

JAROSŁAW GOCLAWSKI, JOANNA SEKULSKA-NALEWAJKO

Wydział Elektrotechniki Automatyki Informatyki i Elektroniki
Politechniki Łódzkiej

KOMPUTEROWE PRZETWARZANIE I ANALIZA OBRAZÓW W OCENIE ZJAWISK ZACHODZĄCYCH W KOMÓRKACH I TKANKACH ROŚLIN

Recenzent: **dr hab. inż. Włodzimierz Mosorow**

Maszynopis dostarczono: 1. 10. 2010

Katedra Informatyki Stosowanej Politechniki Łódzkiej współpracuje z biologami z dwóch jednostek Uniwersytetu Łódzkiego, które zajmują się badaniami procesów fizjologicznych i zakłóceniami rozwoju roślin powodowanymi różnorodnymi czynnikami zewnętrznymi. Celem współpracy jest opracowanie metod automatycznego pomiaru wybranych objawów reakcji roślin na stres przy zastosowaniu technik przetwarzania i analizy obrazu. Rozważano obrazy barwne przedstawiające wybrane reakcje zarówno na poziomie komórkowym, np. w postaci anomalii mitozy i uszkodzeń chromosomów, jak i na poziomie tkankowym jako przebarwienia oraz jako zmiany topologii i morfologii różnych części roślin. W pracy zaprezentowano przegląd metod segmentacji i rozpoznawania obrazów opracowanych przez autorów w celu automatyzacji pomiarów tych reakcji obserwowanych u roślin w skali mikro- i makroskopowej.

1. WPROWADZENIE

Dynamiczny rozwój technologii komputerowych wywiera istotny wpływ na rozwój metod obserwacji i pomiaru w naukach biologicznych.

W niniejszym artykule zaprezentowano wybrane zagadnienia biologiczne rozwiązywane przez autorów metodami przetwarzania i analizy obrazu. Taki zakres tematyki prac w Katedrze Informatyki Stosowanej PŁ zaistniał w związku z intensywną współpracą z biologami z dwóch jednostek Uniwersytetu Łódzkiego: Katedrą Cytologii i Cytochemii oraz Katedrą Fizjologii i Biochemii Roślin. Dzięki zastosowaniu metod komputerowych rozwiązywane są konkretne zagadnienia wynikające z badań statutowych tych jednostek, związane z eksperymentalną hodowlą roślin w warunkach stresu biotycznego i abiotycznego. Wyniki badań biologicznych wnoszą istotny wkład w poznanie reakcji fizjologicznych roślin hodowlanych na różnorodne szkodliwe czynniki powszechnie spotykane w środowisku, w tym zanieczyszczenia metalami ciężkimi, promieniowanie jonizujące i różnego typu patogeny.

Katedra Cytologii i Cytochemii bada głównie zagadnienia wzrostu i rozwoju roślin na poziomie komórkowym. Z tą jednostką realizowano tematy:

- pomiar zawartości DNA poprzez cytometrię komputerową,
- wyznaczanie poziomu syntezy DNA komórek roślinnych znakowanych radiograficznie,
- wyznaczanie indeksu mitotycznego w populacji komórek cebuli,
- badanie cech morfologicznych i topologii komórek tytoniu typu BY-2.

Druga jednostka - Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin zajmuje się badaniem odporności roślin na stresy środowiskowe i choroby infekcyjne. W ramach współpracy realizowane były tematy:

- ocena zmian topologicznych i morfologicznych korzeni pszenicy pod wpływem abiotycznych czynników stresu,
- ocena stopnia infekcji jabłoni zarazą ogniową na podstawie badania zmian w blaszkach liściowych.

W związku ze specyfiką obiektów biologicznych oraz specjalistyczną preparatyką stosowaną przez biologów badane obrazy wymagały indywidualnego podejścia w zakresie segmentacji, wyznaczania cech i rozpoznawania obiektów. Autorzy zaproponowali nowe podejście między innymi do wykonywania obliczeń indeksu mitotycznego, rozpoznawania topologii korzeni, czy oceny ilościowej zmian chorobowych roślin.

2. OPRACOWANE METODY IDENTYFIKACJI I POMIARU STUKTUR KOMÓRKOWYCH I TKANKOWYCH

Zależnie od skali obiektów analizom poddawane były obrazy pobierane spod mikroskopu, ze skanera lub z bezpośredniej fotografii makroskopowej. Obrazy mikroskopowe pozyskiwano za pomocą systemu akwizycji składającego się z mikroskopu optycznego Olympus CH20 pracującego w jasnym polu, podłączonej do trinokularu kamery CCD z interfejsem USB i komputera osobistego PC. Pracowano na obrazach o rozmiarach 786×576 (PAL) lub 1280×1024 piksele.

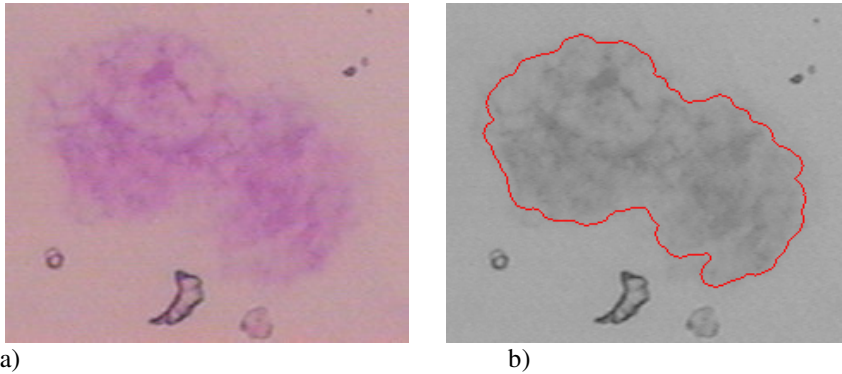
Rejestrację obrazów makroskopowych części roślin prowadzono przy użyciu cyfrowego aparatu fotograficznego lub popularnych skanerów biurkowych i ich firmowego oprogramowania dostarczającego plików obrazowych w formacie JPG. Obrazy były skanowane z rozdzielczością 300 lub 600 dpi. Rozpatrywane metody przetwarzania i analizy obrazu realizowane były jako zamknięte aplikacje C++ (Builder) lub otwarte oprogramowanie dla środowiska MATLAB w postaci funkcji interpretowanych języka M lub skompilowanych w języku C++ do postaci MEX plików.

2.1. Pomiar zawartości DNA poprzez cytometrię komputerową

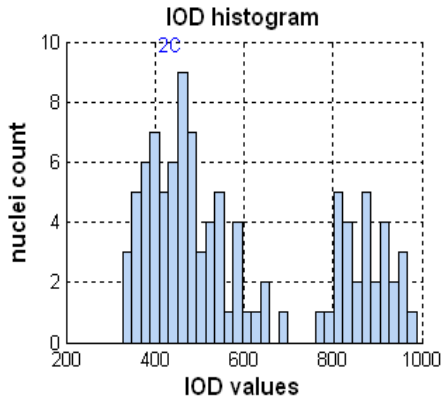
Pomiary DNA metodami cytometrycznymi mają duże znaczenie w medycynie i biologii przy diagnozowaniu złośliwych nowotworów, wykrywaniu patologii tkanek, obecności antygenów a także różnego typu zakłóceń i anomalii w procesach wzrostu roślin [25]. Pozwalają także różnicować plemniki na determinujące płęć męską lub żeńską ze względu na inną zawartość DNA w ich jądrach. Diagnostyka opiera się o badanie odchyień od spodziewanego kształtu histogramu całkowitej gęstości optycznej badanej populacji jąder komórkowych. Całkowita gęstość optyczna jądra komórki IOD (*Integrated Optical Density*) odniesiona do gęstości jądra wzorcowego o znanej masie DNA stanowi miarę zawartości DNA. Dokładność wykonywanych pomiarów IOD determinuje przede wszystkim etap segmentacji obrazów jąder. Mianem segmentacji określa się proces podziału pola obrazu na podobszary jednolite ze względu na wybrane kryteria rozróżniające.

Metody segmentacji jąder komórkowych w celu pomiaru DNA znane z literatury [5, 25] dotyczą obrazów mikroskopowych zbieranych przy małych powiększeniach (10× lub 20×) i zawierających wiele jąder w ramach pojedynczego kadru. Preparaty przygotowywane są zazwyczaj w taki sposób, że nie występują w nich jądra sklejone lub nakładające się na siebie. Nie zawierają również istotnych artefaktów tła, które mogłyby być mylnie zaliczone jako obiekty podlegające pomiarowi.

Podczas pomiarów wykonywanych przez autorów zastosowano obiektywy o dużych powiększeniach (100×) i lokalne progowanie, unikając w ten sposób wyrównywania nierównomierności oświetlenia (rys. 1).



Rys. 1. Obszar zainteresowania (ROI) wokół wybranego jądra komórkowego:
 a) obraz DNA jądra utrwalonego metodą Feulgena wraz z otaczającymi artefaktami,
 b) profil jądra zidentyfikowany w wyniku segmentacji komputerowej



Rys. 2. Przykładowy histogram IOD badanej populacji 100 jąder glonów

Autorzy dysponowali próbkami z międzywęzłowymi komórkami glonów i komórkami cebuli zanurzonymi w balsamie kanadyjskim, które zawierały wiele artefaktów w tle, takich jak ściany komórkowe lub, w przypadku glonów, pozostałości okrzemek.

Uwzględnienie tych zjawisk w autorskim algorytmie segmentacji [6] umożliwiło badanie wszystkich próbek bez ich wstępnej selekcji, co potencjalnie poprawia obiektywizm uzyskiwanych wyników pomiaru. Na rysunku 2 przedstawiono przykładowy wynik działania proponowanego algorytmu

pomiarowego – rozkład gęstości optycznej IOD badanej populacji jąder komórkowych glonów.

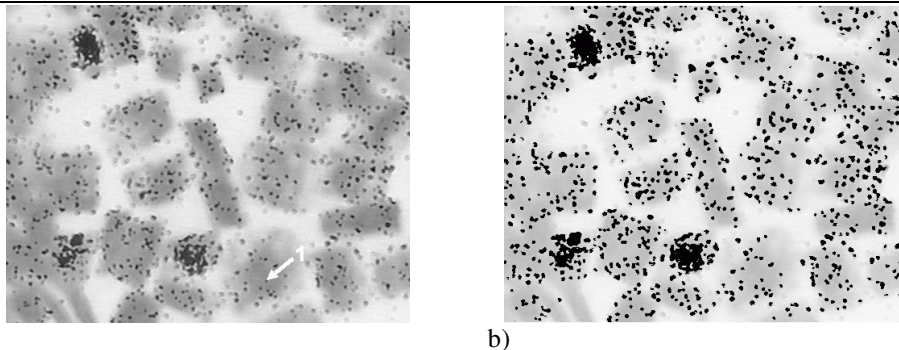
2.2. Wyznaczanie poziomu syntezy DNA komórek roślinnych znakowanych radiograficznie

Badania poziomu syntezy DNA stanowią podstawową metodę oceny metabolizmu komórek i ich zdolności reprodukcyjnych. Zmiany ilości DNA w populacji komórek mogą świadczyć o działaniu zewnętrznych czynników, które hamują ich wzrost. Synteza DNA polega na cyklu przemian biochemicznych, w efekcie których odpowiednie związki wbudowywane są w łańcuch kwasu dezoksyrybonukleinowego. W eksperymencie zwanym autoradiografią jako budulec związków nukleinowych wykorzystywane są izotopy (np. tryt ^3H), które podawane są w trakcie hodowli. Następnie miejsca włączenia izotopu wykrywa się dzięki naświetlaniu emulsji fotograficznej, nałożonej na skrawki sporządzone z inkubowanej tkanki. Emulsja ta wytwarza ziarna metalicznego srebra w miejscach naświetlania, widoczne w postaci ciemnych plamek na obrazach autoradiogramów uzyskanych w świetle przechodzącym mikroskopu (rys. 3).

Metodą tą badane są różnorodne tkanki zwierzęce i roślinne, w których zachodzi intensywny podział komórek np. tkanka merystematyczna systemu korzeniowego roślin [4].

Nie opracowano dotąd w dziedzinie badań radiogramów jednolitej metody, powszechnie uznanej i stosowanej do wszystkich typów znakowanych preparatów tkankowych. Podstawowe ograniczenie stanowi etap segmentacji obrazu. Jej przebieg i zastosowane metody są bowiem uwarunkowane wieloma czynnikami, takimi jak struktura materiału biologicznego poddanego obserwacji, metody preparatyki czy technika obserwacji mikroskopowej.

Autorzy opracowali oryginalną metodę komputerową zliczania ziaren znacznika dla komórek merystemu korzeniowego rzodkiewki (*Raphanus sativus* L.) wybarwionych metodą Feulgena. Została ona sprawdzona dla preparatów zawierających oderwane fragmenty cytoplazmy i jąder oraz niespecyficznie powstałe ziarna srebra, które należało wyeliminować z rozważań [7, 16]. Metoda dokonuje oceny poziomu aktywności DNA zliczając zarówno pojedyncze ziarna radioznacznika jak i ich skupienia (aglomeracje), które przeliczane są za pomocą pola powierzchni tzw. ziarna referencyjnego. Powierzchnia ziarna referencyjnego najczęściej stanowi średnią powierzchnię obliczoną dla wybranego pola ziaren znacznika uważanych za pojedyncze lub jest przyjmowana arbitralnie przez biologa.



Rys. 3. a) Obraz źródłowy komórek korzenia rzodkiewki (oryginalnie kolorowy), 1-wskazuje przykładowy, niewielki obiekt znacznika zachowany w pełni po segmentacji, b) obraz wynikowy z zaznaczonymi na czarno wykrytymi skupiskami ziaren srebra

Na rysunku 3 pokazano przykładowy obraz oznaczonych radiograficznie komórek rzodkiewki i wynik rozpoznawania ziaren znacznika za pomocą omawianego algorytmu.

Dla oceny syntezy DNA brane były pod uwagę jedynie ziarna występujące na tle jąder komórkowych, świadczące o wewnątrzkomórkowej lokalizacji izotopów promieniotwórczych wiązanych przez komórki w procesie syntezy DNA. Ilości znaczników i zajmowane przez nie pola można mierzyć poprzez analizę dwuwymiarowego obrazu preparatu obserwowanego w mikroskopie, ponieważ izotopowe znakowanie preparatu ma charakter procesu powierzchniowego. Słabiej wyróżnialne pod względem jasności, niewielkie ślady znakowania mogą znajdować się tuż pod powierzchnią jąder, nieco głębiej od pozostałych obiektów.

Aby przeprowadzić segmentację obrazu badanego autoradiogramu należało wyznaczyć:

- obszar skupień znaczników na podstawie ich obniżonej jasności,
- obszar występowania jąder komórkowych na podstawie ich podwyższonej saturacji względem tła preparatu.

Poziom aktywności DNA komórek merystematycznych definiuje się jako [22, 23]:

- średnią ilość ziaren znacznika na powierzchni jednej komórki w badanej populacji lub
- całkowitą, wyliczoną ilość ziaren znacznika odniesioną do całkowitej powierzchni wszystkich komórek (jąder) wyrażonej w jednostkach powierzchni tych ziaren (lub w jednostkach fizycznych).

Do oceny umownej ilości ziaren N_G zastosowano przeliczniki opisane równaniami (1) i (2).

$$N_G = (C_G)_{a \leq a_L} + \left(\frac{A_G}{a_{REF}} \right)_{a > a_L}, \quad (1)$$

gdzie: A_G – całkowite pole powierzchni ziaren znacznika, a_{REF} – pole powierzchni ziarna referencyjnego, a , a_L – zmierzona i graniczna wartość pola dla pojedynczych ziaren, C_G – ilość pojedynczych ziaren znacznika.

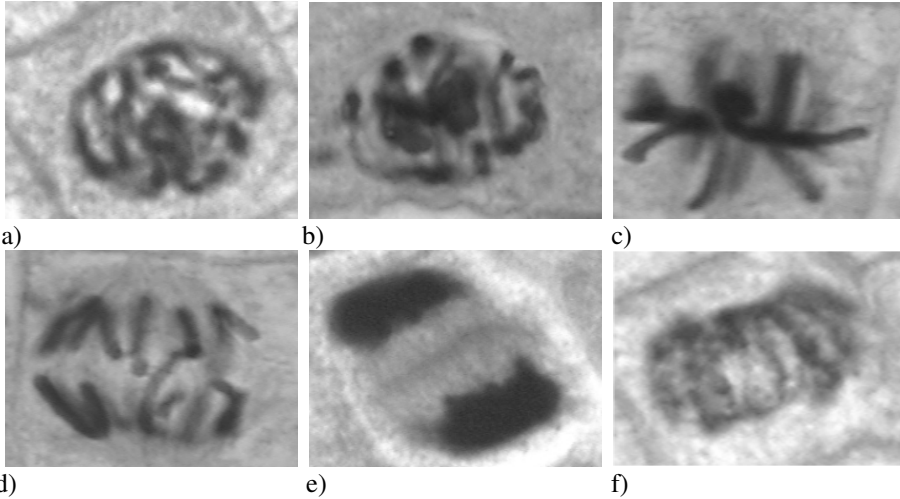
$$N_G = \frac{\log \left(1 - \frac{A_G}{A_N} \right)}{\log \left(1 - \frac{a_{REF}}{A_G} \right)}, \quad (2)$$

przy czym: A_N – całkowite pole powierzchni badanych komórek, A_G , a_{REF} – jak w równaniu (1).

Sposób 2 zawiera statystyczną korektę uwzględniającą nakładanie się ziaren. Opracowana metoda segmentacji zapewnia wyznaczenie zarówno ilości, powierzchni poszczególnych ziaren (skupień ziaren) jak i całkowitego pola powierzchni wszystkich badanych komórek i stanowi podstawę do określenia stopnia aktywności DNA w badanej serii autoradiogramów.

2.3. Wyznaczanie indeksu mitotycznego w populacji komórek cebuli

Mitoza jest procesem przemian w jądrze komórkowym i cytoplazmie komórek somatycznych organizmów, zmierzającym do ich podziału i wytworzenia komórek potomnych. Najważniejsze przeobrażenia w trakcie mitozy zachodzą w jądrze komórkowym, którego materiał nukleinowy ulega organizacji w chromosomy rozdzielane następnie między komórki potomne. Przy pomocy mikroskopu można zaobserwować to jako zmiany liczby składników jądra komórkowego, ich kształtu oraz położenia (rys. 4). Często proces mitozy jest zaburzany – następuje jej nienaturalne spowolnienie lub intensyfikacja, czemu towarzyszyć może także uszkodzenie chromosomów oraz nierównomierny ich podział między komórki potomne.



Rys. 4. Obrazy jąder komórkowych tkanki merystematycznej korzenia cebuli w kolejnych stadiach mitozy: a) wczesna profaza, b) późna profaza, c) metafaza, d) anafaza, e) wczesna telofaza, f) późna telofaza (pojedyncza komórka potomna)

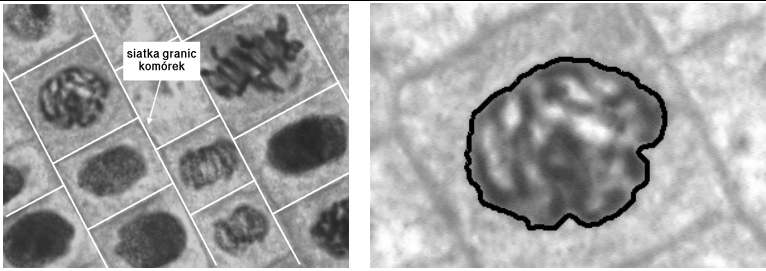
Obserwacje występowania podziałów komórkowych oraz ich etapów w populacji komórek prowadzone są w badaniach oceniających wpływ różnych czynników chemicznych lub promieniowania jonizującego na stan organizmów [13]. Elementarnym wskaźnikiem aktywności mitotycznej populacji komórek jest indeks mitotyczny MI wyrażający udział procentowy komórek podlegających mitozie w danej populacji (równanie (3)) [18].

$$MI = \frac{1}{|S|} \sum_i (C_i(S_i) \neq I), \quad (3)$$

gdzie: $C_i(S_i)$ – klasa przypisana i -temu elementowi $S_i \in S$ zbioru danych opisujących jądra komórek, I – klasa oznaczająca interfazę.

Wobec możliwości badania różnych tkanek, a także zmienności preparatyki, należy stosować różne metody automatycznej obróbki obrazu w szczególności w zakresie segmentacji. Autorzy opracowali metody segmentacji, ekstrakcji cech jąder komórkowych oraz klasyfikacji stadiów mitozy dostosowane do preparatów tkanki merystematycznej cebuli (*Allium cepa*).

Zaproponowano metodę wyznaczania kierunku podziału komórek w obrazie oraz wyodrębniania poszczególnych komórek [8, 9] (rys. 5a i b). Wykorzystuje ona wykrywanie krawędzi komórek przy pomocy detektora Canny'ego [3] przy równoczesnym maskowaniu krawędzi elementów jąder.



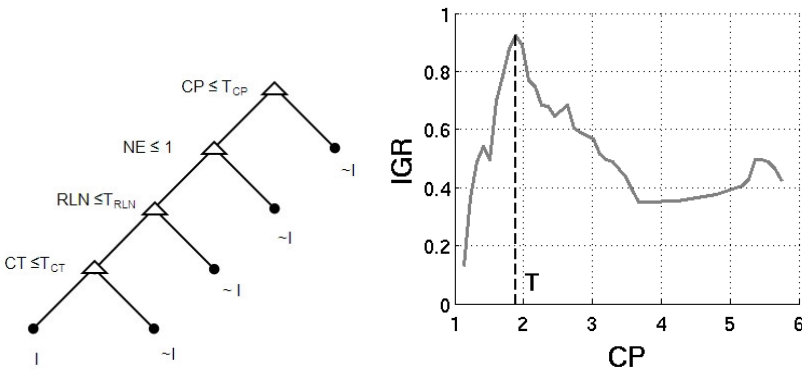
a)

b)

Rys. 5. Przykłady segmentacji obrazów: a) komórek merystematycznych cebuli, b) jednego z jąder komórkowych z tego preparatu

W drugim kroku tej metody przeprowadza się segmentację jąder komórkowych, które w zależności od stadium mitozy występują w postaci chromosomów lub chromatyny. Podstawę jej stanowi lokalne progowanie pod maską krawędzi elementów jądra w obszarze ROI każdej komórki.

W celu przeprowadzenia klasyfikacji faz mitozy jądra komórkowe opisano przy pomocy dobranej serii cech morfologicznych takich jak: liczba elementów jądra (NE), eliptyczność (EL), zwartość (CP) oraz tekstualnych: kontrast (CT), jednorodność (H), nierównomierność bieżącej długości (RLN). Cechy te zostały wykorzystane do budowy klasyfikatora faz mitozy w formie drzewa decyzyjnego opartego o algorytm C4.5 [17] z progami dyskryminacji wyznaczanymi na podstawie współczynnika wzmocnienia informacyjnego (IGR) (rys. 6).



a)

b)

Rys. 6. a) Proponowane drzewo decyzyjne dla klasyfikacji stadiów interfazy I oraz mitozy $\sim I$, b) przykładowy przebieg IGR dla CP na poziomie I

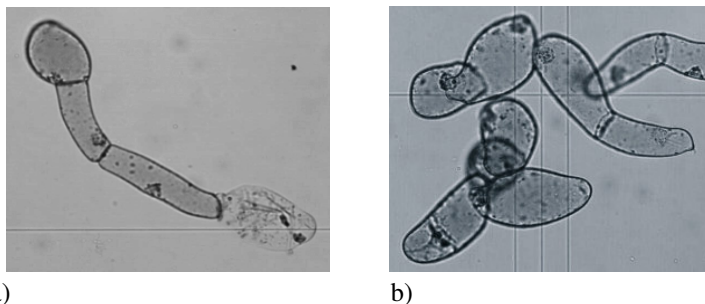
W celu weryfikacji poprawności algorytmu przeprowadzono wyznaczenie indeksu mitotycznego dla populacji 172 komórek cebuli. Szczegółowe wyniki pomiarów wraz z błędem estymatora i błędem klasyfikacji przedstawiono w

publikacji [9]. Wskazują one na możliwość skutecznego pomiaru indeksu mitotycznego populacji komórek z wykorzystaniem proponowanych parametrów.

2.4. Badanie cech morfologicznych i topologii komórek tytoniu typu BY-2

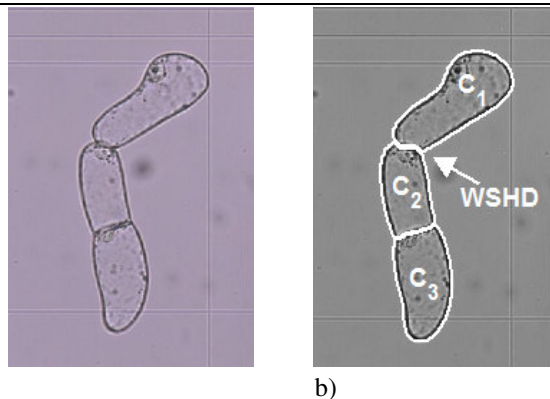
Pracownicy naukowcy Katedry Informatyki Stosowanej PŁ oraz Katedry Cytologii i Cytochemii UŁ opracowują nową metodę segmentacji obrazów mikroskopowych zawierających komórki tytoniu typu BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow 2) hodowane w zawieszynie [12].

Komórki roślinne typu BY-2 posiadają specyficzne cechy ułatwiające ich hodowlę takie jak szybki wzrost i łatwość synchronizacji cyklu komórkowego [16]. Linia BY-2 stanowi modelowy typ rośliny do badania stadiów przemiany komórek, ich fizjologii i oddziaływań międzykomórkowych. Dlatego w ostatnich latach obserwuje się duże zainteresowanie cytologów komórkami tytoniu BY-2. Dla celów badawczych przeprowadza się obliczenia rozmiaru, kształtu, ilości komórek oraz zliczenia długości łańcuchów komórek. Łańcuchy te formują się tuż po podziale komórki w fazie intensywnego namnażania. Niektóre z łańcuchów i pojedynczych komórek stykają się z sobą w preparacie lub skleją w aglomeracje (klastry) (rys. 7). Nie mają one charakterystycznego kształtu elipsoidalnego i nawet nie tworzą obiektów wypukłych. Klasyczne metody automatycznej segmentacji komórek nie znajdują zastosowania w takim przypadku.



Rys. 7. Przykładowe fragmenty obrazów zawierające: a) łańcuch komórek tytoniu z martwą komórką na jednym z końców, b) sklejenie wielu komórek

Do chwili obecnej autorom udało się przygotować algorytm segmentacji odróżniający łańcuchy i pojedyncze egzemplarze komórek od ich sklejeń (rys. 7, 8). Poszczególne komórki w łańcuchach, zarówno oddzielnych jak i stykających się ze sobą, są efektywnie rozdzielane i identyfikowane. Eliminacja sklejeń odbywa się w oparciu o wykrywanie ich wielogąłęziowych szkieletów.



Rys. 8. a) Łańcuch komórek tytoniu stykający się z pojedynczą komórką, b) wynik segmentacji komórek opracowaną metodą WSHD (watershed) – wskazano miejsce przewężenia, gdzie użyto metody działów wodnych dla transformaty odległości obiektów od tła

Stykanie się łańcuchów identyfikowane jest poprzez wykrywanie ich przewężeń metodą działów wodnych (watershed) dla transformaty odległości od tła. Do separacji komórek łańcucha stosuje się metodę rozrostu wewnątrz tych komórek, aż do linii krawędzi brzegowych tworzonych przez ściany komórkowe.

Wyniki segmentacji proponowaną metodą dla populacji 130 komórek (25 obrazów) tytoniu BY-2 przedstawiono w (tabeli 1).

Tabela 1

Rezultat zliczania komórek z użyciem metody komputerowej analizy obrazów

N_{FR} – ilość obrazów	25
N_T – łączna ilość komórek (wartość odniesienia)	130
N_C – ilość komórek poprawnie wykrytych	123
N_M – ilość komórek nie wykrytych	7
N_F – ilość komórek fałszywie wykrytych	3
N_{CL} – ilość wykrytych sklejeń	18
e_E – błąd przeliczania komórek	- 3,1%
e_S – błąd segmentacji	7,7%

2.5. Badania systemu korzeniowego pszenicy

2.5.1. Pomiar długości korzenia

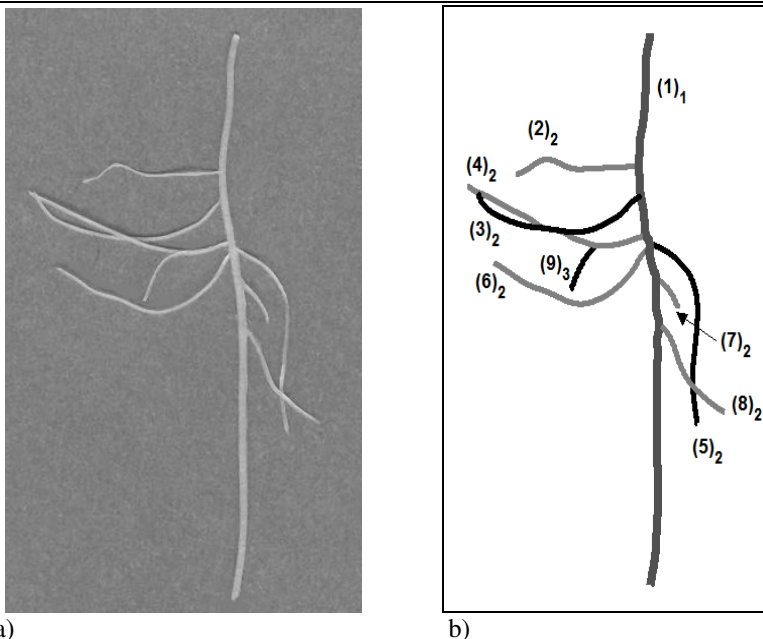
Naturalną reakcją roślin na niedobór związków pokarmowych lub szkodliwe działanie czynników biotycznych i abiotycznych jest zahamowanie wzrostu i rozwoju oraz zmiana topologii organów roślinnych. Do elementarnych metod oceny wzrostu rośliny należy badanie systemu korzeniowego, jednak oznaczenie wielu parametrów korzenia (długości, objętości, masy) metodami tradycyjnymi bywa utrudnione i uciążliwe. Na przykład stosowana do tej pory przez biologów metoda pomiaru długości korzeni wymaga mechanicznego oddzielenia ich od siebie, a następnie wyniki odczytywane są za pomocą linijki [24]. Taki sposób pomiaru powoduje zgubienie informacji o topologii całego systemu korzeniowego oraz jest obciążony tzw. błędami czynnika ludzkiego.

Oparta o analizę obrazu, automatyczna metoda pomiaru długości korzeni wiązkowych opracowana przez autorów [10, 20] wykorzystuje obrazy barwne RGB korzeni siewek pszenicy pobierane ze skanera. Badane systemy korzeniowe pochodzące z hodowli hydroponicznej nie wymagają wstępnego mechanicznego oczyszczania. Przygotowanie ich do przeprowadzenia analizy polega na:

- mechanicznym oddzieleniu od ziarniaka poszczególnych korzeni wiązki,
- ułożeniu tych korzeni obok siebie na szybie skanera, z kolorowym podłożem (niebieskie lub czerwone) o dużym nasyceniu barwy nie występującej na powierzchni tkanki.

Algorytm segmentacji obrazu w tej metodzie składa się z następujących kroków:

- przekształcenia obrazu wejściowego *RGB* do przestrzeni koloru *HCI* (*Hue*, *Chroma*, *Intensity*) [14],
- lokalnego progowania obrazu chrominancji *C* lub jednej z jej składowych (czerwonej albo niebieskiej), metodą Bernsena [1] z interpolacją progów; zmniejsza ono błędy segmentacji wynikające z półprzezroczystości cienkich bardzo uwodnionych korzeni.



Rys. 9. Wynik przetwarzania obrazu systemu korzeniowego pszenicy:
 a) zeskanowany obraz korzeni pszenicy, b) fragment systemu korzeniowego po
 identyfikacji: $(1)_1$ – korzeń 1. rzędu, $(2)_2$ - $(8)_2$ – korzenie boczne 2. rzędu,
 $(9)_3$ – korzeń 3.rzędu

Analiza obrazu po segmentacji obejmuje:

- szkieletyzację obrazu binarnego korzeni zakończoną przycinaniem szkieletu (*pruning*),
- odtwarzanie osobno struktury każdego z podsystemów korzeni wiązkowych jako drzewa grafu, poprzez śledzenie jego dróg składowych zgodnie z mechanizmem wzrostu korzeni od początku korzenia 1. rzędu po najdalsze korzenie boczne.

Metoda identyfikuje poprawnie zarówno korzenie nie splecione jak i przecinające się ze sobą (rys. 9a i b). Ze względu na wykorzystywanie płaskiego obrazu w odniesieniu do trójwymiarowej struktury drzewa korzeniowego nie jest możliwe rozróżnienie korzeni nakładających się na dłuższych odcinkach. Należy zapobiegać takiej sytuacji poprzez właściwe ułożenie korzeni przed pomiarem. W odróżnieniu od znanych technik komputerowych analizy korzeni rozważana metoda nie wymaga do pobierania obrazu specjalnego typu skanerów, ani umieszczania korzeni w kuwecie wypełnionej wodą.

Długości poszczególnych korzeni składowych są mierzone przez podpixelowe sumowanie długości odcinków odpowiednich linii łamanych szkieletu uprzednio wygładzonych splajnami 3. stopnia. Przykładowe wyniki

pomiarów korzeni głównych 7-dniowych siewek pszenicy przedstawiono w (tabeli 2).

Tabela 2

Zestawienie sumarycznych długości korzeni głównych pszenicy na poszczególnych obrazach przy zastosowaniu różnych metod pomiaru

Nr obrazu	Metody		
	manualna mm	Lebowitza mm	Autorska mm
1	261,0	270,94	257,35
2	263,0	268,61	254,32
3	246,0	254,03	241,35
4	220,5	233,25	217,95
5	288,0	295,78	281,65
6	413,0	433,90	409,92
7	406,0	421,07	399,03
8	481,0	497,81	470,69
9	441,0	456,85	431,63
10	466,0	481,55	454,44

W metodzie autorskiej uzyskano wyniki zbliżone do rezultatów manualnych i lepsze niż w komputerowej metodzie Lebowitza [15] operującej gorszymi przybliżeniami linii środkowej korzeni.

2.5.2. Analiza przebarwień

Ekspozycja roślin na nikiel powoduje pojawienie się na korzeniach achromatycznych przebarwień. Ponadto w badaniach reakcji roślin na czynniki stresowe występujące w środowisku często stosuje się metody barwienia przyżyciowego prowadzące do wybarwienia korzeni np. na kolor czerwony (rys. 10). W związku z tym w trakcie skanowania zastosowano kolorowe podłoże o wysokim stopniu nasycenia barwą niebieską, kontrastującą z kolorem przebarwień korzeni.

W wyniku serii eksperymentów opracowano komputerową metodę wyliczania indeksu przebarwień achromatycznych D_I rozumianego jako stosunek łącznego pola powierzchni przebarwień A_D do całkowitego pola A_R badanych korzeni (równanie (4)), obecnych na jednym obrazie lub w pewnej ich populacji [11].

$$D_I = \frac{A_D}{A_R}. \quad (4)$$

Do oszacowania poziomu błędów metody komputerowej zastosowano manualne zliczanie przez specjalistę pikseli zdrowej i przebarwionej tkanki na obrazie korzeni.



Rys. 10. Fotografia systemu korzeniowego pszenicy zmienionego pod wpływem działania nikielu (Ni). Plamy widoczne na korzeniu zostały uwidocznione po barwieniu przeżyciowym na wykrywanie ligniny

Objętościową (wagową) proporcję tkanki przebarwionej pod wpływem stresu i tkanek zdrowych tradycyjnie wyznacza się kosztownymi i czasochłonnymi metodami biochemicznymi. Wyniki automatycznego pomiaru indeksu przebarwień achromatycznych mogłyby zastępować metodykę biochemiczną po ustaleniu typu zależności i odpowiednich przeliczników.

Proponowany sposób wyznaczania D_I ze skanowanego obrazu wymaga takiego samego przygotowania korzeni jak przy pomiarze ich długości. Identyczny jest także etap segmentacji prowadzącej do uzyskania obrazu binarnego (maski) wszystkich korzeni obejmującej obszary wewnętrznych przebarwień oraz szkieletu (linii środkowych) tych korzeni.

Aby wydzielić pola A_D ciemnych przebarwień achromatycznych przeprowadza się dodatkową segmentację wewnątrz maski korzeni. Składa się ona z następujących etapów:

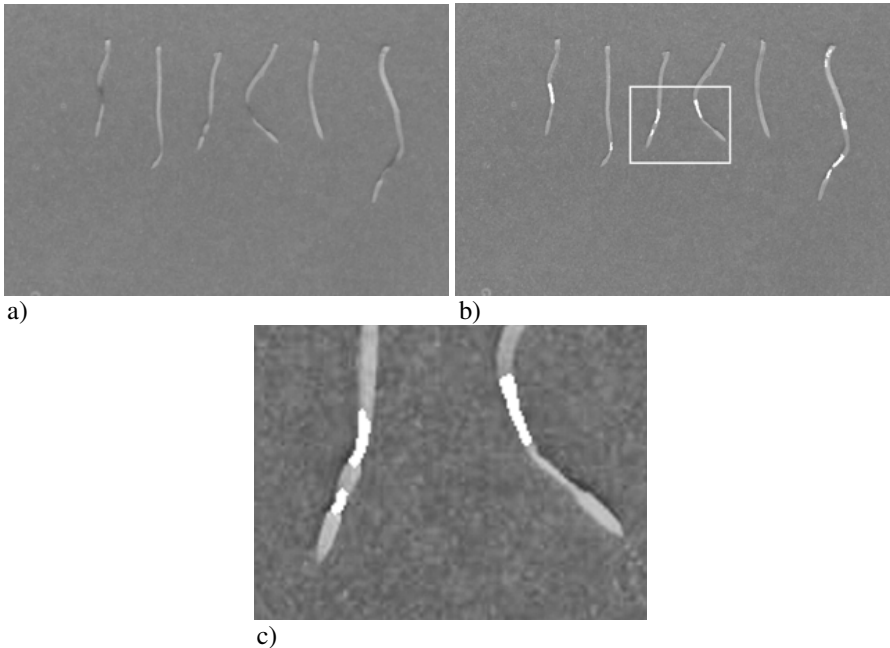
- próbkowania szkieletu korzeni z odpowiednio dobranym krokiem,
- określenia lokalnego okna W_k wokół każdego z punktów próbkowania,
- lokalnej binaryzacji metodą rozmytych c-średnich w obrębie maski korzeni i wewnątrz każdego z okien W_k ; wyniki binaryzacji są uśredniane w zakresie nakładających się okien,
- eliminacji z klasy przebarwień achromatycznych ciemniejszych pikseli z zabarwieniem tła (np. niebieskie).

Wykorzystywana metoda rozmytych c-średnich (FCM) [2] minimalizuje niepewność co do przynależności każdego piksela do klasy normalnej albo

przebarwionej tkanki korzeniowej. Jej realizacja w rozpatrywanym przypadku oznacza iteracyjny proces poszukiwania w każdym z okien lokalnych W_k minimum funkcji celu podanej w równaniu (5).

$$J_M = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M u_{ij}^m \|d_i - v_j\|^2, \quad (5)$$

gdzie N to liczba pikseli, $M=2$ – ilość klas jasności, $m \geq 1$ jest parametrem „rozmycia”, u_{ij} opisuje stopień przynależności wartości d_i piksela do klasy j , v_j stanowi środek klasy, a $\| \cdot \|$ przedstawia normę wyrażającą odległość między wartością piksela i środkiem jego klasy. Na rysunku 11a przedstawiono zeskanowany obraz korzeni pszenicy, a na rysunkach 11b i c w postaci białych plam nałożono wyniki identyfikacji przebarwień uzyskane omawianą metodą analizy obrazu.



Rys. 11. a) Zeskanowany obraz białych korzeni pszenicy na niebieskim podłożu z widocznymi ciemnymi, achromatycznymi przebarwieniami pod wpływem niklu, b) wynik rozpoznawania przebarwień w formie białych pól nałożonych na obraz, c) zawartość okienka z obrazu b) w powiększeniu

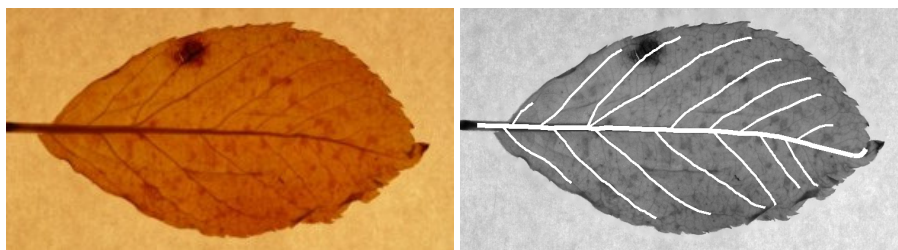
2.6. Analiza symptomów zainfekowania liści jabłoni zarazą ogniową

Zaraza ogniowa stanowi bardzo niebezpieczną chorobę bakteryjną roślin wywoływaną przez bakterię *Erwinia amylovora*. Powoduje ona znaczne straty gospodarcze przy uprawie jabłoni i gruszy oraz podlega obowiązkowi zwalczania w krajach Unii Europejskiej, zwłaszcza na materiale rozmnożeniowym roślin. Porażone pędy i liście brunatnieją, a później czernieją lecz utrzymują się na drzewie, co przypomina efekt spalenia (stąd nazwa choroby). W opracowaniu znajduje się algorytm oceny stopnia infekcji zarazą ogniową przy wykorzystaniu metod analizy obrazu zakażonych i odpowiednio spreparowanych liści jabłoni. Reakcją liści jabłoni na stres spowodowany infekcją jest pojawienie się obszarów wydzielania nadtlenku wodoru (H_2O_2). Po ich wybarwieniu diaminobenzzydynam (DAB) w tych miejscach pojawiają się brązowe plamy, ciemniejsze od pozostałych części blaszki liścia. Jako miarę stopnia zakażenia zaproponowano iloraz IF całkowitego pola powierzchni brązowych plamek H_2O_2 i łącznego pola powierzchni blaszek w badanej populacji liści o liczności N (równanie (6)).

$$IF = \frac{\sum_{i=1}^N A_{s,i}}{\sum_{i=1}^N (A_{b,i} - A_{v,i})}, \quad (6)$$

gdzie: $A_{s,i}$ – pole powierzchni plamek i -tego liścia, $A_{b,i}$ – pole powierzchni blaszki i -tego liścia, $A_{v,i}$ – pole powierzchni odjętej z obliczeń (żyłkowanie).

Spreparowane liście jabłoni były zanurzane w wodzie, a następnie fotografowane w rozproszonym świetle przechodzącym, co umożliwiło obserwację plamek po obu stronach liścia. Uwidoczniło także system żyłkowania liścia (w szczególności pierwszego i drugiego rzędu) posiadający odcień i barwę zbliżone do analizowanych plamek. Jego identyfikacja może być w przyszłości przydatna dla ustalenia zależności rozkładu powierzchniowego badanych plamek od bliskości sieci żyłek, które jako wiązki przewodzące mogą stanowić możliwą drogą transportu czynnika chorobowego.



a)

b)

Rys. 12. a) Obraz liścia jabłoni (od spodu) z utrwalonymi śladami H_2O_2 w postaci ciemnych plamek, b) ten sam liść z rozpoznanym systemem żyłkowania pierzastego (1. i 2. rzędu)

Żyłkowanie 1. i 2. rzędu powinno zostać wykryte w pierwszej kolejności i wyeliminowane z blaszki, aby umożliwić późniejsze, jednoznaczne wykrywanie plamek. Obecnie opracowano i przetestowano algorytm śledzenia pierzastego systemu żyłek liści jabłoni [21], działający w obecności plam – utrwalonych śladów infekcji (rys 12).

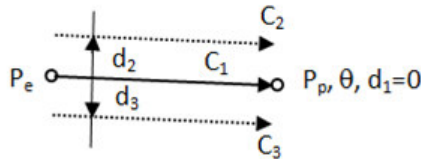
Algorytm ten wykonuje następujące zadania:

- konwertuje obraz barwny (RGB) (rys. 12a) do postaci poziomów jasności (luminancji),
- wykrywa ciemniejszą od tła blaszkę liścia poprzez progowanie obrazu metodą Otsu,
- rozpoznaje położenie szypułki liścia ułożonego zawsze poziomo od lewej krawędzi obrazu i buduje odcinek startowy śledzenia żyłki głównej,
- śledzi odcinkowo-liniowo żyłkę główną liścia w każdym kroku minimalizując funkcję kosztu $C(\theta)$ zaprojektowaną przez autorów (równanie (7), (rys. 13)),

$$C(\theta) = k_0 + k_1 C_1(\theta) - k_2 (C_2(\theta, d_2) + C_3(\theta, d_3)), \quad (7)$$

gdzie: k_0, k_1, k_2 – odpowiednio dobrane stałe, θ – kierunek predykcji, C_1, C_2, C_3 – składowe funkcji kosztu (średnie jasności wzdłuż 3 równoległych wektorów predykcji), d_2, d_3 – odległości równoległych wektorów predykcji.

- wykrywa odprowadzenia żyłek bocznych na liniach równoległych do głównej żyłki,
- śledzi każde z odprowadzeń bocznych (żyłki 2. rzędu) na tej samej zasadzie co żyłkę główną.



Rys. 13. Ilustracja symboli użytych w równaniu funkcji celu: $P_e P_p$ – główny wektor predykcji nowego kierunku śledzenia pod kątem θ , wyznaczający składową C_1 funkcji kosztu, d_i ($i=1,2,3$) – odległości towarzyszących wektorów predykcji, C_1, C_2, C_3 – pozostałe składowe funkcji kosztu nowego kroku

3. UWAGI KOŃCOWE

Zaprezentowana praca miała charakter przeglądowny, podsumowujący wyniki prac naukowych prowadzonych przez autorów w przeciągu ostatnich kilku lat. Wszystkie one miały na celu opracowanie nowych metod automatyzacji pomiarów w biologii z wykorzystaniem technik analizy obrazów. Tradycyjne badania ilościowe (np. chemiczne lub manualne) są długotrwałe, często kosztowne i zorientowane na wydobywanie informacji określonego typu. Ocena wizualna materiału biologicznego, nawet przez ekspertów, jest obciążona tzw. błędem czynnika ludzkiego wynikającym ze zmęczenia lub złudzenia optycznego. Komputerowa, ilościowa analiza obrazu pozwala na obiektywizację pomiarów, zwiększenie ich dokładności i zapewnienie powtarzalności. W omawianych zastosowaniach zazwyczaj jest ona uzupełniona wnioskowaniem statystycznym umożliwiającym odniesienie wyników pomiaru do badanej populacji obiektów. Uzyskanie poprawnych wyników takiej analizy wymaga zachowania ścisłego reżimu przygotowania próbek i starannego rozmieszczenia obiektów zainteresowania w polu widzenia, aby ograniczyć liczbę przypadków nierozpoznawalnych automatycznie i pozostawionych do rozstrzygnięcia przez operatora.

Obrazy makroskopowe rejestruje się najczęściej przy użyciu skanerów lub aparatów fotograficznych, mikroskopowe za pomocą kamer cyfrowych lub aparatów podłączonych do trinokularu. Należy w tym miejscu zwrócić uwagę, że do pełnej automatyzacji analiz mikroskopowych w dostatecznie dużym polu wymagany jest automatyczny napęd XYZ stolika mikroskopu piezoelektryczny lub pomocy silników krokowych.

W ramach analizy komputerowej obrazów biologicznych największe wyzwanie stanowi segmentacja obrazu. Najistotniejszym problemem dla algorytmów segmentacji jest brak deterministycznej powtarzalności rozmiarów i kształtów obiektów zainteresowania (można liczyć jedynie na statystyczną) oraz duże ilości artefaktów zawartych w materiale biologicznym lub powstałych na etapie preparatyki czy hodowli.

Niezależnie od przedstawionych wyżej problemów i ograniczeń metody cyfrowej analizy obrazów stanowią efektywny sposób ilościowej oceny materiału biologicznego tworzącej podstawę do wyciągania wniosków naukowych.

LITERATURA

- [1] **Bernsen J.:** Dynamic thresholding of grey-level images. Proceedings 8th International Conference on Pattern Recognition, 1986, pp. 1251-1255.
- [2] **Bezdek, J. C.:** Pattern Recognition with Fuzzy Objective Function Algorithms. Plenum Press, New York, NY, 1981.

- [3] **Canny J.:** A Computational Approach to Edge Detection. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, Vol. PAMI-8, No. 6, 1986, 679-698.
- [4] **Caro L. G.:** High-resolution autoradiography. Methods in Cell Physiology. Academic Press, New York and London 1964.
- [5] **Claeys A., Cornelis A., Kreckaert I., Coen H., Zukowski F., Smets G., Roels F.:** Fully Automated Measurements by Light Microscopy of Tissue Sections Using a Cellular Array Computer. Gegenbaurs morphol. Jahrbuch, 135, 1989, pp. 83-90.
- [6] **Goćlawski J., Anioł P.:** Selected segmentation methods applied for DNA image cytometry. . Proceedings of the IInd International Conference MEMSTECH' 2006, Lviv-Polyana 2006, pp. 125 – 130.
- [7] **Goćlawski J., Sekulska-Nalewajko J., Anioł P.:** Metoda segmentacji obrazów mikroskopowych komórek roślinnych znakowanych radiograficznie dla wyznaczenia poziomu syntezy DNA w jądrach komórkowych. Wydawnictwo Naukowo-Dydaktyczne Akademii Górniczo-Hutniczej. Vol 11, No. 3, 2007. pp. 75-87.
- [8] **Goćlawski J., Sekulska-Nalewajko J., Anioł P.:** The segmentation of meristematic Allium cell images and extraction of nuclei features for the purpose of mitotic index evaluation. Proceedings of the IVth International Conference MEMSTECH' 2008, Lviv-Polyana 2008, pp. 123-128.
- [9] **Goćlawski J., Sekulska-Nalewajko J., Anioł P.:** Metoda automatycznego wyznaczenia indeksu mitotycznego komórek cebuli z wykorzystaniem drzewa decyzyjnego. Wydawnictwo Naukowo-Dydaktyczne Akademii Górniczo-Hutniczej. Vol.12, No..3, 2008, , pp.641-656.
- [10] **Goćlawski J., Sekulska-Nalewajko J., Gajewska E., Wielanek M.:** Automatyczny pomiar długości korzeni siewek pszenicy z hodowli hydroponicznej przy wykorzystaniu metod przetwarzania i analizy obrazów. Wydawnictwo Naukowo-Dydaktyczne Akademii Górniczo-Hutniczej. Vol.13, No. 3, 2009, pp. 831-847.
- [11] **Goćlawski J., Sekulska-Nalewajko J., Gajewska E., Wielanek M.:** An automatic segmentation method for scanned images of wheat root systems with dark discolourations. International Journal of Applied Mathematics and Computer Science. Vol. 19, No 4, 2009, pp. 679-689.
- [12] **Goćlawski J., Sekulska-Nalewajko J., Anioł P.:** A segmentation method for microscope images of BY-2 tobacco cells in suspension cultures. IEEE Proceedings of the VI-th International Conference MEMSTECH'2010, Lviv-Polyana 2010, pp. 192-196.
- [13] **Kovalchuk O., Kovalchuk I., Arkchipov A, Telyuk P., Hohn B., Kovalchuk L.:** The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. Mutation Research 415: 1998, pp. 47-57.
- [14] **Lambert P., Carron T.:** Symbolic fusion of luminance-hue-chroma features for region segmentation. Pattern Recognition. Vol. 32, 1999, pp. 1857-1872.
- [15] **Lebowitz R. J.:** Digital image analysis measurement of root length and diameter. Environmental and Experimental Botany. Vol. 28, 1988, pp. 267-273.
- [16] **Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S.:** Tobacco BY-2 Cell Line as the „He-La” cell in the cell biology of higher plants. International Review of Cytology. Vol. 132, 1992, pp. 1-30.

-
- [17] **Ruggieri S.:** *Efficient C4.5*. IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering, Vol. 14, No. 2, 2002, 438-444.
- [18] **Santiago F. I., Cannen R. E. L.:** Mitotic index and chromosomal changes in *Allium cepa* as affected by an organophosphate pesticide, malathion. Philippine Journal of Science. Vol. 128 (1), 1999, 49-54.
- [19] **Sawicki W.:** Autoradiografia w badaniach cytochemicznych i histochemicznych, Post. Bioch. Vol. 257, 1963.
- [20] **Sekulska-Nalewajko J., Gocławski J.:** Segmentation and geometry identification of white roots in two-dimensional scanner images. IEEE Proceedings of the V-th International Conference MEMSTECH'2009, Lviv-Polyana 2009, pp. 73-76.
- [21] **Sekulska-Nalewajko J., Gocławski J., Gajewska E., Wielanek M.:** An algorithm to extract first and second order venation of apple-tree leaves stained for H₂O₂ detection. Wydawnictwo Naukowo-Dydaktyczne Akademii Górniczo-Hutniczej, 2010, - w druku.
- [22] **Shuette W. H., Chen S.S., Occhipinti S. J., Mujagic H.S., Shackney S.E.:** Automated Radiographic Grain Counting: Correction for Grain Overlap. National Cancer Institute, Bethesda, Maryland.
- [23] **Sklarew R. J.:** Simultaneous Feulgen Densitometry and Autoradiographic Grain Counting with the Quantimet 720D Image-Analysis System. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Vol. 30, No. 1, 1982, pp. 49-57.
- [24] **Smit A. L., Bengough A. G., Engels C., Van Noordwijk M., Pellerin S., Van de Geijn S. C.:** Root Methods: A Handbook. Springer Verlag, 2000.
- [25] **Wählby C.:** Algorithms for Applied Digital Image Cytometry. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, 896, 2003, pp. 1-75.