

氏 名	LI TAO
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	博理工甲第 1131 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Evaluation of plant root system complexity under heavy metal stress based on fractal analysis (フラクタル解析に基づく重金属ストレス下の植物の根系の形態評価)
論文審査委員	委員長 教 授 門野 博史 委 員 教 授 川合 真紀 委 員 准教授 藤野 毅 委 員 教 授 王 青躍 委 員 学外委員 ラジャゴパワン・ウママヘスワリ

## 論文の内容の要旨

The plant root system performs various functions which are important to the whole plant growth and development. The architecture of the root system is a critical factor for the acquisition of resources such as water and nutrients. This in turn means that plants with a larger root surface area, and also finer roots or high lateral root branching density would have higher efficiency in absorption of water and minerals and thus will be effective for water uptake, nutrient acquisition, and other functions. Plant growth significantly depends on the root system morphology, which includes root length, root branching density, root distribution etc.

Extensive studies have focused on methods to determine root growth mainly through length measurement, weight measurement and lateral root counting. Traditional methods, such as trench method, core method, etc., are frequently used to measure and analysis the root system. However, there are many disadvantages of these traditional methods, such as large losses of fine roots, labor- intensive by these processing.

However, a challenging problem in the measurement of root morphologies quantifying the complexity of the root architecture. If quantification of root complexity could be described, it would provide a strong evidence of existing relationships between root functions and the overall plant performance. Therefore, an accurate method to estimate the complexity of the root system is required. As a way to estimate the complexity of the root system, a different approach that is based on fractal analysis has been applied. A fractal is a natural phenomenon or a mathematical set showing a repeating pattern that could be displayed at every scale. Despite considering root systems as fractal objects is still under debate as to the genuinity of to having self-similarity and thus non- integer dimension, application of fractal geometry to describing complexity of roots has found applications in describing the influence of environment. For instance, effect of different phosphorous conditions on root systems of common bean genotypes by Niels, effect of drought stress on rice system, effect of salt-stressed conditions on corn root system development.

In the last decade, with the development of industry, environment contamination by heavy metal has become an

increasing global concern as their widespread distribution and toxicity to living things. Heavy metal toxicity has been found to affect root formation other than grain yield, seed formation, chlorophyll synthesis, hormone proteins and membrane functions. Cd has been shown to affect lateral root formation and root development. Further, it has been known that such root systems undergo changes with environmental conditions, for example, heavy metal pollution of the soil. Therefore, there is a need for a method to characterize the complexity of the root systems that is also sensitive to evaluate the environmental effects. To our knowledge up to now, no study has examined the root complexity under heavy metal stress using fractal analysis. To our knowledge up to now, no study has examined the root complexity under heavy metal stress using fractal analysis.

Fractal dimension was calculated using the box-counting method. Box-counting method was used due to its popularity in calculating the dimensions and ease of use. In this study, fractal geometry was applied to characterize the complexity of the root system morphology of wheat plants under the exposure of heavy metals, namely Cd and Cu which are toxic to a plant and Zn, a micronutrient having a positive effect on the plant. We calculated the relative complexity index (RCI), which indicates fractal dimension (FD) changes. FDs were calculated by box-counting method with digitized and skeletonized images of roots of wheat plants cultivated in hydroculture system. RCI, relative root length and relative weight were measured under different concentrations of Cd (0.001, 0.01 and 0.05 mM), Cu (0.016, 0.4 and 1.2 mM) and Zn (0.3 and 0.75 mM). Results showed significant reduction of RCI for Cd stress with 0.01 and 0.05 mM, all Cu stress and promotion at all Zn concentration. In comparison, no significant changes were found in conventional measurements under Cu and Zn. RCI were more sensitive and were reliable in reflecting the influence of heavy metals than the conventional measures. These results imply that RCI can be an effective measure of the negative and positive effects of heavy metals on the development of complexity of root system under heavy metal exposures.

## 論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会は、当該論文の発表会を平成 31 年 2 月 26 日に公開で開催し、約 45 分の発表の後、本論文に関する詳細な質疑を行い、論文内容を審査した。以下に、論文内容を示すとともに、学位論文審査の結果を要約する。

第 1 章では、序論として研究の背景と目的について記述している。すなわち、植物の根系の機能と重要性および重金属が根系に与える影響について概観し、重金属ストレスが根系の発達に与える影響評価の重要性を指摘している。本研究では、重金属ストレス下の根系の発達すなわち根系の構造の複雑さの評価に新たにフラクタル幾何学を適用することを提案している。本章では、植物学におけるこれまでのフラクタル幾何学の応用研究を概観し本研究の位置づけを明らかにしている。

第 2 章では、本研究で重金属影響下での植物の根系の発達評価にフラクタル次元を用いることを提案している。まず、フラクタルとはどのような構造・性質を持つかを概説し、いくつか提案されているフラクタル次元の算出法について議論している。本研究では Box-counting 法を採用することとした。さらに、フラクタル次元 (FD) に基づいて、根系の複雑さを評価する指標として新たに Complexity Index (CI) を定義している。CI は単純な線状の形態では 0 を取り、より複雑な構造になるに従って 1 に近づく指標である。以降の議論では CI に基づいて重金属の根系への影響が評価されている。

第 3 章では、植物の根系に対するフラクタル次元を決定する際に必要となる根系の画像撮影法と Box-counting 法によりフラクタル次元を決定するために必要となる画像処理法について議論している。根系の画像撮影に関しては、植物を水耕栽培することとし、根系の画像撮影の際の根系への負荷や損傷を最小にした。また、根系に対する照明としては落射照明ではなく LED パネルを用いて均一な背景光による照明が以降の画像処理・Box-counting 法に対して最適であることを確認している。そのための画像処理として、まずデジタルカメラを用いて撮影しデジタル化した後、二値化処理、メディアンフィルタによるノイズ除去、細線化処理をおこなっている。これらの画像処理における最適なパラメータを検討している。これら一連の計算処理は Matlab による処理系を開発している。

第 4 章では、植物試料として麦 (Norin-61) を用い、重金属として毒性の強いカドミウム (Cd) に関して植物の根系への影響を提案手法により評価している。同時に、従来評価法である乾燥重量、ルーラーによる長さ計測をおこない比較検討している。カドミウム濃度は 0, 0.001, 0.01, 0.05mM についてカドミウム暴露を 3 週間 (一部 6 週間) に渡っておこなった。その結果、フラクタル次元に基づく提案手法である CI では低濃度に対しても早期にカドミウムの根系の発達への影響を有意差を持って明らかに示すことができた。これに対して、従来法である乾燥重量ではいずれの濃度に対しても有意な影響は見られなかった。ルーラーによる根系全体の長さ計測では最も高い濃度に関してのみ有意な差が見られた。さらに、根の長さ計測に関しては画像ソフトウェア (Image J) を用いて主根の総長さの計測をおこなった結果、重金属の根系への影響すなわち、根の発達の遅れを有意な差で示すことができた。しかし、この処理は手作業で根をトレースするため一つの試料に対して主根のみに関しても場合によっては 1 時間以上の作業を必要とした。これに対してフラクタル次元による手法では根系全体の構造評価に対して処理時間は数秒と非常に高速処理することが可能

である。

興味深い例として、カドミウムの影響により根の枝分かれが抑制され発達が貧弱となるが、全体としては長くなる試料がある。この場合もフラクタル次元による方法では正しく根系の構造の複雑さが失われていることを評価することが可能であった。

第5章では、重金属として銅（Cu）を用いた実験をおこなった。銅は微量栄養素であり微量であれば成長を促進するが、本実験では毒性を示す高い濃度（0.16, 0.4, 1.2mM）で実験をおこなった。CIに基づく根系の発達評価ではいずれの濃度においても1週間の暴露の早期においても有意な影響を定量的に示すことができた。一方、従来法である乾燥重量やルーラーによる長さ計測ではいずれの濃度においても3週間という短時間では有意な影響は観測できなかった。Image Jによる計測では有意な影響を示すことができたが、先に述べたように長い作業時間を要し、効率的な方法ではない。

第6章では、重金属として亜鉛を用いた実験をおこなった。銅と同様に亜鉛（Zn）は微量栄養素である。本実験では比較的低濃度で成長促進を示す濃度（0.3, 0.75mM）で計測をおこなった。結果として、いずれの濃度・暴露時間においても、提案手法により成長の促進効果を観測した。CIは最大で0.75mM、3週間で25%の増加が見られた。従来法である、乾燥重量やルーラーによる長さ計測ではいずれの濃度においても3週間という短時間では有意な影響は観測できなかった。

第7章では、本研究で提案したフラクタル幾何学に基づいた重金属ストレス下の根系の発達の評価手法を総括するとともに今後の展望についてまとめている。

以上総括すると、従来法である乾燥重量や根の長さ計測に比べて、本研究で提案したフラクタル次元に基づいた Complexity Index は根系の構造の複雑さそのものを評価するものであり本質的に異なる指標である。その有効性については実験により十分検証されている。加えて、本手法は詳細な画像解析による総長さ計測に比べて極短時間で処理可能であり効率がよく実用的な手法である。本研究では、試料として麦および重金属ストレスに関して詳細に調べているが、本手法は樹木を含む他の植物の根系、他の多くの環境ストレスの評価に適用可能であり学術的価値が高い。よって、博士（工学）の学位を授与するにふさわしい内容を備えていると判断し、当学位論文審査委員会は合格と判定した。