

方向選択的局所二値化法（DSL_T）と反復領域分割 アルゴリズムによる葉内三次元構造の抽出と解析

京都大学大学院 理学研究科 生物科学専攻 植物学系
植物分子細胞生物学分科

川瀬 貴士

目次

目次	1
要旨	2
序論	3
結果と考察	6
結論	15
材料と方法	16
謝辞	20
引用文献	21
表・図	

要旨

近年、三次元画像から得られた構造データの抽出と定量化の重要性が増してきている。正確かつ詳細な構造データを抽出し、定量化するためには染色などによる可視化と画像の領域分割が必要不可欠である。しかし、植物の葉のような空気間隙が存在する組織では、屈折率の不一致により共焦点レーザー顕微鏡や多光子顕微鏡などで明瞭な像を得ることが難しいという問題があった。本研究では、この問題を解決するためにナイルレッド/シリコンオイル溶液を用いた染色法を開発した。この染色法は細胞と空気間隙を同時に異なる色で可視化することができた上、植物体への影響も小さく抑えることができた。さらに、繰り返し染色することによって5日間以上のタイムラプス撮影にも成功した。また、領域分割の際に問題となる組織内部でのSN比(signal-to-noise ratio)の低下に対応するため、新たな局所二値化法の一つである方向選択的局所二値化法(direction-selective local thresholding [DSLTL])と反復領域分割アルゴリズムも開発した。反復領域分割アルゴリズムでは構造を抽出するために様々な方法を用いることができるが、本研究ではDSLTLを構造抽出のために利用した。本研究で開発した染色法と領域分割アルゴリズムを用いることによって従来法より優れた精度で生きた葉の三次元画像から細胞と空気間隙の形状を抽出することに成功した。さらに、考案した領域分割アルゴリズムを利用したデータ処理を補助するためにグラフィカルユーザーインターフェース (GUI) を備えたソフトウェアを開発し、公開した。

序論

(基本的な画像処理に関する解説については図 1-4 を参照.)

共焦点レーザー顕微鏡や多光子顕微鏡などの三次元イメージング技術は細胞・組織・個体の構造データを取得する上で非常に重要である。得られた構造データを定量化することによって二次元的な解析では同定することのできない表現型を同定できるようになる。これはより詳細な発生等の仕組みを明らかにするための手がかりとなる。葉の発生については先行研究により、固定した葉から得られた二次元画像から細胞分裂の方向、細胞の分化、空気間隙の観察・解析がなされている(Donnelly *et al.* 1999)。より詳しい解析を行うには三次元的な解析が必要になってくるが、その際問題となるのが空気間隙と細胞を分ける方法である。蛍光による可視化の方法では細胞の輪郭が可視化されることが多い。そのような場合は、すべての空気間隙と細胞を分けることが手作業でも難しくなる。従って、効率的に葉の構造データを解析するには少なくとも細胞の輪郭だけではなく空気間隙も区別できる状態で可視化する必要がある。また、発生の解析には非常に重要な時系列データを取得するために葉を生きたまま組織を可視化することも必要である。

正確かつ詳細な構造データを取得するためには高品質な元画像が必要となる。そのため、画像取得の方法は非常に重要である。近年、蛍光タンパクなどの遺伝子導入、顕微鏡、試料の処理法など画像取得にかかわる様々な技術が大きく進歩している(Shaw and Ehrhardt 2013)。植物科学においては、組織の三次元画像を取得するために共焦点レーザー顕微鏡や多光子顕微鏡がよく用いられて

いる(Feijó and Moreno 2004, Hepler and Gunning 1998). 根などの空気間隙を含まず透明度が高い組織では特別な処理を行わなくてもこれらの顕微鏡で高品質な三次元画像を取得することができるが、空気間隙を含む葉の内部では画像の品質は著しく低下してしまう。これは空気間隙が存在すると細胞内部との屈折率の不一致により励起光や蛍光が散乱・減衰してしまうためである(Feijó and Moreno 2004, Cheng 2006). 空気間隙による屈折率の不一致は間隙内を水で満たすことで解消できるが、一度葉内に入れた水を取り除くことは難しく、ガス交換に大きな支障をきたしてしまう。このような問題を解決するものとしては perfluorodecalin (PFD) と perfluoroperhydrophenanthrene (PP11) が報告されている(Littlejohn *et al.* 2010, 2014). PFD と PP11 は炭化水素の水素原子をすべてフッ素原子に置換した perfluorocarbon の一種である。これらの物質は表面張力が非常に低い上、水に近い屈折率を持つため、葉を浸すだけで内部に侵入して屈折率の不一致を解消できる。また、PFD と PP11 は揮発性も高いため、観察後放置しておくだけで短時間の内に葉内から取り除かれる。しかし、細胞の可視化は蛍光タンパクなどを用いて別途行う必要がある。

構造データを定量化するには、目的の構造や領域を画像から分割・抽出しなければならない。このような処理は領域分割と呼ばれている。領域分割は構造抽出の主要な技術であり、現在までに様々な手法が開発されている(Zanella *et al.* 2010, Bellaiche *et al.* 2011, Indhumathi *et al.* 2011, Mikula *et al.* 2011). さらに、植物の根・茎頂分裂組織・花芽分裂組織などの植物組織の三次元画像を対象とした領域分割法も開発されている(Marcuzzo *et al.* 2009, Fernandez *et al.* 2010, Liu *et al.* 2011, Schmidt *et al.* 2014). Fernandez *et al.* (2010) は *Arabidopsis thaliana* の根端分裂組織の三次元画像を領域分割して解析することによって、オーキシン輸送の異常がもたらす細胞分裂パターンのわずかな変

化を計測することに成功した。Schmidt *et al.* (2014) は *Arabidopsis thaliana* の花芽分裂組織の解析によって、花芽形成の初期段階での細胞の成長パターンを明らかにした。しかし、共焦点レーザー顕微鏡や多光子顕微鏡などによって得られた生きた葉の三次元画像を正確な領域分割を行うには問題が残されている。まず、葉は光の透過性が低いため、観察する部分が深くなるとシグナル強度が急激に落ちてしまう。さらに、Z 方向（焦点面に対して垂直方向）の解像度が低いため、焦点面に平行な膜のシグナルが検出しにくい(Inoué 2006, Pawley 2006)。また、細胞や空気間隙の形の複雑さも領域分割を困難にする一因となっている。

本研究では、葉の三次元画像を取得し、構造データを抽出するため、ナイルレッド/シリコンオイル溶液を使用した染色法と方向選択的局所二値化法(direction-selective local thresholding [DSLTL]), 反復領域分割アルゴリズムを開発した(図 5)。開発した染色法によって空気間隙と細胞をそれぞれ異なる蛍光で同時に可視化することを可能にした。また、染色液の溶媒に表面張力の低いシリコンオイルを使用することにより、葉を浸すだけで染色液を内部に浸透させて屈折率の不一致を解消することにも成功した。DSLTL は反復領域分割アルゴリズムで構造を抽出するために利用した二値化法である。DSLTL を用いることでシグナル強度のムラと Z 方向の解像度の低さの影響を抑えつつ正確に構造を抽出することに成功した。反復領域分割アルゴリズムは様々なパラメータで正しく分割されるまで繰り返し領域分割していくというもので、DSLTL でも対応できないほど部分ごとに品質に大きな違いがある画像でも高い精度で領域分割を行うことができるようになった。

結果と考察

葉の細胞と空気間隙の可視化

顕微鏡で撮影して得られる画像の品質は組織の可視化方法に大きく依存する。葉の細胞と空気間隙の三次元形状データを取得するためには、それぞれを区別できる状態で可視化する必要がある。また、空気間隙を水に近い物質で満たすことで屈折率の不一致を解消しなければならない。これらの条件を満たすため、蛍光試薬であるナイルレッドをシリコーンオイルに溶解させた溶液を用いて染色を行った。シリコーンオイルの表面張力は小さいため、葉を浸すだけでシリコーンオイルを葉の内部へ侵入させて空気間隙を満たすことができた。また、使用したシリコーンオイルの屈折率は 1.382 であり水の屈折率 1.333 に近かったため、屈折率の不一致による画像の品質の低下は生じなかった。さらに、シリコーンオイル自体の蛍光は非常に弱いので他の蛍光を観察する上での障害にはならなかった。以上の性質をもつシリコーンオイルに蛍光試薬であるナイルレッドを溶解させた溶液を染色に用いることで、葉内の染色と屈折率の不一致の解消を同時に行うことができた (図 6)。

空気間隙と細胞を区別できる状態で可視化するためにはナイルレッドの蛍光スペクトルが溶媒によって大きく変化する性質を利用した。このようなナイルレッドの性質は過去に報告されている (Greenspan et al. 1985)。実際に蛍光スペクトルを計測したところ、シリコーンオイル中のナイルレッドの蛍光極大波長は 533 nm だったが、植物細胞の脂質二重膜中の蛍光極大波長は 587 nm だった (図 7)。なお、シリコーンオイル中のナイルレッドの蛍光スペクトルは蛍光分光光度計 LS50-B (PerkinElmer) を用いて計測し、植物細胞の脂質二重膜中のナ

イルレッドの蛍光スペクトルは LSM780META の λ モードを使用して計測した。実際に、ナイルレッド/シリコーンオイル溶液に *Nicotiana glauca* と *Spirodela polyrhiza* の葉を浸して染色することによって、空気間隙と細胞を異なる蛍光で可視化することができた (図 8)。このことから、この染色法は蛍光タンパクなどの遺伝子導入が使用できないモデル植物以外の種でも広く適用可能であると考えられる。

次に、このナイルレッド/シリコーンオイル溶液を用いた染色を繰り返し行ってタイムラプス撮影を行った。一回の撮影の手順は以下のとおりである。

- (1) 葉を 5 分間ナイルレッド/シリコーンオイル溶液に浸す。
- (2) 葉を共焦点レーザー顕微鏡で撮影する。
- (3) 葉をシリコーンオイルで 2 回洗浄する。

シリコーンオイルは揮発性が高いので洗浄後放置しておくだけで葉内からシリコーンオイルを除去することができる。手順 (1) と (3) の染色と洗浄が植物体の生育にどの程度影響を与えるか確かめるために、*Arabidopsis thaliana* の植物体を手順 (1), (3) の通りに処理した後、葉の面積を計測した (図 9)。染色と洗浄を行なった植物体の葉の面積と何も処理をしていない植物体の葉の面積との間には有意差は認められなかった。従って、染色後にシリコーンオイルを用いて洗浄を行なえばナイルレッド/シリコーンオイル溶液による染色は植物体の生育に影響を及ぼさないと考えられる。実際に上述の 3 つの手順を繰り返し行うことで 5 日間以上にわたって *Nicotiana glauca* の葉のタイムラプス撮影に成功した (図 10)。*Arabidopsis thaliana* 等の遺伝子導入が容易に可能なモデル植物では、蛍光タンパクなどで細胞を可視化した上で PFD または PP11 で空気間隙を満たして撮影を行なえば、空気間隙の可視化はできないが同様のタイムラプス撮影が可能である。しかし、遺伝子導入が難しい、または遺伝子

導入の方法がまだ確立されていない植物種では、ナイルレッド/シリコーンオイル溶液を用いた方法以外で葉のような空気間隙を持つ器官を内部までタイムラプス撮影することは非常に困難である。また、細胞の変形などを引き起こし得る減圧または加圧処理をせずに空気間隙を液体で満たして屈折率の不一致を解消すると同時に染色も行う手法は前例がない。そのため、*Nicotiana glauca* のような遺伝子導入が容易でない種の葉の撮影を行う上では、タイムラプス撮影でない場合でも組織に出来る限り影響を小さくするためにナイルレッド/シリコーンオイル溶液を用いた染色を使う価値があると言える。

方向選択的局所二値化法(Direction-Selective Local Thresholding [DSLT])

葉の三次元画像から定量的な構造データを取得するためには、画像を細胞と空気間隙に相当するセグメントに分割してそれぞれを抽出する必要がある。セグメントの核を抽出するためには H-minima transform と呼ばれる方法が良く用いられている(Wahlby et al. 2004, Jierong and Rajapakse 2009, Fernandez et al. 2010)。なお、最終的なセグメントの生成は、抽出された核を元にして分水嶺法(Watershed アルゴリズム)などによって行われる。このような H-minima transform を利用した領域分割法は多光子顕微鏡で撮影した花芽分裂組織の三次元画像に対しては良好な結果を残している(Fernandez et al. 2010)。しかし、深部になるほど急激にシグナル強度が低下する葉の三次元画像(図 11a)においては過剰な分割を生じさせてしまうことが多かった(図 18a)。これは h-minima transform がシグナル強度の変化に鋭敏であるためであると考えられる(図 11b)。

シグナル強度の変化に影響されにくい方法として局所二値化法が挙げられる。局所二値化法では、近傍領域の加重平均値を元にして画素ごとに閾値を決定す

る．三次元画像の場合は，立方体または球状の近傍領域がよく用いられる．背景が黒の場合，各画素は次の式に従って二値化される．

$$dst(x, y, z) = \begin{cases} 1 & \text{if } src(x, y, z) > T(x, y, z) + C \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

$T(x, y, z)$ は点 (x, y, z) の近傍領域の加重平均であり， C はユーザー定義の定数である．また， src は元画像， dst は処理後の画像を表している．点 (x, y, z) における閾値は $T(x, y, z) + C$ である．この場合は細胞の輪郭部分を白(1)それ以外の背景部分を黒(0)として検出し，分断された黒の領域をそれぞれセグメントとして取り出す．しかし，この方法では，弱いシグナルの周りに強いシグナルが存在する場合に弱いシグナルを検出できないという問題が生じる．実際に葉の三次元画像に対して立方体の近傍領域を用いた局所二値化処理を行ったところ，検出できない部分が多く見られた（図 11c）．

本研究ではこの問題を解決するために方向選択的局所二値化法 (direction-selective local thresholding [DSLTL])を開発した．図 12 に DSLTL の処理過程を示した．DSLTL では従来の局所二値化法と同様に画素ごとに閾値を計算するが，対象となる画素を中点にもつ様々な方向の線分状領域を閾値の計算に使用する近傍領域として使用した．加重平均は 1 方向の線分状領域ごとに計算し，背景が黒の場合はその最小値を閾値の計算に使用した．H-minima transform と立方体状近傍領域を使用した局所二値化法と比較して DSLTL はより正確に構造を検出することができた（図 11d）．DSLTL では点 (x, y, z) における 1 方向の線分状領域の加重平均 T は次の式に従って計算される．

$$T(x, y, z, \theta, \psi) = \sum_{-R \leq k \leq R} f(k)src(x + k \cos\theta \cos\psi, y + k \cos\theta \sin\psi, z + k \sin\theta),$$

R は線分領域の半長， θ は線分領域のピッチ角， ψ はヨー角である． f は加重平均を求めるためのカーネルである．線分領域の加重平均を求める際に，元画像上

の座標が整数でない点の輝度値が必要になる場合は線形補完によって輝度値を推定して加重平均を計算した。

一般的に、共焦点レーザー顕微鏡や多光子顕微鏡で撮影した三次元画像の Z 方向の解像度は XY 方向の解像度と比べて低い。そのため、シグナルが焦点面に対して平行に近くなるほど強度が低下してしまい、検出するのが難しくなる。このことにより、セグメントの分割が不十分になり、複数の細胞や空気間隙が含まれたセグメントが生じてしまうことがある (図 18a, ix)。この問題を解決するため、次のような補正項を導入した。

$$C(\theta_{min}) = C_{const}(1 - \alpha|2\theta_{min}/\pi|) \quad (0 \leq \alpha \leq 1),$$

α と C_{const} はそれぞれユーザ一定義の補正係数と定数である。また、 $(\theta_{min}, \psi_{min})$ は点 (x, y, z) において最小の T を与える線分領域のピッチ角とヨー角である。

最終的に DSLT では点 (x, y, z) の画素は次の式に従って二値化される。

$$dst(x, y, z) = \begin{cases} 1 & \text{if } src(x, y, z) > \min_{(\theta, \psi) \in A} \{T(x, y, z, \theta, \psi)\} + C(\theta_{min}) \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

点 (x, y, z) の画素での閾値は $\min_{(\theta, \psi) \in A} \{T(x, y, z, \theta, \psi)\} + C(\theta_{min})$ である。また、 A は

使用する線分領域のピッチ角 θ とヨー角 ψ の組の集合である。膜状のシグナルが焦点面に対して平行に近くなるほど、そのシグナル上の点で最小の T を与える線分領域は焦点面に対して垂直に近くなる。また、補正項 $C(\theta_{min})$ は最小の T を与える線分領域が焦点面に対して垂直 (Z 軸に対して平行) に近くなるほど小さくなり、最終的な閾値が下がる。従って、膜状シグナルが焦点面に対して平行に近いほど感度が上がり検出しやすくなる。このような効果をもたらす補正項 $C(\theta_{min})$ により、焦点面に対して平行に近い膜状のシグナルもより良く検出できるようになった (図 11d)。

反復領域分割アルゴリズムによる葉の細胞と空気間隙の抽出

共焦点レーザー顕微鏡や多光子顕微鏡によって得られた葉の三次元画像では、深部へ行くほど急激にシグナル強度が低下してしまう。そのため、DSLIT を用いて画像を処理しても、画像全体で精度よく領域分割を行うことは難しい。この問題に対応するため、構造を抽出するための二値化処理 (DSLIT) の感度を上昇させながら繰り返し領域分割を行い正しく分割されたセグメントを保存していく反復領域分割アルゴリズムを開発した (図 13)。

実際の処理では、前処理としてノイズ低減のためのガウシアンフィルタによるスムージングと表面からの深さを元にした輝度調節を行った。その後、反復領域分割アルゴリズムによって画像を細胞と空気間隙の領域に分割した。反復領域分割アルゴリズムでは次の処理を繰り返し実行する。

(1) 画像を DSLIT によって二値化する。与えられた値以下の全ての自然数の R を用いた DSLIT の処理結果を論理和で合成する。これは、複雑な構造が密集している場合には、長い線分領域を用いた DSLIT では構造を抽出できない場合があるためである。

(2) ノイズなどによる小さな穴を埋めるため、二値化された画像に対して球形の構造要素を用いて Closing 処理 (Soille 2003) を行う (図 4)。

(3) Flood fill (塗りつぶし) アルゴリズムを利用してセグメントを抽出する。

(4) 抽出されたセグメントの正誤判定を行う (図 14)。分割が正しく行われなかったと判定されたセグメントの領域については、DSLIT の感度を上げた状態で (1) から同じ処理を繰り返し行う。すなわち、 C_{const} を前回の処理より小さくして DSLIT 処理を行う。正しく分割されたと判断されたセグメントは保存し、そのセグメントの領域への処理は終了する。

正しく分割されていないセグメントとは、2 つ以上の細胞が含まれるもの、また

は細胞と空気間隙の両方を含むものであるとした．このようなセグメントは図 14 で示したような体積の大きい内部構造を持つ．この内部構造を検出し，体積を閾値と比較することで(4)のセグメントの正誤判定を行った．具体的には，元の二値画像と Closing 処理されたセグメントの論理積を求めることによって内部構造を抽出し，内部構造の体積が設定した閾値より大きければ誤ったセグメント，小さければ正しいセグメントと判断するようにした．正誤判定の際，Closing 処理の構造要素の半径は内部構造の厚みとできる限り近くしなければならない．半径が小さすぎると内部構造を Closing によって埋められないため，内部構造を検出できなくなる．逆に大きすぎる場合はセグメントの外側も Closing によって埋められてしまい外部の構造を内部構造として検出してしまふ．このような現象は表皮細胞など外周が大きく湾曲しているもので生じやすくなる．Closing 処理の構造要素の適切な半径の推定には Opening 処理を利用した (図 15)．本研究では Closing 処理の構造要素の適切な半径は元の 2 値画像に Opening 処理を行なった時に大半の構造が消失する半径と考えた．具体的な推定の手順は次の通りである．まず，元の二値画像に半径 1 で Opening 処理を行い，残っている構造（白い部分）の体積を計測した．その後，同様に半径を 1 ずつ増加させて元の二値画像に Opening 処理を行なった後に残っている構造の体積を計測し，元の構造の体積の半分以上が消失する半径を正誤判定の際に行う Closing 処理の構造要素の半径とした．

反復領域分割アルゴリズムは全てのセグメントが正しく分割されたと判断されるか， C_{const} が設定された下限値に達した時点で反復処理を終了するようにした．その後，空気間隙の検出，小さすぎるセグメントの除去，必要であればプラスチックに相当するセグメントの除去を行った．空気間隙の検出には，シリコーンオイル中のナイルレッドの蛍光を利用する．具体的には，セグメント中の

平均輝度が設定した閾値以上である場合にそのセグメントを空気間隙と判断する自動判別機能を実装した。この機能は単純な閾値処理によるものであるため、ある程度手作業での修正が必要である。プラスチックに相当するセグメントの検出には自家蛍光を利用し、空気間隙の場合と同様の方法で検出を行った。以上のすべての工程が終了した後、セグメント間の境界領域を埋めるために分水嶺法で処理を行い、最終結果を得た（図 16）。

開発した反復領域分割アルゴリズムの精度を検証するため、反復領域分割アルゴリズムを用いて抽出したセグメントと完全に手動で抽出したセグメントの比較を行い、正しく分割されたセグメントの割合を計測した。この比較を行うために *Arabidopsis thaliana* のロゼット・形成葉の表と裏の三次元画像を用いた。また、表面からの深さが 0~45 μm の領域を評価の対象とした（図 17）。開発した反復領域分割アルゴリズムによって正しく一つの細胞に分割されたセグメントは 91.3%だった（図 18b 上段）。さらに詳細な検証を行うために、反復領域分割アルゴリズムを用いて抽出したセグメントと完全に手動で抽出したセグメントの横断面の面積を計測し、抽出されたセグメントの横断面積の誤差を求めた（図 18b 下段）。横断面積の誤差の平均は 2.5%，標準偏差は 2.0%だった。さらに、従来の方法との精度の比較も行った。比較に用いた従来法は、反復領域分割アルゴリズムの二値化処理を `h-minima transform` に置き換えたものと Automated Cell Morphology Extractor (ACME) (Mosaliganti *et al.* 2012)である（図 18）。比較の結果、DSLIT を用いた反復領域分割アルゴリズムは他の手法より良い精度で構造を抽出できることが明らかになった。ACME は DSLIT と同じように、共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した三次元画像で不鮮明になることが多い焦点面に対して平行に近い膜状のシグナルも検出できるように開発された手法である。また、ACME は `tensor voting` という技術を用いている (Guy

and Medioni 1996). Tensor voting には非常に高い補完能力があるため、高いノイズ耐性がある。しかし、葉の三次元画像から精度よく構造の抽出を行うことはできなかった。これは複雑な形を持つ葉の細胞を抽出する際にはその高い補完能力によって過剰な分割を生じさせたためであると考えられる。

次に、開発した手法の実用性の検証を兼ねて、気孔密度と表層付近の空気間隙の関係を解析した (図 19)。実験には *Arabidopsis thaliana* の野生型 (Col-0) と *STOMAGEN* の過剰発現株と発現抑制株を用いた。*STOMAGEN* は *Arabidopsis thaliana* において気孔の密度を正に制御するペプチドホルモンである (Sugano et al. 2010)。共焦点レーザー顕微鏡を用いて第 1・2 葉の表側の三次元画像を撮影し、表面からの深さが 9~31 μm の領域の空気間隙を抽出した。気孔密度が高い *STOMAGEN* 過剰発現株では野生型と比べて空気間隙の体積が有意に増大していた。気孔系列細胞は孔辺母細胞の時点で葉肉細胞との接着が外れ始める。したがって、気孔密度が増大すれば表皮と葉肉の接着面積が減少することになる。これに加えて、*STOMAGEN* 過剰発現株の気孔がクラスター状に集まっている部位が表皮の他の部位よりも薄くなっていたことを考慮すると、この結果は妥当であると考えられる。しかし、一方で *STOMAGEN* 発現抑制株と野生型では空気間隙の体積に有意差は見られなかった。これにより、*Arabidopsis thaliana* の葉の表側においては、野生型より気孔密度が減少しても表層付近の葉肉組織の構造には影響が出ないということを示唆された。考えられる要因としては、野生型と *STOMAGEN* 発現抑制株の表皮のパターンの差が小さいことが挙げられる。つまり、気孔密度では野生型と *STOMAGEN* 発現抑制株の間には大きな差が存在するが、その差分の気孔の面積は表皮全体の中では小さいため、葉肉組織のパターンに影響を与えるまでには至らなかったと考えられる。

結論

本研究によって植物の葉を固定せずに空気間隙と細胞を異なる蛍光で同時に可視化できるナイルレッド/シリコーンオイル溶液による染色法を確立することに成功した。この染色法は植物体への影響も小さく、長期間のタイムラプス撮影も可能であった。また、モデル植物に限らず多様な植物に対して使用できるので、応用範囲は広いと考えられる。

また、従来法を超える精度をもつ三次元領域分割アルゴリズムの開発にも成功した。開発した反復領域分割アルゴリズムによって葉の三次元画像から高い精度で細胞と空気間隙を抽出することが可能になった。この反復領域分割アルゴリズムには本研究で新たに開発した局所二値化法である **DSL**T を利用した。従来法の問題点を克服した **DSL**T によって、より正確かつ柔軟に画像から物体を抽出できるようになった。**DSL**T は葉の三次元画像だけではなく、他の画像にも使用できる汎用的な方法であるため、物体認識など様々な分野で利用できる可能性がある。解析ツールとして提供するために、**DSL**T を利用した反復領域分割アルゴリズムを実装し、GUI を備えたソフトウェアを公開した (図 20)。このソフトウェアの実行可能ファイル、ソースコード、マニュアルは <https://github.com/nslab2000/DSL>T からダウンロード可能である。

材料と方法

試薬

特に記述しない場合，ナカライテスクもしくは和光純薬工業から購入したものを用いた．

植物材料

Arabidopsis thaliana エコタイプ Col-0 をバックグラウンドとし，原形質膜に局在して緑色蛍光を発する融合タンパクである GFP-LTI6b を発現する形質転換体 (Somerville line) を用いた (Cutler *et al.*, 2000)．また，同様にエコタイプ Col-0 をバックグラウンドとする *STOMAGEN* の過剰発現株 (STOMAGEN-OX10) と発現抑制株 (STOMAGEN-RNAi10) も使用した (Sugano *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2013)．

植物体の育成条件

Arabidopsis thaliana 播種用培地として，ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類，ショ糖（最終濃度 1 %），Mes-KOH（pH = 5.7）（最終濃度 0.05 %）を，ゲランガム（最終濃度 0.5 %）と混合して調製したムラシゲ・スクーグ培地を用いた．

Arabidopsis thaliana の種子は 70 % エタノールで滅菌した後，99 % エタノールで脱水し，乾燥させてからムラシゲ・スクーグ培地上に無菌的に播種し，人工気象器を用いて 22 °C，連続明条件下で育成した．播種後 24 日以降は土ポット（ジフィー）上に移し，一度ハイポネックスを与えた上で，長日条件（16 時間明期，8 時間暗期）の下，22 °C で育成した．

Nicotiana glauca の種子は葉たばこ研究所（日本たばこ産業）から提供を受けたものを使用した．本研究では種子を土ポット（ジフィー）上に播種し、ハイポネックスを与えながら、長日条件（16 時間明期，8 時間暗期）の下，22°C で育成した．

Spirodela polyrhiza 7003 育成用培地としてショ糖最終濃度 1 % の neurofilament medium を使用した．植物体は 75 ml の培地を入れた 200 ml 三角フラスコ中で，22±1 °C，連続明条件下で育成した(Muranaka *et al.*, 2014)．200 ml 三角フラスコはコットンを用いて栓をした．また，毎週健康な植物体を取り出し，新しい培地移すことで継代を行った．

ナイルレッド/シリコーンオイル溶液を用いた染色

染色には 10 μ M ナイルレッド/シリコーンオイル(KF96L-1.0 cs)溶液を使用した．葉の表側を観察する場合は 5 分間，裏側の場合は 15 分間葉を染色液に浸して染色を行った．タイムラプス撮影の場合は撮影前に染色を行い，撮影後にナイルレッドを除くためにシリコーンオイルを用いて 2 回洗浄を行った．葉内のシリコーンオイルは空気乾燥によって取り除いた．

共焦点レーザー顕微鏡を用いた三次元画像の撮影

共焦点レーザー顕微鏡として LSM780META(Carl Zeiss)を用いて Z stack を撮影し，三次元再構成を行うことで三次元画像を得た．特に記述しない場合，対物レンズは C-Apochromat 63x/1.20 W Corr M27 を使用した．シリコーンオイル中のナイルレッドと GFP の蛍光の検出を行う際には，488 nm の波長のレーザーを励起光として使用し，490-560 nm の範囲の波長の光を検出した．脂質二重膜中のナイルレッドの蛍光の場合は，561 nm の波長のレーザーを励起光と

して使用し、560-639 nm の範囲の波長の光を蛍光として検出した。また、同じ励起光を用いて 640-712 nm の範囲を自家蛍光として検出した。ダイクロイックミラーには MBS 488/561 を使用した。ピンホールサイズは 59 μm とし、スキャンの Z 方向の間隔は 0.45 μm に設定して撮影を行った。

ナイルレッド/シリコンオイル溶液が植物体へ及ぼす影響の評価

まず播種後 14 日目の *Arabidopsis thaliana* の植物体をシリコンオイルまたはナイルレッド/シリコンオイル溶液に 5 分間浸した。その後、シリコンオイルを用いた 1 分間の洗浄を 2 回行ってナイルレッドを除去し、10 分間空気乾燥することによって葉内に残ったシリコンオイルを取り除いた。すべての処理はクリーンベンチ中で行った。処理を行ってから 3 日後に、第 5 葉全体を SteREO Lumar.V12 microscope (Carl Zeiss) を用いて撮影した。得られた画像から imageJ(National Institutes of Health)を用いて第 5 葉の葉面積を計測した。

葉の三次元画像中の葉の表面の検出

葉の組織中での深さを特定するために、次の手順に従って葉の表面を検出した。

- (1) Z 軸に沿って上から下へスキャンを行い、設定した閾値と画素の輝度を比較する。
- (2) 画素の輝度が閾値より大きければ、その画素と直上の画素の間に表面があるとし、線形補完によって表面の座標を推定する。

前処理として Z 方向のみにガウシアンフィルタを使用した平滑化を行った。また、後処理として、得られた表面の高さマップをガウシアンフィルタで処理して平滑化を行った。

空気間隙の解析

播種後 14 日目の *Arabidopsis thaliana* の植物体の第 1 葉表側を解析の対象とした．三次元画像データの取得には共焦点レーザー顕微鏡を使用した．スキャン範囲は $224.48\text{ }\mu\text{m} \times 224.48\text{ }\mu\text{m}$ (縦 $\times$ 横)とした．開発した反復領域分割アルゴリズムを用いて表面からの深さ 9~31 μm の範囲の空気間隙を抽出し体積を計測した．空気間隙の体積は，画素の体積に空気間隙のセグメントに含まれる画素数を積算することによって求めた．なお，自動領域分割で正常に分割できなかったセグメントは手動で修正してから体積の計測を行った．

開発したアルゴリズムのソフトウェアへの実装

本研究で開発した DSLT と反復領域分割アルゴリズムは GUI を備えたソフトウェアに実装した．実装は C/C++ と CUDA を用いて行った．GUI については C# と Windows Presentation Foundation を用いて作成した．セグメントの修正を容易にするため，セグメントの膨張・収縮機能やそれらを利用した連結・分離機能も実装した．開発したソフトウェアは Geforce GTX 580, Geforce GTX 680 または Tesla K20 を搭載したコンピュータ上で動作することを確認した．

謝辞

本研究は京都大学大学院理学研究科植物分子細胞生物学的研究室にて行われました。快適かつ高度な研究環境と非常に多くの助言を頂きましたことに、指導教官である西村いくこ教授に心から感謝申し上げます。嶋田知生講師，田村謙太郎助教，上田晴子特定准教授，ならびに菅野茂夫博士は実験技術の指導や研究の進め方など多岐にわたって理解しやすく丁寧なアドバイスをして下さいました。特に菅野茂夫博士には日頃から研究や生活面について相談に乗っていただき，新しいアルゴリズムを開発する上で貴重な助言を頂きましたことに心から感謝申し上げます。植物分子細胞生物分科の皆様も日頃から研究についての議論をしてくださり，研究や生活面について多くの助言を頂きました。心から深く御礼申し上げます。

京都大学理学研究科植物学系植物生理学分科の長谷あきら教授はシリコーンオイル中のナイルレッドの蛍光スペクトルを計測するために用いた蛍光分光光度計をお貸し下さいました。*Nicotiana glauca* の種子は今関英雅名誉教授のご紹介で葉たばこ研究所の小鞠敏彦氏と齊藤靖人氏から提供していただきました。また、*Spirodela polyrhiza* 7003 の植物体は京都大学理学研究科植物学系形態統御学分科の小山時隆准教授と村中智明氏から提供して頂きました。深く感謝申し上げます。

皆様の親身なご協力がなければ，本研究をここまで形にし，博士論文としてまとめることは到底できなかったことと思います。皆様のご協力に深く感謝の意を表します。

引用文献

- Bellaiche, Y., Bosveld, F., Graner, F., Mikula, K., Remesikova, M. and Smisek, M. (2011) New robust algorithm for tracking cells in videos of drosophila morphogenesis based on finding an ideal path in segmented spatio-temporal cellular structures. In *Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC, 2011 Annual International Conference of the IEEE*, pp. 6609-6612.
- Cheng, P.-C. (2006) Interaction of Light with Botanical Specimens. In *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* (Pawley, J.B. ed.). New York: Springer US, pp. 414-441.
- Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffiths, J.S. and Somerville, C.R. (2000) Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 3718-3723.
- Donnelly, P.M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R.E. and Dengler, N.G. (1999) Cell Cycling and Cell Enlargement in Developing Leaves of Arabidopsis. *Developmental Biology*, **215**, 407-419.
- Feijó, J.A. and Moreno, N. (2004) Imaging plant cells by two-photon excitation. *Protoplasma*, **223**, 1-32.
- Fernandez, R., Das, P., Mirabet, V., Moscardi, E., Traas, J., Verdeil, J.-L., Malandain, G. and Godin, C. (2010) Imaging plant growth in 4D: robust tissue reconstruction and lineaging at cell resolution. *Nat Meth*, **7**, 547-553.
- Greenspan, P., Mayer, E.P. and Fowler, S.D. (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*, **100**, 965-973.
- Guy, G. and Medioni, G. (1996) Inferring global perceptual contours from local features. *International Journal of Computer Vision*, **20**, 113-133.
- Hepler, P. and Gunning, B.S. (1998) Confocal fluorescence microscopy of plant cells. *Protoplasma*, **201**, 121-157.
- Indhumathi, C., Cai, Y.Y., Guan, Y.Q. and Opas, M. (2011) An automatic segmentation algorithm for 3D cell cluster splitting using volumetric

- confocal images. *Journal of Microscopy*, **243**, 60-76.
- Inoué, S.** (2006) Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy. In *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* (Pawley, J.B. ed.). New York: Springer US, pp. 1-19.
- Jierong, C. and Rajapakse, J.C.** (2009) Segmentation of Clustered Nuclei With Shape Markers and Marking Function. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, **56**, 741-748.
- Littlejohn, G.R., Gouveia, J.D., Edner, C., Smirnov, N. and Love, J.** (2010) Perfluorodecalin enhances *in vivo* confocal microscopy resolution of *Arabidopsis thaliana* mesophyll. *New Phytologist*, **186**, 1018-1025.
- Littlejohn, G.R., Mansfield, J.C., Christmas, J.T., Witterick, E., Fricker, M.D., Grant, M.R., Smirnov, N., Everson, R.M., Moger, J. and Love, J.** (2014) An update: improvements in imaging perfluorocarbon-mounted plant leaves with implications for studies of plant pathology, physiology, development and cell biology. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 140.
- Liu, M., Chakraborty, A., Singh, D., Yadav, R.K., Meenakshisundaram, G., Reddy, G.V. and Roy-Chowdhury, A.** (2011) Adaptive Cell Segmentation and Tracking for Volumetric Confocal Microscopy Images of a Developing Plant Meristem. *Molecular Plant*, **4**, 922-931.
- Marcuzzo, M., Quelhas, P., Campilho, A., Maria Mendonça, A. and Campilho, A.** (2009) Automated Arabidopsis plant root cell segmentation based on SVM classification and region merging. *Computers in Biology and Medicine*, **39**, 785-793.
- Mikula, K., Peyri  ras, N., Reme   kov  , M. and Sta  ov  , O.** (2011) Segmentation of 3D cell membrane images by PDE methods and its applications. *Computers in Biology and Medicine*, **41**, 326-339.
- Mosaliganti, K.R., Noche, R.R., Xiong, F., Swinburne, I.A. and Megason, S.G.** (2012) ACME: automated cell morphology extractor for comprehensive reconstruction of cell membranes. *PLoS Comput Biol*, **8**, e1002780.
- Muranaka, T., Okada, M., Yomo, J., Kubota, S. and Oyama, T.** (2014) Characterisation of circadian rhythms of various duckweeds. *Plant Biology*. in press. doi: 10.1111/plb.12202.
- Pawley, J.** (2006) Fundamental Limits in Confocal Microscopy. In *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* (Pawley, J.B. ed.). New York: Springer US, pp. 20-42.

- Schmidt, T., Pasternak, T., Liu, K., Blein, T., Aubry-Hivet, D., Dovzhenko, A., Duerr, J., Teale, W., Ditengou, F.A., Burkhardt, H., Ronneberger, O. and Palme, K. (2014) The iRoCS Toolbox--3D analysis of the plant root apical meristem at cellular resolution. *Plant J*, **77**, 806-814.
- Shaw, S.L. and Ehrhardt, D.W. (2013) Smaller, Faster, Brighter: Advances in Optical Imaging of Living Plant Cells. *Annual Review of Plant Biology*, **64**, 351-375.
- Soille, P. (2003) *Morphological image analysis : principles and applications* 2nd edn. Berlin ; New York: Springer.
- Sugano, S.S., Shimada, T., Imai, Y., Okawa, K., Tamai, A., Mori, M. and Hara-Nishimura, I. (2010) Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. *Nature*, **463**, 241-244.
- Tanaka, Y., Sugano, S.S., Shimada, T. and Hara-Nishimura, I. (2013) Enhancement of leaf photosynthetic capacity through increased stomatal density in Arabidopsis. *New Phytol*, **198**, 757-764.
- Wahlby, C., Sintorn, I.M., Erlandsson, F., Borgefors, G. and Bengtsson, E. (2004) Combining intensity, edge and shape information for 2D and 3D segmentation of cell nuclei in tissue sections. *J Microsc*, **215**, 67-76.
- Zanella, C., Campana, M., Rizzi, B., Melani, C., Sanguinetti, G., Bourguine, P., Mikula, K., Peyrieras, N. and Sarti, A. (2010) Cells Segmentation From 3-D Confocal Images of Early Zebrafish Embryogenesis. *Image Processing, IEEE Transactions on*, **19**, 770-781.

元画像

0	0	0	0	0
0	0	1	1	0
0	1	2	2	1
0	1	2	3	2
1	1	2	2	2

カーネル

0	0	0
-2	0	2
0	0	0

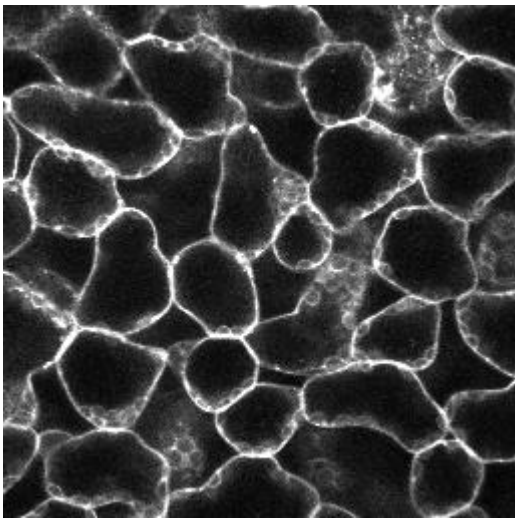
処理後

	4			

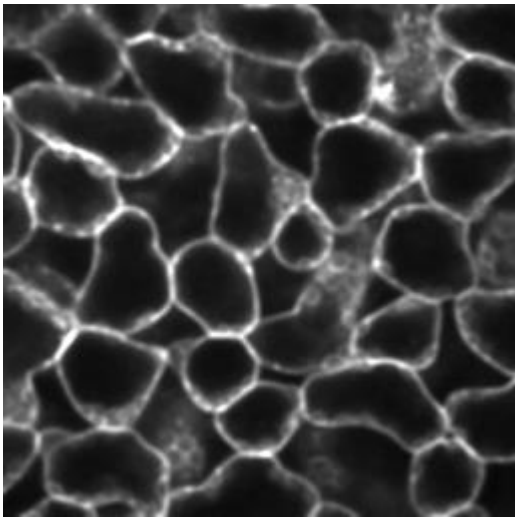
図 1. 畳み込み演算.

元画像の赤枠で囲まれた画素を対象とした畳み込み演算の例. カーネルの中心要素が対象となる画素に重なるようにして, 重なったそれぞれの要素と画素の値を積算する. 得られた積を全て足し合わせて加重平均を求め, それを処理後の画素の値とする.

元画像

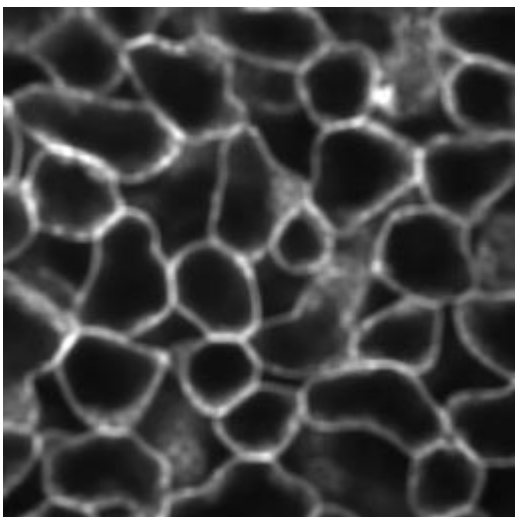


5 × 5 ガウシアンフィルタ



$\frac{1}{256}$	$\frac{4}{256}$	$\frac{6}{256}$	$\frac{4}{256}$	$\frac{1}{256}$
$\frac{4}{256}$	$\frac{16}{256}$	$\frac{24}{256}$	$\frac{16}{256}$	$\frac{4}{256}$
$\frac{6}{256}$	$\frac{24}{256}$	$\frac{36}{256}$	$\frac{24}{256}$	$\frac{6}{256}$
$\frac{4}{256}$	$\frac{16}{256}$	$\frac{24}{256}$	$\frac{16}{256}$	$\frac{4}{256}$
$\frac{1}{256}$	$\frac{4}{256}$	$\frac{6}{256}$	$\frac{4}{256}$	$\frac{1}{256}$

5 × 5 平均フィルタ



$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$
$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$
$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$
$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$
$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{25}$

図 2. 畳み込み演算によるフィルタ処理の例.

ガウシアンフィルタ(中段), 平均フィルタ(下段)を使用した畳み込み演算による画像の平滑化.
結果の画像の右側に使用したカーネルを示した.

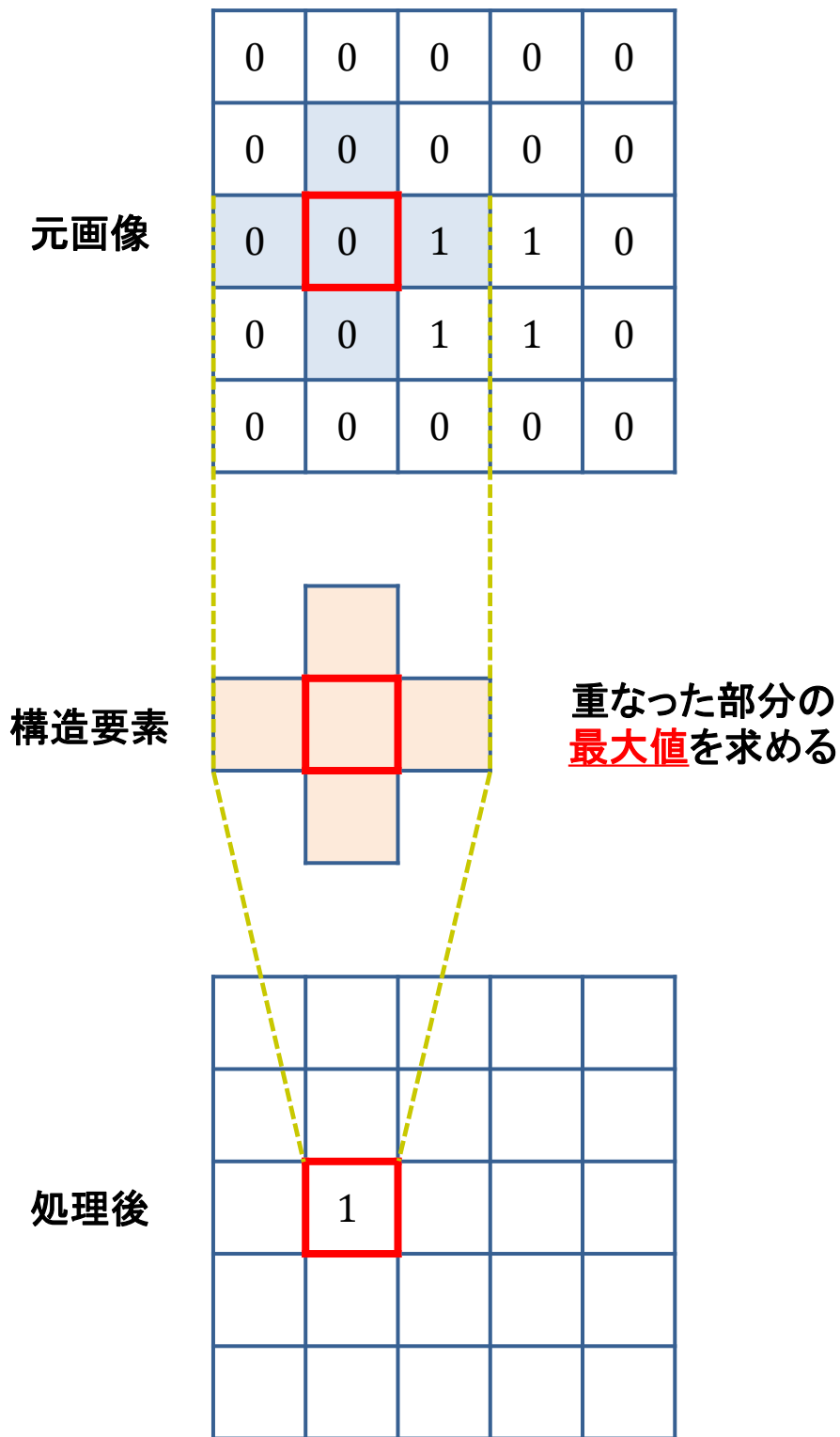


図 3. 膨張処理.

元画像の赤枠で囲まれた画素を対象とした膨張処理の例. カーネルの中心要素が対象となる画素に重なるようにして, 重なった画素の値の最大値を求める. 得られた最大値を処理後の画素の値とする. 収縮処理の場合は重なった画素の値の最小値を求め, それを処理後の画素の値とする.

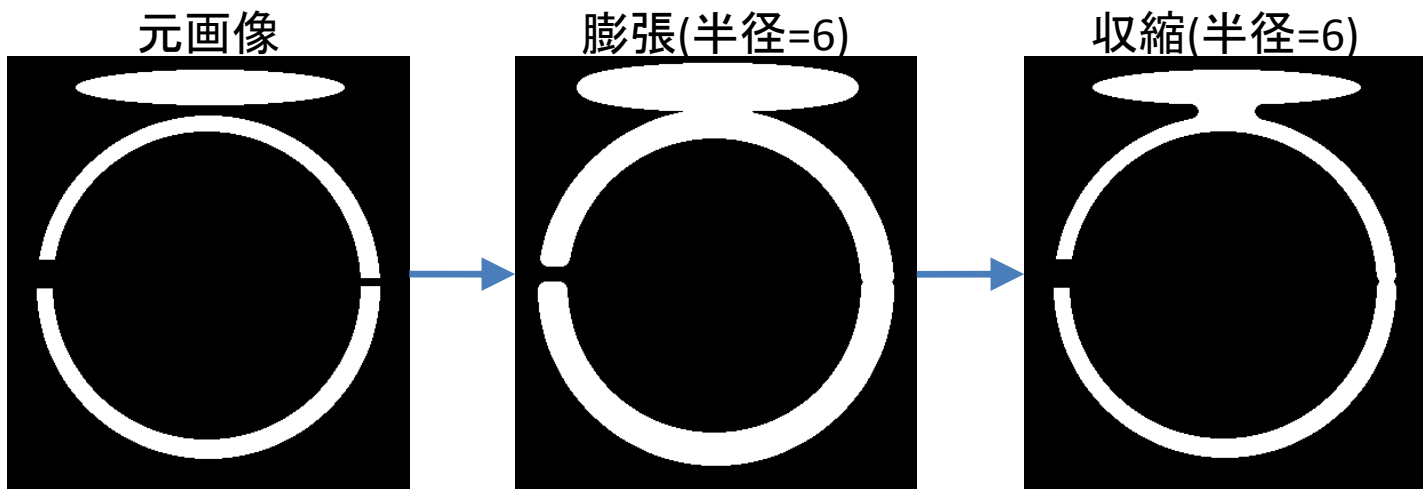


図 4. Closing処理.

Closingとは元画像に対して膨張→収縮の順で処理を行うことである。構造要素は膨張と収縮で同じものを用いる。この例では、半径が6の円形の構造要素を用いている。Closingには狭い隙間を埋める効果がある。逆の処理としてOpeningというものもある。Openingは収縮→膨張の順で処理を行うものであり、隙間をあける効果がある。

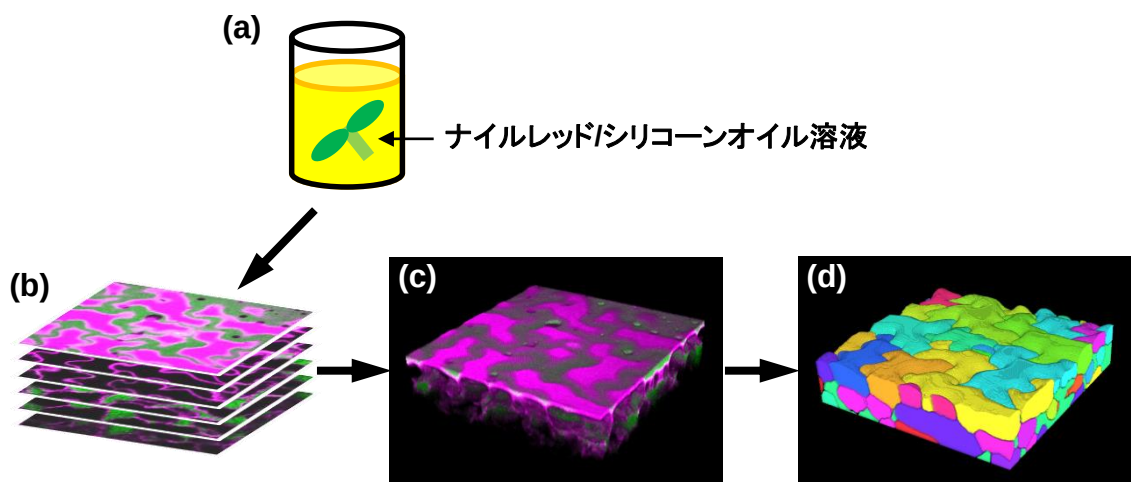


図 5. 三次元領域分割によって構造データを得るまでの工程.

- (a) ナイルレッド/シリコンオイル溶液による蛍光染色. 空気間隙と細胞が異なる色で可視化される.
- (b) 共焦点レーザー顕微鏡を用いて取得した画像スタック.
- (c) 画像スタックから生成した三次元画像.
- (d) 自動三次元領域分割によって抽出された細胞または空気間隙に相当するセグメント. セグメントはそれぞれ異なる色で表示した.

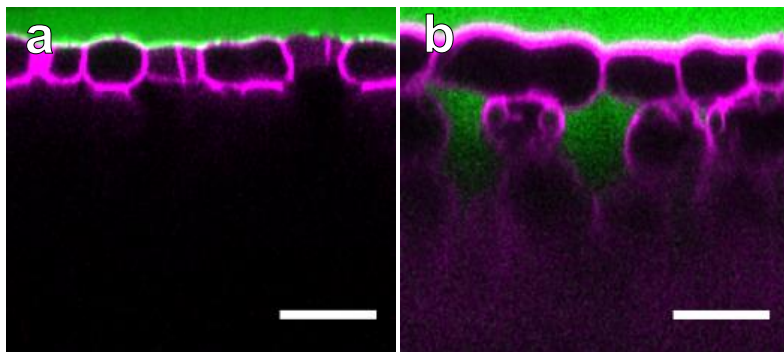


図 6. ナイルレッド/シリコーンオイル溶液の葉内への浸透性.

(a) 細胞膜に局在するGFP-LTI6bを発現する*Arabidopsis thaliana*形質転換体の葉をAlexa 568 hydrazide sodium saltの水溶液中にマウントして撮影した三次元画像の横断面. GFP 蛍光はマゼンタ, Alexa 568 hydrazideの蛍光は緑で表示した.

(b) シロイヌナズナ野生株の葉をナイルレッド/シリコーンオイル溶液中にマウントして撮影した三次元画像の横断面. 脂質二重膜中のナイルレッドの蛍光はマゼンタ, シリコーンオイル中のナイルレッドの蛍光は緑で表示した.

画像は共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した. Bars = 20 μ m.

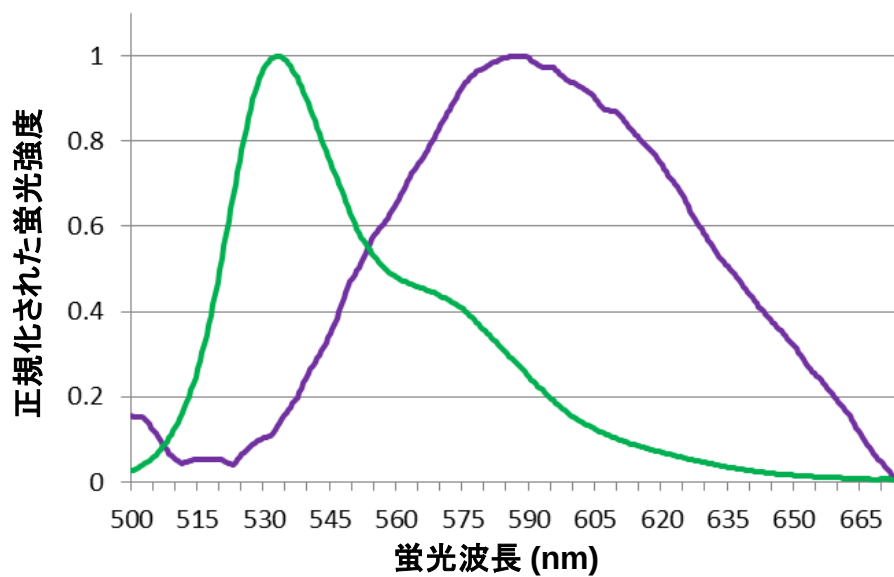


図 7. ナイルレッドの蛍光スペクトル.

シリコンオイル中のナイルレッドの蛍光スペクトル(緑)と脂質二重膜中のナイルレッドの蛍光スペクトル(マゼンタ). 励起光の波長は488 nm.

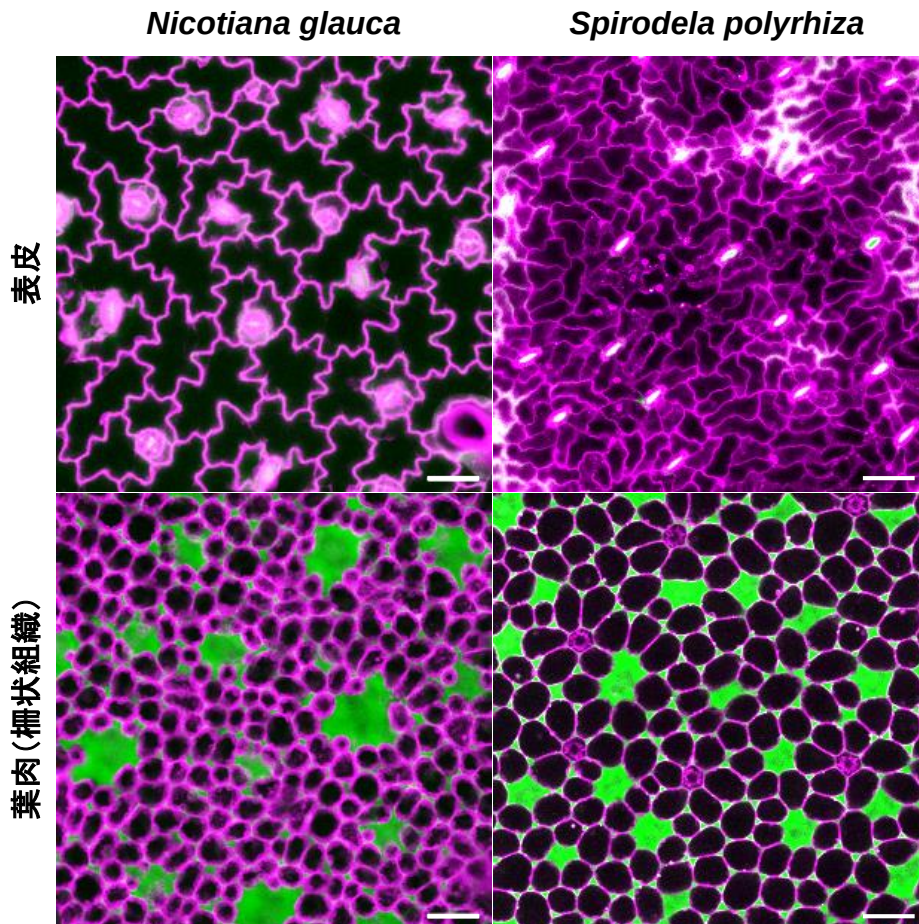


図 8. ナイルレッド/シリコーンオイル溶液による葉の表皮と葉肉(柵状組織)の染色像.

Nicotiana glauca と *Spirodela polyrhiza* の葉の向軸側の共焦点レーザー顕微鏡像. ナイルレッド/シリコーンオイル溶液を用いて染色を行った. シリコーンオイル中のナイルレッドは波長 488 nm のレーザーで励起し, 脂質二重膜中のナイルレッドは波長 561 nm のレーザーで励起した. 対物レンズは Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 を用いた. Bars = 50 μ m.

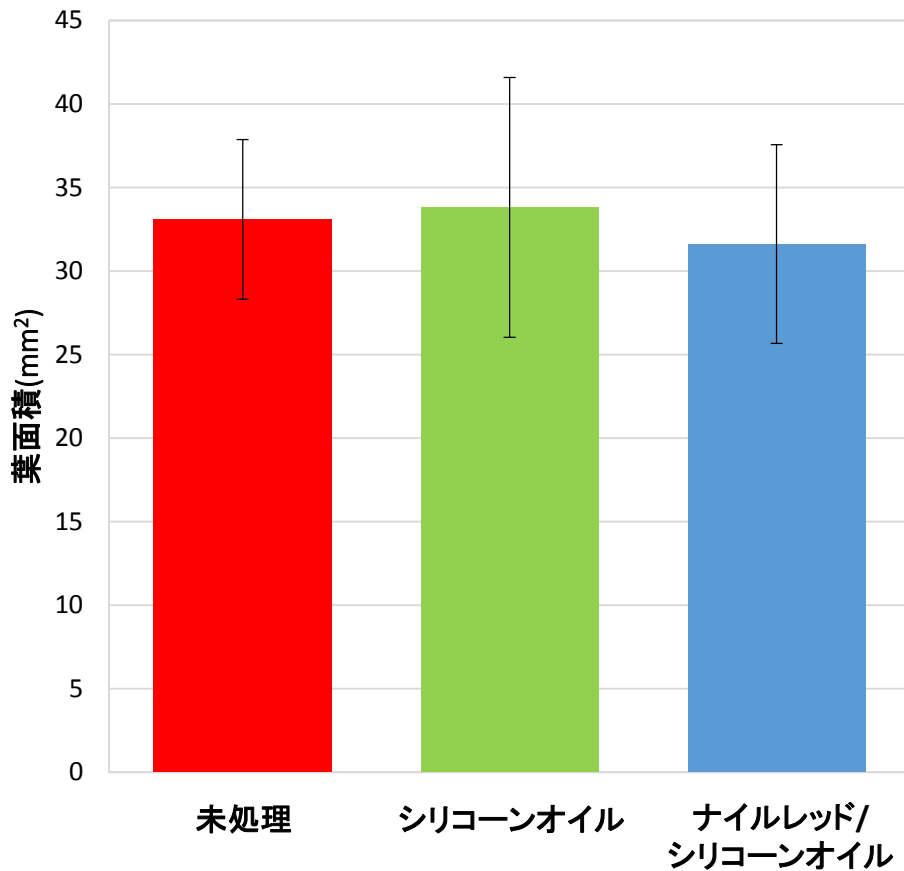


図 9. ナイルレッド/シリコンオイル溶液が植物体の生育に及ぼす影響の評価.

処理後三日の *Arabidopsis thaliana* 第5葉の面積を計測した. 処理は播種後14日目に行った. “未処理”は何も処理を行っていないもの, “シリコンオイル”は葉を5分間シリコンオイルに浸したもの, “ナイルレッド/シリコンオイル”は葉を5分間10 μ M ナイルレッド/シリコンオイル溶液に浸した後, 1分間のシリコンオイルによる洗浄を2回行ったものである. 全てのグループ間で有意差は見られなかった. (Student's *t*-test with Holm's correction, $P \leq 0.05$).

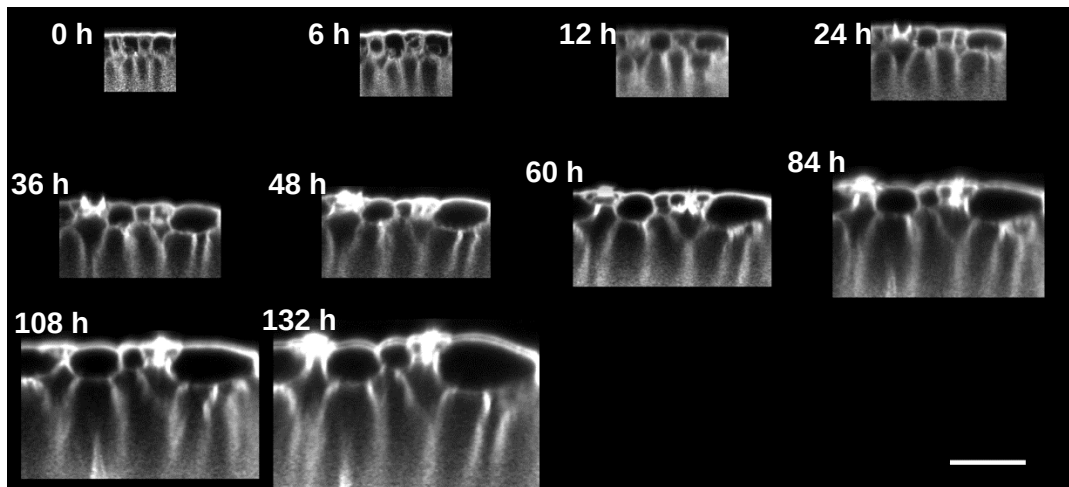


図 10. ナイルレッド/シリコーンオイル溶液による染色を使用した *Nicotiana glauca* の葉のタイムラプス撮影.

Nicotiana glauca の葉の向軸側の三次元画像横断面. 5日間以上にわたって撮影を行った (撮影開始からの経過時間は各画像の左上に表示). 脂質二重膜中のナイルレッドの蛍光のみを表示した. Bar = 50 μm .

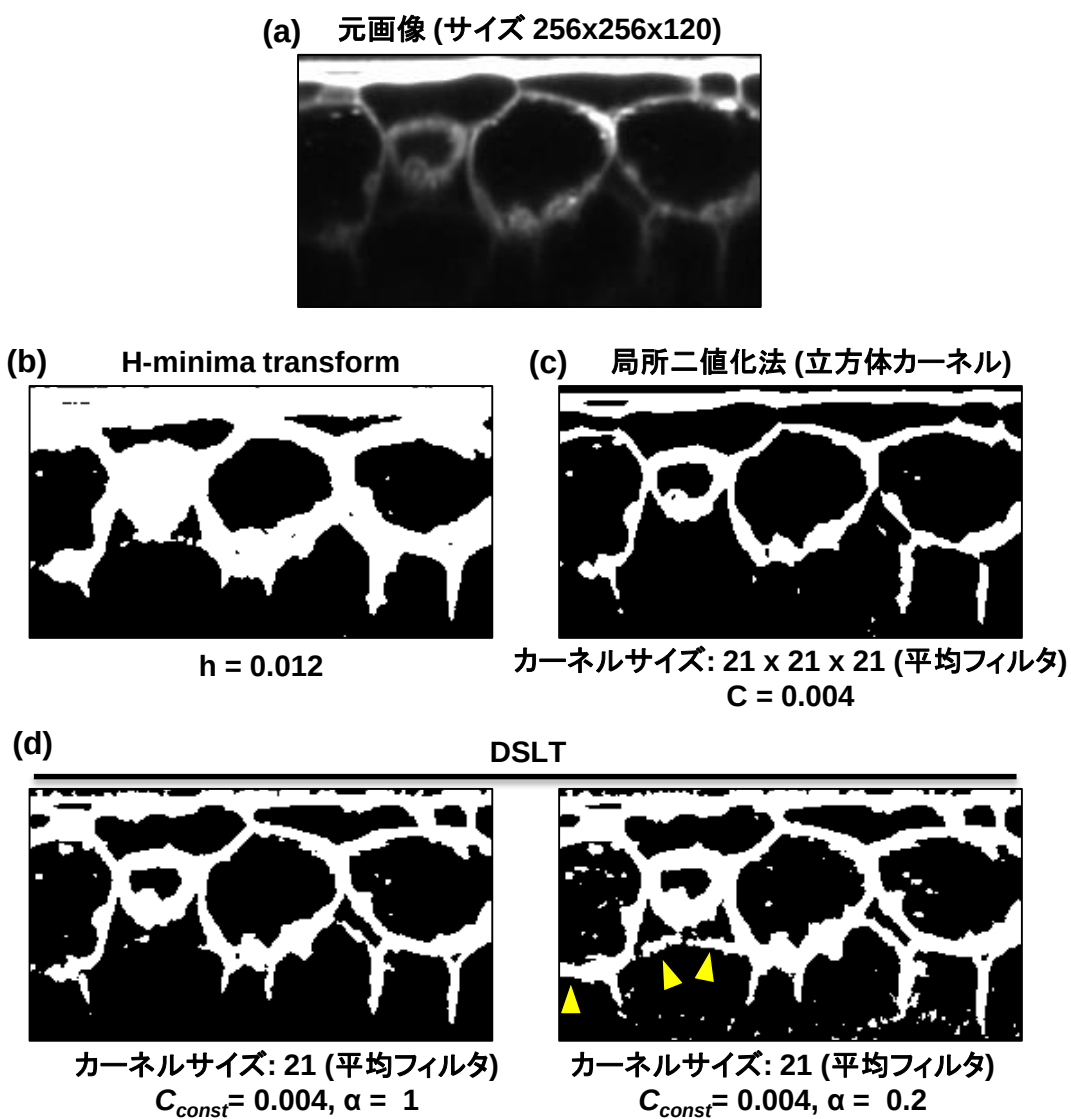


図 11. DSLTと従来法による二値化処理結果の比較.

*Spirodela polyrhiza*の葉の向軸側の三次元画像横断面. 脂質二重膜中のナイルレッドの蛍光のみを表示, または処理の対象とした.

(a) 元画像.

(b) H-minima transformによる処理の結果.

(c) 立方体カーネルを用いた局所二値化による処理の結果.

(d) DSLTによる処理の結果. 左は焦点面に対して平行に近いシグナルを検出しやすくする補正なし, 右は補正あり. 補正をかけると黄色の矢じりで示した焦点面に対して平行に近いシグナルを検出できるようになった.

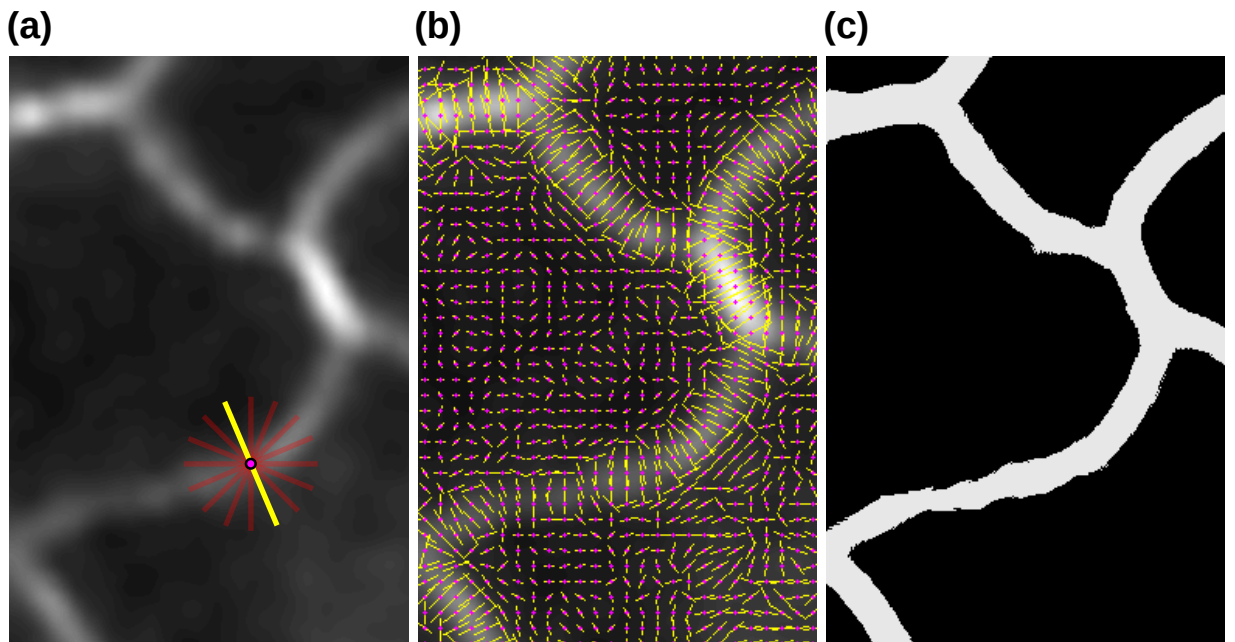


図 12. DSLTの二値化アルゴリズム.

(a) 元画像. 加重平均を求めるための近傍領域は処理の対象となる画素(紫の点)を中点とする線分である. X軸に対する角度が $0, \pm\pi/8, \pm\pi/4, \pm3\pi/8, \pm\pi/2$ の線分領域のうち, 最も小さい加重平均をとるものを黄, それ以外を赤で表した.

(b) 等間隔にサンプリングした画素(紫)において最小の加重平均をとる線分領域の方向と加重平均の大きさをそれぞれ黄色の線分の方向と長さで示した.

(c) DSLTによる処理の結果.

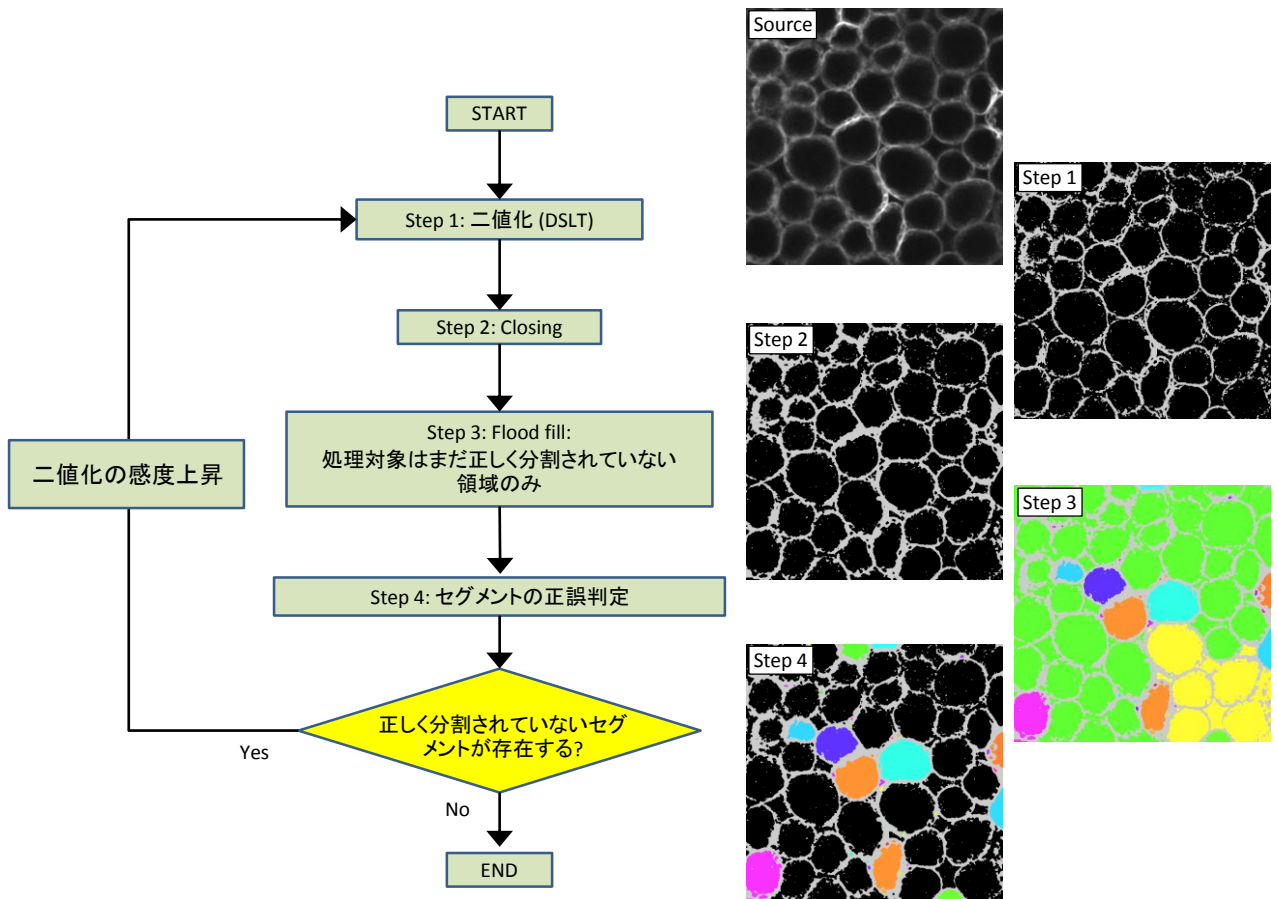


図 13. DSLTを利用した反復領域分割アルゴリズム.

DSLITを利用した反復領域分割アルゴリズムのフローチャート. このアルゴリズムは二値化の感度を上昇させながら処理を繰り返し実行する. 各サイクルは, 二値化, closing, flood fill, セグメントの正誤判定の4つのステップを含んでいる. セグメントの正誤判定の詳細については図10を参照.

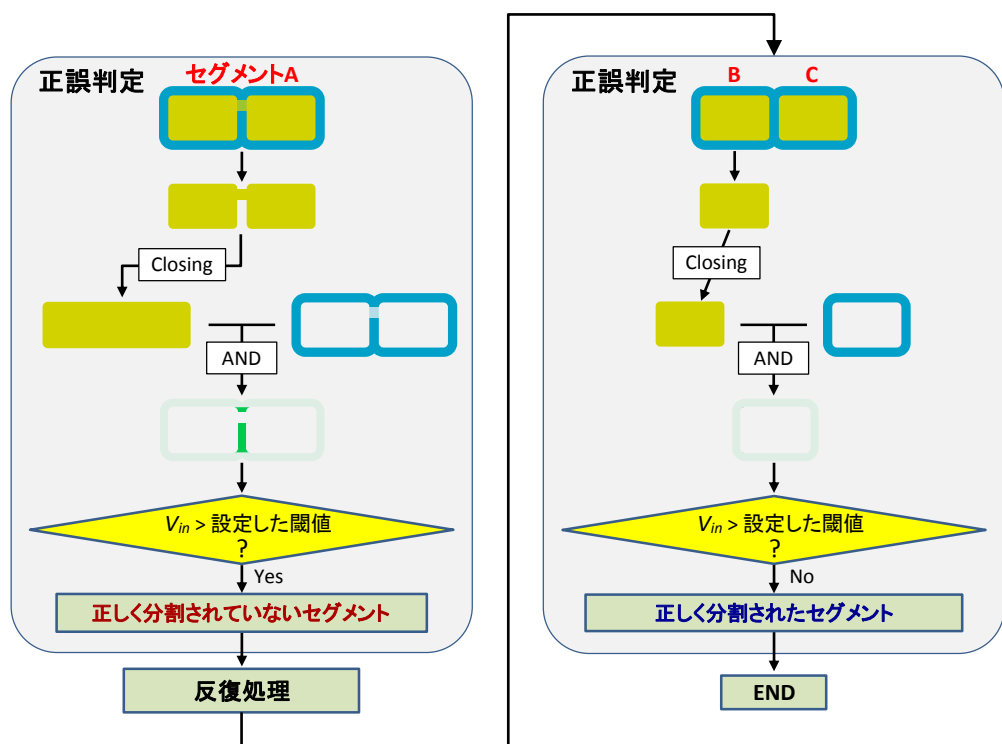


図 14. セグメントの正誤判定を利用して反復領域分割アルゴリズムが正しい結果を得るまでの過程.

図9で示した反復領域分割アルゴリズムのStep 4 “セグメントの正誤判定”でセグメントは正しく分割されたものとそうでないものに分類される. 図中に緑で示した内部構造を一定の体積以上含むセグメントは正しく分割されていないと判断される. この図の場合は、セグメントAは2つの細胞を含み、大きな内部構造を含むため、正しく分割されていないと判断される. その後、セグメントAがそれぞれ一つの細胞を含む二つのセグメントに分割されるまで二値化の感度を上げつつ反復処理が行われる.

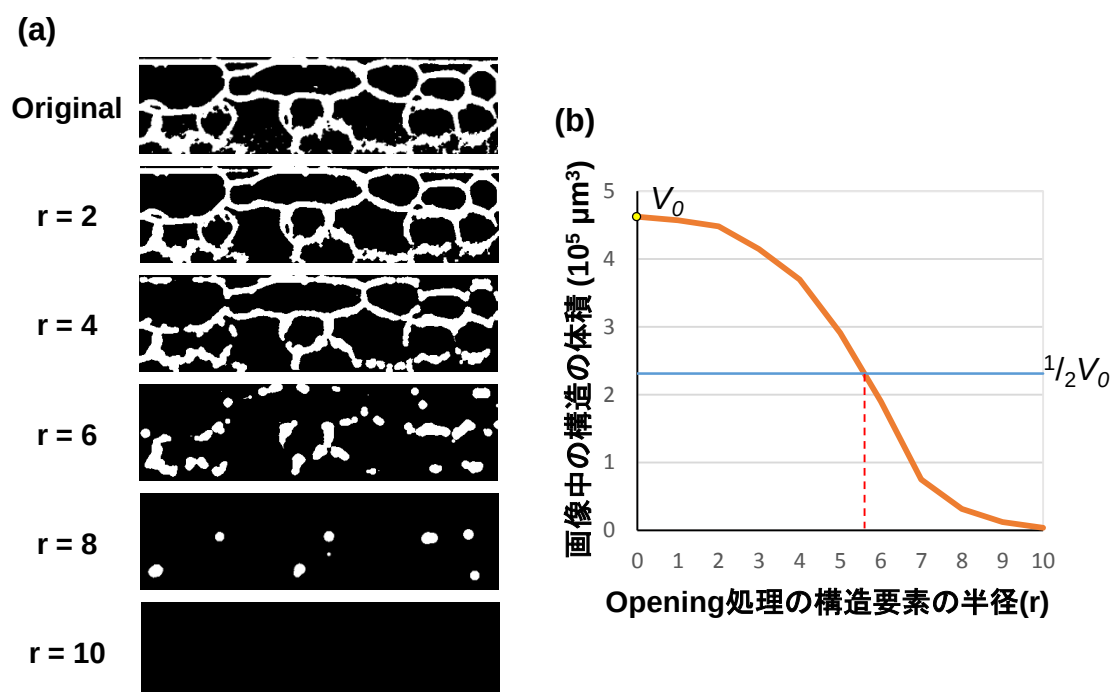


図 15. セグメントの正誤判定の際に行うclosing処理の構造要素の適切な半径の推定.

(a) 元の三次元画像の横断面(Original)とopening処理された画像の横断面($r = 2 \sim 10$). r はopening処理の構造要素の半径.

(b) Opening処理を行った画像中の構造(aの画像の白い領域)の体積と r の関係. V_0 は元画像中の構造の体積. opening処理の構造要素の直径が元画像中の構造の厚みを超えると、処理後に構造の体積が大きく減少するようになる. 構造要素セグメントの正誤判定の際に行うclosing処理の構造要素の半径は、opening処理によって画像中の構造の体積が $1/2 V_0$ 以下になる最小の r とした(この図の場合は6となる).



図 16. DSLTを利用した反復領域分割アルゴリズムの処理結果.

共焦点レーザー顕微鏡で撮影した*Arabidopsis thaliana*の葉の背軸側の三次元画像に対して DSLTを利用した反復領域分割アルゴリズムで処理を行った. 抽出された細胞と空気間隙のセグメントはランダムに色分けした.

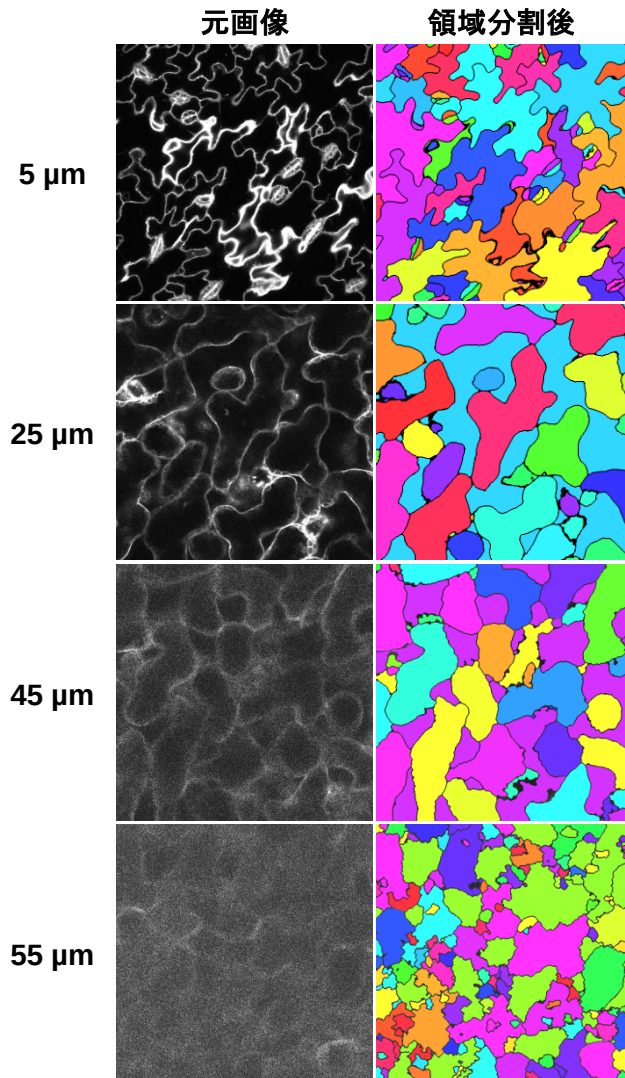
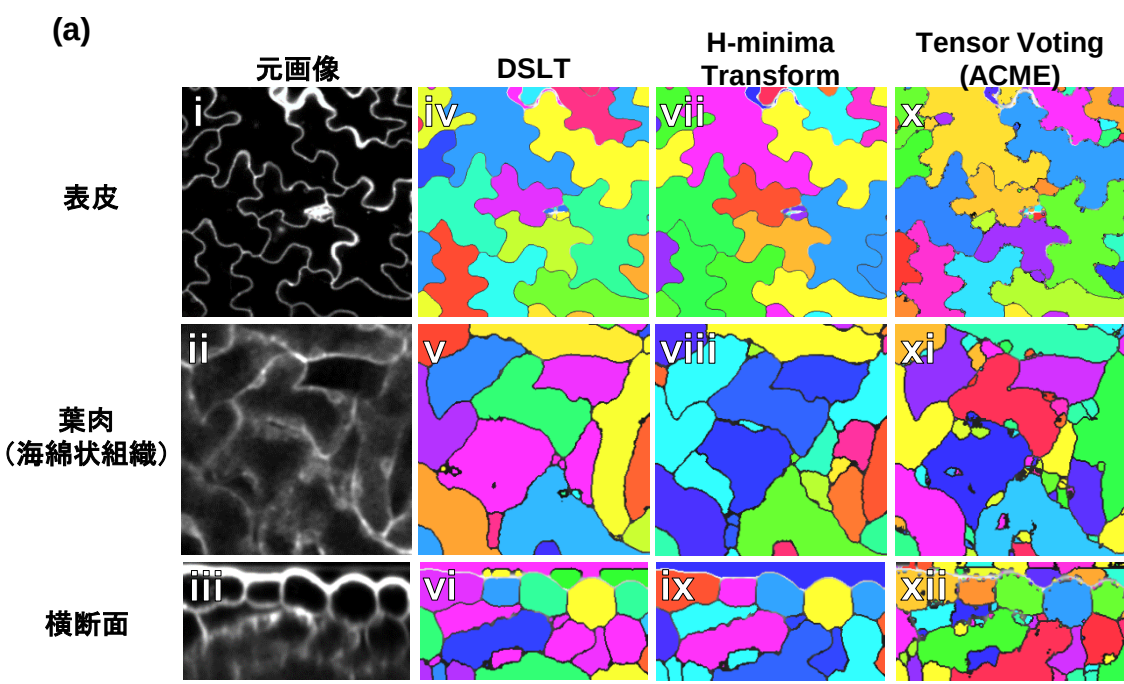


図 17. 様々な深さの範囲での領域分割結果

ナイルレッド/シリコンオイル溶液で染色した葉の向軸側の共焦点レーザー顕微鏡像(左)とその領域分割結果(右). 左にそれぞれの表面からの深さを示した. 各行の画像は異なるパラメーターによる領域分割の結果に由来している. 領域分割は表面から行の右に示した深さを含む範囲で行った. 例えば, 45 μm と表示されている行の領域分割後の画像は, 深さ0 μm から約47 μm の範囲で領域分割を行った結果の深さ45 μm におけるスライス画像である.



(b)

	DSLТ	H-minima Transform	Tensor Voting (ACME)
正しく分割されたセグメントの割合 (%)	91.3	76.9	53.2
$ \Delta A /A$	0.025 ± 0.020	n.d.	n.d.

図 18. DSLТを利用した反復領域分割アルゴリズムの精度の検証.

(a) 同じ元画像(i-iii)から得られた領域分割の結果の比較. "DSLТ"の列の画像(iv-vi)は, DSLТを利用した反復領域分割アルゴリズムを用いてセグメントを抽出したもの. "H-minima Transform"の列の画像(vii-ix)は, 反復領域分割アルゴリズムの中のDSLТを用いた二値化をH-minima Transformで置き換えたものでセグメントを抽出したもの. "ACME"の列の画像(x-xii)は, は Automated Cell Morphology Extractor (Mosaliganti et al. 2012) を用いてセグメントを抽出したもの. 上段の画像(i, iv, vii, x)は*Arabidopsis thaliana*の葉の背軸側の表皮の元画像と領域分割後の画像. 中段の画像(ii, v, viii, xi)は葉肉(海綿状組織)の元画像と領域分割後の画像. 下段の画像(iii, vi, ix, xii)は横断面. 各セグメントは異なる色でランダムに色分けした.

(b) 正しく分割されたセグメントの割合は4枚の画像中の350個以上の細胞を調べて算出した. A は手動で分割したセグメントの断面の面積, ΔA は自動分割によって得られたセグメントの断面と A の差である. 4枚の画像中の300以上のセグメントの横断面で $|\Delta A|/A$ を計測し, 平均と標準偏差を算出した. (n.d., not determined.)

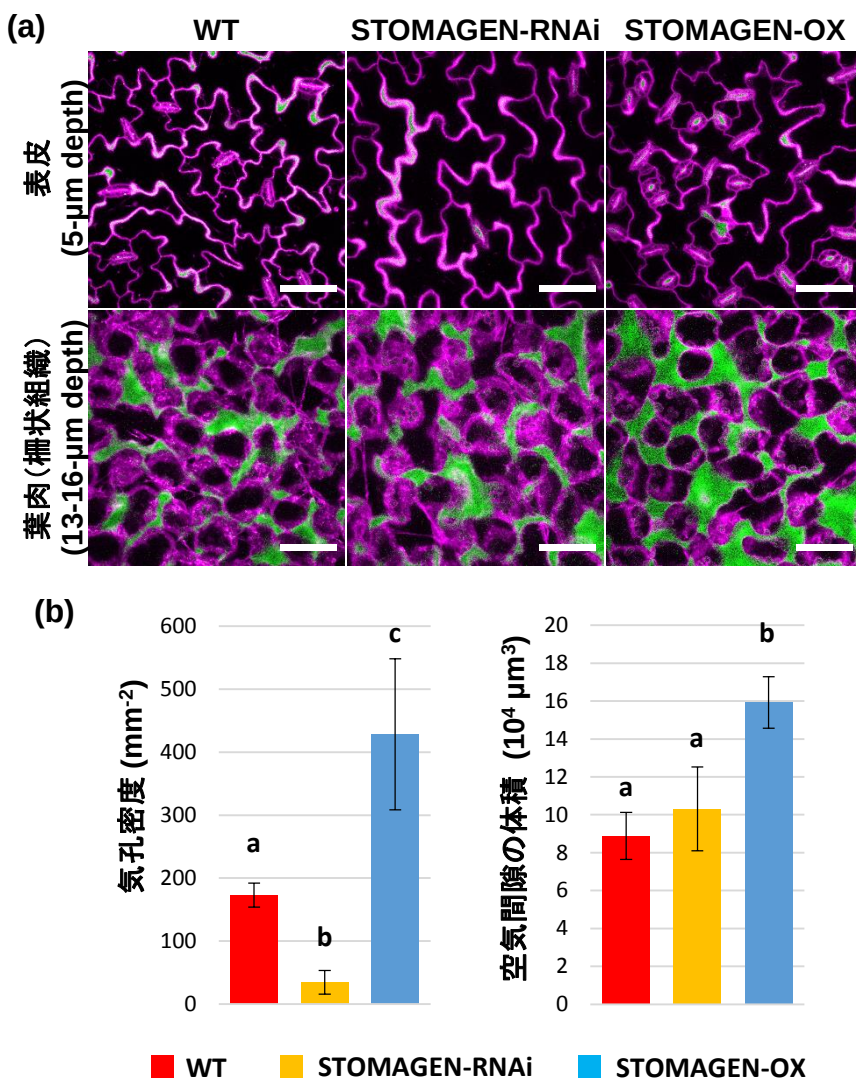
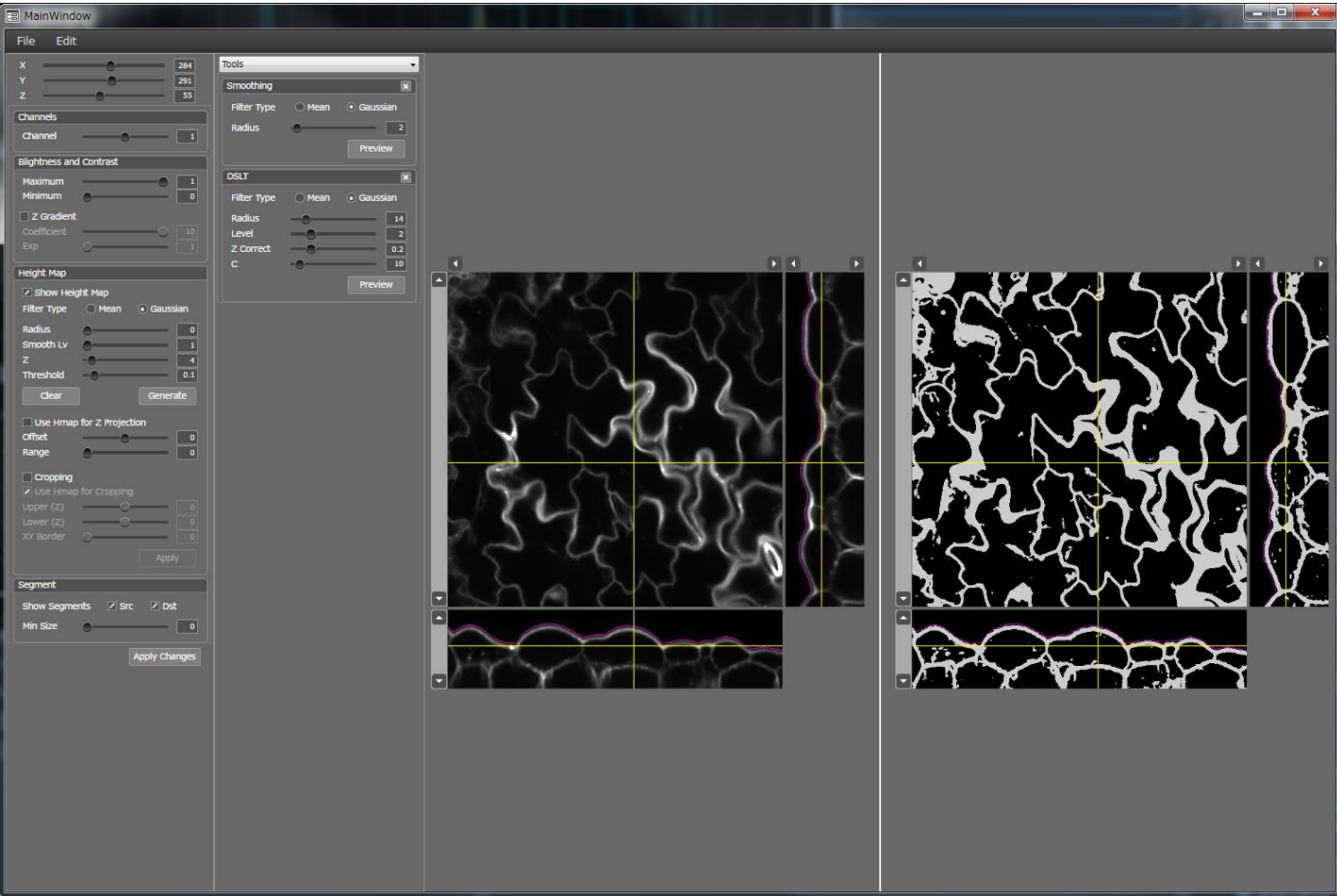


図 19. 気孔密度と表層近くの空気間隙の関係の解析.

(a) *Arabidopsis thaliana*の野生型(WT) , *STOMAGEN*発現抑制株(STOMAGEN-RNAi) , *STOMAGEN*過剰発現株(STOMAGEN-OX) の葉の向軸側の共焦点レーザー顕微鏡像. ナイルレッド/シリコンオイル溶液を用いて葉を染色した. 細胞内の脂質二重膜中のナイルレッドの蛍光をマゼンタ, 空気間隙に満たされたシリコンオイル中のナイルレッドの蛍光を緑として表示している. 上段の画像は表面からの深さ5 μm のもの, 下段の画像は表面からの深さ13–16 μm の範囲で最大値投影を行ったもの. Bars = 50 μm .

(b) *Arabidopsis thaliana*の野生型(WT), *STOMAGEN*発現抑制株(STOMAGEN-RNAi), *STOMAGEN*過剰発現株(STOMAGEN-OX)の葉の向軸側の気孔密度(左)と空気間隙の体積(右). 播種後14日目の第1・2葉を解析に用いた. 画像を取得する範囲の面積は0.051 mm^2 となるようにした. 表面から深さ9–31 μm の範囲の空気間隙の体積を計測した. 詳細は“材料と方法”の“空気間隙の解析”を参照. 各グラフでデータの上の文字が異なる場合にはその間に有意差があることを意味している(Student's *t*-test with Holm's correction, $P \leq 0.05$).

(a)



(b)

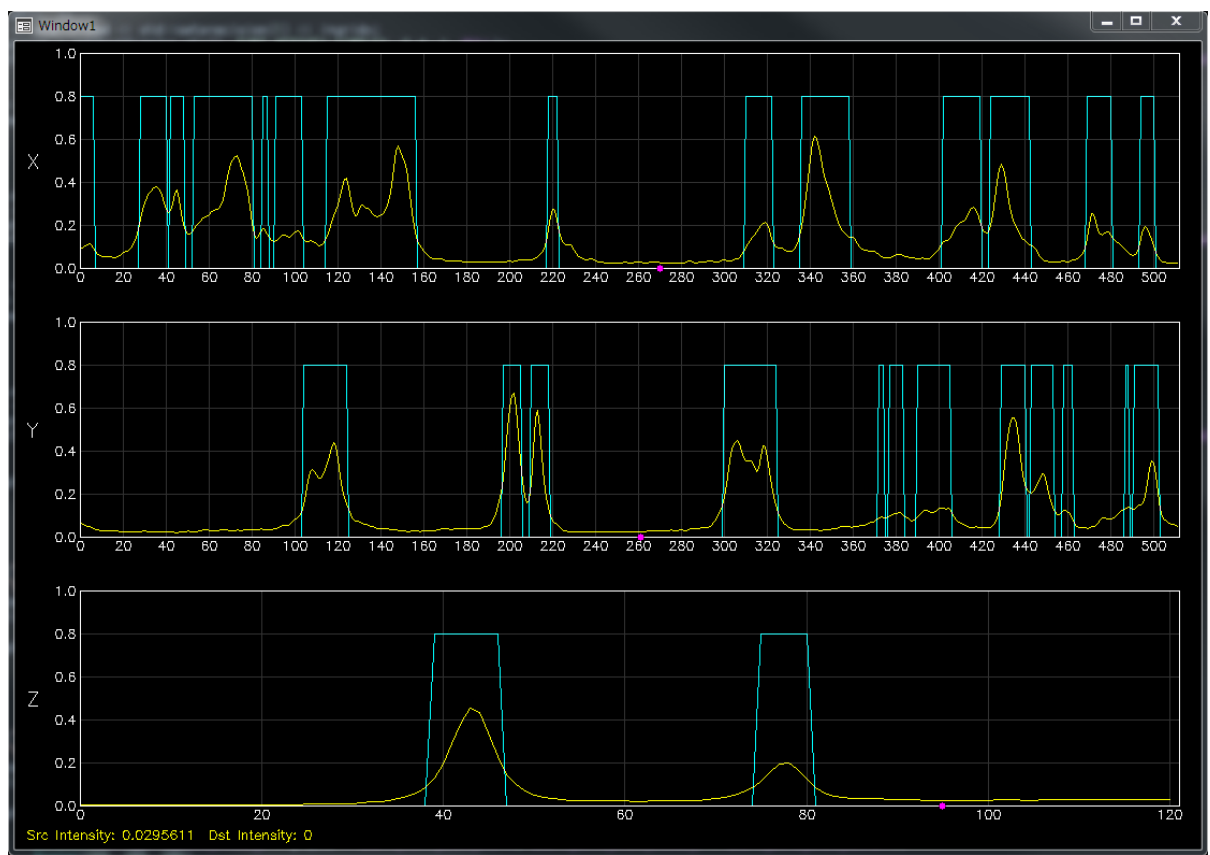


図 20. 開発したソフトウェアのグラフィカルユーザーインターフェイス

(a) メインウィンドウ. (b) 輝度確認用のグラフウィンドウ.

Received Date : 25-Jul-2014

Revised Date : 24-Oct-2014

Accepted Date : 17-Nov-2014

Article type : Technical Advance

A direction-selective local-thresholding method, DSLT, in combination with a dye-based method for automated 3D segmentation of cells and airspaces in developing leaves

Takashi Kawase¹, Shigeo S. Sugano², Tomoo Shimada¹ and Ikuko Hara-Nishimura^{1,*}

¹ *Department of Botany, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan*

² *Center for Collaboration among Agriculture, Industry and Commerce, University of Tokushima, Tokushima 770-8501, Japan*

The authors declare no conflict of interest.

*For correspondence (e-mail ihnishi@gr.bot.kyoto-u.ac.jp).

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as an 'Accepted Article', doi: 10.1111/tpj.12738

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Running title: Visualization and segmentation of plant leaves

Keywords: confocal microscopy, Nile red, silicone oil, automated segmentation, local thresholding, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana glauca*, *Spirodela polyrhiza*

SUMMARY

Quantifying the anatomical data acquired from 3D images has become increasingly important in recent years. Visualization and image segmentation are essential for acquiring accurate and detailed anatomical data from images. However, plant tissues such as leaves are difficult to image by confocal or multi-photon laser scanning microscopy because their airspaces generate optical aberrations. To overcome this problem, we established a staining method based on Nile-red-in-silicone-oil solution. Our staining method enables color differentiation between lipid bilayer membranes and airspaces, while minimizing damage to leaf development. By repeated applications of our staining method, we performed time-lapse imaging of a leaf over 5 days. To counteract the drastic decline in signal-to-noise ratio at greater tissue depths, we also developed a local thresholding method (direction-selective local thresholding [DSLTL]) and an automated iterative segmentation algorithm. The segmentation algorithm uses the DSLTL to extract the anatomical structures. Using the proposed methods, we accurately segmented 3D images of intact leaves to single-cell resolution, and measured the airspace volumes in intact leaves.

INTRODUCTION

Three-dimensional (3D) imaging technology is an important tool for creating the anatomical data of cells, organs, and individuals. By performing detailed analysis of quantified anatomical data, we can identify subtle phenotypes and reveal their

growth and/or homeostatic mechanisms. In leaf development, coordinated cell divisions, cell differentiations, and airspace enlargements have been observed (Donnelly *et al.* 1999). To efficiently quantify the anatomical data of leaves, the airspaces must be visually differentiated from the plant cells. Thus, a staining method by which we can easily visualize leaf interiors is needed for *in vivo* imaging of intact plant leaves.

Accurate and detailed anatomical data acquisition requires high-quality source images. Therefore the imaging process is very important. Molecular tools, instrumentation, imaging methods, and methods of handling plant specimens have technologically progressed in recent years (Shaw and Ehrhardt 2013). In plant biology, 3D images are usually acquired at single-cell resolution by confocal and multi-photon laser scanning microscopy (Feijó and Moreno 2004, Hepler and Gunning 1998). These techniques are ideal for visualizing root tissues, which are transparent to visible light, but are less successful at imaging the mesophyll of plant leaves. Mesophyll tissue contains airspaces that refract and attenuate the light transmitted through it, creating optical aberrations (Feijó and Moreno 2004, Cheng 2006). Littlejohn *et al.* (2010, 2014) proposed an efficient method that overcomes these optical aberrations and preserves confocal image quality. They treated mesophyll with perfluorodecalin (PFD) and perfluoroperhydrophenanthrene (PP11), fluorocarbon compounds with lower surface tension and refractive index than water. Consequently, these compounds readily infiltrate mesophyll tissue and enhance the resolution of microscopy. However, to visualize the tissues, agents such as genetically encoded fluorescent reporters are required.

To quantify anatomical data, the anatomical structure or region of interest must be delineated and extracted from an image. This process is known as image

segmentation. Several general-purpose segmentation algorithms have been developed (Zanella *et al.* 2010, Bellaiche *et al.* 2011, Indhumathi *et al.* 2011, Mikula *et al.* 2011). Other researchers have proposed accurate 3D image segmentation methods specific to plant features, such as roots, shoot apical meristems and young flower meristems (Marcuzzo *et al.* 2009, Fernandez *et al.* 2010, Liu *et al.* 2011, Schmidt *et al.* 2014). Fernandez *et al.* (2010) measured the subtle changes in cell division patterns caused by modified auxin flux within the root apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. Schmidt *et al.* (2014) quantitatively analyzed *Arabidopsis* flower development at single-cell resolution, revealing differential growth patterns in the main regions during the early stages of floral morphogenesis. However, accurate segmentation of 3D confocal images of intact leaves remains a difficult problem. Because light weakly penetrates leaf tissue, the signal intensity of an acquired image drastically reduces with increasing depth of the focal plane. In addition, the plasma membranes of leaf cells are nearly parallel to the focal plane, where the resolution of confocal microscope lenses is poorest (Inoué 2006, Pawley 2006). Consequently, the cell surfaces of leaves are not easily detectable. To overcome these difficulties, the structure detection method in leaf segmentation algorithms must be extremely robust.

In this paper, we propose a staining method and a segmentation algorithm for 3D confocal imaging of leaves (Figure 1). Our staining method rapidly penetrates the leaf interiors and separately visualizes the cell membranes and airspaces. Our direction-selective local thresholding (DSLT) approach is insensitive to the depth-dependent intensity decline and the low resolution along the Z axis. The local thresholding method is applied to the segmentation of mesophyll structures in leaves. The segmentation algorithm iteratively varies the segmentation parameters and validates the detected segments. Combining our staining method with our segmentation algorithm, we successfully quantified the airspaces in *Arabidopsis*

leaves and detected volumetric changes in the stomatal cavities of *Arabidopsis* mutants.

RESULTS AND DISCUSSION

Visualizing the cells and airspaces in plant leaves

The quality of confocal 3D images of plant leaves depends on the selected staining method. In this study, we developed a simple and effective method that differentially stains leaf cells and airspaces for visualization by confocal laser scanning microscopy (CLSM). This method uses Nile red as the staining fluorescent dye, and silicone oil as the dye dissolution agent. Silicone oil (KF96L - 1.0 cs) has three desirable physical properties: (1) its low surface tension allows the stain solution to easily fill the mesophyll airspaces; (2) its refractive index (1.382) is similar to that of water (1.333), and (3) it produces negligible fluorescence. Consequently, leaf interiors can be visualized under the confocal laser scanning microscope to higher resolution than is possible with water solubilized dye (Figure 2a).

The emission maximum of Nile red is 533 nm in silicone oil, but lengthens to 587 nm in the phospholipid bilayers of plant cell membranes (Figure 2b). Such a large variation in the emission maximum has been previously reported (Greenspan *et al.* 1985). When the Nile-red-in-silicone-oil solution infiltrates the leaves of *Nicotiana glauca* and *Spirodela polyrhiza*, the airspaces and cell membranes exhibit different fluorescence (Figure 2c). Since the different species can be similarly stained, the Nile-red-in-silicone-oil solution not only color-differentiates between the plasma membrane and airspace, but provides a versatile staining method for confocal laser scanning microscopy of a variety of plants, including non-model plants. Incidentally, Nile red is insoluble in PFD and PP11.

We next established a three-step staining method that minimizes the damage to leaf development. First, the leaf is stained with Nile red-in-silicone-oil solution for 5 min. The Nile red is then removed by washing twice with silicone oil. Afterward, the high-volatility compound silicone oil is removed by air drying. The leaf areas of *Arabidopsis* plants treated with this staining method were similar to those of the untreated plants (Figure S1), indicating that the plant tissues are not damaged by the infused compounds. By repeatedly applying the three-step staining method, we achieved time-lapse imaging of *N. glauca* leaves over 5 days (Figure 3). The Nile red-in-silicone-oil solution is much more suitable for staining living plant tissues than water-soluble dyes, which become fixed in the tissues and thereby damage them.

Direction-selective local thresholding (DSLTT)

To quantify the anatomical structures of leaves at single-cell resolution, it is necessary to segment the images of the leaves into the plant cells and the airspaces. The h-minima transform is popularly used to extract the seeds of segments (Wahlby *et al.* 2004, Jierong and Rajapakse 2009, Fernandez *et al.* 2010), which are then grown into segments by the watershed transform. This method has successfully segmented confocal image stacks of young flower meristems (Fernandez *et al.* 2010). However, the h-minima transform excessively fragments the segment seeds in confocal images of plant leaves (see Figure 9a), in which the signal intensity decreases with penetration depth of the excitation laser (Figure 4a). This indicates that the h-minima transform is overly sensitive to intensity gradation (Figure 4b).

To overcome the limitations of the h-minima transform, we considered local thresholding, which is relatively robust to graduated intensity (Figure 4b, c). Usually,

local thresholding values are calculated as weighted sums of cubic or spherical neighboring regions (Soille 2003). In a dark background, the local thresholding is calculated by:

$$dst(x,y,z) = \begin{cases} 1 & \text{if } src(x,y,z) > T(x,y,z) + C \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

where $T(x,y,z)$ is the weighted sum of the neighborhoods of the point (x,y,z) , and C is a given constant. src and dst denote the source and destination images, respectively. However, in this method, very intense signals can overwhelm other neighboring signals. Accordingly, computing the local thresholding by cubic neighbor regions sometimes produces voids in regions actually occupied by cell membranes (Figure 4c).

To address this problem, we established a modified local thresholding method called direction selective local thresholding (DSLT). Figure 5 shows the binarization process of DSLT. Rather than weighting the cubic or spherical neighbor regions, DSLT weights the neighboring regions connected to the central point by line segment kernels in various orientations. DSLT provides more accurate binary images than the h-minima transform or local thresholding (cubic kernel) (Figure 4d). The threshold at each voxel is the minimal weighted sum calculated by convolving the original images with a line segment kernel. The weighted sum T of a line segment kernel f at the point (x,y,z) is given by

$$T(x,y,z,\theta,\psi) = \sum_{-8 \leq k \leq 8} f(k)src(x+k \cos\theta \cos\psi, y+k \cos\theta \sin\psi, z+k \sin\theta),$$

where R is half the length of the line segment kernel. θ and ψ are the pitch and yaw angles of the line segment connecting the neighboring region, respectively. When the coordinates of a point are non-integral, the intensity at the point of the source image (src) is estimated by trilinear interpolation.

In general, the Z resolution of a confocal microscope lens is worse than its lateral resolution. Therefore, since membranes are nearly parallel to the focal plane, they are difficult to detect by conformal microscopy. It often causes under-segmentation (see Figure 9a, ix). To counteract this problem, we introduce a correction term $C(\theta_{min})$, calculated as follows:

$$C(\theta_{min}) = C_{const}(1 - \alpha|2\theta_{min}/\pi|) \quad (0 \leq \alpha \leq 1),$$

where α and C_{const} are user-defined correction factor and constant, respectively.

$(\theta_{min}, \psi_{min})$ are the arguments of the minimum of T at the point (x, y, z) . The purpose of $C(\theta_{min})$ is to reduce the effect of the anisotropic resolution (Figure 4d).

The binarization formula in a dark background is given by:

$$dst(x, y, z) = \begin{cases} 1 & \text{if } src(x, y, z) \geq \min_{(\theta, \psi) \in A} \{T(x, y, z, \theta, \psi)\} + C(\theta_{min}) \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

where $\min_{(\theta, \psi) \in A} \{T(x, y, z, \theta, \psi)\} + C(\theta_{min})$ is the threshold, which is individually calculated for each voxel, and A is the set of combinations of θ and ψ .

Automated 3D segmentation of leaf cells and airspaces

Because the signal intensity decreases with depth in a 3D image acquired by CLSM, simultaneous accurate segments were difficult to acquire even by DSLT. To overcome this difficulty, we established an automated segmentation method that iterates the following four steps (Figure 6). Prior to segmentation, the source image is processed by Gaussian smoothing to reduce noise and its brightness is adjusted for depth. In step 1, the image is binarized by DSLT with all R set below a given value. The results are then combined using a voxelwise OR operator. This process reduces the number of detection failures. In step 2, the binary image is subjected to a closing operation with a sphere-shaped structuring element, which fills the small gaps introduced by noise (Soille 2003). In step 3, segments are extracted from the resulting image by the flood fill algorithm. In step 4, the segments are classified as correct or incorrect as shown in Figure 7. Most of the incorrect segments, which comprise at least two cells or a cell and an airspace, are characterized by large-volume inner structures. The inner structures are extracted by performing a voxelwise AND operation on the binarized source image and the closing operation result of the segment (Figure S2).

Regions containing incorrect segments are repeatedly processed, gradually reducing C_{inner} until the incorrect segment becomes negligible. This loop terminates when all segments are correct or C_{inner} has reached a given limit. Excessively small segments are then removed from the processed segments. Finally, the gaps between the segments are filled by a marker-based watershed transform using the segments as markers. The automated 3D segmentation using DSLT segmented each of cells and airspaces (Figure 8).

Accepted Article

To evaluate the accuracy of our segmentation algorithm, we compared results between automatic and manual segmentations of 3D images of the adaxial and abaxial sides of rosette and cauline leaves, varying the depth from 0 μm to $\sim 45 \mu\text{m}$, in which accurate results were obtained (Figure S3). The percentage of segments, each of which corresponded to a single cell, was high (91.3%; Figure 9b, upper). For a more detailed evaluation, we measured the difference between automatically extracted and manually determined cross-sectional areas (Figure 9b, lower). The average estimation error in the cross-sectional areas of segments was 2.5%, with a standard deviation of 2.0%. In addition, the result of our segmentation algorithm was better than that of segmentation using either h-minima transform or Automated Cell Morphology Extractor (ACME) (Mosaliganti *et al.* 2012) (Figure 9). ACME overcomes difficulties of detecting faint signals of membranes which are nearly parallel to the focal plane as DSLT does and tensor voting (Guy and Medioni 1996) used in ACME has a high ability to fill structural gaps. However, this ability might cause over-segmentations and create an adverse effect on segmentation of leaf cells with complex shapes.

We then applied our staining and segmentation methods to investigate the relationship between airspace volume and stomatal density in transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing or silencing the *STOMAGEN* gene (Figure 10), a positive regulator of stomatal density in *Arabidopsis* (Sugano *et al.* 2010). We acquired 3D images of the adaxial side of the first or second leaves and segmented cells and airspaces, varying the depth from 9 μm to 31 μm . The airspace regions were extracted from the fluorescence of Nile red in airspaces filled with silicone oil containing the dye. First, the mean fluorescent intensity was calculated in each extracted segment. Second, if the mean intensity in a segment exceeded a given threshold, the segment was identified as an airspace candidate. Third, any selection errors were manually corrected. The *STOMAGEN*-overexpressing line, which

Accepted Article

frequently forms stomata clusters, demonstrated significantly larger volumes of airspaces than the wild type. The increased airspace volume might be attributable to the thinning of the epidermis around the cluster. On the other hand, the airspace volume of the *STOMAGEN*-silenced line was statistically equal to that of the wild type. This result suggests that reducing the stomatal density in the adaxial epidermis does not influence the internal mesophyll structure in *Arabidopsis*.

CONCLUSION

We established a staining method by which lipid bilayer membranes are color-differentiated from airspaces in plant leaves. The method is completely harmless to plant tissues. Staining by Nile-red-in-silicone-oil solution is suitable for CLSM analyses of a variety of plants, including non-model plants.

We also developed an automated method for segmenting 3D images of leaf structures containing cells and airspaces in complex configurations. Our proposed DSLT accurately extracts anatomical structures for segmentation, and is broadly applicable. For instance, it could be used to detect organs, neurons and letters in text. High segmentation accuracy was achieved by combining DSLT with an iterative segmentation process and validation of the extracted segments. Our segmentation algorithm was implemented in an application with a graphical user interface (Figure S4). We designated the application as DSLT_Demo. All of the application, source codes, sample dataset and the manual are filed under the GPL3.0 license available at <https://github.com/nslab2000/DSLT>. The manual is also provided as Documentation D1 in Supporting Information.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant materials and growth conditions

The wild type strain was *Arabidopsis thaliana* (ecotype Col-0). *STOMAGEN* overexpressing lines (STOMAGEN-OX10) and amiRNA-mediated silencing lines (STOMAGEN-RNAi10) were prepared as previously described (Sugano *et al.* 2010, Tanaka *et al.* 2013). Transgenic *Arabidopsis* expressing GFP-LTI6b was obtained from ABRC (Cutler *et al.* 2000). The seeds were surface sterilized and sown onto MS medium containing Gellan Gum (Wako, Tokyo, Japan; <http://www.wako-chem.co.jp/english/>) with *myo*-inositol and 1% sucrose. The plants were grown at 22°C under continuous light for 24 days. After this period, they were transferred to soil and grown at 22°C under a 16h light/8h dark regime.

Nicotiana glauca was provided by Leaf Tobacco Research Laboratory (Japan Tobacco, Tokyo, Japan). The seeds were sown in soil and grown at 22°C under a 16h light/8h dark regime. *Spirodela polyrhiza* 7003 was cultured in neurofilament medium with 1% sucrose under constant light conditions as described previously (Muranaka *et al.* 2014). Growth temperature was maintained at 25°C ± 1°C. Colonies were grown in 75 ml of growth medium in 200 ml Erlenmeyer flasks plugged with cotton. New stock cultures were prepared every week, and well-grown plants were used for experiments.

Staining with Nile-red-in-silicone-oil solution

Stain solutions were prepared by dissolving Nile red (10 µM) in silicone oil (KF96L - 1.0 cs; Shin-Etsu Chemical, Tokyo, Japan, <http://www.shinetsu.co.jp/en/>). Unfixed intact leaves were incubated in stain solution for 5 min (adaxial side) or 15 min (abaxial side). During time-lapse imaging, the leaves were freshly stained prior to

each image acquisition, and were afterwards washed twice in silicone oil to remove the Nile red. The silicone oil was then removed by air drying.

Confocal microscopy

Confocal imaging was performed using an LSM 780 (Carl Zeiss, <http://www.zeiss.com/>) with a C-Apochromat 63x/1.20 W Corr M27 objective unless otherwise stated. Nile red in silicone oil and GFP were excited at 488 nm and the fluorescence was recorded at 490–560 nm. Nile red in lipid and Alexa 568 hydrazide were excited at 561 nm, and the fluorescence and autofluorescence were recorded at 560–639 nm and 640–712 nm, respectively. Light paths and wavelengths were controlled by the dichroic mirror MBS 488/561. The pinhole size was 59 μm and scans were performed at depth intervals of 0.45 μm .

Evaluating the effect of Nile red in silicone oil solution

Fourteen-day-old Arabidopsis seedlings were treated with silicone oil with or without Nile red for 5 min. Nile red was removed by washing the seedlings in silicone oil for 1 min. After two washes, the silicone oil was removed by air drying for 10 min. These treatments were conducted on a clean bench. Three days after treatment, whole images of the fifth leaves were acquired by an AxioCam HRc camera coupled to a SteREO Lumar.V12 microscope (Carl Zeiss, <http://www.zeiss.com/>). Leaf areas were measured using ImageJ software (National Institutes of Health, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

Detection of leaf surfaces in confocal image stacks

The leaf surfaces, used to determine tissue depth, were detected as follows. Images were scanned from top to bottom (along the z axis), and the signal intensity at each voxel was compared with a specified threshold intensity. If the intensity of the voxel exceeded the manually determined threshold, we discriminated that a surface was located between the voxel and its immediate upper neighbor. The z-coordinate of the surface was calculated by linear interpolation.

Analysis of airspaces

Airspaces were analyzed in fourteen-day-old Arabidopsis seedlings. We acquired 3D images of the adaxial side of the first leaves by CLSM. The images were $224.48 \mu\text{m} \times 224.48 \mu\text{m}$ (width $\times$ height). Prior to segmentation, images were smoothed by a Gaussian filter to reduce noise. 3D structures of airspaces at depths ranging from $9 \mu\text{m}$ to $31 \mu\text{m}$ were extracted by our proposed segmentation method. The volume was calculated as the number of voxels multiplied by the volume of a single voxel. Segmentation errors were manually corrected by separating and joining the segments using dilation and erosion.

Estimating the proper radius of the sphere structuring element in the closing operation of segment validation

In this study, we used morphological operations such as opening and closing operations (Soille 2003). To detect incorrect segments, the radius of the sphere structuring element in the closing operation of segment validation should be properly set to fill the inner structure of objects. If the radius is too small, the inner structure of segments cannot be extracted. If the radius is too large, the external structure could be incorrectly extracted as the inner structure of a segment. The most appropriate

radius was estimated by an opening operation (Figure S2). The radius was set to the minimum integral radius of the sphere structuring element in the opening operation for which the object volume was below $\frac{1}{2}V_0$.

The segment validation algorithm is based on the threshold volume of the inner structure of each segment. Therefore, its accuracy is affected by the segment size. This algorithm operated well in mesophyll composed of similarly sized cells. By contrast, exact validation was difficult in epidermis, which comprises differently sized cells. To overcome this difficulty, we set C_{const} of the first binarization to an appropriate value for segmenting epidermal cells.

Software implementation

The segmentation algorithm described in this manuscript was implemented in a Windows application with a graphical user interface (GUI). The algorithm was implemented in C/C++ and CUDA. The GUI was implemented using C# and Windows Presentation. Simple segment-modifying functions, such as dilation, erosion, joining and separation, were also implemented. The software was evaluated on computers installed with the following graphic cards: Geforce GTX 580, Geforce GTX 680 and Tesla K20.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Toshihiko Komari and Yasuhito Saito (Japan Tobacco) for providing *Nicotiana glauca* seeds, to Tokitaka Oyama (Kyoto University) for providing *Spirodela polyrhiza* 7003, to Fumiyoshi Ishidate (Kyoto University) for his valuable suggestions, and to the Arabidopsis Biological Resource Center for their donations

of materials. This work was supported by a Specially Promoted Research of Grant-in-Aid for Scientific Research to I.H-N. (no. 22000014) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS). The authors declare no conflicts of interest.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Figure S1. Evaluating the impact of Nile-red-in-silicone-oil solution on leaf development.

Figure S2. Estimating the proper radius of the sphere structuring element in the closing operation of segment validation.

Figure S3. Segmentation results with various depth ranges.

Figure S4. Graphical User Interface of the Windows application in which proposed algorithms were implemented.

Documentation D1. User's manual of DSLT_Demo.

REFERENCES

- Bellaiche, Y., Bosveld, F., Graner, F., Mikula, K., Remesikova, M. and Smisek, M.** (2011) New robust algorithm for tracking cells in videos of drosophila morphogenesis based on finding an ideal path in segmented spatio-temporal cellular structures. In *Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC, 2011 Annual International Conference of the IEEE*, pp. 6609-6612.
- Cheng, P.-C.** (2006) Interaction of Light with Botanical Specimens. In *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* (Pawley, J.B. ed: Springer US, pp. 414-441.
- Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffiths, J.S. and Somerville, C.R.** (2000) Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of

Arabidopsis at a high frequency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 3718-3723.

Donnelly, P.M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R.E. and Dengler, N.G. (1999) Cell Cycling and Cell Enlargement in Developing Leaves of Arabidopsis. *Developmental Biology*, **215**, 407-419.

Feijó, J.A. and Moreno, N. (2004) Imaging plant cells by two-photon excitation. *Protoplasma*, **223**, 1-32.

Fernandez, R., Das, P., Mirabet, V., Moscardi, E., Traas, J., Verdeil, J.-L., Malandain, G. and Godin, C. (2010) Imaging plant growth in 4D: robust tissue reconstruction and lineaging at cell resolution. *Nat Meth*, **7**, 547-553.

Greenspan, P., Mayer, E.P. and Fowler, S.D. (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*, **100**, 965-973.

Guy, G. and Medioni, G. (1996) Inferring global perceptual contours from local features. *International Journal of Computer Vision*, **20**, 113-133.

Hepler, P. and Gunning, B.S. (1998) Confocal fluorescence microscopy of plant cells. *Protoplasma*, **201**, 121-157.

Indhumathi, C., Cai, Y.Y., Guan, Y.Q. and Opas, M. (2011) An automatic segmentation algorithm for 3D cell cluster splitting using volumetric confocal images. *Journal of Microscopy*, **243**, 60-76.

Inoué, S. (2006) Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy. In *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* (Pawley, J.B. ed: Springer US, pp. 1-19.

Jierong, C. and Rajapakse, J.C. (2009) Segmentation of Clustered Nuclei With Shape Markers and Marking Function. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, **56**, 741-748.

Liu, M., Chakraborty, A., Singh, D., Yadav, R.K., Meenakshisundaram, G., Reddy, G.V. and Roy-Chowdhury, A. (2011) Adaptive Cell Segmentation and Tracking for Volumetric Confocal Microscopy Images of a Developing Plant Meristem. *Molecular Plant*, **4**, 922-931.

Marcuzzo, M., Quelhas, P., Campilho, A., Maria Mendonça, A. and Campilho, A. (2009) Automated Arabidopsis plant root cell segmentation based on SVM classification and region merging. *Computers in Biology and Medicine*, **39**, 785-793.

Mikula, K., Peyriéras, N., Remešíková, M. and Stašová, O. (2011) Segmentation of 3D cell membrane images by PDE methods and its applications. *Computers in Biology and Medicine*, **41**, 326-339.

- Mosaliganti, K.R., Noche, R.R., Xiong, F., Swinburne, I.A. and Megason, S.G.** (2012) ACME: automated cell morphology extractor for comprehensive reconstruction of cell membranes. *PLoS Comput Biol*, **8**, e1002780.
- Muranaka, T., Okada, M., Yomo, J., Kubota, S. and Oyama, T.** (2014) Characterisation of circadian rhythms of various duckweeds. *Plant Biology*, doi: 10.1111/plb.12202.
- Pawley, J.** (2006) Fundamental Limits in Confocal Microscopy. In *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* (Pawley, J.B. ed: Springer US, pp. 20-42.
- Schmidt, T., Pasternak, T., Liu, K., Blein, T., Aubry-Hivet, D., Dovzhenko, A., Duerr, J., Teale, W., Ditengou, F.A., Burkhardt, H., Ronneberger, O. and Palme, K.** (2014) The iRoCS Toolbox--3D analysis of the plant root apical meristem at cellular resolution. *Plant J*, **77**, 806-814.
- Shaw, S.L. and Ehrhardt, D.W.** (2013) Smaller, Faster, Brighter: Advances in Optical Imaging of Living Plant Cells. *Annual Review of Plant Biology*, **64**, 351-375.
- Soille, P.** (2003) *Morphological image analysis : principles and applications* 2nd edn. Berlin ; New York: Springer.
- Sugano, S.S., Shimada, T., Imai, Y., Okawa, K., Tamai, A., Mori, M. and Hara-Nishimura, I.** (2010) Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. *Nature*, **463**, 241-244.
- Tanaka, Y., Sugano, S.S., Shimada, T. and Hara-Nishimura, I.** (2013) Enhancement of leaf photosynthetic capacity through increased stomatal density in Arabidopsis. *New Phytol*, **198**, 757-764.
- Wahlby, C., Sintorn, I.M., Erlandsson, F., Borgefors, G. and Bengtsson, E.** (2004) Combining intensity, edge and shape information for 2D and 3D segmentation of cell nuclei in tissue sections. *J Microsc*, **215**, 67-76.
- Zanella, C., Campana, M., Rizzi, B., Melani, C., Sanguinetti, G., Bourguine, P., Mikula, K., Peyrieras, N. and Sarti, A.** (2010) Cells Segmentation From 3-D Confocal Images of Early Zebrafish Embryogenesis. *Image Processing, IEEE Transactions on*, **19**, 770-781.

Figure legends

Figure 1. Workflow of the 3D segmentation of plant leaves.

- (a) Fluorescent staining of leaves with nile-red-in-silicone-oil solution. Cell membranes and airspaces are visualized in different colors.
- (b) A stack of pictures is acquired by confocal laser scanning microscopy.
- (c) A 3D image is generated from the stack of pictures.
- (d) The 3D structure is reconstructed by our automated 3D segmentation method. Each differently colored segment corresponds to a single cell or airspace.

Figure 2. Visualizing the leaf interior by staining with nile red dissolved in silicone oil.

- (a) The nile-red-in-silicone-oil solution easily penetrates the leaf interior. (i) A cross-sectional image of a GFP-LTI6b-expressing *Arabidopsis thaliana* leaf mounted in Alexa 568 hydrazide sodium salt in water solution. The fluorescence of Alexa 568 hydrazide and plasma-membrane-localized GFP are shown in green and magenta, respectively. (ii) A cross-sectional image of a wild-type *Arabidopsis* leaf mounted in nile-red-in-silicone-oil solution. The fluorescence profiles of nile red in the silicone oil and the lipid bilayer membrane are shown in green and magenta, respectively. Images were acquired by CLSM. Bars are 20 μm .
- (b) Fluorescence emission spectra of nile red in silicone oil (green) and phospholipid bilayer membranes (magenta) with a 488-nm excitation.
- (c) Confocal images of the epidermis and mesophyll of *Nicotiana glauca* and *Spirodela polyrrhiza* leaves. The adaxial side of the leaves was stained with the nile-red-in-silicone-oil solution and imaged with a 488-nm excitation for nile red in silicone

oil (airspace) and a 561-nm excitation for Nile red in lipid (cellular membrane). Note that this excitation condition enables to distinguish plasma membrane and airspace without any deconvolution. Bars are 50 μm .

Figure 3. Time-lapse imaging of a developing *N. glauca* leaf stained with Nile-red-in-silicone-oil solution.

Cross-sectional views of 3D images of the adaxial side of an *N. glauca* leaf. Confocal images were taken over 5 days of leaf development (times indicated in white above each image). Shown is the fluorescence of Nile red in the lipid bilayer membrane. Bar is 50 μm .

Figure 4. Comparison of binarization results between DSLT and previous methods.

Cross sectional views of 3D images of the adaxial side of a *S. polyrrhiza* leaf, showing Nile red fluorescence in the lipid bilayer.

- (a) Source image, shown for comparison.
- (b) Result of h-minima transform.
- (c) Result of local thresholding with a cubic kernel.
- (d) Result of uncorrected (left) and corrected (right) DSLT. Note that this correction visually clarifies the membranes parallel to the focal plane (indicated by arrowheads).

Figure 5. Binarization by DSLT.

(a) Source image of a cross-sectional view of a confocal image stack of an Arabidopsis leaf. Neighboring regions are connected to the central point (purple) by line segments (lines). The region yielding the minimum weighted intensity sum is shown in yellow; others are in red. At each pixel, the threshold is computed from the minimum value of the weighted sums. The angles θ formed by the line segments (relative to the X-axis) are $0, \pm\pi/8, \pm\pi/4, \pm3\pi/8, \pm\pi/2$.

(b) The length and orientation of the yellow line segment indicate the weighted sum and orientation, respectively, of the line segment kernel that has the minimum weighted sum at the center point (purple).

(c) The result of DSLT.

Figure 6. Automated 3D segmentation using DSLT.

A flowchart of the automated 3D segmentation process using DSLT. The segmentation algorithm is repeatedly applied, gradually increasing the binarization sensitivity. Each cycle proceeds through four steps: binarization, closing, flood filling, and validation. In the validation step (Step 4), segments are classified into correct and incorrect segments as shown in Figure 7.

Figure 7. Schematic for validation method of extracted segments and the following process to achieve correct segmentation.

A segment from which inner structures are extracted (shown in green) is determined to be an incorrect segment. In this example, Segment A, which is actually composed

of two cells, is determined to be an incorrect segment. The segment is then repeatedly subjected to the segmentation algorithm until it is separated into two segments (B and C). V_{in} indicates the volume of inner structures.

Figure 8. Automated 3D segmentation of an Arabidopsis leaf by using DSLT.

A 3D image generated from a confocal image stack of an Arabidopsis leaf was subjected to automated 3D segmentation using DSLT. Segmented cells and airspaces with random color coding.

Figure 9. Accuracy of automated 3D segmentation using DSLT.

(a) Comparison of segmentation results obtained from the same source image (i-iii). DSLT (iv-vi) indicates the segmentation algorithm proposed in Figure 6. H-minima Transform (vii-ix) indicates the proposed method, in which the binarization process was replaced by h-minima transform. ACME (x-xii) indicates Automated Cell Morphology Extractor. The upper panels (i, iv, vii, x) are source and segmented images of the epidermal cells of Arabidopsis leaf. The middle panels (ii, v, viii, xi) are source and segmented images of the mesophyll cells. The lower panels (iii, vi, ix, xii) are cross-sectional views. Segments are color-coded in different colors.

(b) The percentage of correctly segmented cells to the total cell number was determined with over 350 cells in four images. A is the cross-sectional area of the manually extracted reference segment, while ΔA is the areal difference between the automatic and manual segmentations. Over 300 cross-sectional area of segments were examined. n.d., not determined.

Figure 10. Analysis of relationships between stomatal density and airspace volume.

(a) Confocal images of the adaxial side of Arabidopsis leaves of wild-type (WT) (left), *STOMAGEN*-silenced line (*STOMAGEN*-RNAi) (center) and *STOMAGEN*-overexpressing line (*STOMAGEN*-OX) (right). Leaves were stained with Nile-red-in-silicone-oil solution. Cell boundaries and airspaces are visualized in magenta and green, respectively. The images in each row were generated by maximum intensity projection of voxels at the indicated depth (5 μm) or in the indicated depth range (13–16 μm). Bars are 50 μm .

(b) Stomatal densities (left) and airspace volumes (right) of the adaxial side of Arabidopsis leaves of wild-type (WT), *STOMAGEN*-silenced line (*STOMAGEN*-RNAi) and *STOMAGEN*-overexpressing line (*STOMAGEN*-OX). The first or second leaves of 14-day-old seedlings were used in these images. Airspace volumes were calculated in the depth range 9–31 μm , over square areas of 0.051 mm^2 . See Experimental procedure for details. Different letters denote that the results are significantly different among the genotypes (Student's *t*-test, $P \leq 0.05$).

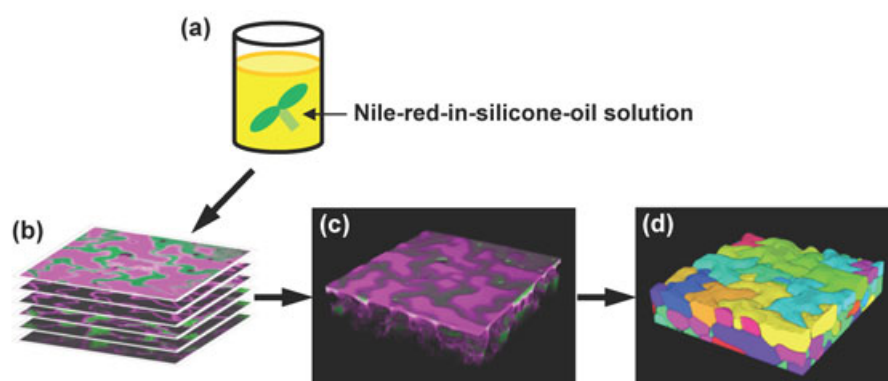


Figure 1. Workflow of the 3D segmentation of plant leaves.

- (a) Fluorescent staining of leaves with Nile-red-in-silicone-oil solution. Cell membranes and airspaces are visualized in different colors.
- (b) A stack of pictures is acquired by confocal laser scanning microscopy.
- (c) A 3D image is generated from the stack of pictures.
- (d) The 3D structure is reconstructed by our automated 3D segmentation method. Each differently colored segment corresponds to a single cell or airspace.

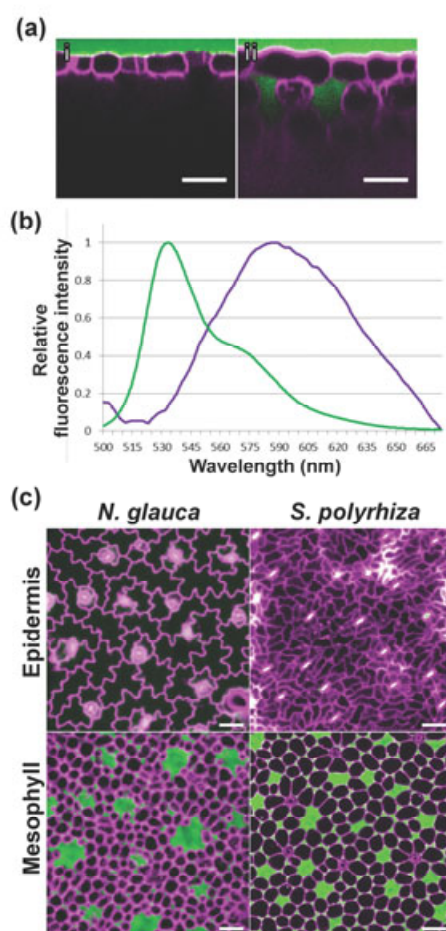


Figure 2. Visualizing the leaf interior by staining with Nile red dissolved in silicone oil.

(a) The Nile-red-in-silicone-oil solution easily penetrates the leaf interior. (i) A cross-sectional image of a GFP-LTI6b-expressing *Arabidopsis thaliana* leaf mounted in Alexa 568 hydrazide sodium salt in water solution. The fluorescence of Alexa 568 hydrazide and plasma-membrane-localized GFP are shown in green and magenta, respectively. (ii) A cross-sectional image of a wild-type *Arabidopsis* leaf mounted in Nile-red-in-silicone-oil solution. The fluorescence profiles of Nile red in the silicone oil and the lipid bilayer membrane are shown in green and magenta, respectively. Images were acquired by CLSM. Bars are 20 μm.

(b) Fluorescence emission spectra of Nile red in silicone oil (green) and phospholipid bilayer membranes (magenta) with a 488-nm excitation.

(c) Confocal images of the epidermis and mesophyll of *Nicotiana glauca* and *Spirodela polyrhiza* leaves. The adaxial side of the leaves was stained with the Nile-red-in-silicone-oil solution and imaged with a 488-nm excitation for Nile red in silicone oil (airspace) and a 561-nm excitation for Nile red in lipid (cellular membrane). Note that this excitation condition enables to distinguish plasma membrane and airspace without any deconvolution. Bars are 50 μm.

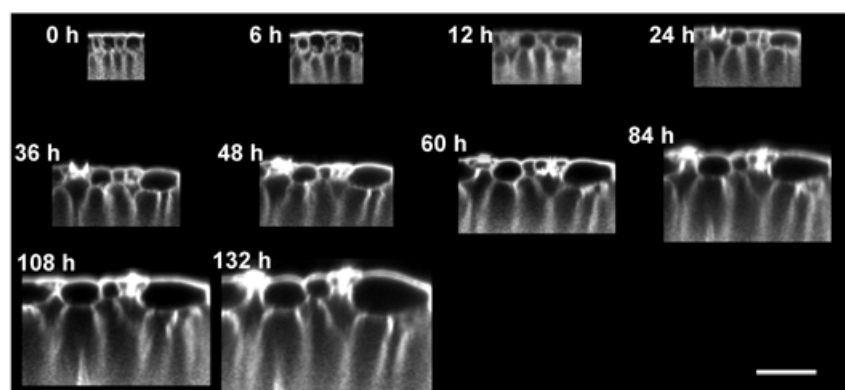


Figure 3. Time-lapse imaging of a developing *N. glauca* leaf stained with nile-red-in-silicone-oil solution.

Cross-sectional views of 3D images of the adaxial side of an *N. glauca* leaf. Confocal images were taken over 5 days of leaf development (times indicated in white above each image). Shown is the fluorescence of nile red in the lipid bilayer membrane. Bar is 50 μm .

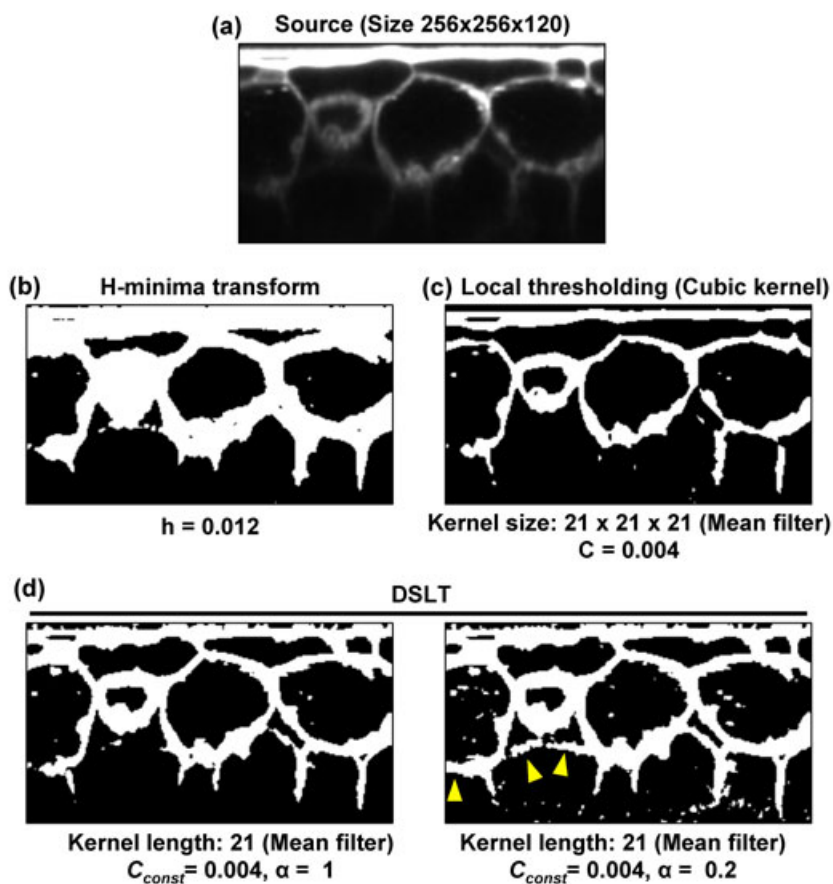


Figure 4. Comparison of binarization results between DSLT and previous methods.

Cross sectional views of 3D images of the adaxial side of a *S. polyrrhiza* leaf, showing Nile red fluorescence in the lipid bilayer.

(a) Source image, shown for comparison.

(b) Result of h-minima transform.

(c) Result of local thresholding with a cubic kernel.

(d) Result of uncorrected (left) and corrected (right) DSLT. Note that this correction visually clarifies the membranes parallel to the focal plane (indicated by arrowheads).

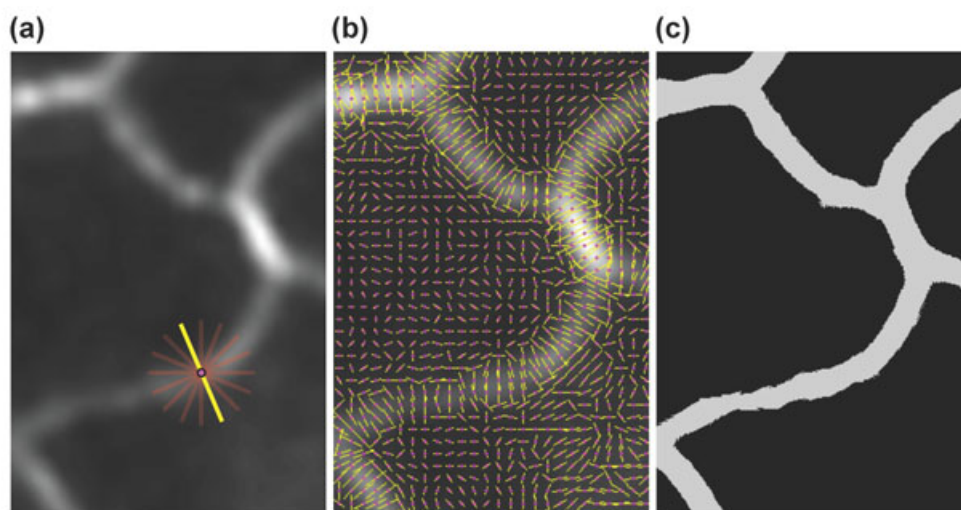


Figure 5. Binarization by DSLT.

(a) Source image. Neighboring regions are connected to the central point (purple) by line segments (lines). The region yielding the minimum weighted intensity sum is shown in yellow; others are in red. At each pixel, the threshold is computed from the minimum value of the weighted sums. The angles θ formed by the line segments (relative to the X-axis) are $0, \pm\pi/8, \pm\pi/4, \pm3\pi/8, \pm\pi/2$.

(b) The length and orientation of the yellow line segment indicate the weighted sum and orientation, respectively, of the line segment kernel that has the minimum weighted sum at the center point (purple).

(c) The result of DSLT.

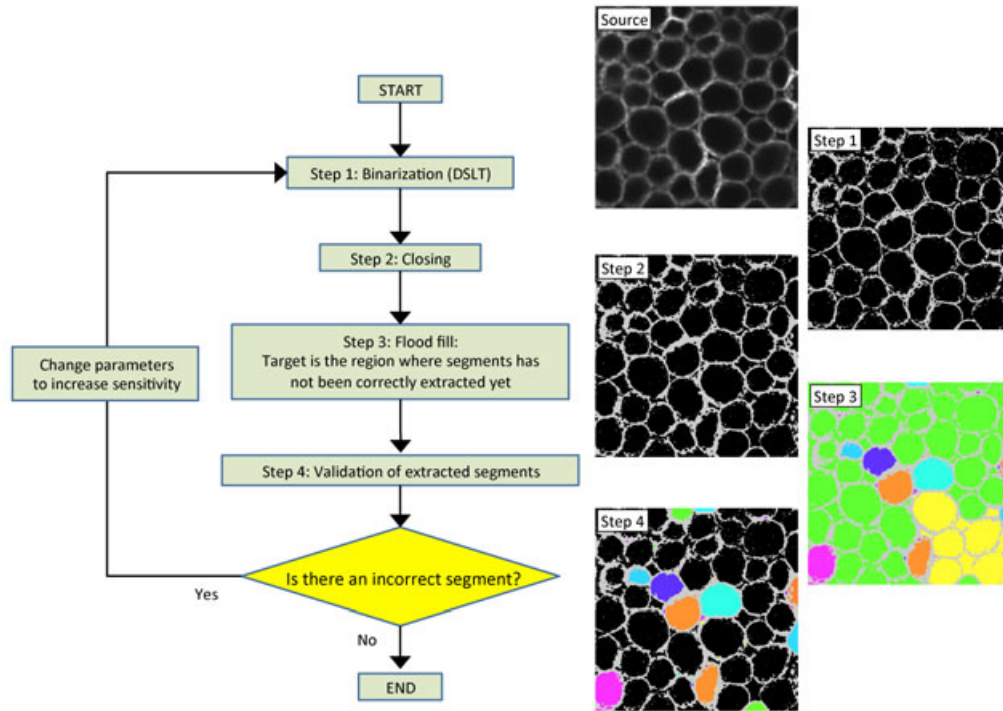


Figure 6. Automated 3D segmentation using DSLT.

A flowchart of the automated 3D segmentation process using DSLT. The segmentation algorithm is repeatedly applied, gradually increasing the binarization sensitivity. Each cycle proceeds through four steps: binarization, closing, flood filling, and validation. In the validation step (Step 4), segments are classified into correct and incorrect segments as shown in Figure 7.

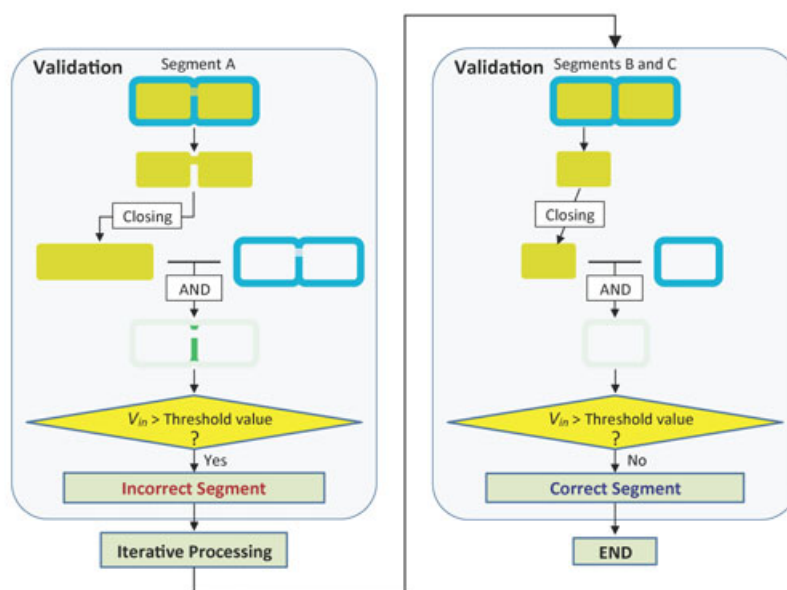


Figure 7. Schematic for validation method of extracted segments and the following process to achieve correct segmentation.

A segment from which inner structures are extracted (shown in green) is determined to be an incorrect segment. In this example, Segment A, which is actually composed of two cells, is determined to be an incorrect segment. The segment is then repeatedly subjected to the segmentation algorithm until it is separated into two segments (B and C). V_{in} indicates the volume of inner structures.

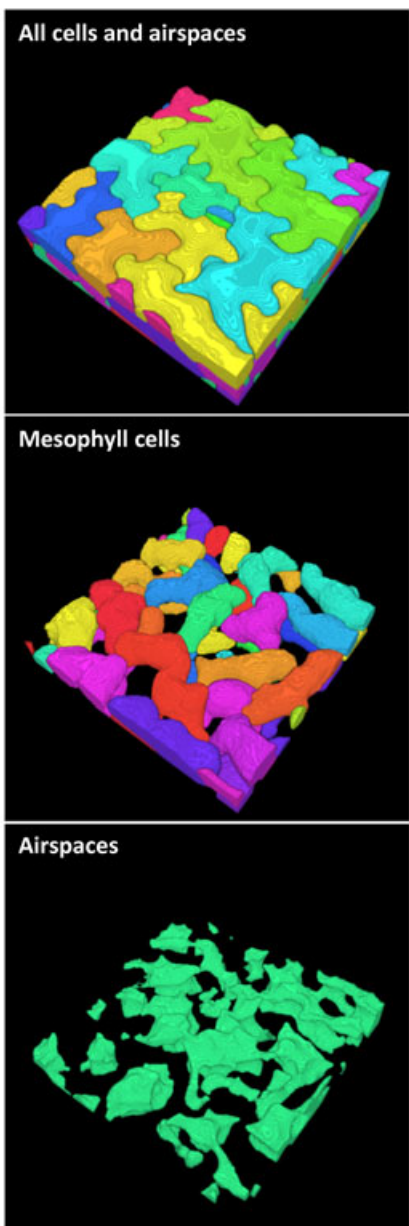


Figure 8. Automated 3D segmentation of an Arabidopsis leaf by using DSLT.

A 3D image generated from a confocal image stack of an Arabidopsis leaf was subjected to automated 3D segmentation using DSLT. Segmented cells and airspaces with random color coding.

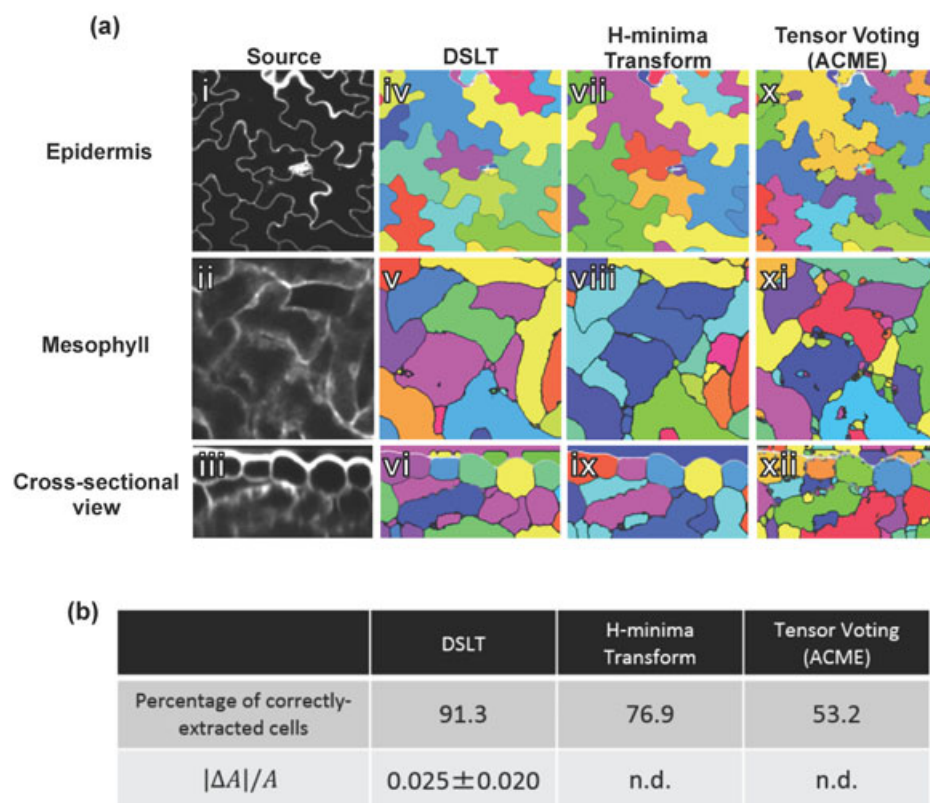


Figure 9. Accuracy of automated 3D segmentation using DSLT.

(a) Comparison of segmentation results obtained from the same source image (i-iii). DSLT (iv-vi) indicates the segmentation algorithm proposed in Figure 6. H-minima Transform (vii-ix) indicates the proposed method, in which the binarization process was replaced by h-minima transform. ACME (x-xii) indicates Automated Cell Morphology Extractor (Mosaliganti *et al.* 2012). The upper panels (i, iv, vii, x) are source and segmented images of the epidermal cells of Arabidopsis leaf. The middle panels (ii, v, viii, xi) are source and segmented images of the mesophyll cells. The lower panels (iii, vi, ix, xii) are cross-sectional views. Segments are color-coded in different colors.

(b) The percentage of correctly segmented cells to the total cell number was determined with over 350 cells in four images. A is the cross-sectional area of the manually extracted reference segment, while ΔA is the areal difference between the automatic and manual segmentations. Over 300 cross-sectional area of segments were examined. n.d., not determined.

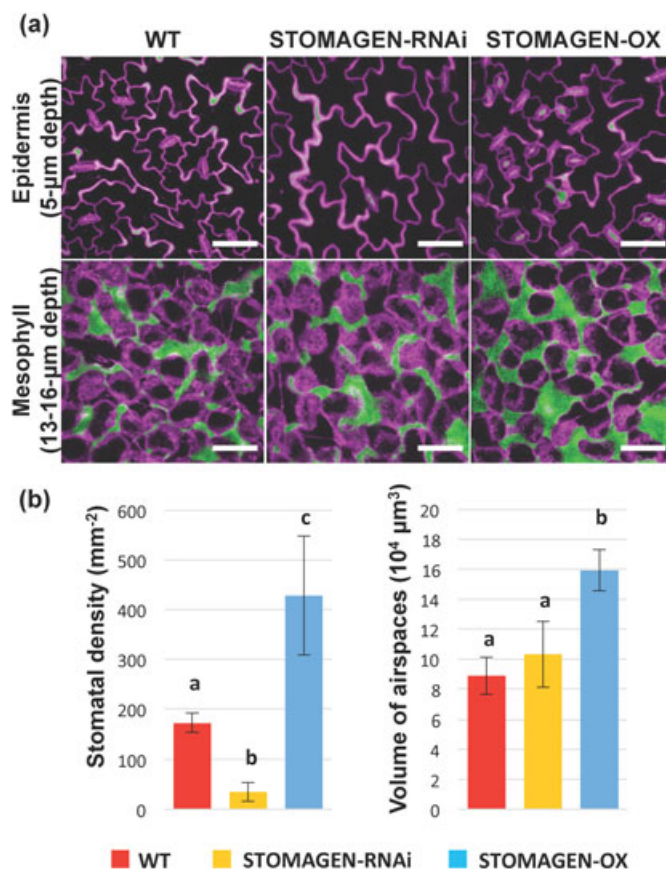


Figure 10. Analysis of relationships between stomatal density and airspace volume.

(a) Confocal images of the adaxial side of Arabidopsis leaves of wild-type (WT) (left), *STOMAGEN*-silenced line (*STOMAGEN*-RNAi) (center) and *STOMAGEN*-overexpressing line (*STOMAGEN*-OX) (right). Leaves were stained with Nile-red-in-silicone-oil solution. Cell boundaries and airspaces are visualized in magenta and green, respectively. The images in each row were generated by maximum intensity projection of voxels at the indicated depth (5 μm) or in the indicated depth range (13–16 μm). Bars are 50 μm.

(b) Stomatal densities (left) and airspace volumes (right) of the adaxial side of Arabidopsis leaves of wild-type (WT), *STOMAGEN*-silenced line (*STOMAGEN*-RNAi) and *STOMAGEN*-overexpressing line (*STOMAGEN*-OX). The first or second leaves of 14-day-old seedlings were used in these images. Airspace volumes were calculated in the depth range 9–31 μm, over square areas of 0.051 mm². See Experimental procedure for details. Different letters denote that the results are significantly different among the genotypes (Student's *t*-test, $P \leq 0.05$).

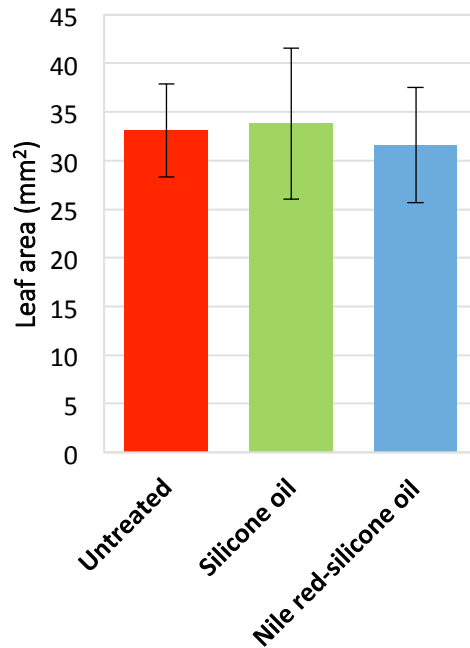


Figure S1. Evaluating the impact of nile-red-in-silicone-oil solution on leaf development.

Areas of the fifth leaves of *Arabidopsis* at 3 days post-treatment. Treatments were applied to 14-day-old seedlings. “Untreated” indicates leaves without any treatment. “Silicone oil” indicates that the leaves were incubated in silicone oil for 5 min. “Nile red-silicone oil” indicates that the leaves were incubated in 10 μ M nile-red-in-silicone-oil solution for 5 min, followed by two 1-min washes in silicone oil. The results are statistically equal among the samples (Student’s *t*-test, $P \leq 0.05$).

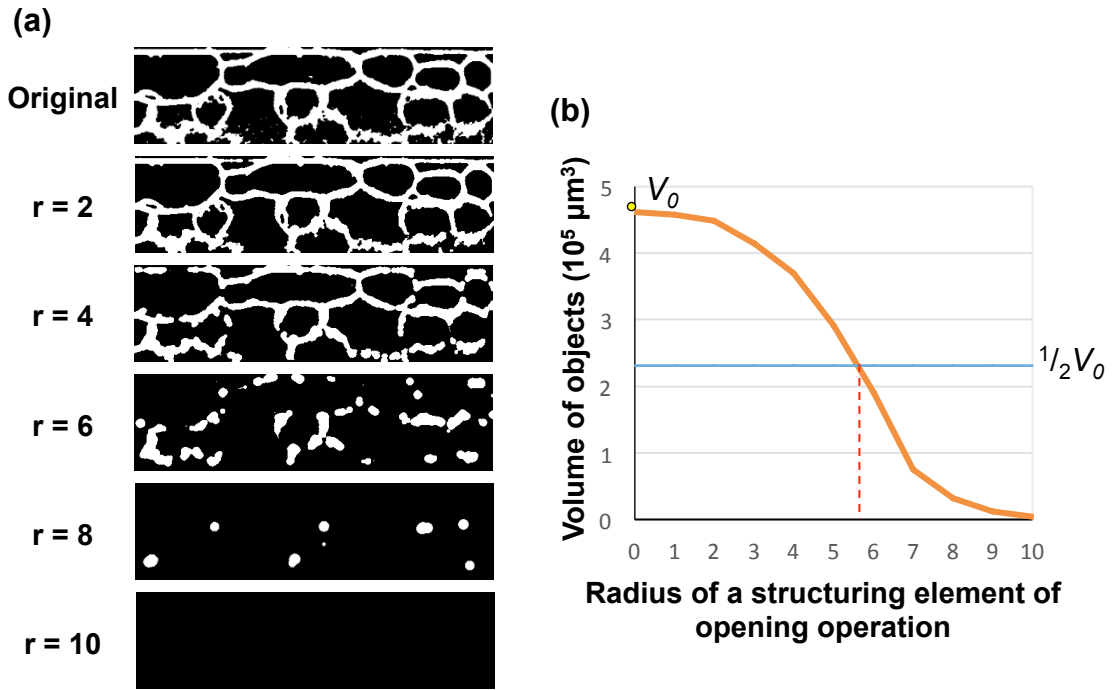


Figure S2. Estimating the proper radius of the sphere structuring element in the closing operation of segment validation.

(a) Cross sectional views of the original 3D image (Original) and 3D images processed by the opening operation ($r = 2$ to 10). r represents the radius of the sphere structuring elements used for morphological operations, such as opening and closing operations.

(b) Object volume (white regions in a) as a function of r . V_0 is the volume of objects in the original image. The radius (r) in the closing operation of segment validation is set to the minimum integral radius (r) for which the object volume is below $\frac{1}{2}V_0$ in the opening operation.

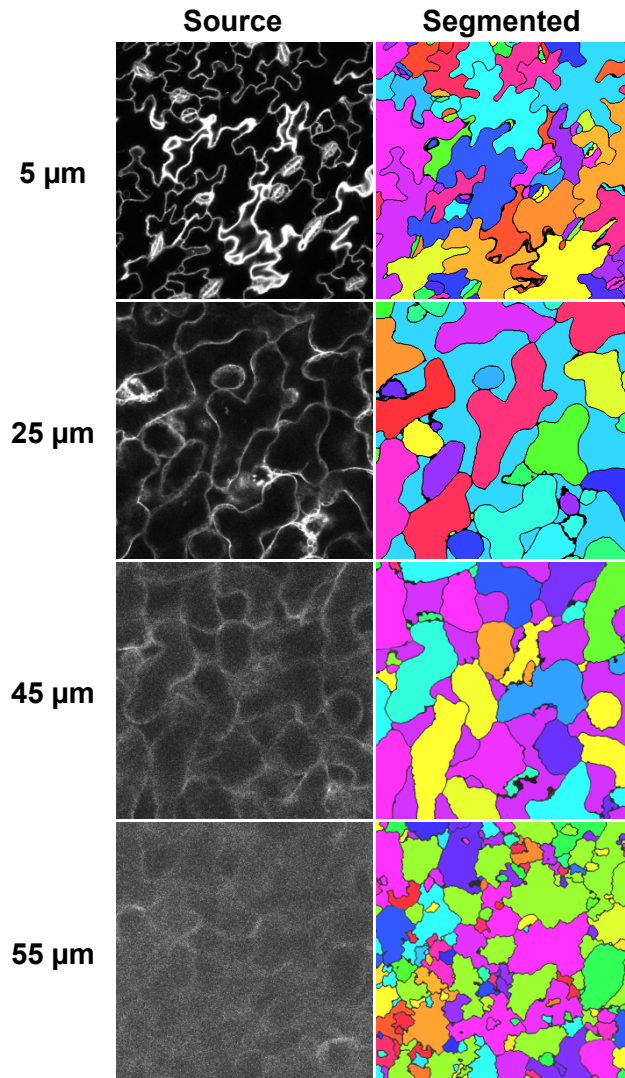
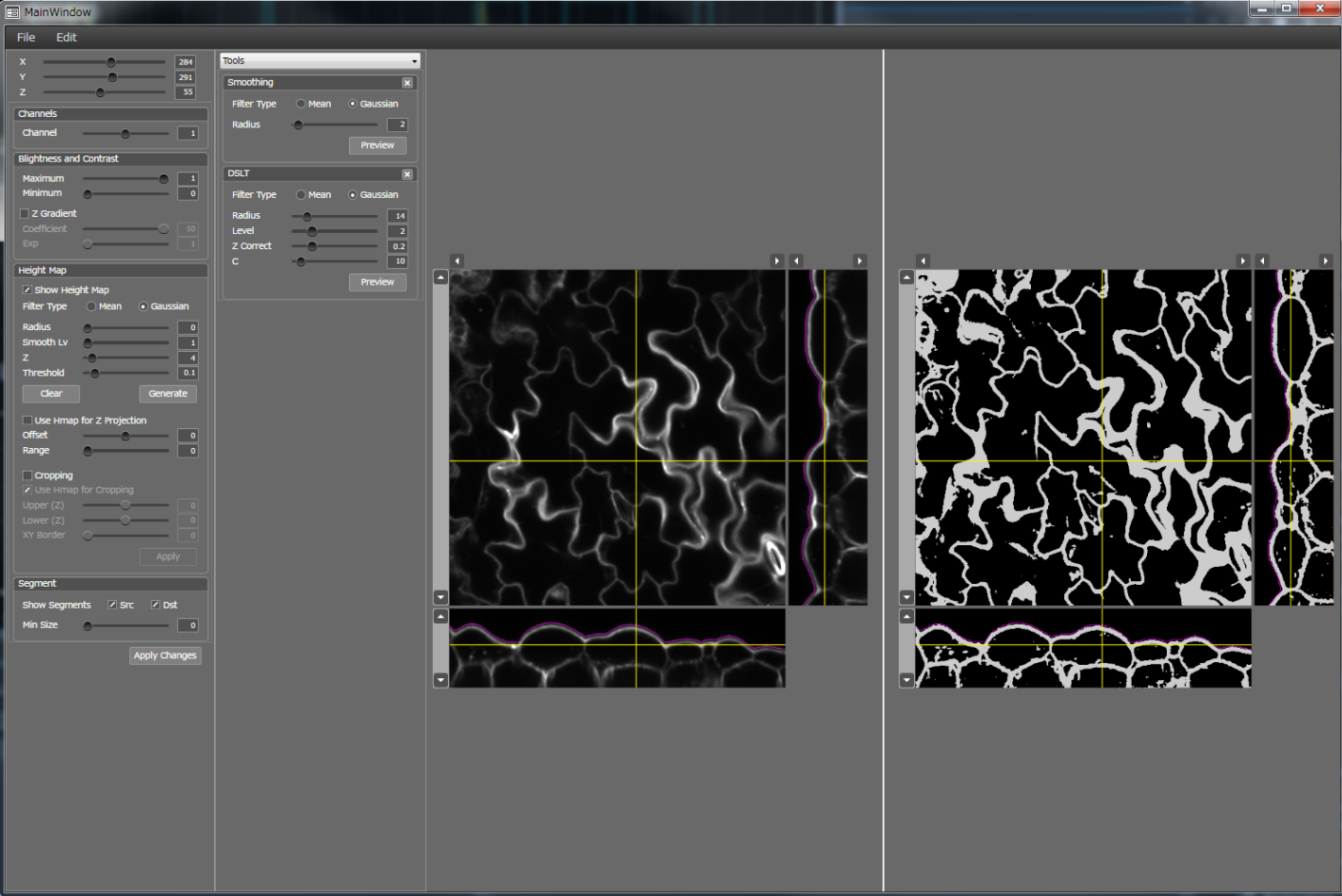


Figure S3. Segmentation results with various depth ranges.

Confocal source images (left) and their segmented images (right) of the abaxial side of a Nile red-stained *Arabidopsis* leaf at the depth indicated. To acquire each segmented image, segmentation was performed from the top of the source image to the depth more than indicated.

(a)



(b)

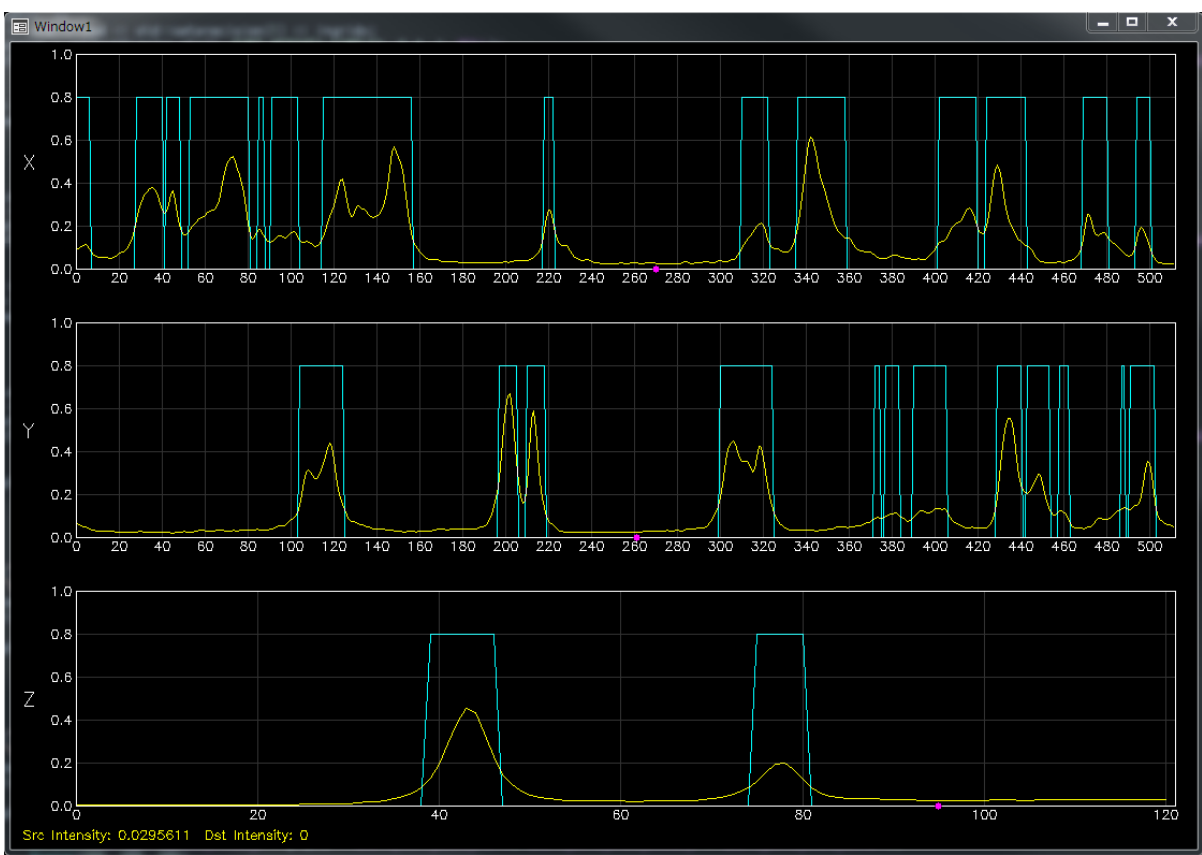


Figure S4. Graphical User Interface of the Windows application in which proposed algorithms were implemented.

- (a) Main window.
- (b) Graphics window.

DSLT_Demo User's Manual (DSLT_Demo Ver. 1.11)

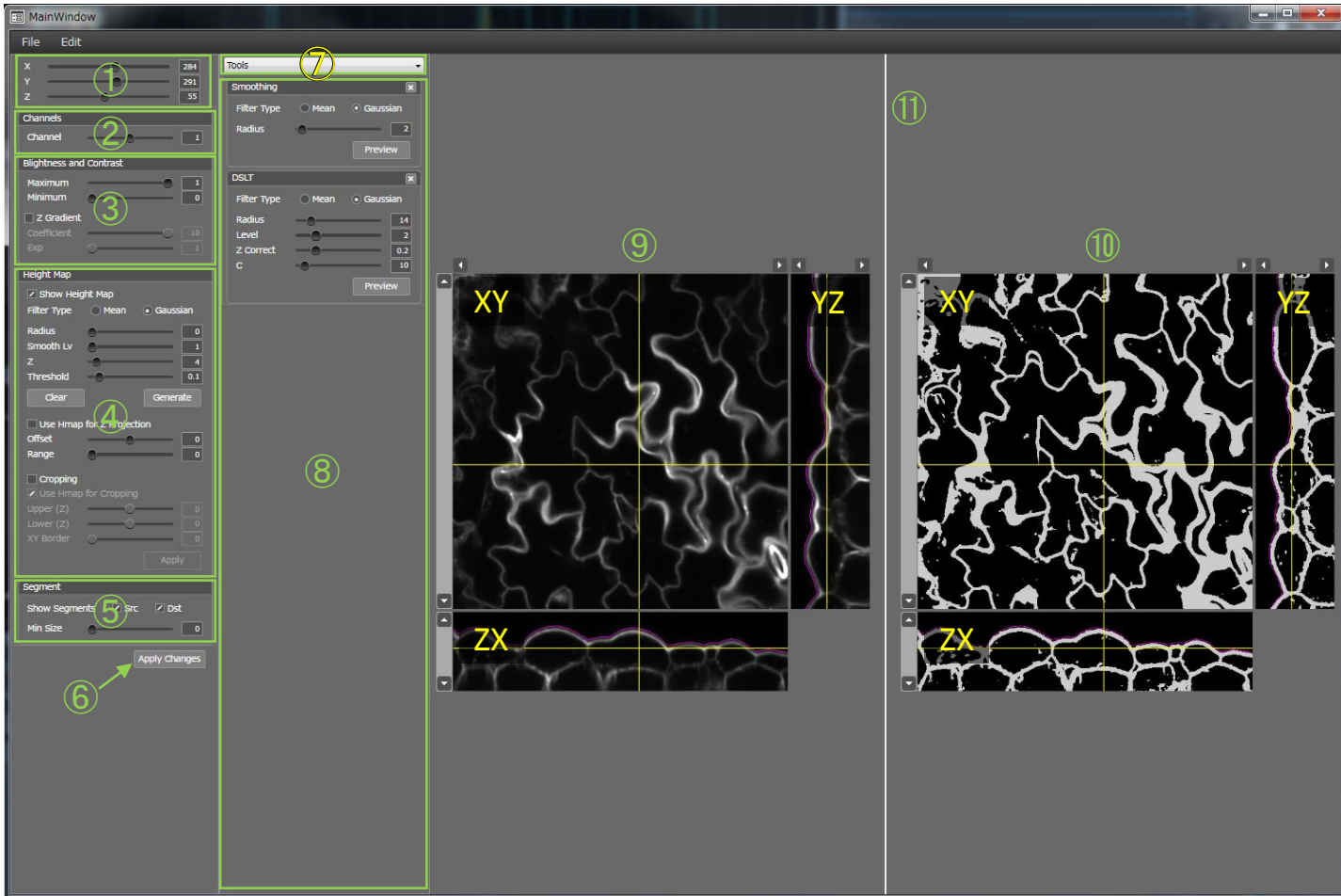
Before Installing DSLT_Demo

Download and install the CUDA Toolkit 6.5.
(<https://developer.nvidia.com/cuda-downloads>)

Installing DSLT_Demo

After downloading the installation package (DSLT_setup_x64_111.exe or DSLT_setup_x86_111.exe), double-click on the file icon and installation will begin.

DSLT_Demo GUI

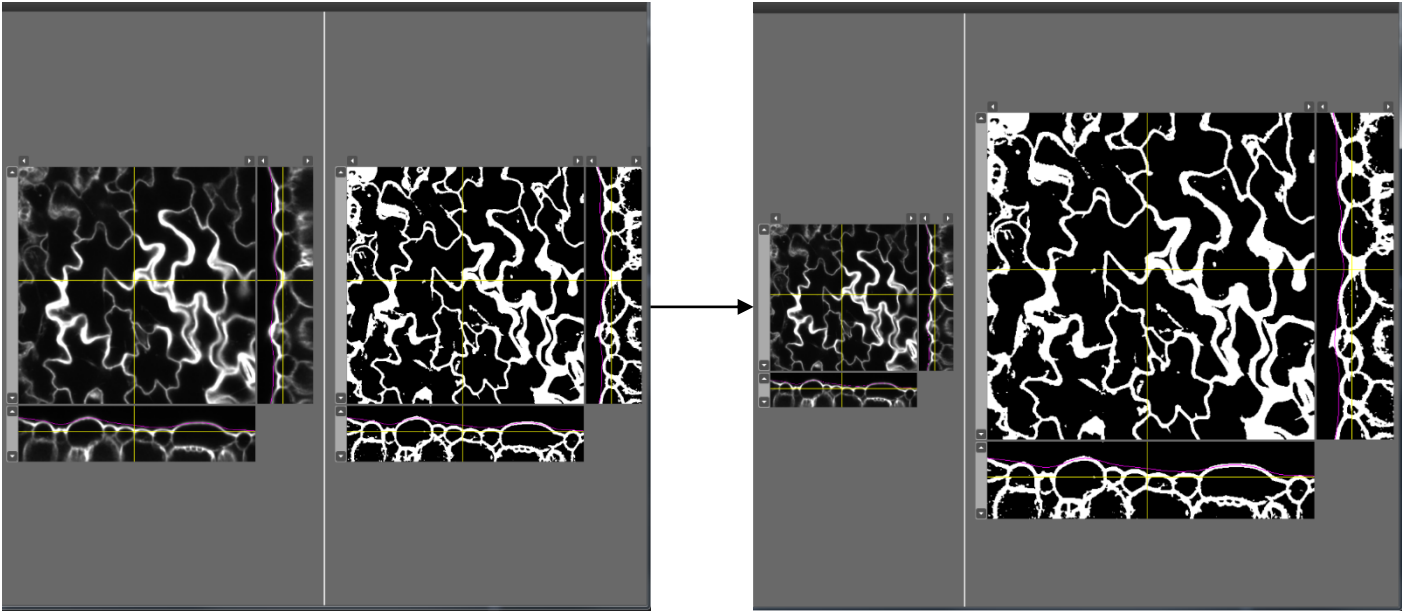


- 1: Position Settings sliders
- 2: Channel Selector
- 3: Brightness and Contrast Settings sliders
- 4: Height Map Settings sliders
- 5: Segment Display slider
- 6: Apply Changes button
- 7: Tools shelf
- 8: Tools panel
- 9: Orthogonal View (Source)
- 10: Orthogonal View (Destination)
- 11: View Panel splitter

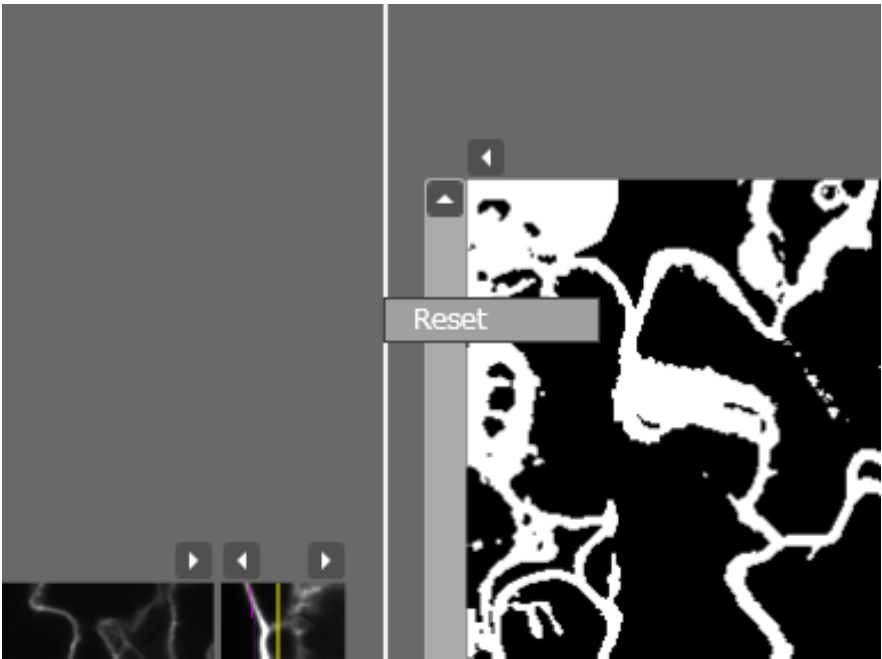
Shift + Left-Click: Zoom in (Orthogonal View)
Shift + Right-Click: Zoom out (Orthogonal View)

View Panel Splitter

You can adjust the size ratio of orthogonal views by dragging the view panel splitter horizontally.



You can reset the size ratio of orthogonal views to the default by right-clicking on the splitter and selecting “Reset” from the menu.



Segmentation Procedure

1: Opening a 3D image file

In the File menu select “Open” or press Ctrl+O to open the image file.

This software supports 8, 16, and 32-bit TIFF image stacks and ImageJ TIFF hyperstacks. We recommend using Fiji for conversion of a file in a different format into one of these formats.

We use “ST_ami 1st adaxial 2-1.tif” for demonstration of the segmentation procedure.

This file includes three channels:

Channel 0: fluorescence of Nile red in silicone oil

Channel 1: fluorescence of Nile red in phospholipid bilayers of cells

Channel 2: autofluorescence

We mainly used Channel 1 for segmentation.

Note that Channel 1 is used unless otherwise stated in the following procedures.

2: Generating a height map to adjust brightness for depth

The height map is a 2D image to store surface elevation data of a 3D image. The software allows adjustment of brightness for improved visualization with increasing depth from the surface. This function enables correction for the reduction in signal intensity with penetration depth of the excitation laser.

The Height Map panel enables adjustment of the following parameters.

Filter Type:

Type of kernel for the smoothing filter that is applied to the height map.

Radius:

Radius of a kernel for the smoothing filter that is applied to the height map.

Smooth Lv:

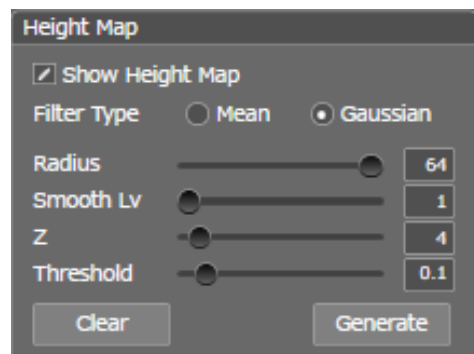
Number of iterations of smoothing for the height map.

Z:

Radius of a kernel for the Z smoothing filter that is applied before surface detection.

Threshold:

Threshold value for surface detection.



The following parameters can be adjusted after height map generation.

Offset:

Depth offset of the height map.

Range:

Depth range of maximum intensity projections along the z-axis. The projection results are displayed on the orthogonal views (XY).

If the option “Use hmap for Z projection” is checked, a value for each point on the height map will be used as a z coordinate for the starting point of the maximum intensity projection.

Generate Button:

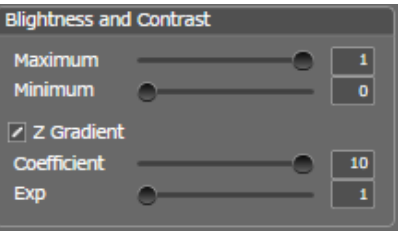
Execute height map generation.

Clear Button:

Clear a generated height map.

If the option “Show height map” is checked, the height map is shown in the orthogonal views (YZ, ZX) as purple curves.

- 1) Set parameters for generation of a height map.
- 2) Click “Generate” button.



3: Brightness and Contrast adjustment

If the option “Z Gradient” is checked, brightness adjustment for improved visualization depth will be activated.

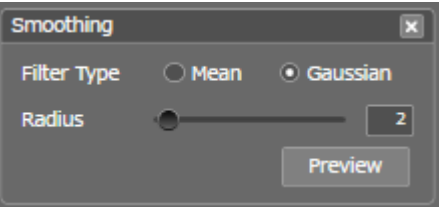
New intensity values I_{new} are calculated with the following formula:

$$I_{\text{new}}(x, y, z) = \text{Coefficient} * z^{\text{Exp}} * I(x, y, z)$$

- 1) Check “Z Gradient”.
- 2) Set parameters for brightness adjustment.

4: Smoothing

Select “Smoothing” from the tool shelf, and the Smoothing box will appear in the Tools panel.



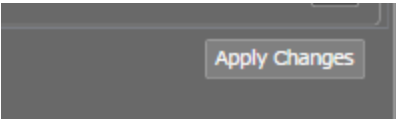
Filter Type:

Type of kernel for the smoothing filter.

Radius:

Radius of the kernel for the smoothing filter

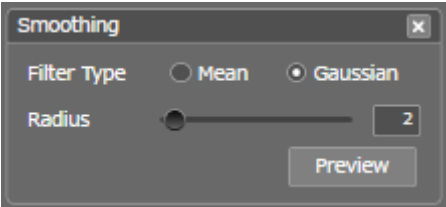
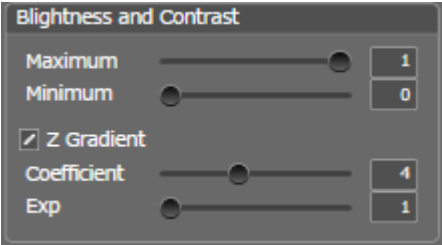
- 1) Set parameters for smoothing.
- 2) Click “Preview” button.



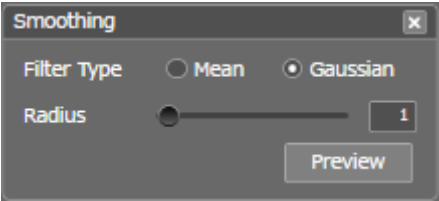
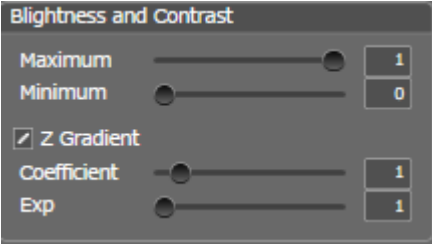
To apply the brightness adjustment and the smoothing settings, click on the “Apply Changes” button. **Perform smoothing and brightness adjustment for improved depth to all channels.**

(Select channel -> Brightness adjustment for depth -> Smoothing -> Apply Changes)

Ch. 0



Ch. 2



5: Segmentation

Select “Segmentation (DSLTL)” from the Tools shelf. The Segmentation settings dialog will appear in the Tools panel.

Filter Type:

Type of kernel for DSLTL.

Radius:

Radius of the kernel for DSLTL.

Level:

Quality of DSLTL.

Z Correct

Correction factor for DSLTL (α).

min C:

Lower limit of C_{const} .

max C:

Upper limit of C_{const} .

Interval:

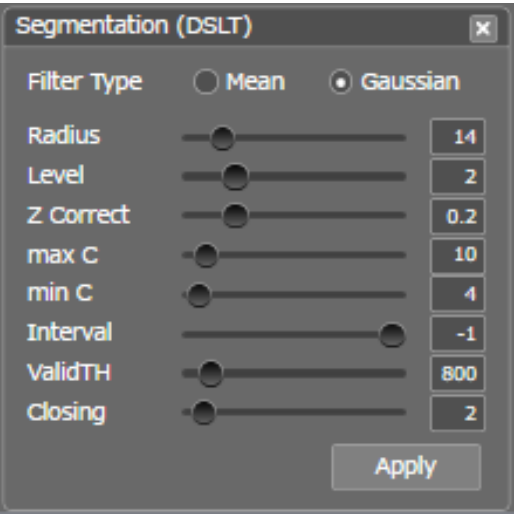
ΔC_{const} that each loop iteration will have.

ValidTH (for segment validation):

The threshold value of the inner structure volume is the sum of multiplying “ValidTH” and the estimated proper radius of the sphere structuring element in the closing operation of segment validation.

Closing:

Radius of the closing operation, which is performed after the binarization.



Check on the “Cropping” option and set parameters for cropping if you want to specify a region that becomes the object of segmentation. You can set the cropping parameters in the Height Map settings dialog. We skipped this step in this demonstration.

Upper:

Upper bound of the cropping region.

If “Use height map” is checked, the z coordinate of each point on the upper bound is the sum of “Upper” and the value of the generated height map at the corresponding x-y coordinate point.

Otherwise, the z coordinate for each point on the upper bound is set to this value.

Lower:

Lower bound of the cropping region.

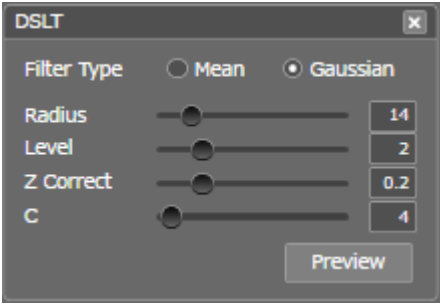
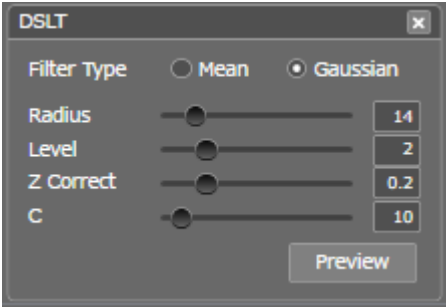
If “Use height map” is checked, the z coordinate of each point on the lower bound is the sum of “Lower” and the value of the generated height map at the corresponding x-y coordinate point.

Otherwise, the z coordinate of each point on the lower bound is set to this value.

Edge:

X-Y edge thickness surrounding the cropping region.

We recommend that you check the results of the DSLTL before segmentation.

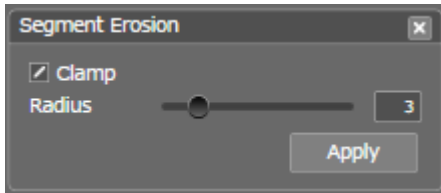


- 1) Set parameters for segmentation.
- 2) Click on the “Apply” button in the Segmentation settings dialog.

6: Segment Editing

Correct segmentation errors.

Select “Segment Erosion” and “Segment Dilation” from the Tools shelf.
The respective settings dialogs will appear in the Tools panel.



Segment Erosion

Erode **selected** segments.

If “Clamp” is checked, a voxel at an edge of an image will not be eroded.

Radius:

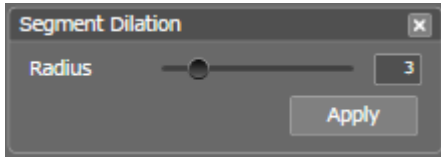
Radius of erosion.

Segment Dilation

Dilate **selected** segments.

Radius:

Radius of dilation.



Middle-Click: Select a segment

Alt+J: Join selected segments

Alt+S: Separate selected segments

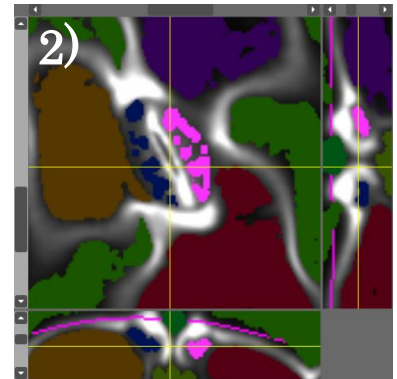
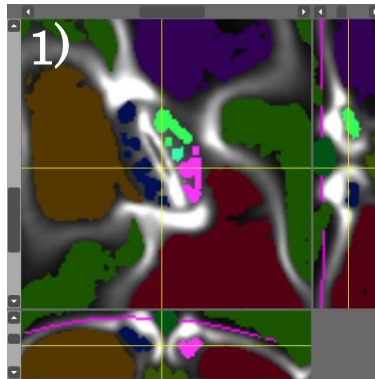
Ctrl+Z: Undo

Alt+A: Select all segments

Alt+D: Deselect all segments

<Over-segmentation>

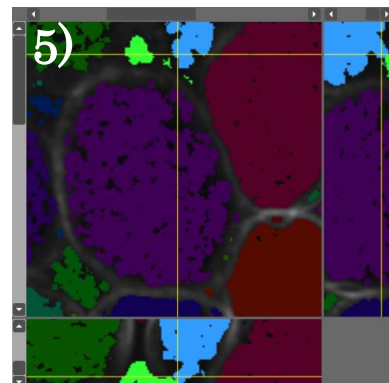
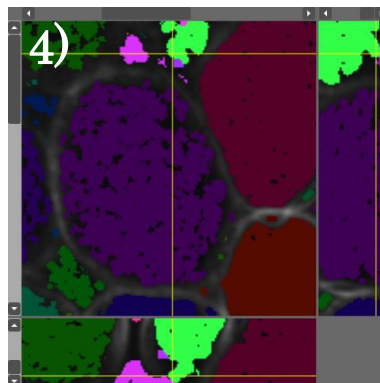
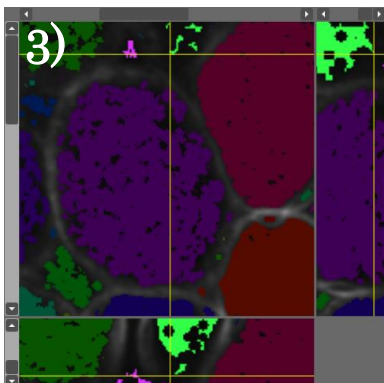
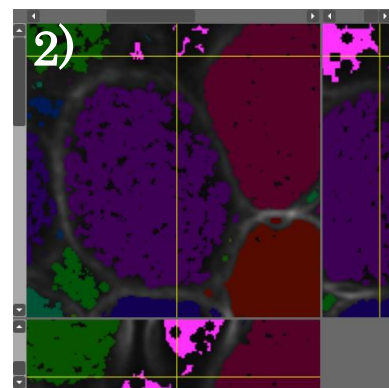
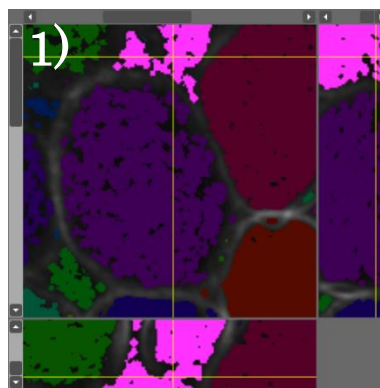
- 1) Select over-segmented segments.
- 2) Join selected segments (Alt+J).



<Under-segmentation>

- 1) Select an under-segmented segment.
- 2) Erode the selected segment (radius = 3, clamp = checked).
- 3) Perform segment separation (Alt+S).
- 4) Dilate the separated segments (radius = 3).
- 5) Join fragments.

The radii of the erosion and the dilation should be the same.



7: Extracting Air Spaces

Select “Segment Selection th” from the Tools shelf. The Segment Selection th settings dialog will appear in the Tools panel.

Threshold:

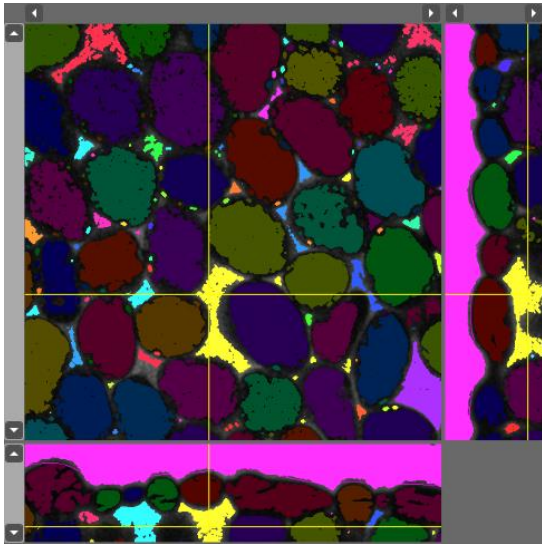
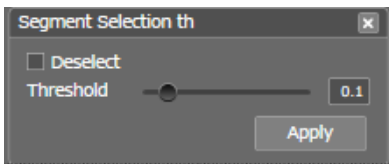
Threshold value for auto-selection of segments.

If “deselect” is **not checked** and the mean intensity of a segment is higher than this value, the segment will be **selected**.

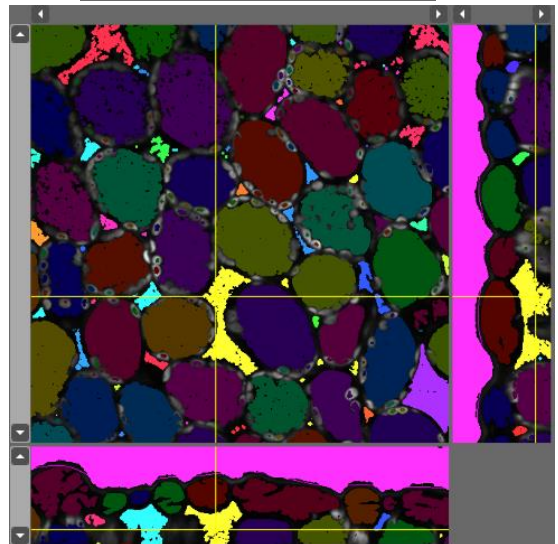
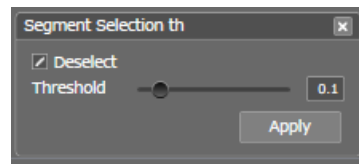
If “deselect” is **checked** and the mean intensity of a segment is higher than this value, the segment will be **deselected**.

- 1) Switch over to channel 0
- 2) Set “Threshold”
- 3) Click on the “Apply” button ---- (perform auto-**selection** (roughly select airspaces))
- 4) Switch over to channel 2
- 5) Check “deselect”
- 6) Set “Threshold”
- 7) Click on the “Apply” button ---- (perform auto-**deselection** (deselect plastids))
- 8) Check selection errors, and then join the selected segments (Alt+J).

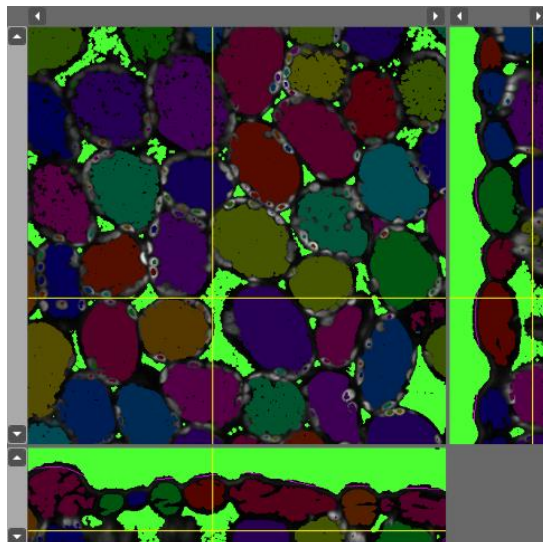
3)



7)

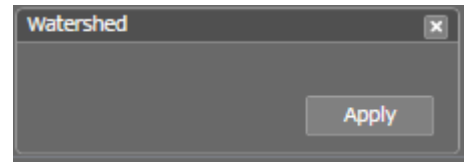
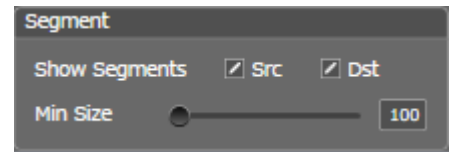


8)



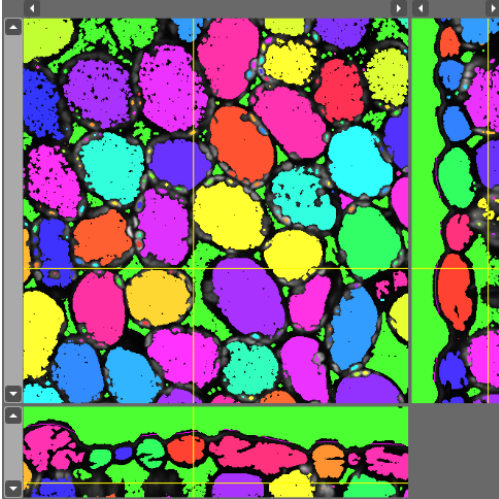
8: Watershed

Select “Watershed” from the Tools shelf. The Watershed settings dialog will appear in the Tools panel. This function ignores unselected and undisplayed segments.

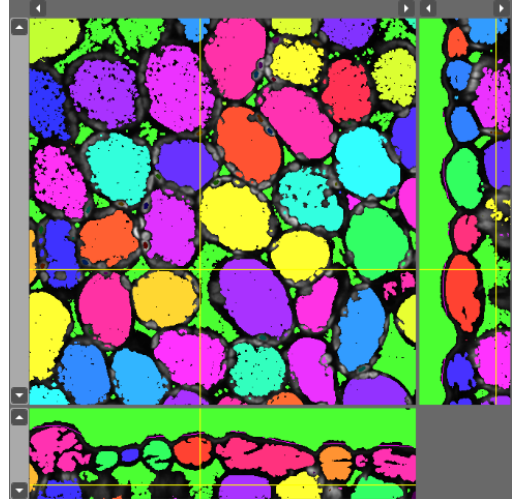


- 1) Select all segments (Alt+A).
- 2) Set the minimum size of segments on the segment-displaying setting dialog
- 3) Deselect plastid if you want to obtain 3D data for cells. This process is not necessary if you want only 3D data for airspaces.
- 4) Switch over to channel 1
- 5) Click on the “Apply” button.

1)



2,3)

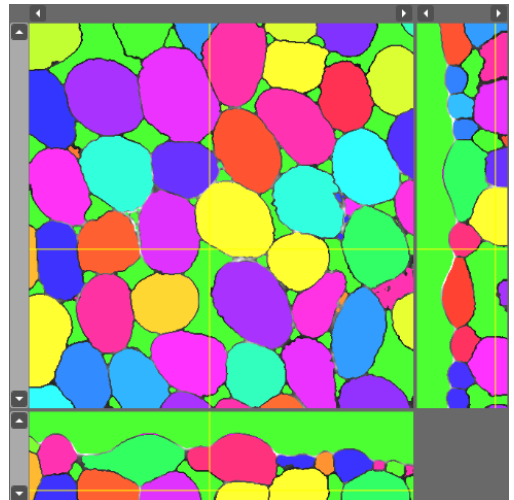


9: Morphological Smoothing (Optional)

Perform morphological smoothing to remove small protuberances.

Select “Segment Dilation” and “Segment Erosion” from the Tools shelf. The respective settings dialogs will appear in the Tools panel.

- 1) Select all segments (Alt+A).
- 2) Erode segments (radius = 3, clamp = checked).
- 3) Dilate segments (radius = 3).
- 4) Erode segments (radius = 3, clamp = checked).
- 5) Dilate segments (radius = 3).
- 6) Erode segments (radius = 1, clamp = checked).

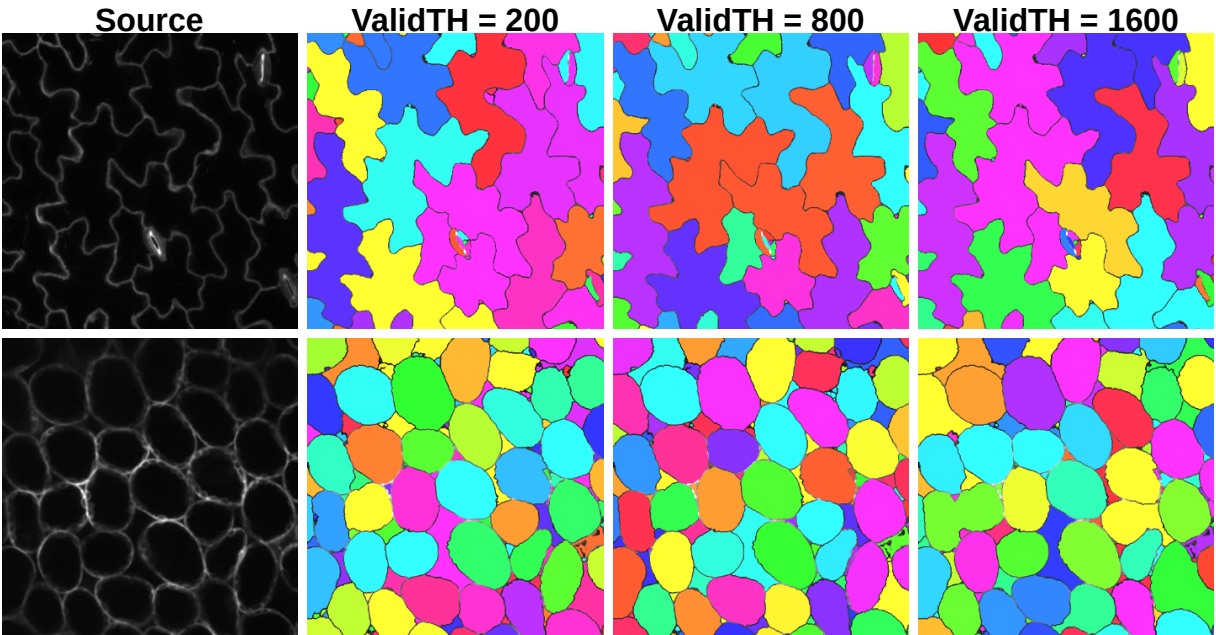
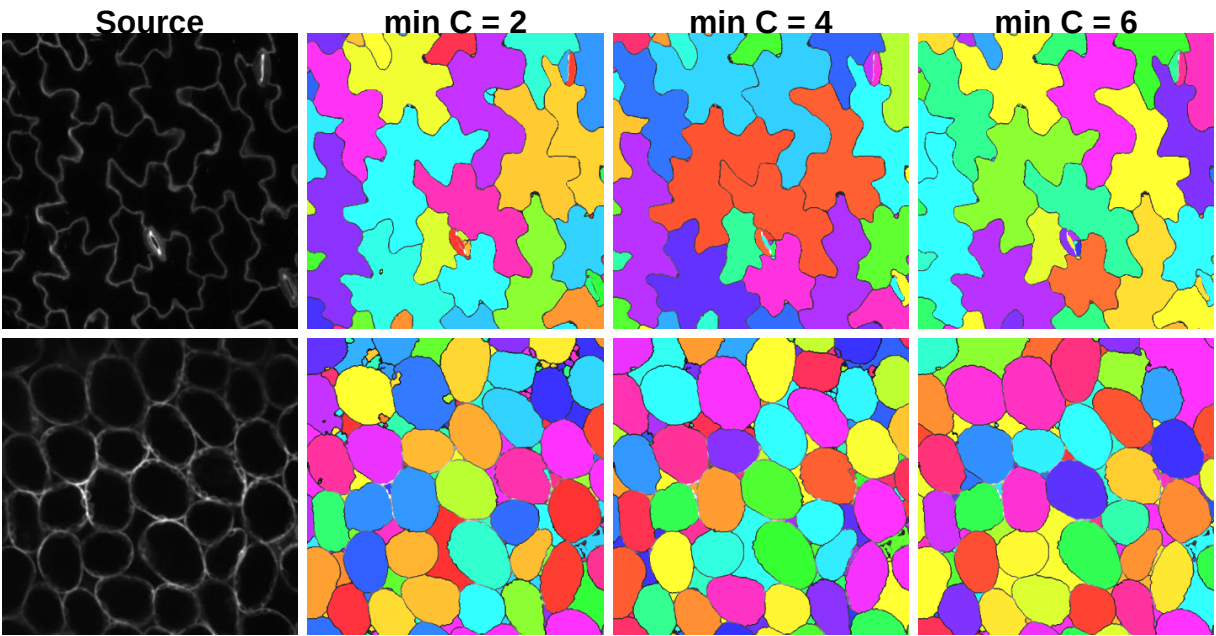
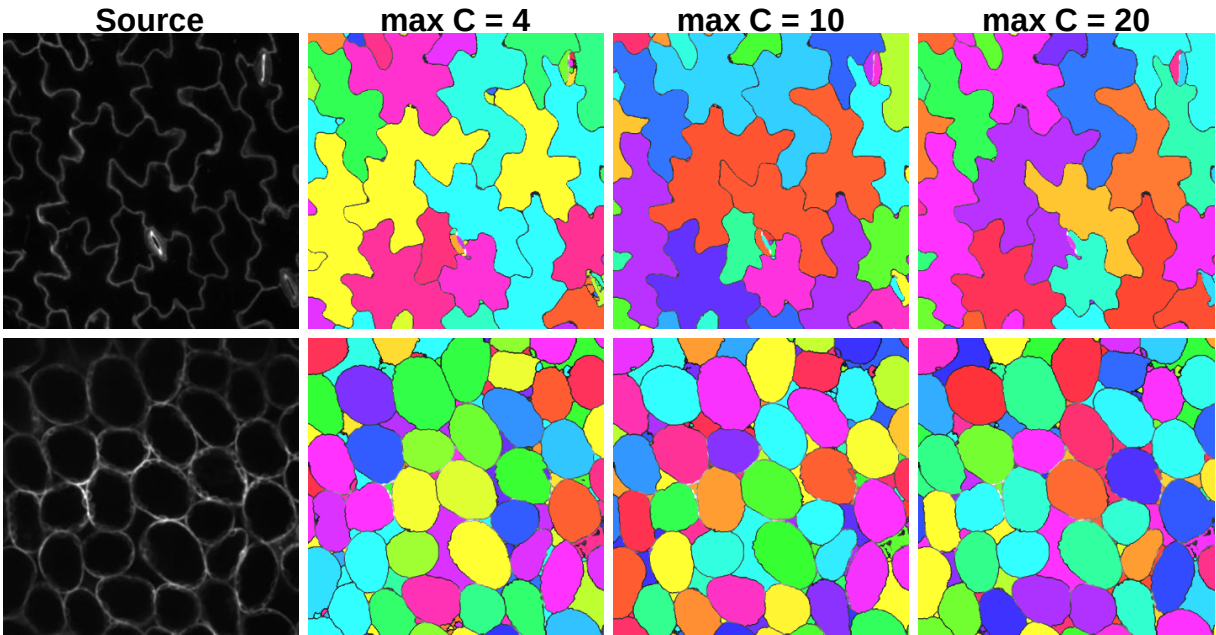


10: Saving Results

File (Menu bar) > Save

File (Menu bar) > Save_Segments

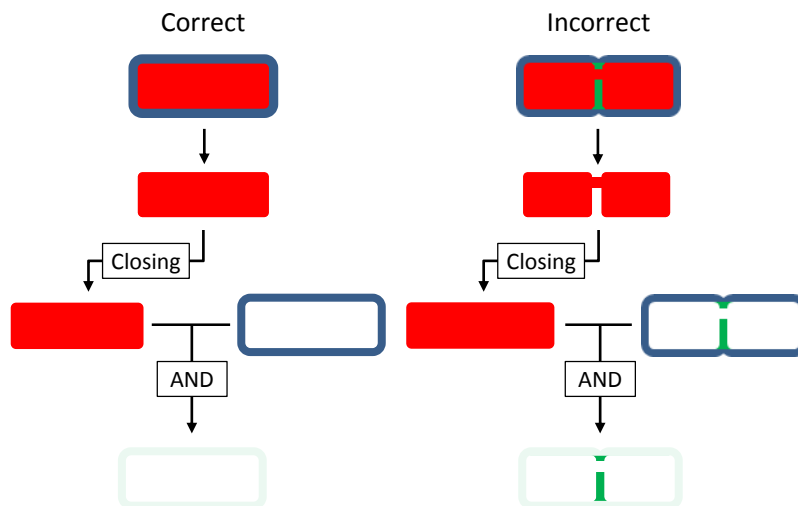
Parameter Settings



“max C” mainly affects a segmentation result in the brightest region. In this case, this parameter mainly affects segmentation results of epidermal cells. If “max C” is too low, some over-segmentation might occur. If “max C” is too high, small cells (e.g. guard cells) might be under-segmented because the segment validation system cannot detect under-segmented cells that have very small **inner structure** (see below).

“min C” mainly affects a segmentation result in the darkest region. In this case, this parameter mainly affects segmentation results of mesophyll cells. If “min C” is too low, some over-segmentation might occur, but the over-segmentation should be suppressed if “ValidTH” is set to a realistic value. If “min C” is too high, under-segmentation should occur.

“ValidTH” mainly affects a segmentation result in regions except for the brightest one. In this case, this parameter mainly affects segmentation results of mesophyll cells. Even if “ValidTH” is too low, it should not affect results significantly when “min C” is set to a realistic value. If “ValidTH” is too high, under-segmentation should occur because the segment validation system cannot detect under-segmented regions as incorrect segments.



Validation of extracted segments.

Schematics of the validation method, showing the major steps by which segments are classified as correct or incorrect based on their extracted **inner structures** (green).