

Jarosław Goćławski*, Joanna Sekulska-Nalewajko*,
Ewa Gajewska**, Marzena Wielanek**

Automatyczny pomiar długości korzeni siewek pszenicy z hodowli hydroponicznej przy wykorzystaniu metod przetwarzania i analizy obrazów

1. Wprowadzenie

Badania systemów korzeniowych należą do elementarnych metod oceny wzrostu roślin. Długość korzeni oraz ich objętość i biomasa obliczane na podstawie objętości są najczęściej wykorzystywanymi parametrami, lecz ich ocena bywa utrudniona ze względu na konieczność wykonania pomiaru pracochłonnymi metodami.

W pomiarach długości korzeni metodami tradycyjnymi aby uzyskać poprawne wyniki konieczne jest mechaniczne oddzielenie od siebie poszczególnych korzeni np. za pomocą odcinania. Pomiar ten polega na odpowiednim rozciągnięciu korzenia i odczytaniu długości przy użyciu linijki [17]. Taki sposób pomiaru jest bardzo uciążliwy i czasochłonny zwłaszcza przy badaniu serii o dużej liczności. Dokładność badania zależy od jakości przyrządu pomiarowego i jest również ograniczona tzw. błędami czynnika ludzkiego. Metoda ta już na wstępie powoduje utratę danych o topologii całego systemu.

Metody pomiarowe oparte na przetwarzaniu obrazów [4, 7, 9, 16, 17] pomimo automatyzacji samego etapu pomiaru także mogą być procesem pracochłonnym ze względu na wymóg starannego przygotowania danych wejściowych. Wynik takiego badania jest jednak obiektywny i zachowuje jednakowe warunki pomiaru dla serii obrazów. Wiele komputerowych programów do analiz systemów korzeniowych także wymaga wcześniejszego rozdzielenia korzeni, w celu usunięcia efektu ich sklejanania i nakładania w obrazie [2]. Ponadto formułowane są specjalne procedury skanowania obrazu, narzucające stosowanie dodatkowych urządzeń współpracujących z wysokiej klasy skanerami i kuwet z cienką warstwą

* Katedra Informatyki Stosowanej, Politechnika Łódzka

** Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki

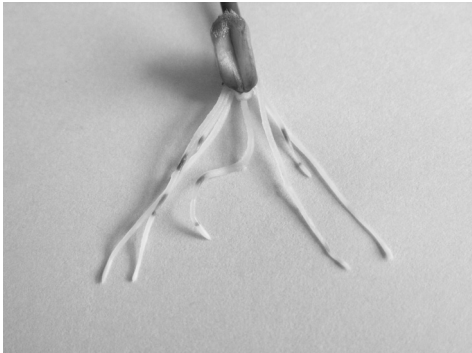
wody zapewniających równomierność oświetlenia i rozkładu korzeni. W komercyjne programach do badania systemów korzeniowych roślin jak *WinRHIZO* lub *Delta-T SCAN* używa się metod analizy i pomiaru w znacznej mierze stanowiących tajemnice handlowe [3, 15, 21]. Programy te są uważane za bardzo kosztowne i rozbudowane, ponieważ mają ogólne zastosowanie do różnych odmian systemów korzeniowych.

Na obecnym etapie rozwoju sprzętu komputerowego i technik programowania możliwe jest opracowanie w laboratoriach badawczych własnych algorytmów pomiaru systemów korzeniowych, przystosowanych do określonej klasy badanych obiektów. Autorzy zaproponowali własną metodę analizy i pomiaru długości systemów korzeniowych pszenicy z hodowli hydroponicznej. Algorytm proponowanej metody opracowano w środowisku *MATLAB* z użyciem bibliotek *Image Processing Toolbox*, i *Spline Toolbox* [19, 20]. W odróżnieniu od programów komercyjnych pozyskiwanie obrazu wymaga jedynie średniej klasy skanera.

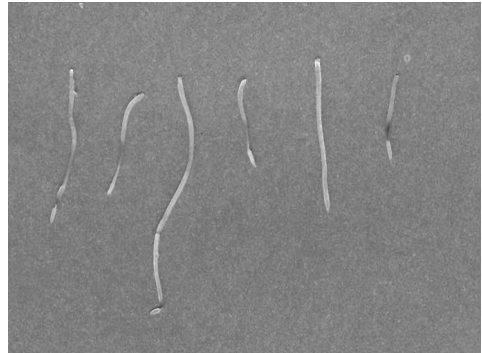
2. Materiał i metody

Materiał do pomiarów stanowiły 7-dniowe siewki pszenicy (*Triticum aestivum L.*) uprawiane w hodowli hydroponicznej w kontrolowanych warunkach temperatury (23°C) i oświetlenia (175 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperiod 16/8). Hodowle prowadzono na pożywce Hoaglanda [6] z dodatkiem 100 μM NiSO_4 . Serię kontrolną stanowiły siewki nietraktowane niklem. W odróżnieniu od serii kontrolnej, obecność niklu w podłożu wywoływała zmiany długości i topologii systemu korzeniowego oraz wystąpienie achromatycznych przebarwień korzeni.

a)



b)



Rys. 1. Przykładowe obrazy: a) wiązki korzeni pszenicy traktowanej niklem, z czerwonymi przebarwieniami po testach na wykrycie ligniny; b) odseparowanych korzeni pszenicy hodowanej w obecności niklu, z przebarwieniami achromatycznymi

Pszenica należy do roślin jednoliściennych z wiązkowym systemem korzeniowym, który składa się z kilku do kilkudziesięciu równorzędnych korzeni przybyszowych, określonych w pracy jako korzenie 1. rzędu, wytwarzających odgałęzienia boczne kolejnych rzędów. System korzeniowy młodej siewki pszenicy jest słabo rozwinięty; zawiera najwyżej

kilka korzeni 1. rzędu w wiązce wytwarzających odgałęzienia boczne, co najwyżej 2. i 3. rzędu. Aby zminimalizować ich wzajemne przesłanianie się w obrazie dwuwymiarowym, konieczne jest oddzielanie ich od ziarniaka i równomierny rozkład na szybie skanera. Ekspozycja roślin na nikiel powoduje pojawienie się na korzeniach achromatycznych przebarwień. Ponadto w badaniach reakcji roślin na stresy środowiskowe często stosuje się metody barwienia przyżyciowego prowadzące do wybarwienia korzeni np. na kolor czerwony (rys. 1). W związku z tym w trakcie skanowania zastosowano kolorowe podłoże o wysokim stopniu nasycenia barwą niebieską, kontrastującą z kolorem przebarwień korzeni. Materiał skanowano na standardowym skanerze z rozdzielczością obrazu 300 dpi oraz 24-bitową rozdzielczością koloru. Zdjęcia zapisywano w formacie JPEG.

Najwcześniejsze metody komputerowe pomiaru długości korzeni opierały się na zliczaniu przecięć z liniami siatki nakładanymi na obraz korzeni (*line-intercept*) [8, 9]. Większość obecnie stosowanych metod jest opartych na założeniu, że zeskanowany obraz musi być programowo przekształcony na obraz binarny linii środkowych (szkielet) korzeni. Pomiar długości dotyczy widocznych gałęzi tego szkieletu i polega na zliczaniu osobno pionowych, poziomych oraz diagonalnych par sąsiadujących pikseli (wg Lebowitza [12]). Odległości diagonalnych sąsiadów są dodawane ze współczynnikiem $\sqrt{2}$, wynikającym z budowy rastru obrazu. Taki pomiar jest obarczony błędami odwzorowania w rastrze zarówno korzeni, jak i ich szkieletów. Długości mierzone tą metodą są zwykle zawyżone, z uwagi na nakładanie drogi przejścia między kolejnymi pikselami. Różni badacze, w oparciu o rozważania geometryczne i eksperymenty, proponowali globalne współczynniki korekcyjne długości (1,12 1,21 1,34) w odniesieniu do sumy wszystkich pikseli gałęzi szkieletu. Opierają się one o założenia jednakowego prawdopodobieństwa każdego kierunku korzenia względem rastru. W celu uniezależnienia wyników pomiaru od tych założeń, do badania długości używano również obrazów powierzchni i krawędzi korzeni (*edge chord algorithm*) [4, 17].

3. Segmentacja obrazów systemu korzeniowego z uwzględnieniem przebarwień powierzchni

Standardowo w metodach segmentacji obrazu systemów korzeniowych wykorzystywana jest jedynie informacja o ich luminancji z 256 poziomami jasności [17]. Naturalnie białe korzenie oświetlone z przodu mogą być łatwo eksponowane na ciemnym podłożu.

Z uwagi na możliwość powstawania cieni preferuje się oświetlanie od tyłu, albo z obu stron, co wymaga sztucznego wybarwienia korzeni dla uzyskania właściwego kontrastu względem jasnego tła [13, 17]. Wybarwienie jest czasochłonnym procesem chemicznym, który ponadto może mieć wpływ na morfologię korzeni. W przypadku systemów korzeniowych z przebarwieniami powierzchni żadna z tradycyjnych metod nie jest wystarczająca do poprawnej segmentacji. Przebarwienia achromatyczne powstające pod wpływem metali ciężkich (np. nekrozy) oraz będące efektem barwienia przyżyciowego przebarwienia o wysokiej chromatyczności eliminują możliwość wyróżniania korzeni na obrazie poprzez określony zakres poziomów jasności (rys. 1a, b).

Autorzy opracowali własną metodę segmentacji dla korzeni siewek pszenicy, uwzględniającą istnienie przebarwień i wykorzystującą barwne obrazy RGB pobierane ze skanera. Metoda ta została szczegółowo opisana w pracy *An Automatic Segmentation Method for Scanned Images of Wheat Root Systems with Dark Discolourations* przyjętej do druku w czasopiśmie „International Journal of Applied Mathematics and Computer Science”. Przyjęto w niej dwuetapowe przekształcenie obrazu wejściowego I_{RGB} do przestrzeni koloru HCI (*Hue Chroma Intensity*) wybranej m. in. ze względu na niską wrażliwość szumową składowego obrazu chrominancji [11];

- Etap pierwszy – przekształcenie liniowe RGB do YC_1C_2 :

$$\begin{bmatrix} Y \\ C_1 \\ C_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1/3 & 1/3 & 1/3 \\ 1 & -1/2 & -1/2 \\ 0 & -\sqrt{3}/2 & \sqrt{3}/2 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} \quad (1)$$

gdzie:

Y – luminancja,

C_1, C_2 – składowe chrominancji odpowiednio czerwona i niebieska.

- Etap drugi – przekształcenie nieliniowe:

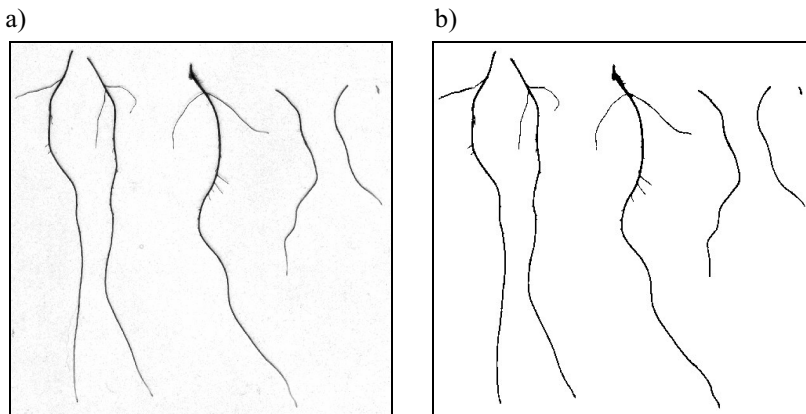
$$I = Y, \quad C = \sqrt{C_1^2 + C_2^2}, \quad H = \begin{cases} \arccos(C_1/C) & \text{gdy } C_1 > 0 \\ 2\pi - \arccos(C_1/C) & \text{gdy } C_1 \leq 0 \end{cases} \quad (2)$$

gdzie:

I – luminancja,

C, H – odpowiednio całkowita chrominancja i odcień koloru.

Na rysunku 2a pokazano przykładowy obraz składowej chrominancji $I_C(I_{RGB})$ badanego systemu korzeniowego.



Rys. 2. Obraz chrominancji I_C składowych systemu korzeniowego (a), obraz binarny tych samych korzeni po progowaniu metodą Bernsena (równ. (3)) (b)

Chrominancja pikseli (x, y) niebieskiego albo czerwonego podłoża przejawia się relatywnie dużymi wartościami $I_C(x, y)$ w porównaniu z pikselami korzeni, niezależnie od tego czy są jasne czy ciemne na oryginalnym obrazie I_{RGB} . Można więc zastosować progowanie obrazu I_C w celu wydobywania korzeni z otaczającego tła. Obszary przebarwień korzenia o wysokiej chrominancji są także uwzględniane, jeśli zawierają ograniczony zakres odcieni kolorów w dostatecznej odległości od tła na cyklicznej skali odcieni H . W obszarach wysokiej chrominancji obraz odcieni $I_H(x, y)$ można poddawać globalnemu progowaniu okienkowemu w celu złożenia z wynikiem progowania obrazu chrominancji. Piksele korzeni na obrazie chrominancji I_C typowo zajmują zaledwie kilka procent powierzchni obrazu. Histogramy tego obrazu są unimodalne i określone przez zmiany chrominancji tła. Chrominancje korzeni mogą podlegać zmianie na różnych odcinkach wskutek efektu półprzezroczystości cieńszych korzeni wypełnionych wodą, przez które prześwituje kolor tła (podłoża). Do wydobywania systemów korzeniowych zastosowano więc progowanie lokalne metodą Bernsena w połączeniu z biliniową interpolacją progów [1, 14].

$$t_C(W) = \frac{I_{Cm}(W) + I_{CM}(W)}{2}, \quad I_{CM}(W) - I_{Cm}(W) \geq \Delta C \quad (3)$$

gdzie:

- $t_C(W)$ – wartość proggu lokalnego Bernsena dla okna W ,
- W – okno progowania 31×31 pikseli,
- ΔC – granica minimalnego kontrastu przy wyliczaniu proggu,
- I_{Cm}, I_{CM} – odpowiednio minimalna i maksymalna wartość w oknie W .

Po wybraniu maski punktów o wysokiej chrominancji $I_C = I_{C \min}$, dla obrazu odcieni barw I_H :

$$I'_H = \begin{cases} I_H & \text{gdy } I_C \geq I_{C \min} \\ 0 & \text{gdy } I_C < I_{C \min} \end{cases} \quad (4)$$

można przeprowadzić w jej obrębie globalne progowanie metodą Otsu [14], w wybranym przedziale odcieni $[H_1, H_2]$. Ostateczny wynik segmentacji stanowi logiczną sumę obrazów binarnych z równań (3) i (4):

$$I_B(x, y) = T_C(I_C) \cup T_{H_1, H_2}(I'_H) \quad (5)$$

gdzie:

- T_C – operator Bernsena na obrazie I_C ,
- T_{H_1, H_2} – operator globalnego progowania okienkowego I'_H w przedziale $[H_1, H_2]$ odcieni przebarwień,
- I_B – obraz wynikowy segmentacji.

Aby dołączyć przebarwienia chromatyczne zwykle wystarcza wyprogować obraz składowej czerwonej chrominancji I_{C1} dla tła niebieskiego albo składowej niebieskiej I_{C2} w przypadku tła czerwonego (równ. (1)). Wynik segmentacji przykładowego obrazu korzeni przedstawioną metodą zobrazowano na rysunku 2b.

4. Identyfikacja struktury drzewa korzeniowego

Wiązkowy system korzeniowy pszenicy stanowi układ wzajemnych powiązań korzeni odpowiadający wprost przestrzennej strukturze drzewa grafu. Poszczególne podsystemy korzeni 1. rzędu, rozdzielone przed skanowaniem obrazu, można także uważać za drzewa składające się na las w przestrzeni trójwymiarowej. Na analizowanych obrazach widoczna jest jedynie dwuwymiarowa projekcja drzewa korzeniowego sprowadzonego do płaszczyzny skanowania (rys. 1). W takim widoku drzewo może zgubić acykliczność, przekształcając się na płaszczyźnie w ogólniejszą formę grafu, zawierającą cykle (obwody) i pętle; towarzyszą im skrzyżowania gałęzi (korzeni) pierwotnie niepołączonych ze sobą w przestrzeni. Odtworzenie topologii systemu korzeniowego (struktury drzewa 3D) stanowi podstawę poprawnego pomiaru długości zarówno 1. rzędu, jak i bocznych korzeni rośliny na podstawie informacji zawartej w ich obrazie.

Aby znaleźć graf drzewa korzeniowego przeprowadza się szkieletyzację maski korzeni na obrazie I_B (równ. (5)) [14, 18]. Do wyznaczenia szkieletu wykorzystano iteracyjną funkcję pocieniania z biblioteki *Image Processing Toolbox* w środowisku *MATLAB* [10, 19].

$$I_{SK}(x, y) = \text{bwmorph}(I_B(x, y), 'thin', Inf) \quad (6)$$

gdzie:

I_{SK} – obraz szkieletu korzeni,

Inf – oznacza zatrzymanie iteracji ścieniających przy braku zmian w obrazie,

I_B – wejściowy obraz binarny korzeni.

Uzyskany szkielet poddaje się przycinaniu (*pruning*) poprzez iteracyjne usuwanie gałęzi końcowych (z węzłami końcowymi), o długościach poniżej określonego minimum.

Szkielet korzeni odpowiada strukturze grafu 2D, w którym powiązania między węzłami (wierzchołkami) sąsiednimi są określone przez gałęzie szkieletu. W dalszych rozważaniach utożsamiono pojęcie szkieletu korzeni i jego grafu na płaszczyźnie obrazu, co pozwala na stosowanie pojęć dotyczących grafów. Odwzorowanie szkieletu (jego grafu) w drzewo 3D obejmuje m.in.:

- identyfikację i tablicowanie węzłów końcowych szkieletu $N_E(x, y)$ oraz pozostałych $N_I(x, y)$ [5],

- śledzenie i tablicowanie poszczególnych gałęzi $B(x, y)$ uzupełnionych węzłami przyległymi,
- powiązanie z gałęziami drzewa tablic pikseli $B(x, y)$ i przybliżonych długości gałęzi szkieletu.

W proponowanym algorytmie strukturę drzewa T odtwarza się poprzez śledzenie jego dróg składowych zgodnie z mechanizmem wzrostu korzeni, od początku korzenia 1. rzędu (odciętego przy ziarniaku) po najdalsze korzenie boczne. Zbiór danych S_c w równaniu (7) stanowi strukturę programową opisującą gałąź drzewa, odpowiadającą i -tej gałęzi szkieletu.

$$S_c = \left\{ i, \&B^{(i)}, \&S_p, \{\&S^{(k)}\}, \alpha_b^{(i)}, \alpha_e^{(i)}, w_b^{(i)}, w_e^{(i)}, (x_e^{(i)}, y_e^{(i)}), L^{(i)} \right\} \quad (7)$$

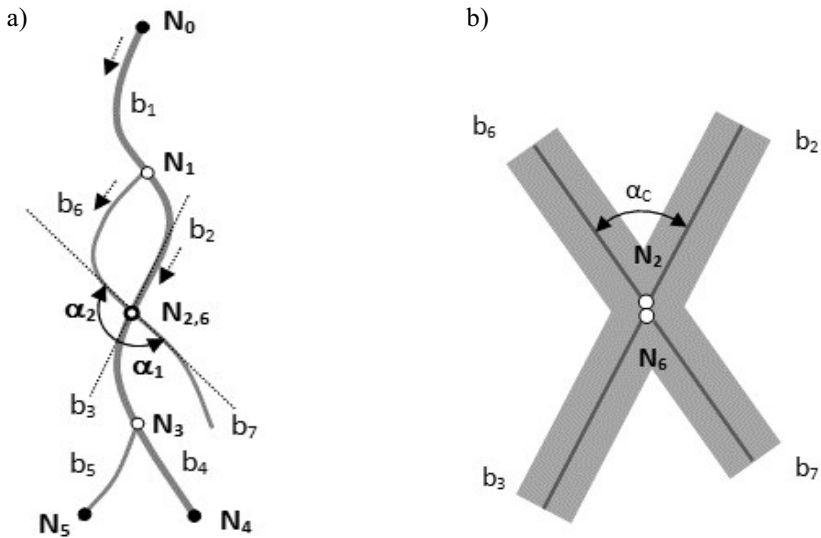
gdzie:

- i – numer odwzorowanej gałęzi szkieletu,
- $\&B^{(i)}$ – referencja do tablicy opisu gałęzi,
- $\&S_p$ – adres struktury gałęzi poprzedzającej na drodze od korzenia,
- $\{\&S^{(k)}\}$ – zbiór adresów do struktur gałęzi wychodzących,
- $\alpha_b^{(i)}, \alpha_e^{(i)}$ – kąty stycznych odpowiednio na początku i końcu gałęzi $B^{(i)}$,
- $w_b^{(i)}, w_e^{(i)}$ – lokalne grubości korzenia w pobliżu początku i końca $B^{(i)}$,
- $(x_e^{(i)}, y_e^{(i)})$ – współrzędne węzła końcowego gałęzi $B^{(i)}$,
- $L^{(i)}$ – szacunkowa długość i -tej gałęzi szkieletu.

Autorzy zaproponowali podział węzłów środkowych szkieletu na trzy kategorie:

- 1) węzły rozgałęzienia korzeni,
- 2) węzły skrzyżowania korzeni (pozorne),
- 3) węzły sklejenia korzeni.

Odtworzenie drzewa korzeniowego z pojedynczego widoku dwuwymiarowego jest możliwe tylko częściowo, poprzez wykrywanie i eliminację skrzyżowań w szkielecie. Skrzyżowania dotyczą oddzielnych korzeni związanych pozornym węzłem na obrazie (rys. 3a). Ze względu na określone grubości krzyżujących się korzeni tworzą one w rzeczywistości pary węzłów oddalających się od siebie przy zmniejszaniu kąta skrzyżowania (rys. 3b). Zgodnie z budową drzewa do każdego węzła dochodzi tylko jedna gałąź, pozostałe są wychodzące. Jeżeli wśród gałęzi wychodzących znajdują się nachylone pod kątem $|\alpha| > 90^\circ$ względem kierunku wejścia, może to być początek skrzyżowania (np. gałąź b_6 względem wejścia b_2 na rysunku 3a). Warunkiem wystąpienia skrzyżowania jest istnienie gałęzi uzupełniającej, wychodzącej z kolejnego węzła na rozpatrywanej drodze drzewa. Gałęzie uzupełniające, muszą być zgodne kątowno z początkowymi i grubości korzeni obu tych gałęzi w pobliżu węzłów skrzyżowania muszą być zgodne.



Rys. 3. Ilustracja pojęć i założeń modelu szkieletu systemu korzeniowego:

N_0, N_4, N_5 – węzły końcowe szkieletu, $N_1, N_3, N_{2,6}$ – węzły środkowe, α_1, α_2 – odchylenia gałęzi wyjściowych b_6, b_7 od kierunku b_2 w punktach skrzyżowania $N_{2,6}$ (a), układ gałęzi i węzłów szkieletu typowy dla skrzyżowania korzeni, α_c – kąt skrzyżowania (b)

Zgodność kątów i grubości określa się z dokładnością do pewnych stałych, które należą do parametrów programu. W hodowli hydroponicznej, bez mechanicznego wpływu gleby, korzenie pszenicy rosną w dół i nie powinny odchyłać się od kierunku korzeni niższego rzędu ponad kąt prosty. W węzłach sklejenia pojawiają się gałęzie wychodzące pod kątem o wartości bezwzględnej ponad 90° , ale bez gałęzi uzupełniających skrzyżowanie (węzeł N_2 na rysunku 4a). Sytuacja taka zwykle towarzyszy błędom odtwarzania drzewa 3D z obrazu 2D powstającym w wyniku wzajemnego przesłaniania zakończeń korzeni. Przy niestarannym ułożeniu może dojść także do sklejenia początków korzeni bocznych, w wyniku czego na obrazie pojawia się wspólny fragment korzenia zakończony nieistniejącym w rzeczywistości rozgałęzieniem (rys. 4b).

Rekurencyjna procedura budowy struktury danych T drzewa korzeniowego jest następująca:

function *tree_branch* (i, p)

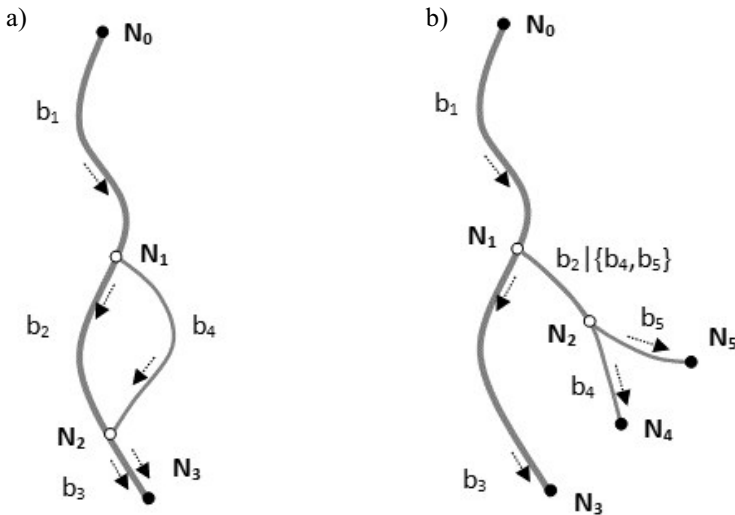
- alokacja struktury $S_c^{(i)}$ gałęzi drzewa T odpowiadającej i -tej gałęzi szkieletu;
- $S_p \leftarrow \&S_c$;
- ustalenie początku $P_b^{(i)}(x_b, y_b)$ i końca $P_e^{(i)}(x_e, y_e)$ i -tej gałęzi szkieletu;
- $S_c \leftarrow \{i, \&B^{(i)}, \&S_p, \alpha_b^{(i)}, \alpha_e^{(i)}, w_b^{(i)}, w_e^{(i)}, P_e^{(i)}\}$;
- wyszukanie gałęzi wychodzących $K = \{k: P_e^{(k)} \in B^{(k)}\}$ – potomków i -tej gałęzi szkieletu;

- $\{k\} = \text{sort}(\{k\}, |\alpha_b^{(k)} - \alpha_e^{(i)}|)$ – sortowanie według kątów odchylenia gałęzi potomka względem rodzica;
- usuwanie ze zbioru $\{k\}$ numerów gałęzi uzupełniających i początków skrzyżowań w strukturach poprzedzających na drodze $S_1 \rightarrow S_c$;
- usuwanie ze zbioru $\{k\}$ numerów gałęzi występujących wcześniej na drodze $S_1 \rightarrow S_c$ (zapobieganie zapętleniom przez cykle);
- $\forall k$: wywołanie rekurencyjne `tree_branch(k, c)`;

end

gdzie:

- i – numer gałęzi szkieletu przypisanej strukturze S_c ,
- c, p – indeksy struktur gałęzi bieżącej i jej poprzednika w drzewie T ,
- $\{k\}$ – numery gałęzi wychodzących szkieletu,
- $B^{(i)}$ – tablica punktów i -tej gałęzi szkieletu,
- α_b, α_e – kąty nachylenia gałęzi odpowiednio przy węźle początkowym i końcowym,
- w_b, w_e – grubości korzenia przy węźle początkowym i końcowym gałęzi.



Rys. 4. Ilustracja zjawiska tworzenia cykli przy sklejanu korzeni: N_2 – węzeł sklejenia, N_0, N_3 – węzły końcowe, b_2, b_4 – gałęzie tworzące cykl, \rightarrow oznaczenie kierunków śledzenia dróg drzewa (a), tworzenie się pozornego rozgałęzienia przy sklejeniu początków korzeni bocznych: N_1, N_2 – węzły środkowe, N_0, N_3, N_4, N_5 – węzły końcowe, gałąź b_2 zamiast b_4, b_5 od węzła (b)

Krótkie (do kilkunastu pikseli) gałęzie pośredniczące w skrzyżowaniu (np. N_2N_6 na rysunku 3b) nie dają pewności co do kierunku i nie powinny stanowić referencji kątowej dla swoich następników w drzewie. W takiej sytuacji zmiany kątów gałęzi wychodzących

z węzła $|\alpha_b^{(k)} - \alpha_e^{(i)}|$ obliczane są na podstawie wartości kąta gałęzi poprzedzającej. To samo podejście wykorzystano przy pomiarze grubości korzeni niemożliwej do oceny w miejscu ich skrzyżowania (nakładania).

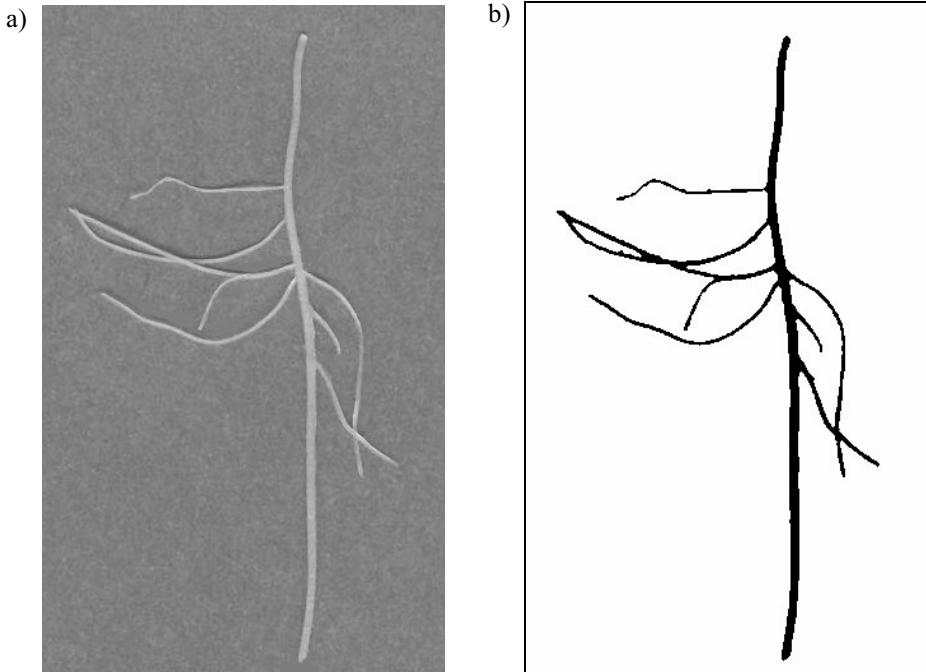
Drogi W_i wyznaczone w strukturze danych T całego drzewa można interpretować jako tablice opisujących je struktur S_c (równ. (7)) lub numerów gałęzi b grafu. Gałęzie końcowe są opisane przez struktury S bez potomków.

$$W_i = [S_j], \quad w_i = [b_j], \quad j = 1, \dots, end \quad (8)$$

gdzie:

$W_i(w_i)$ – tablica struktur danych (numerów gałęzi) dla i -tej drogi w grafie.

end – końcowy indeks tablicy składników i -tej drogi wyznaczonej w grafie.

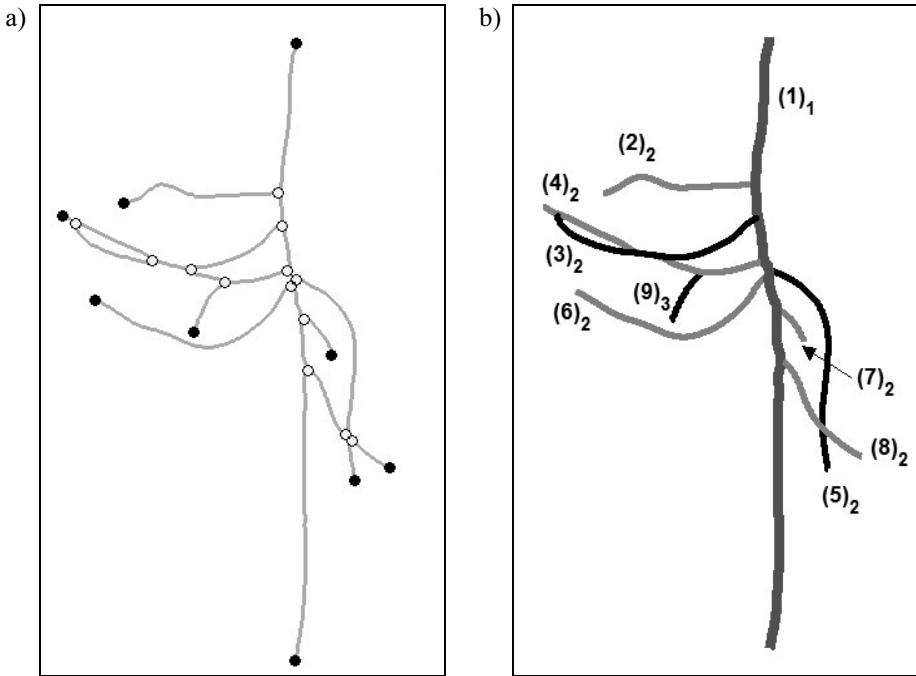


Rys. 5. Wybrane etapy przetwarzania wycinka obrazu systemu korzeniowego pszenicy:

a) zeskanowany obraz barwny I_{RGB} białych korzeni na niebieskim tle;

b) obraz binarny I_B po segmentacji

Wszystkie drogi W_i w tworzonemu drzewie T muszą być zakończone odrębnymi gałęziami i węzłami liści zgodnie z wymogami jego budowy. Potencjalne duplikaty gałęzi końcowych dróg b_{end} (równ. (8)), towarzyszące cykлом grafu i węzłom sklejeń (rys. 4a), powinny zostać wyeliminowane (rys. 6).



Rys. 6. Wybrane etapy przetwarzania wycinka obrazu systemu korzeniowego pszenicy:
 a) szkielet podsystemu korzeniowego z rysunku 5 po identyfikacji gałęzi i węzłów;
 b) obraz odtworzonego fragmentu systemu korzeniowego: $(1)_1$ – korzeń 1. rzędu,
 $(2)_2$ – $(8)_2$ – korzenie boczne 2. rzędu, $(9)_3$ – 3. rzędu

Przyjęte reguły usuwania powtarzalnych gałęzi końcowych można zwięźle zapisać jako:

$$\begin{aligned}
 \exists_{i,m,n \neq m} w_m(i \neq end) = w_n(end) &\Rightarrow W_n(end) = [] \\
 \exists_{m,n \neq m} w_m(end) = w_n(end) &\Rightarrow W_k(end) = [] \\
 k = \arg \left(\max_{m,n} (\Delta\alpha_m(end), \Delta\alpha_n(end)) \right) &
 \end{aligned}
 \tag{9}$$

gdzie:

- end – indeks elementu końcowego tablicy w_i lub W_i ,
- $[]$ – oznaczenie pustego (usuniętego) elementu tablicy,
- $=$ – operator porównania gałęzi nieuwzględniający zgodności kierunków,
- $\Delta\alpha_i(end)$ – moduł zmiany kąta gałęzi końcowej i -tej drogi względem gałęzi poprzedzającej,
- k – indeks drogi wybranej do usunięcia końcowej struktury gałęzi.

Usuwanie duplikatów końcowych gałęzi powtarza się iteracyjnie, aż do osiągnięcia braku dalszych zmian w drogach grafu. Działanie to prowadzi w efekcie do rozcięcia cykli i usunięcia węzłów sklejeń korzeni, poprzez wydzielenie węzłów końcowych ścieżek grafu nałożonych na węzły środkowe.

5. Pomiar długości korzeni 1. rzędu i korzeni bocznych

Sprowadzenie wszystkich korzeni 1. rzędu i bocznych systemu do jednej płaszczyzny skanowania zasadniczo zachowuje oryginalne długości korzeni, bez skrócenia wynikającego z perspektywy. Po usunięciu skrzyżowań i sklejeń podczas odtwarzania drzewa korzeniowego T (rozdz. 4), pozostają następujące typy rozgałęzień korzeni:

- rozwidlenia, których wszystkie następniki odpowiadają korzeniom bocznym wyższego rzędu,
- odgałęzienia, w których jedna z gałęzi wychodzących stanowi kontynuację korzenia aktualnego rzędu.

Ze względu na potencjalne odgałęzienia, głębokość drzewa nie jest równoznaczna z rzędem korzeni bocznych wiązki. Długość każdej drogi W_i drzewa T oszacowano wstępnie jako sumę długości gałęzi wyznaczonych metodą Lebowitza i zapamiętanych w strukturach S_j (równ. (7), (8)). Dla rozważanej klasy obrazów korzeni pszenicy na podstawie eksperymentów przyjęto, że korzenie 1. rzędu reprezentują najdłuższe drogi (średnice) w swoich poddrzewach. Indeks i_{\max} najdłuższej drogi korzenia pszenicy 1. rzędu wyznacza się, przeszukując wszystkie drogi W_i w kierunku od liścia do korzenia drzewa T i sumując szacowane długości L w strukturach gałęzi (równ. (10)).

$$i_{\max} = \arg \left(\max_i \sum_j S_{i,j} \cdot L \right) \quad (10)$$

gdzie:

i_{\max} – indeks najdłuższej drogi W_i wyznaczonej w drzewie T (równ. (8)),

$S_{i,j} \cdot L$ – długość gałęzi j na drodze W_i .

We wszystkich strukturach S gałęzi drzewa wprowadza się dodatkowo dane $S.R$ o przynależności gałęzi do korzenia odpowiedniego rzędu. Początkowo są one równe zeru; po identyfikacji korzenia 1. rzędu przyjmuje się $S.R = 1$ we wszystkich opisujących go strukturach gałęzi. Korzenie boczne stanowią sekwencje struktur S_p , które:

- rozpoczynają się warunkiem:

$$S_p .R = N_R \quad \& \quad S_c .R = 0 \quad (11)$$

gdzie:

$S_c.R$ – rząd korzenia w strukturze bieżącej opisu gałęzi drzewa,

$S_p.R$ – rząd korzenia w strukturze poprzedzającej,

$N_R = 1$ – wartość rzędu.

- kończą się warunkiem braku potomka lub rozwidleniem:

$$S_c.R = 0 \ \& \ \left(|\{S_n\}| = 0 \mid |\{S_n\}| > 1 \ \& \ \min_n |S_n.\alpha_b - S_c.\alpha_e| > \Delta\alpha_{\min} \right) \quad (12)$$

gdzie:

c, n – odpowiednio indeks struktury S_c bieżącej gałęzi drzewa i dowolnego z jej następników S_n ,

$|\{S_n\}|$ – liczność zbioru gałęzi wychodzących,

α_b, α_e – odpowiednio kąt początkowy gałęzi potomnej n i kąt końcowy gałęzi bieżącej c ,

$\Delta\alpha_{\min}$ – granica dopuszczalnego odchylenia kąтового pomiędzy rozwidleniem a odgałęzieniem.

Jeśli warunek kątowy w równaniu (12) nie jest spełniony, korzeń aktualnego rzędu jest kontynuowany dla struktury S_n gałęzi z minimalnym odchyleniem kątowym $\Delta\alpha$. Do warunku tego można także dołączać dodatkowo maksymalną różnicę grubości między gałęzią potomną, najmniej odchyloną od dotychczasowego kierunku a inną spośród gałęzi wychodzących.

Po zakończeniu tworzenia wszystkich sekwencji korzeni danego rzędu zwiększa się jego numer i przechodzi do identyfikacji rzędów wyższych według analogicznej zasady. Poszczególne ciągi gałęzi jednakowego rzędu łączą się ze sobą w spójne sekwencje pikseli, usuwając pokrywające się węzły końcowe tych gałęzi.

$$R_k = [B_{k,j}] = \begin{bmatrix} x_i \\ y_i \end{bmatrix}, \quad i = 1, \dots, m, \quad j = 1, \dots, l \quad (13)$$

gdzie:

R_k – tablica pikseli połączonych gałęzi k -tego korzenia,

l – liczba gałęzi grafu składających się na k -ty korzeń,

m – liczba pikseli w tablicy R_k .

Gałęzie szkieletu każdego z podsystemów korzenia 1. rzędu opisane w tablicach B_k podczas połączenia we wspólną tablicę R_k , powinny zawierać sekwencje pikseli ułożone w jednym kierunku, zgodnym z kierunkiem gałęzi początkowej $B_{k,1}$ (równ. (13)). Procedura identyfikacji gałęzi szkieletu dołącza do nich węzły na obu końcach. W związku z tym sprawdzenie, że $B_{k,j}(\text{end}) \neq B_{k,j+1}(1)$, implikuje konieczność odwrócenia porządku pikseli w $B_{k,j+1}$ poprzedzającego usuwanie powtórnego pikselu w tablicy drogi R_k .

Uzyskane w ten sposób drogi R_k odpowiadają korzeniowi 1. rzędu i poszczególnym korzeniom bocznym. Każdy ciąg pikseli drogi $R(x, y)$ reprezentujący krzywą dyskretną należy wygładzić przed pomiarem długości poprzez aproksymację funkcjami sklejanymi (splajnami) 3. stopnia na płaszczyźnie obrazu szkieletu. W tym celu wykorzystano funkcję *csaps* z biblioteki *Spline Toolbox* dla środowiska *MATLAB* [20]. Funkcję *csaps* zastosowano w następujący sposób:

$$\begin{aligned} [x_j \ y_j]^T &= \text{csaps}([d_i], [x_i \ y_i]^T, p, [d_j]) \\ i &= 1, \dots, m, \quad j = 1, \dots, n, \quad \Delta d_j = k \times d_m \end{aligned} \quad (14)$$

gdzie:

- $[d_i]$ – tablica odległości pikseli (x_i, y_i) od punktu początkowego (x_1, y_1) wzdłuż dowolnej krzywej dyskretniej R_k ,
- $[d_j]$ – tablica odległości zagęszczonych punktów próbkowania (x_j, y_j) po aproksymacji funkcją sklejaną f ,
- $[x_j, y_j]$ – tablica R_k punktów linii środkowej (osi) k -tego korzenia,
- Δd_j – krok zagęszczonego próbkowania,
- $p \in [0, 1]$ – udział składnika aproksymacji przy optymalizacji wbudowanej funkcji celu; przyjęto doświadczalnie $p = 0,95$.

Funkcję sklejaną f aproksymującą dane tablicy $[x_j, y_j]$ próbkuje się równomiernie, z rozdzielczością średnio 10-krotnie wyższą niż wynikająca z rastru obrazu (w równaniu (14) przyjęto $k = 0,1$). Następnie, w celu obliczenia długości korzenia danego rzędu sumuje się odległości między sąsiednimi punktami stabilizowanej funkcji aproksymacji $[x_j, y_j]$. Długości zliczane osobno dla wszystkich korzeni każdego rzędu stanowią wyniki pomiarów systemu korzeniowego.

$$L_k = \sum_{j=2}^n \left\| (x_j, y_j), (x_{j-1}, y_{j-1}) \right\| \quad (15)$$

gdzie:

- L_k – wyznaczona długość dla k -tego korzenia,
- n – liczba punktów krzywej aproksymującej R_k ,
- $\| \|$ – operator wyznaczania odległości.

6. Wyniki pomiarów i wnioski

Wykonano serię pomiarów długości dla 10 obrazów systemów korzeniowych pszenicy. Pomiary przeprowadzono wyłącznie w odniesieniu do korzeni 1. rzędu w każdej wiąźce. Zostały one wykonane zarówno manualnie, przy użyciu linijki z podziałką milimetrową, jak i omówioną wyżej metodą automatyczną. Wyniki zestawiono w tabeli 1. Uwzględniono w niej także pomiar metodą Lebowitza [12] przez sumowanie odległości sąsiadów dla po-

szczególnych gałęzi szkieletu tworzących oś korzenia. Badano partię kontrolną korzeni nie poddaną działaniu niklu. Przyjęto następujące określenie błędu względnego pomiaru daną metodą w odniesieniu do metody manualnej (rys. 7):

$$e_i = \frac{2(L_i - L_1)}{L_i + L_1} \quad (16)$$

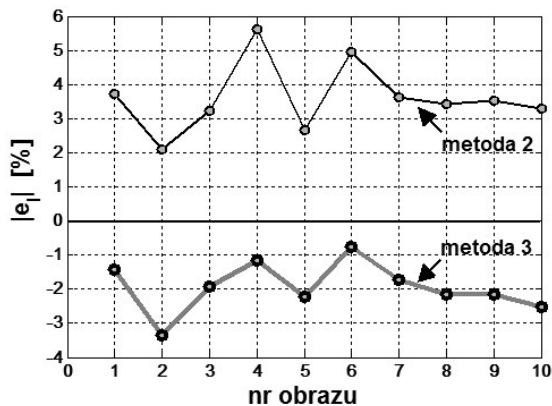
gdzie:

L_i – długość korzeni pomierzona według metody M_i (tab. 1),
 $i = [2, 3]$ – indeks metody.

Tabela 1

Zestawienie wyników pomiaru sumarycznej długości korzeni 1. rzędu przy zastosowaniu różnych metod

Nr obrazu	Metody		
	manualna (M_1) [mm]	Lebowitza (M_2) [mm]	splajnow korzeni (M_3) [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



Rys. 7. Przebieg błędów względnych pomiaru długości korzeni 1. rzędu 10 systemów korzeniowych pszenicy w metodach M_2 i M_3 , w odniesieniu do wyników metody manualnej M_1

Metoda M_2 wykazuje błędy nadmiaru – średnio 3,62% a metoda M_3 niedomiaru – średnio 1,94%. Wyniki nadmiarowe metody M_2 są zrozumiałe, z uwagi na wydłużenie drogi osi korzeni wskutek skoków między punktami rastru. Metoda M_3 wykazuje systematyczne niedomiary (ok. 2 razy mniejsze niż nadmiary metody M_2). Mogą one wynikać np. z problemów rozciągania korzeni przykładanych do linijki lub błędu jej skali. Wyniki obu metod M_2 i M_3 można skorygować w górę (w granicach 1%), dodając nieuwzględnione odległości między rzeczywistymi końcami korzeni a końcami szkieletu. Zmniejszy to błąd względny metody M_3 i powiększy dla metody M_2 .

Tabela 2

Czasy wykonania wybranych zadań algorytmu proponowanej metody w środowisku *MATLAB* dla obrazu wejściowego 1450×1400 pikseli z 4 korzeniami 1. rzędu w wiązce

Wykonywane zadanie	Czas wykonania [s]
segmentacja obrazu	2,93
szkieletyzacja	0,115
węzły szkieletu	0,102
gałęzie szkieletu	0,032
analiza grafu	0,346
obliczanie długości	0,133

W tabeli 2 podano przykładowo czasy wykonywania różnych faz algorytmu pomiarowego dla obrazów systemu korzeniowego badanej serii. Obliczenia wykonywano w środowisku *MATLAB* 2008 z użyciem komputera *Intel Core (TM)2 DuoT5750* 2 GHz, 4 GB RAM i systemu *Windows Vista*.

Zjawisko cienia na podłożu przy oświetleniu korzeni z przodu, poprzez szybę skanera [13, 17], występuje w minimalnym stopniu i nie ma bezpośredniego wpływu na pomiar długości korzeni; może wpływać na pomiary ich grubości. Powstające cienie nie są zupełne i zachowują odcień tła. Eliminuje się je z maski korzeni podczas segmentacji, jako zbiory pikseli o wartości podprogowej jasności, dla których składowa koloru tła w przestrzeni RGB dominuje nad pozostałymi np. $B > R$, G dla niebieskiego podłoża.

Literatura

- [1] Bernsen J., *Dynamic thresholding of grey-level images*. Proceedings 8th International Conference on Pattern Recognition, 1986, 1251–1255.
- [2] Bouma T.J., Nielsen K.L., Koutstaal B., *Sample preparation and scanning protocol for computerised analysis of root length and diameter*. Plant and Soil, vol. 218, 2000, 185–196.
- [3] Delta-T Devices Ltd, <http://www.delta-t.co.uk/products.html?product200509281> 8743.
- [4] Ewig R., Kaspar T., *Accurate perimeter and length measurement using an edge chord algorithm*. Journal of Computer Assisted Microscopy, vol. 7, 1995, 99–100.

- [5] Hasthorpe J. and Mount N., *The generation of river channel skeletons from binary images using raster thinning algorithms*. Available at: <http://ncg.nuim.ie/gisruk/materials/proceedings/PDF/P7.pdf>, 2007.
- [6] Hoagland D.R., Arnon A.I., *The water-culture method for growing plants without soil*. California Agricultural Experiment Station Circular, vol. 347, 1950, 1–39.
- [7] Kimura K., Yamasaki S., *Root length and diameter measurement using NIH Image: application of the line-intercept principle for diameter estimation*. Plant and Soil, vol. 234, 2001, 37–46.
- [8] Kimura K., Kikuchi S., Yamasaki S., *Accurate root length measurement by image analysis*. Plant and Soil, vol. 216, 1999, 117–127.
- [9] Kirchof G., *Measurement of root length and thickness using a hand-held computer scanner*. Field Crops Research, vol. 29, 1992, 79–88.
- [10] Lam L., Lee S., Suen Y., *Thinning Methodologies – A Comprehensive Survey*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, vol. 14, 1992, 869–885.
- [11] Lambert P., Carron T., *Symbolic fusion of luminance-hue-chroma features for region segmentation*. Pattern Recognition, vol. 32, 1999, 1857–1872.
- [12] Lebowitz R.J., *Digital image analysis measurement of root length and diameter*. Environmental and Experimental Botany, vol. 28, 1988, 267–273.
- [13] Lynch and Brown labs at Penn State University: <http://roots.psu.edu/en/RootLength>
- [14] Malina W., Smiatacz M., *Metody cyfrowego przetwarzania obrazów*. Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa, 2005.
- [15] Regent Instruments Inc., *WinRHIZO for root analysis*. Available at: <http://www.regent.qc.ca/products/Brochures/WinRHIZO.pdf>.
- [16] Smit A.L., Sprangers J.F., Sablik P.W., Groenwold J., *Automated measurement of root length with a three-dimensional high-resolution scanner and image analysis*. Plant and Soil, vol. 158, 1994, 145–149.
- [17] 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.
- [18] Tadeusiewicz R., Korohoda P., *Komputerowa analiza i przetwarzanie obrazów*. Wydawnictwo Fundacji Postępu i Telekomunikacji, Kraków, 1997.
- [19] The Mathworks, *Image processing toolbox user's guide*. Available at: http://www.mathworks.com/access/helpdesk/help/pdf_doc/images/images_tb.pdf.
- [20] The Mathworks, *Spline toolbox user's guide*. Available at: http://www.mathworks.com/access/helpdesk/help/pdf_doc/splines/splines.pdf.
- [21] Zobel R., *Sensitivity Analysis of Computer-Based Diameter Measurement from Digital Images*. Crop Sciences, vol. 43, 2003, 581–593.