係を図5に示した。種子の厚さは、長径よりも草種間の違いが大きく、草種間の判別性が高いことが示唆される(例えばホナガイヌビユは、種子の厚さでアオゲイトウ、イガホビユ、ホソアオゲイトウと明確に判別できるが、長径ではレンジの重なりが大きく、判別困難)。同じく3次元画像だけから得ることができる短径は長径との相関が極めて高く、判別性は長径と変わりがなかった(データ略)。

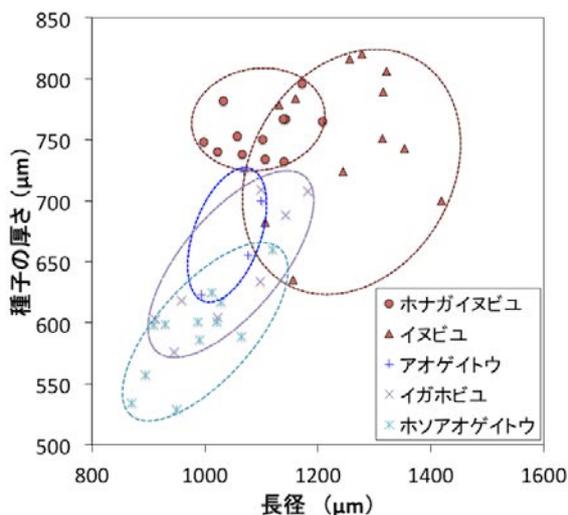


図5 ヒユ属雑草種子の長径と厚さの関係

ただし、アオゲイトウ、イガホビユ、ホソアオゲイトウについてはこの順番で種子の厚さが大きい傾向が認められたものの、レンジの重なりが大きく、草種の判別は困難だった。このようなレンジの大きな重なりは、他の3次元形質においても同様に認められた。

我が国においては、これらの3種を巡って分類上の混乱があって、かつて *Amaranthus*

*patulus* とされていたホソアオゲイトウ (大井 1983) は、現在は *A. hybridus* と考えられており、*A. hybridus* とされていたホナガイオゲイトウ (イガホビユ) には *A. powellii* があてられている (勝山 2001)。また、アオゲイトウと、イガホビユ・ホソアオゲイトウの間には花被片の長さを除けば判別性の高い形質に乏しく、相互に雑種が生じているとの見解もある (清水 2003)。したがって、種子の形態にみられる3種のレンジの重なりは、3種の自然集団の実体を反映したものである可能性がある。

また、ヒユ属5種のうち、種内のばらつきが最も小さかったのはホナガイヌビユだった。本種は、上述のように種皮表面の形状に起因して3次元画像の再現性が高いため、他種と比べて測定誤差が小さかった可能性がある。すなわち、ホナガイヌビユ以外のヒユ属雑草の形状データの分散には測定誤差がなお相当量含まれていると推定される (図5)。このことは、より正確な3次元画像を取得することで種内のばらつきを減らし、より確実な判別が可能になることを示唆している。

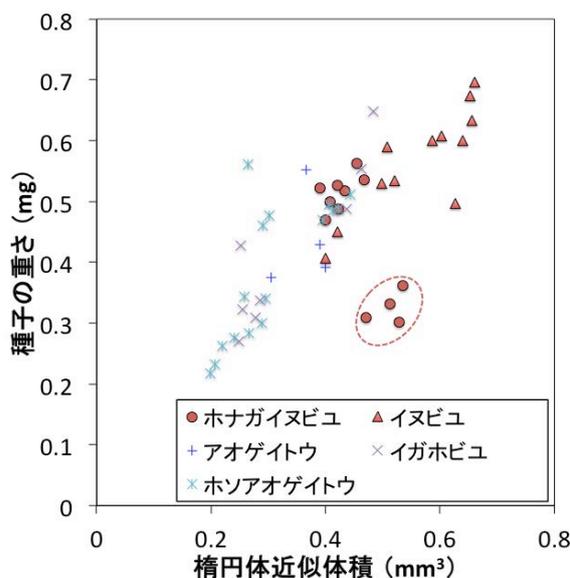


図6 ヒユ属雑草種子の体積と重さの関係

#### (4) 3次元形状データと重さの関係

種子の体積 (長径、短径、厚さを  $x, y, z$  として、 $4\pi xyz/3$  により算出した楕円体近似体積) と種子の重さの間には高い相関があった (図6)。しかし、体積はロットが異なっても同一種では比較的似通っている一方で、重さはロット間でばらつきがやや大きく、ホナガイヌビユのように、サイズがほぼ同じでも重さが大きく異なるロットが存在した。種子のサイズと比較して、重さは栄養状態に起因する充実度や、含水率の違いからばらつきやすいと考えられる。このことから、同定に用いるのは重さではなく本研究で検討を行ったサイズの方が適切であることが示唆された。

#### (5) まとめ

以上により、一般的な実体顕微鏡と顕微鏡撮影装置、画像解析用ソフトウェアを組み合わせることで3次元形状データを得ることが可能になった。また、これまで同定が困難だったヒユ属雑草の同定が、これらのデータにより可能になると考えられた。一部の種間では形状データのレンジが大きく重なり、同定が困難だったが、このようなレンジの重なりは自然集団の実体を反映したものである可能性が示唆された。今後の撮影装置の性能向上に期待されるのは解像度ではなく高感度耐性である。これにより、飛躍的に正確な3次元画像が取得でき、より明確な種の判別が可能になると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計0件)

〔学会発表〕 (計1件)

小林浩幸、内田智子、好野奈美子、実体顕微鏡を用いたヒユ科雑草種子の3次元形状観察と計測、日本雑草学会第53回講演会、2014年3月29~30日、法政大学小金井キャンパス (東京都小金井市)

〔図書〕 (計1件)

中央農業総合研究センター、東北農業研究センター、九州沖縄農業研究センター、麦作・大豆作・水稲作の難防除雑草 埋土種子調査マニュアル(第2版)、中央農業総合研究センター、つくば、69ページ、2014

〈初版は別予算で作成されたが、第2版作成にあたって、本研究の成果の一部を活用した〉

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.naro.affrc.go.jp/publicity\\_report/publication/pamphlet/tech-pamph/049250.html](http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/049250.html)

〈上述図書を紹介するページ〉

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小林 浩幸 (KOBAYASHI, Hiroyuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター・上席研究員

研究者番号：70355329

##### (2) 研究分担者

内田 智子 (UCHIDA, Tomoko)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター・主任研究員

研究者番号：70531854