

УДК 630*811.1: 58.08

П.П. Силкин, Н.В. Екимова

Сибирский федеральный университет

Силкин Павел Павлович родился в 1969 г., окончил в 1994 г. Красноярский государственный университет, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры биотехнологии, заведующий лабораторией функционирования лесных экосистем Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета. Имеет около 50 печатных работ в области биофизики, дендрологии, дендрозкологии. e-mail: ppsilk@forest.akadem.ru; ppsilk@rambler.ru



Екимова Наталья Викторовна родилась в 1972 г., окончила в 1996 г. Иркутский государственный университет, кандидат биологических наук, докторант Сибирского федерального университета. Имеет около 40 печатных работ в области эволюционной биологии, дендрологии, дендрозкологии, популяционной генетики, биологии и стратегии выживания видов, сопряженной эволюции, экологического мониторинга, интродукции и реинтродукции, ландшафтного дизайна, сохранения биологического разнообразия Сибири. e-mail: ekimova_n@mail.ru



ИЗМЕРЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПАРАМЕТРОВ ГОДИЧНЫХ КОЛЕЦ ХВОЙНЫХ*

Рассмотрена система анализа изображений. Разработанные методы и программное обеспечение адаптированы для массовых измерений с последующей обработкой гистометрических параметров клеточной структуры годичных колец хвойных в разных режимах работы.

Ключевые слова: клеточные параметры, программное обеспечение, структура годичных колец, система анализа изображений.

Годичные кольца хвойных более чем на 90 % состоят из трахеид, несущих разную функциональную нагрузку в зависимости от зоны годичного кольца [4]. Тем не менее ряд трахеид является производной одной и той же инициальной клетки боковой меристемы, которая, согласно современным представлениям [2], является мишенью воздействия физических факторов окружающей среды. Это превращает ряд трахеид в набор ячеек памяти, содержащий информацию о климатических и экологических характеристиках вегетационного периода, которая развернута в пространстве годичного кольца, а следовательно, и во времени. Базис изучения клеточной структуры годичных колец хвойных для решения задач климатологии и экологии был заложен во второй половине прошлого столетия работами И.А. Терского, Е.А. Ваганова и их коллег [1, 3], показавших перспективность данного направления. Развитие технологий того времени накладывало отпечаток на аппаратное обеспечение клеточных измерений, которое создавалось как комбинация оптико-механических устройств, объединяя в себе оптический микроскоп отраженного света и моторизованный предметный столик, который с постоянной скоростью перемещал в поле зрения оператора образец древесины. Современное развитие цифровых ПЗС камер высокого разрешения, световой микроскопии и компьютерных технологий позволило подойти к исследованию структуры годичных колец древесных растений с новых позиций. В нашей работе рассматривается аппаратно-программный комплекс по измерению клеточных параметров, созданный автором и прошедший

* Работа поддержана грантом РФФИ 08-04-00296 и Аналитической ведомственной целевой программой «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010 годы)». «История климата Голоцена Евразии по дендроклиматическим данным», № 2.1.1/6131.

апробацию в течение последних 7 лет в Институте леса им. В.Н. Сукачева СО РАН и затем в Лаборатории функционирования лесных экосистем Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета.

Методы и материалы. Разработанная система анализа изображений (САИ) для измерения клеточных параметров годичных колец хвойных базируется на любом стандартном световом микроскопе проходящего света, оснащенного цифровой видеокамерой реального времени, которая может быть как черно-белой, так и цветной. Обязательным условием должно быть наличие стандартного программного обеспечения, позволяющего изображение с видеокамеры записывать на жесткий диск компьютера. Как правило, данная программа поставляется в комплекте с видеокамерой. Программный комплекс работает с любым микроскопом в описанной выше конфигурации, что делает его независимым от аппаратного обеспечения лаборатории, позволяя с минимальными финансовыми затратами организовать массовые измерения клеточных структур. Данный комплекс прошел апробацию на двух типах световых микроскопов фирмы «Карл Цейс» (Германия): Axioskop-20 с программой KS 300 и AxioImager.D1 с программой AxioVision-6. Это микроскопы разных поколений и разных возможностей [7]. Программный комплекс состоит из трех основных компьютерных программ, последовательно используемых оператором. Это программы SuperMoment2, Lineyka и ProcessorKR, написанные на языке компьютерного программирования Delphi фирмы «Борланд».

Рассмотрим процедуру измерения и программный комплекс более подробно. Для того чтобы было легко проводить измерения клеточных структур, необходимо получать как можно более контрастные, четкие изображения годичных колец, без посторонних деталей. Идеальный вариант соответствовал бы ситуации, когда люмен представлен абсолютно белым изображением, а клеточная стенка – абсолютно черным. Для увеличения контрастности обычно используются световые фильтры. К сожалению, этого явно недостаточно. Для превращения изображения годичного кольца в монохромное обычно выполняют его спектральную обработку на компьютере. Реально такой подход осуществим только для идеально сделанных изображений годичных колец, а значит, не приемлем для измерений больших массивов клеток. Например, даже маленькую тень у клеточной стенки программа превратит в элемент, что приведет к существенным погрешностям измерения ее толщины.

Необходимое качество изображения достигается двумя способами повышения его контрастности. Это окрашивание микротомных препаратов годичных колец с последующим использованием цветных светофильтров на микроскопе и увеличение светового потока от конденсора до такой величины, при которой он, проходя через люмен, превышает верхний рабочий порог ПЗС-матрицы видеокамеры, что приводит к их «ослеплению». При этом люмен выглядит равномерно-белым, без лишних деталей. В результате отпадает надобность в спектральной обработке изображения, оно имеет высокое качество и по виду приближается к монохромному. Реальное применение подобной методики показало ее высокую эффективность в работе (рис. 1).

Программа SuperMoment2 предназначена для формирования в автоматическом режиме изображений отдельных участков годичного кольца в одно общее, что в большинстве случаев невозможно сделать с приемлемым разрешением. SuperMoment2 работает в паре со стандартным программным обеспечением видеокамеры, с помощью которой оператор создает цепочку файлов с изображением

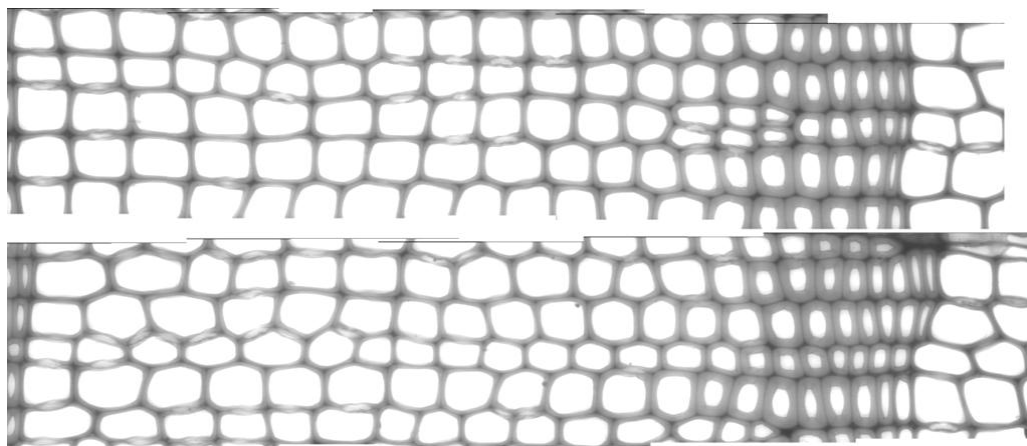


Рис. 1. Изображение годичного кольца сосны (*Pinus sylvestris* L.), сформированное из отдельных кадров в автоматическом режиме программой SuperMoment2

участков годичного кольца на жестком диске компьютера. Программа в автоматическом режиме считывает изображения с диска, определяет их смещения друг относительно друга по двум взаимно ортогональным осям и сохраняет изображения в виде одного файла с учетом их взаимного расположения. В зависимости от разрешающей способности видеокамеры и применяемого объектива одной линии фотографирования годичного кольца бывает недостаточно, и вся процедура повторяется для другой группы рядов клеток того же годичного кольца. Программа SuperMoment2 имеет удобный графический интерфейс, возможность ручного редактирования и позволяет оператору быстро фотографировать годичные кольца. Процесс анализа изображений и их склеивание занимают менее секунды для нескольких десятков кадров. Точность склеивания кадров фактически абсолютна для подавляющего числа годичных колец. На рис. 1 показан пример сформированного изображения годичного кольца программой SuperMoment2 с разрешением 0,26 мкм на точку изображения (объектив $\times 40$).

Программа Lineyka предназначена для измерения клеточных структур и может работать с любым стандартным графическим файлом, содержащим изображение годичного кольца. Основными измеряемыми параметрами являются радиальный размер люмена и двойная толщина клеточной стенки. В ручном режиме можно определять радиальные и тангентальные размеры клеток. Для фиксирования размеров точки изображения по осям XU служит процедура калибровки. В этих целях используется изображение шкалы объект-микрометра в горизонтальном и вертикальном положениях. В процессе калибровки устанавливается количество точек между минимальными делениями шкалы с расстоянием 10 мкм. Проводится многократное измерение различных участков калибровочной шкалы. Отношение измеряемого расстояния (10 мкм) к среднему количеству точек определяет размеры точки изображения. Калибровка выполняется отдельно для горизонтальной и вертикальной осей. Lineyka имеет два режима измерения – ручной и полуавтоматический. Их можно чередовать в любой последовательности. В ручном режиме оператор курсором компьютерной мыши задает концы отрезка, длину которого необходимо измерить. Программа запоминает эти координаты. Системой координат является сам прямоугольный рисунок. Ось X – верхняя горизонтальная, Y – левая вертикальная стороны рисунка. Начало координат лежит в левом верхнем углу рисунка. Расстояние между указанными точками рассчитывается по формуле:

$$r = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 C_x^2 + (y_2 - y_1)^2 C_y^2},$$

где x_1, y_1 и x_2, y_2 – координаты концов отрезка (число точек);
 C_x, C_y – размер точки изображения по осям X и Y .

Ручной режим измерения является вспомогательным и применяется в тех случаях, когда невозможно использовать полуавтоматический режим, например в случае некачественного изображения годичного кольца.

В полуавтоматическом режиме оператор с помощью курсора мыши проводит линию трассировки через группу клеток. Она задает точки, по которым будут проводиться измерения. Затем оператор включает процедуру построения профиля «яркости» точек вдоль этой линии. В результате получается профиль, изображенный на рис. 2. Он показывает скорее уровень «серости» точек, так как высокие значения профиля соответствуют более темным участкам. В результате пикам профиля соответствуют клеточные стенки, а толщине пика – толщина клеточной стенки. Далее оператор по профилю яркости задает линию, показывающую критический уровень яркости. Точки профиля, лежащие ниже этой линии, программа будет относить к люмену, выше – к клеточной стенке. После включения процедуры измерения программа вычисляет размеры люменов и толщину клеточных стенок, отображает их на самом рисунке в виде линий разного цвета. Например, размеры люмена программа показала линиями синего цвета, а толщину клеточной стенки – красного, что позволяет оператору судить о качестве измерения, а в случае ошибки подобрать другой критический уровень яркости и повторно провести измерения. Работа производится достаточно быстро и гораздо менее утомительна в отличие от полностью ручного режима. Наибольшую эффективность полуавтоматический режим показал для образцов сосны, годовые кольца которой содержат большие массивы клеток ранней древесины.

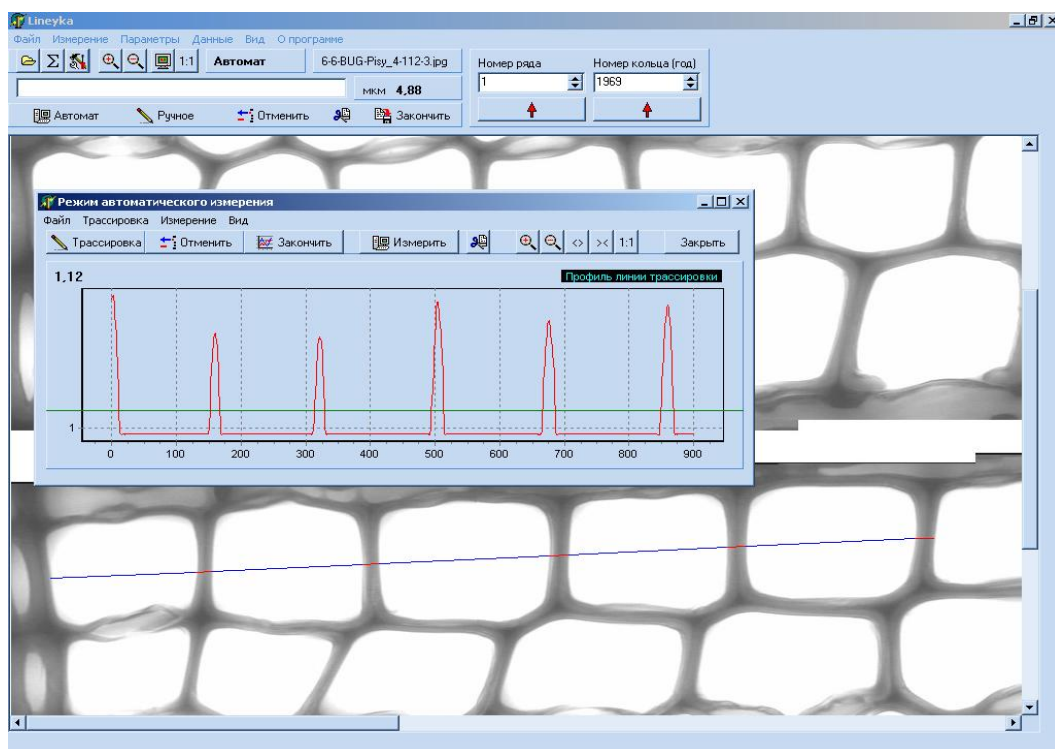


Рис. 2. Пример работы программы Lineyka в режиме полуавтоматического измерения люмена и толщины двойной клеточной стенки

Программа ProcessorKR создана для обработки измеренных клеточных параметров. Она рассчитывает хронологию ширины годичного кольца (ШГК) и позволяет в графическом виде проводить датировку массивов клеточных данных, используя мастерскую хронологию ШГК этого же образца, но построенную с помощью специализированного измерителя ширины колец. Данный подход позволяет исключить пропуск или двойное случайное измерение клеточной структуры годичного кольца, что неоднократно подтверждалось на практике. Программа ProcessorKR содержит модули процедуры стандартизации клеточных данных [3], коррекции пересчета размеров двойных клеточных стенок в одинарные для трахеид переходной зоны годичных колец [5], модули построения хронологий клеточных размеров разных видов [6].

В заключение следует отметить, что созданный программный комплекс для измерения клеточных параметров годичных колец хвойных обладает высокой адаптационной способностью как к аппаратному обеспечению, так и к виду и качеству образцов древесных растений. Наличие автоматических и полуавтоматических режимов работы позволяет оператору измерять большие массивы клеток в приемлемые сроки. Высокая эффективность разработанного комплекса, показанная на практике, базируется не только на использовании современных электронно-оптических систем и компьютерного оборудования, но и на взвешенном использовании автоматических режимов с учетом граничных условий их применения. Например, в установках программы SuperMoment2 определяется, что фотографирование годичного кольца должно происходить от ранней древесины к поздней. Оператором задаются границы пересечения соседних кадров, что позволяет сразу упростить алгоритм автоматического расчета смещения кадров относительно друг друга. В отличие от стандартного программного обеспечения автоматического панорамирования изображений зарубежных фирм результатом данного подхода явилась высокая точность совмещения кадров и скорость их обработки. Другим примером может служить возможность смешанного использования ручного и полуавтоматического режимов измерения клеточных структур одного ряда клеток, что позволяет легко адаптировать процесс к зоне годичного кольца и качеству его изображения, максимально увеличивая тем самым общую скорость измерения образцов. Система анализа изображений разработана для решения задач дендрохронологии, дендроклиматологии, дендрэкологии, а также оценки качества древесины и мониторинга состояния лесных экосистем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ваганов Е.А., Терсков И.А. Анализ роста дерева по структуре годичных колец. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1977. 93 с.
2. Ваганов Е.А., Шашкин А.В. Рост и структура годичных колец хвойных. Новосибирск: Наука, 2000. 214 с.
3. Гистометрический анализ роста древесных растений / Е.А. Ваганов [и др.] Новосибирск: Наука, 1985. 104 с.
4. Раздорский В.Ф. Анатомия растений М.: Сов. наука, 1949. 524 с.
5. Коррекция измерений толщины клеточной стенки в переходной зоне годичных колец лиственницы / П.П. Силкин [и др.] // Вестн. КГУ. 2005. №5. С. 85–88.
6. Силкин П.П. Многопараметрический анализ структуры годичных колец в дендрологических исследованиях: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: Красноярск: ИПК СФУ, 2009. 34 с.
7. www.zeiss.com

Поступила 07.12.09

P.P. Silkin, N.V. Yekimova
Siberian Federal University

Measurements of Cell Parameters of Coniferae Annular Rings

The authors have investigated the image analysis system. The developed methods and software adapted for mass measurements with subsequent processing of Coniferae annular rings cellular structure histometric parameters for different modes of work.

Keywords: cell parameters, software, annular rings structure, image analysis system.
