

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ И ОБЩАЯ БИОЛОГИЯ / PHYSICO-CHEMICAL AND GENERAL BIOLOGY

Оригинальная статья / Original article

УДК 519.688:007.51

DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-1-57-62

АВТОМАТИЗАЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ МОРФОЛОГИИ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ

© Ю.В. Нурминская*, Ф.С. Малков**, С.В. Бахвалов**

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Российская Федерация, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132.

**Иркутский национальный исследовательский технический университет, Российская Федерация, 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83.

Анализ флуктуирующей асимметрии является широко распространённым методом для определения степени воздействия антропогенных факторов на экосистемы. Однако данный метод требует кропотливых замеров и расчётов, многие из которых всё ещё слабо автоматизированы, что затрудняет широкое использование данного метода в осуществлении экологического мониторинга. Предложен проект разработки программного обеспечения, автоматизации морфометрии листа, в том числе вычисления флуктуирующей асимметрии.

Ключевые слова: флуктуирующая асимметрия, экологический мониторинг, автоматизация исследования, морфометрия листа, компьютерное зрение.

Формат цитирования: Нурминская: Ю.В., Малков Ф.С., Бахвалов С.В. Автоматизация исследований морфологии листьев растений // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7, N 1. С. 57–62. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-1-57-62

AUTOMATION STUDIES THE MORPHOLOGY OF LEAVES OF PLANTS

© Yu.V. Nurminskaya*, F.S. Malkov**, S.V. Bakhvalov**

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, 132, Lermontov St., Irkutsk, 664033, Russian Federation.

**Irkutsk National Research Technical University, 83, Lermontov St., Irkutsk, 664074, Russian Federation.

The analysis of fluctuating asymmetry is a widely accepted method for determining the extent of anthropogenic impact on ecosystems. However the given method requires meticulous measurements and of calculations, many of which still poorly are automated which makes it difficult widespread use of this method in the implementation of environmental monitoring. We bring to attention a software development project automation of morphometry leaf, including the computation of the fluctuating asymmetry.

Key words: fluctuating asymmetry, environmental monitoring, automation of the study, morphometry of leaf, computer vision

For citation: Nurminskaya Yu.V., Malkov F.S., Bakhvalov S.V. Automation studies the morphology of leaves of plants. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* [Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology]. 2017, vol. 7, no 1, pp. 57–62. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-1-57-62 (in Russian)

ВВЕДЕНИЕ

Оценка габитуса растения с помощью морфометрического анализа использовалась в ботанике и физиологии растений изначально, и на данный момент не потеряла своего значения. Более того, в XX в появились работы, посвящённые такому феномену, как флуктуирующая асимметрия (ФА) [1–3], что значительно обога-

тило арсенал морфометрических измерений. ФА – мельчайшие, незначительные отклонения от идеальной симметрии [4]. Она была изучена у симметричных структур как растений, так и животных. Постепенно были накоплены факты о связи величины ФА и степени нестабильности развития организма, вызванной стрессовым воздействием [5–8].

В норме всегда имеются отклонения от идеальной симметрии, но они, как правило, не выходят за пределы определённых значений и являются следствием онтогенетического шума – мелких, кумулятивных, редких ошибок в развитии, причиной которых является стохастичность клеточных процессов. Онтогенетический шум увеличивается при воздействии стрессора [9]. В Советском Союзе метод изучения величины ФА для проведения экологического мониторинга получил распространение преимущественно благодаря работам В.М. Захарова. Его коллективом была разработана методика оценки состояния окружающей среды по величине ФА животных и растений [10]. Оценка флуктуирующей асимметрии билатеральных органов хорошо зарекомендовала себя при определении силы стрессового (в т.ч. антропогенного) воздействия на организмы. Традиционные методы, оценивающие химические и физические показатели, не дают комплексного представления о воздействии на биологическую систему, тогда как биоиндикационные показатели отражают реакцию организма на всё многообразие действующих на него факторов, имея при этом биологический смысл. В России различные модификации метода биоиндикации Захарова для листьев растений используются многими исследователями [11–13]. Методика оценки стабильности развития, определяемая по уровню ФА, – чувствительный индикатор состояния природных популяций, что явилось основанием для утверждения Министерством природных ресурсов РФ этой методики в качестве нормативной [14].

Нужно отметить, что данный метод является достаточно трудоёмким и кропотливым в связи с необходимостью большого количества высокоточных замеров (миллиметры, десятые доли миллиметра). Несмотря на модификации, в целом, методика анализа и обработки листьев во многом осталась недостаточно автоматизированной и предполагает большую долю манипуляций практически вручную.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В связи с трудоёмкостью, метод практически не используется для постоянного (многолетнего) мониторинга состояния популяций. По этой же причине изучение ФА не применяется для нужд сельского хозяйства: потенциал данного метода для этой отрасли изучен достаточно слабо.

Возможно, снижение влияния человеческого фактора на результат анализа и уменьшение времени, затрачиваемого на работу за

счет совершенствования технологии обработки данных и автоматизации ряда этапов измерения величины ФА. Это может дать толчок к более широкому применению анализа ФА, а также позволит получить более полную информацию о потенциале и ограничениях в применении данного метода.

Попытки автоматизации замеров листа осуществляются регулярно.

Так, в конце XX в в Сибирском физико-техническом институте аграрных проблем разработана программа «Листомер» [15], которая по изображению листа определяет его площадь. В настоящее время лицензия стоит 8 тыс. руб. [16].

Более современной разработкой по данной теме является коммерческая программа SIAMS MesoPlant [17]. Стоимость данной программы неизвестна, так же как и возможность ведения базы данных результатов исследований. Помимо этого исследователю требуется указывать жилки растения и зубчики, что говорит о несовершенстве предлагаемых алгоритмов распознавания и о том, что исследователю придётся потратить дополнительное время на расстановку необходимых отметок.

Кроме указанных программных продуктов, существует достаточное количество программ и устройств, обеспечивающих автоматический расчет общей площади листовой пластины по её изображению, однако они предназначены только для расчета общей площади листа, что является недостаточным для реализации метода ФА. Программные продукты, предназначенные для проведения морфометрического анализа, в настоящее время на рынке отсутствуют. Разрабатываемая технология позволит производить автоматический расчет площадей листа, разделяемых центральной жилкой, что является необходимым для проведения анализа.

Для решения задачи выделения контура листа растения на изображении и подсчёта площади листовой пластины используются программы общего назначения, такие как ImageJ и Image Pro Plus. Пример использования второй программы можно отметить в методическом пособии «Применение цифровых технологий в морфометрии растений», подготовленном коллективом авторов из СИФИБР СО РАН и ИГУ [18]. В данном методическом пособии описывается процесс фотографирования листьев растений, обработки полученных изображений и анализа данных с помощью программы STATISTICA. Из текста методического пособия ясно, что контуры листа, очер-

ченные с помощью алгоритмов программы Image Pro Plus, имеют погрешности, которые требуется исправлять вручную. Определение углов между главной жилкой и жилками второго порядка тоже должно производиться вручную. Поскольку измерения должны иметь высокую точность, обилие ручных манипуляций снижает ценность замеров, выполненных с помощью данной программы. Однако даже такая частичная автоматизация измерений приводит к существенной экономии времени.

Использование описанных выше программ, по оценке исследователей, проводящих обработку изображений листьев растений, на измерение одного листа затрачивается порядка 3–4 мин (включая все процедуры от фотографирования до обработки данных), тогда как при обработке вручную тратится около 10 мин на лист. В соответствии с методикой анализа для получения достоверных результатов необходимо обработать порядка сотни листьев с одного дерева. Отсюда можно оценить время, необходимое на обработку 100 образцов для получения достоверных результатов (при использовании программы): $4 \times 100 = 400$ мин = 6,5 ч.

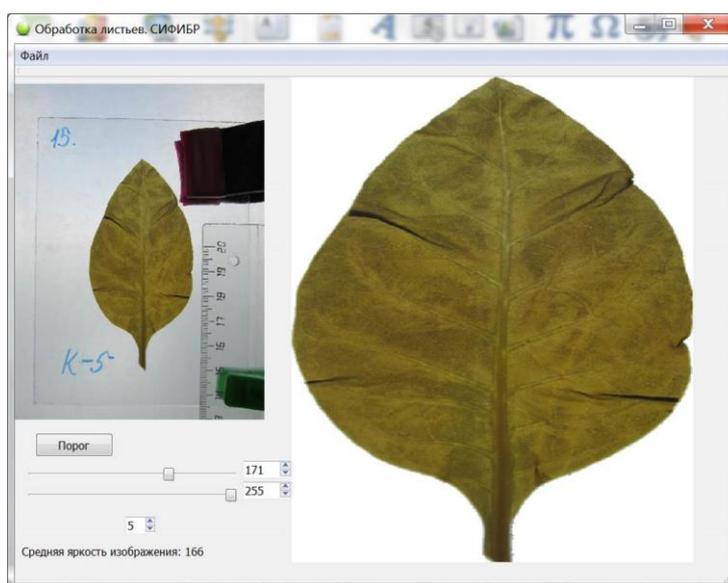
Учитывая необходимость последующей статистической обработки результатов измерений для вычисления ФА, необходимое время можно округлить до 7 ч, т. е. исследователь должен затратить полный рабочий день на выполнение исследований по одному объекту. При ручном же методе исследователь на это же количество листьев потратит два-три рабочих дня.

Скорость обработки может быть повышена ещё в два-три раза, если программа будет, согласно введённым пользователем настройкам, автоматически делать нужные замеры, находить жилку, определять различия между признаками справа и слева и сразу же вычислять ФА для данного листа. Наличие базы данных, куда автоматически будут заноситься результаты замеров и вычислений, позволит пользователю быстро систематизировать информацию и производить дальнейшую статистическую обработку данных.

Таким образом, возникает задача углубленной автоматизации морфологического анализа и, самое главное, расчёта флуктуирующей асимметрии за приемлемое для исследователя время. Иными словами, перед специалистами стоит задача разработки программного обеспечения, позволяющего проводить автоматическое измерение площади растения, определения центральной жилки листа, расчёта флуктуирующей асимметрии и прочих параметров, а так же занесение полученных результатов в базу данных, а также, возможно, дальнейшая статистическая обработка по полученным измерениям.

Разработана макетная версия программы с использованием библиотеки компьютерного зрения Open CV и QT (рисунок).

На данный момент в программе реализован алгоритм выделения листа растения на изображении из имеющегося фона, а так же выполнен расчет площади, длины контура, нахождения максимальной ширины и высоты листа растения.



Пример программы, выделяющей лист растения

Оценка трудоемкости проведения операций позволяет сделать вывод, что время на предварительную обработку данных на данном этапе сокращается до 3–4 с.

В дальнейшем, при расширении возможностей программы, время на автоматизированную обработку не должно превышать 10 с на один образец растения.

С использованием макета программного комплекса были проведены эксперименты по расчету площади листовой пластины. Экспериментальные результаты показали, что отклонения значений расчета площади листа в ручном и автоматическом режиме не превышают 8%. При этом точность измерений в ручном режиме во многом зависит от уровня подготовки и ответственности экспериментатора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложены подходы и реализован макет программного комплекса для автоматизации проведения морфологического анализа.

В настоящий момент ведётся разработка полноценной информационной системы, обеспечивающий автоматизированный сбор, хранение и обработку результатов измерений.

Результаты работы на макетном варианте показали значительное снижение трудоемкости проведения анализов. При создании полноценной информационной системы исследователи получают эффективный инструментарий, предоставляющий возможности по оценке состояния, как природных популяций, так и состояния окружающей среды.

Проект работы, направленной на решение этой задачи, был представлен на грант программы «УМНИК» фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере. По результатам конкурсного отбора был получен грант на выполнение исследовательской работы по разработке программного комплекса для автоматизации исследований морфологии листьев растений (договор № 5876ГУ/2015).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Møller A.P., Pomiankowski A. Fluctuating asymmetry and sexual selection // *Genetica*. 1993. N 89. P. 267–279.
2. Palmer A.R., Strobeck C.C. Fluctuating asymmetry: Measurement, analysis, patterns // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1986. N 17. P. 391–421.
3. Van Valen L. A study of fluctuating asymmetry // *Evolution*. 1962. V. 16, N 2. P. 125–142. DOI: 10.2307/2406192
4. Palmer A.R., Strobeck D. Fluctuating asymmetry analyses revisited. In: Polak M, ed. *Developmental Instability. Causes and Consequences*. New York: Oxford Univ. Press, 2003. P. 279–319.
5. Захаров В.М., Трофимов И.Е. Гомеостатические механизмы биологических систем: гомеостаз развития // *Онтогенез*. 2014. Т. 45, N 3. С. 138–150.
6. Leamy L.J., Ch.P. Klingenberg The genetics and evolution of fluctuating asymmetry // *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2005. V. 36. P. 1–21.
7. Møller A.P., Thornhill R. A meta-analysis of the heritability of developmental stability // *J. Evol. Biol.* 1997. N 10. P. 1–16.
8. Parsons P.A. Fluctuating asymmetry: An epigenetic measure of stress // *Biological Reviews*. 1990. N 65. 131–145.
9. Lens L., Van Dogen S., Kark S., Matthysen E., Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies // *Biol. Rev.* 2002. N 77. P. 27–38.
10. Захаров В.М. Асимметрия животных. М.: Наука, 1987. 216 с.
11. Иванов В.П., Марченко С.И., Акименков Н.В. Использование асимметрии площадей листовых пластинок *Betula pendula* в качестве индикатора экологического состояния природной среды // *Вестник МарГТУ*. 2009. N 3. С. 68–74.
12. Левых А.Ю., Пузынина Г.Г. Оценка благополучия среды по показателям стабильности развития растений и животных // *Известия Самарского научного центра РАН*. 2012. Т. 14, N 5-3. С. 611–614.
13. Скрипальщикова Л.Н., Стасова В.В. Биоиндикационные показатели стабильности развития насаждений в нарушенных ландшафтах // *Сибирский лесной журнал*. 2014. N 2. С. 62–72.
14. Методические рекомендации по выполнению оценки качества среды по состоянию живых существ (оценка стабильности развития живых организмов по уровню асимметрии морфологических структур): распоряжение Росэкология от 16.10.2003 № 460. М.: Наука, 2003. 24 с.
15. «ЛИСТОМЕР» – виртуальный прибор для определения площади и степени поражения листьев // *Каталог науч.-техн. продукции СО Россельхозакадемии [Электронный ресурс]*. URL: <http://catalog.sorashn.ru/node/863> (дата обращения: 15.11.2015).
16. Программное обеспечение СибФТИ: Листомер [Электронный ресурс]. URL: <http://goo.gl/9TpfVm> (дата обращения: 15.11.2015).
17. Программная часть SIAMS MesoPlant: Определение параметров листьев растений [Электронный ресурс]. URL: http://old.siams.com/solutions/sol_meso_leaves.htm (дата обращения: 20.11.2015).
18. Максимова Л.А., Нурминская Ю.В., Петров А.Н. Применение цифровых техноло-

гий в морфометрии растений. Методическое

обеспечение. Иркутск: Изд-во ИГУ, 2013. 40 с.

REFERENCES

1. Møller A.P., Pomiankowski A. Fluctuating asymmetry and sexual selection. *Genetica*, 1993, 89: 267–79.
2. Palmer A.R., Strobeck C.C. 1986. Fluctuating asymmetry: Measurement, analysis, patterns. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 17, 391–421.
3. Van Valen, L. (1962) A study of fluctuating asymmetry. *Evolution*, 16, 125–142.
4. Palmer A.R., Strobeck D. 2003. Fluctuating asymmetry analyses revisited. In: Polak M, ed. 2003. *Developmental Instability. Causes and Consequences*. New York: Oxford Univ. Press. - pp. 279–319.
5. Zakharov V.M., Trofimov I.E. Gomeostaticheskie mekhanizmy biologicheskikh sistem: gomeostaza razvitiya Ontogenez. 2014. vol. 45, no 3. pp. 138–150.
6. Leamy L.J., Ch.P. Klingenber The genetics and evolution of fluctuating asymmetry. *Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2005. V. 36. P. 1–21.
7. Møller A.P., Thornhill R. 1997. A meta-analysis of the heritability of developmental stability. *J. Evol. Biol.* 10:1–16.
8. Parsons P.A. Fluctuating asymmetry: An epigenetic measure of stress. *Biological Review*, 1990, 65, pp. 131–145.
9. Lens L., Van, Dogen S., Kark S., Matthysen E., 2002. Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies. *Biol. Rev.* 77, 27–38.
6. Leamy L.J., Ch.P. Klingenber The genetics and evolution of fluctuating asymmetry. - *Annu.*
10. Zakharov V.M. *Asimetriya zhivotnykh*. Moscow: Nauka, 1987. 216 p.
11. Ivanov V.P., Marchenko S.I., Akimenkov

- N.V. Ispol'zovanie asimmetrii ploshchadei listovykh plastinok *Betulapendula* v kachestve indikatora ekologicheskogo sostoyaniya prirodnoi sredy / *Vestnik MarGTU*. 2009. n 3. pp. 68–74.
12. Levykh A.Yu., Puzynina G.G. Otsenka blagopoluchiya sredy po pokazatelyam stabil'nosti razvitiya rastenii i zhivotnykh / *Izvestiya Samar-skogo nauchnogo tsentra RAN*. 2012. vol. 14, no 5 (3). pp. 608–611.
 13. Skripal'shchikova L.N., Stasova V.V. Bio-indikatsionnye pokazateli stabil'nosti razvitiya nasazhdenii v narushennykh landshaftakh / *Sibirskii lesnoi zhurnal*. 2014, no 2, pp. 62–72.
 14. Metodicheskie rekomendatsii po vypolneniju ocenki kachestva sredy po sostojaniyu zhivykh sushhestv (ocenka stabil'nosti razvitiya zhivykh organizmov po urovnyu asimmetrii morfologicheskikh struktur) // *Rasporyazhenie Rosjekologija ot 16.10.2003 № 460*. Moscow : Nauka, 2003. 24 p.
 15. «LISTOMER» virtual'nyi pribor dlya opredeleniya ploshchadi i stepeni porazheniya list'ev. Available at: <http://catalog.sorashn.ru/node/863> (accessed 15 November 2015).
 16. Programmnoe obespechenie SibFTI: Listomer. Available at: <http://goo.gl/9TpfVm> (accessed 15 November 2015).
 17. Programmnyaya chast' SIAMS MesoPlant: Opredelenie parametrov list'ev rastenii. Available at: http://old.siams.com /solutions/sol_meso _leaves.htm (accessed 20 November 2015).
 18. Maksimova L.A., Nurminskaya Yu.V., Petrov A.N. *Primenenie tsifrovyykh tekhnologii v morfometrii rastenii. Metodicheskoe obespechenie*. Irkutsk: GOU VPO «IGU» Publ., 2013, 40 p.

Критерии авторства

Нурминская Ю.В., Малков Ф.С., Бахвалов С.В. выполнили экспериментальную работу, на основании полученных результатов провели обобщение и написали рукопись. Нурминская Ю.В., Малков Ф.С., Бахвалов С.В. имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Юлия В. Нурминская
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Российская Федерация, 664033,

Contribution

Nurminskaya Yu.V., Malkov F.S., Bakhvalov S.V. carried out the experimental work, on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. Nurminskaya Yu.V., Malkov F.S., Bakhvalov S.V. have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Contribution

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

AUTHORS' INDEX

Affiliations

Yuliya V. Nurminskaya
Institute of Plant Physiology and Biochemistry
SB RASP
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,

г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
Ведущий инженер
nurminskaya@sifibr.irk.ru

Russian Federation
Leading Engineer
nurminskaya@sifibr.irk.ru

Федор С. Малков

Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
Российская Федерация, 664074,
г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83
Магистрант 1-го курса Института кибернетики
им. Е.И. Попова
iksut@narod.ru

Fedor S. Malkov

Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
1st undergraduate courses Institute
of Cybernetics of E.I. Popov,
iksut@narod.ru

Сергей В. Бахвалов

Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
Российская Федерация, 664074, г. Иркутск,
ул. Лермонтова, 83
К.т.н, доцент, заведующий кафедрой
автоматизированных систем,
bsv@istu.edu

Sergei V. Bachvalov

Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
Candidate of technical sciences,
Head of Department of Automated Systems
bsv@istu.edu

Поступила 05.05.2016

Поступила 05.05.2016