

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЬЮТЕРНОГО АНАЛИЗА МИКРОИЗОБРАЖЕНИЙ ЛИСТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ХАРАКТЕРИСТИК ОПУШЕНИЯ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L.

А.В. Дорошков¹, С.И. Арсенина², Т.А. Пшеничникова¹, Д.А. Афонников^{1,2}

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: ada@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Опушение листа у пшеницы имеет большое биологическое значение при адаптации к факторам внешней среды. Изучение особенностей морфологии опушения, а также выявление генетических факторов, ответственных за его формирование, позволят получать сорта, обладающие устойчивостью к суровым климатическим условиям, а также невосприимчивостью к ряду вредителей. Важным шагом в этом направлении является использование компьютерных технологий для описания количественных характеристик опушения. Для оценки характеристик опушения пшеницы в работе предложено использовать компьютерный анализ микроизображения поперечного сгиба листа растения. Результаты показали, что такая методика не требует больших временных затрат, позволяет оценивать плотность опушения, распределение трихом по длине и, таким образом, является эффективным подходом для массового анализа морфологических особенностей опушения листа у отдельных растений.

Ключевые слова: опушение листа, трихомы, компьютерный анализ микроизображений, *Triticum aestivum* L.

Введение

Трихомы пшеницы представляют собой одноклеточные или многоклеточные образования эпидермиса и по классификации Солередера относятся к простым кроющим волоскам (Solereder, 1908, цит. по: Мирославов, 1974). Опушение листа у пшеницы имеет большое биологическое значение в защите от вредителей и при адаптации к факторам среды. В частности, сильное «войлочное» опушение характерно для ряда засухоустойчивых сортов, относящихся к степной экологической группе; для сортов, произрастающих во влажном климате, напротив, характерно очень слабое «мохнатое» опушение (Крупнов, Цапайкин, 1990). Показано влияние опушения покровов на влагоудерживающую способность растений яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. (Лихенко, 2007). Кроме того, существуют данные о том, что сильно опушенные сорта пшеницы значительно более устойчивы к поражению жуком-листоедом

Oulema melanopus L. (Schillinger, Gallun, 1968), а также гессенской мухой *Mayetiola destructor* (Roberts *et al.*, 1979). Опушение имеет также большое физиологическое значение. Предполагается, что клетки трихом, основной объем которых вынесен за плоскость эпидермы, расширяют возможности формирования локальных градиентов тургорных давлений эпидермиса, а также снимают нарастающее в онтогенезе напряжение покровной ткани, увеличивая таким образом эффективность работы устьичного аппарата (Журавлева, 1992). Изучение генетического полиморфизма и выявление генов, ответственных за формирование опушения листа пшеницы, позволят целенаправленно получать сорта, имеющие заданный тип опушения.

Одним из перспективных направлений для решения этой задачи является использование статистических подходов для выявления взаимосвязей между генотипом и фенотипом растения, успешно используемых в генетических исследованиях *Arabidopsis thaliana* (Perazza

et al., 1999). Их преимущество заключается в том, что современные методы секвенирования и выявления полиморфизма генома позволяют быстро и эффективно устанавливать генотип растения и получать информацию о его мутантных аллелях (<http://1001genomes.org/index.html>). Основным затруднением на пути к массовому использованию такого подхода в настоящее время является отсутствие эффективных методов широкомасштабного количественного анализа фенотипов для многих признаков (Baenzinger *et al.*, 2008). Типичными методами определения морфологии трихом у растений разных видов являются сканирующая электронная микроскопия (Luo, Oppenheimer, 1999; Nagata *et al.*, 1999; Perazza *et al.*, 1999), качественная визуальная оценка или визуальный подсчет при помощи линзы (Lacare, Nguyen, 2005). К недостаткам этих методов можно отнести низкую точность качественных оценок и трудоемкость методов подсчета, которые осложняют их применение для анализа большого количества образцов. Получение массовых количественных оценок морфологических характеристик растений может быть эффективным при использовании цифровых технологий. Например, анализ двумерных изображений растений был успешно использован для изучения механизмов передачи сигнала (Xiong *et al.*, 1999). Анализ трехмерных моделей растения, полученных при помощи лазерного сканирования, позволяет получить оценки направления листовой пластины и ростового искривления побега у *Arabidopsis thaliana* (Kaminuma *et al.*, 2004).

В настоящей работе для оценки характеристик опушения листа пшеницы использован метод, реализованный в программе LHDetect, основанный на компьютерном анализе изображения поперечного сгиба листа (Arsenina *et al.*, 2008). Метод позволяет по оцифрованному изображению листа, полученному с использованием световой микроскопии в проходящем свете, оценивать плотность трихом на поверхности листа, а также распределение трихом по длинам. С помощью программы LHDetect проведена оценка опушения листьев 6 сортов яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., в число которых входили как практически неопушенные сорта, так и сорта с различными вариантами опушения. Предложенный метод

позволяет получать в цифровом виде данные как по плотности опушения, так и по распределению трихом по длине. Нами проведен анализ характеристик опушения листа для сортов пшеницы Балаганка и Голубка, неотличимых как тактильно, так и визуально по микроизображению. Показано, что эти сорта имеют близкие величины плотности опушения листа, однако различаются по распределению длин трихом. Сравнение образцов этих сортов по длинам трихом позволяет провести более четкое описание разнообразия опушения листа растений, чем сравнение его только по плотности.

Материалы и методы

1. Используемые сорта

В работе было использовано 5 сортов из коллекции лаборатории хромосомной инженерии злаков (Голубка, Балаганка, Омская 9, Сibaковская 3, Дуванка 501), а также сорт Mahndorfer Viktoria, полученный из коллекции Gene Bank, IPK, Гатерслебен, Германия. Растения были выращены в полевых условиях в окрестностях Новосибирска в 2008 г.

2. Приготовление препаратов

Для приготовления препаратов были использованы предфлаговые листья. После сбора листья помещались в емкости с высокой влажностью для предотвращения их высыхания и последующего повреждения. В выбранной для анализа точке лист сгибался поперек таким образом, что верхняя, анализируемая, поверхность листа оказывалась снаружи (см. рис. 1). Затем при необходимости удалялись края листа и сгиб помещался на предметное стекло. Фиксация производилась покровным стеклом или липкой лентой. Такая методика позволяет получить под микроскопом изображение, на котором на контрастном фоне различимы трихомы.

Толщина сгиба по отношению к ширине листа мала. Поэтому мы предполагали, что плотность опушения (число трихом на единицу площади) прямо пропорциональна числу трихом на единицу длины сгиба листа, которое можно оценить по микроизображению.

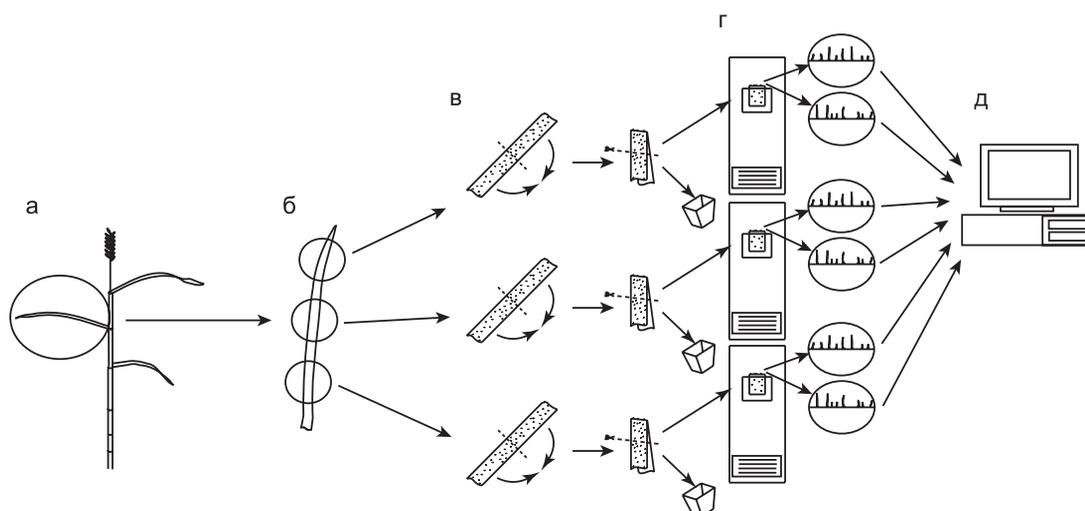


Рис. 1. Основные этапы анализа опушенности листа.

а – отбор предфлаговых листьев; б – выбор точек на листе; в – приготовление микропрепаратов; г – микрофотографирование и получение цифровых изображений; д – обработка изображений и анализ данных.

3. Получение изображений

Анализ препаратов производился под микроскопом Carl Zeiss Axioscop 2 plus ЦКП микроскопического анализа СО РАН, оснащенный цифровой камерой AxoCam HRc с адаптером TV2/3C 0,63x. Для обеспечения широкого поля зрения использовался объектив 5x NA=0,12. Были подобраны оптимальные условия позиционирования, освещенности листа и фона для получения микроизображений. Размер поля зрения при съемке микроизображения составил

2730 × 2163 мкм. Размер оцифрованного изображения составил 1300 × 1030 пикселей. Таким образом, высота и ширина одного пикселя на изображении соответствуют 2,1 мкм.

4. Обработка изображений

Алгоритм оценки степени опушенности может обрабатывать цветные изображения листа, который располагается справа, а его граница проходит приблизительно посередине изображения вертикально (рис. 2). Изображе-

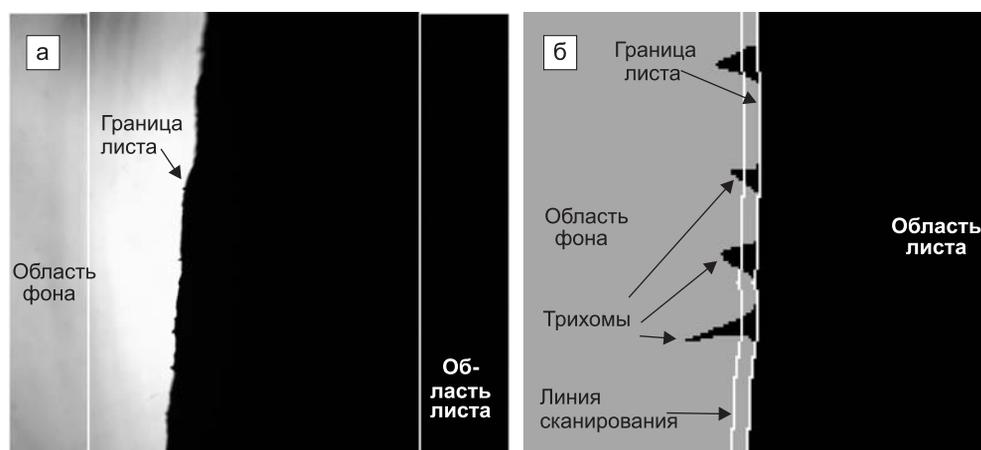


Рис. 2. Схема работы алгоритма определения характеристик опушенности листа.

а – выбор полос для определения цветовых характеристик фона и листа; б – граница листа и работа алгоритма подсчета числа трихом.

ния подаются на вход алгоритма в формате bitmap. Работа алгоритма состоит из нескольких этапов:

- определение цветовых характеристик области фона и листа;
- определение границы листа;
- подсчет числа трихом на различной удаленности от границы листа.

Опишем принципы работы алгоритма для этих этапов.

Определение цветовых характеристик области фона и листа. Первый этап анализа заключается в определении принадлежности пикселя изображения листу или фону. Предварительный анализ показал, что изображения листа и фона можно хорошо различить по цвету (в том числе и по его интенсивности). Файлы в формате BMP содержат информацию об интенсивности цветовых компонент (RGB – красной, зеленой и синей) каждого пикселя изображения. Поэтому для решения первой задачи мы использовали классификацию пикселей в пространстве компонент RGB. Для этого в правой и левой части изображения определялись полосы, которые заведомо принадлежат листу и фону (рис. 2, а). Для пикселей каждой из полос определялись средние значения компонент RGB. Каждый пиксель рисунка относился к типу «фон», если в пространстве RGB его положение ближе к средним значениям компонент RGB полосы фона и к типу «лист», если в пространстве RGB его положение ближе к средним значениям компонент RGB полосы листа.

Определение границы листа. После классификации точек на «фон» и «лист» определялась граница листа. Для этого изображение разбивалось на горизонтальные полосы фиксированной ширины, подобранной опытным путем. В каждой из полос находилась точка фона, являющаяся крайней правой в своей полосе. Полученные в каждой полосе точки являлись узлами границы. Соединив узлы ломаной, получим линию границы листа (рис. 2, б).

Определение числа трихом на различных расстояниях от границы листа. Для подсчета числа трихом на разном удалении от границы листа линия границы смещалась по горизонтали от листа на 1, 2, 3, ..., i , ..., 121 количество пикселей (всего анализировалось 120 линий). Для каждого i -го смещения подсчитывалось

число пересечений линии с трихомами (т. е. число непрерывных отрезков на такой линии, пиксели которых по цветовой классификации были отнесены к типу «лист»). Это число s_i является оценкой количества трихом на удалении от поверхности листа, эквивалентном i пикселям ($i \cdot 2,1$ мкм). На рис. 2, б представлен пример сканирования одной из линий проекции границы, которая пересекает 4 трихомы. Число трихом, имеющих на микроизображении длину i , n_i , вычисляется как $n_i = s_i - s_{i+1}$. В настоящей работе мы использовали более грубую оценку распределения трихом по длине, подсчитывали числа трихом, длины которых находились в пределах $i, i+5$, т. е. рассчитывали n_i с шагом 5 пикселей (~ 10 мкм). Полное число трихом S на микроизображении вычислялось путем суммирования всех значений n_i . В результате такого анализа каждое изображение листа характеризовалось 25 значениями вектора n ($i = 1, 6, 11, \dots, 121$ пикселей) и значением S , которые количественно описывают морфологию опушенности листа. Эти характеристики позволяют оценивать признак опушенности листа более точно, чем ранее использовавшиеся качественные характеристики («без опушения», «слабое опушение», «сильное опушение»), которые определялись тактильно.

Доступность программы. Текущая версия программы LHDetect реализована на платформе Windows32 с оконным интерфейсом и доступна по запросу авторам статьи.

5. Статистический анализ данных

Для сравнения средних значений числа трихом у растений пшеницы сортов Балаганка и Голубка использовался t -критерий равенства выборочных средних. Для иерархической кластеризации образцов по распределению длин трихом использовали метод UPGMA (Sneath, Sokal, 1973) и евклидово расстояние между векторами n .

Результаты и обсуждение

Результаты работы программы LHDetect. Результаты компьютерной обработки изображений листа для растений сортов Омская 9, Сибакловская 3, Дуванка 501, Mahndorfer Viktoria

представлены на рис. 3. Слева приведены микроизображения листа для растений этих сортов, справа – гистограммы распределений трихом по длинам. Из рисунка видно, что растения, которые обладают сильным опушением (рис. 3, а–в), могут иметь различные распределения трихом по длине. Так, для сортов Омская 9 и Сибаконская 3 характерно наличие большой доли длинных трихом, трихомы у этих растений имеют большой разброс по длинам. Для сорта Дуванка 501 характерно более однородное распределение трихом по длине, отсутствуют трихомы большой длины. У сорта Mahndorfer Viktoria опушение практически отсутствует. Лист имеет

небольшое количество очень коротких трихом, размер которых сравним с размерами неровностей поверхности листа. Из рисунка видно, что представление морфологии опушения листа в виде числового вектора n наглядно отражает как степень опушения, так и распределение трихом по длине.

Сравнение морфологии опушения сортов Балаганка и Голубка. Мы провели сравнение морфологии опушения листьев для двух сортов пшеницы Балаганка и Голубка. Эти два сорта пшеницы относятся к стародавним сортам, различным по происхождению. Эти сорта получены в первой половине прошлого века в Иркутской

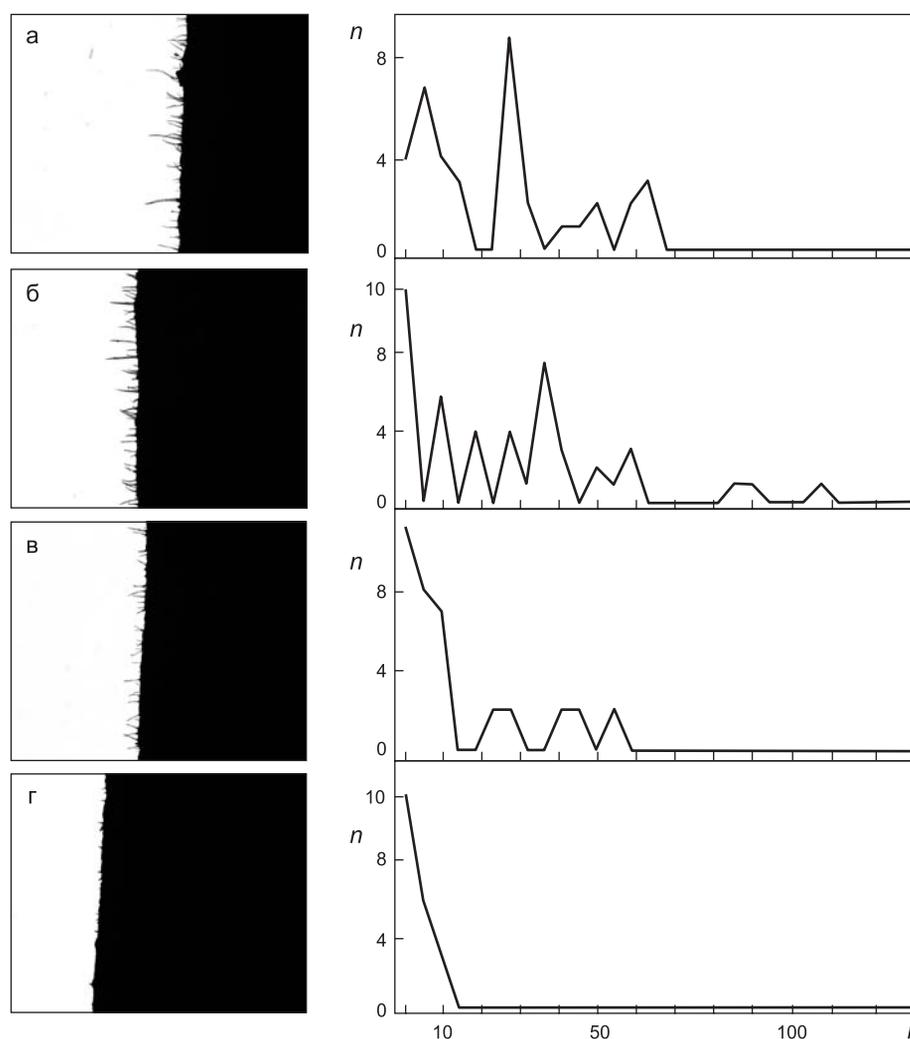


Рис. 3. Результаты анализа микроизображений листа программой LHDetect на примере растений пшеницы сортов Омская 9 (а), Сибаконская 3 (б), Дуванка 501 (в), Mahndorfer Viktoria (г). Справа представлены микроизображения листа, слева – гистограммы распределений трихом по длине, оцененные программой. По оси X отложена длина трихом в пикселях, по оси Y – значения n_i числа трихом.

(Голубка) и Кустанайской (Балаганка) областях. Эти два сорта характерны тем, что их опушение практически неотличимо как тактильно, так и визуально по микроизображению. Для более точного сравнения морфологии опушенности этих двух сортов использовался статистический анализ числовых характеристик, полученных программой LHDetect. В выборке, состоящей из образцов листьев 18 растений сорта Балаганка и 19 растений сорта Голубка, была проведена оценка характеристик опушенности n и S для двух независимо полученных изображений. Затем для каждого листа параметры n и S были усреднены.

Распределение полученных таким образом значений числа трихом S для двух сортов пшеницы проведено на рис. 4. Средние значения числа трихом составили 33,17 для сорта Голубка и 41,64 для сорта Балаганка. Статистический анализ показал, что различия между этими значениями являются значимыми согласно t -критерию Стьюдента ($p = 0,000001$). Таким образом, исследованные нами образцы листьев пшеницы сортов Голубка и Балаганка статистически значимо отличаются по плотности опушения листа (числу трихом на единицу площади).

Мы также провели сравнение образцов данных сортов пшеницы по распределению

длин трихом. Для этого был использован иерархический кластерный анализ, основанный на сравнении компонент векторов n . Результаты приведены на рис. 5. Из дендрограммы видно, что все образцы разделяются на 4 группы, близкие по распределению длин трихом. Группы 2 и 3 однородны по составу. В группу 2 входят образцы растений, представленных сортом Голубка, в группу 3 – сортом Балаганка. В первую и четвертую группы входят образцы и того и другого сорта. Мы построили усредненное распределение трихом по длине для растений, входящих в эти группы (рис. 6). Отчетливо выявляется то, что соотношение трихом различной длины неодинаково. Условно можно разделить трихомы на короткие – до 44 мкм (около 21 пикс.) и длинные – более 44 мкм.

Для первой группы образцов характерны большая доля коротких трихом и наличие небольшого числа более длинных трихом. Вторая и четвертая группы характеризуются небольшой долей коротких трихом и относительно большой долей трихом большей длины. В третьей группе большое число коротких трихом, с увеличением длины доля трихом резко уменьшается.

Таким образом, проведенный анализ распределения трихом по длине позволяет получить

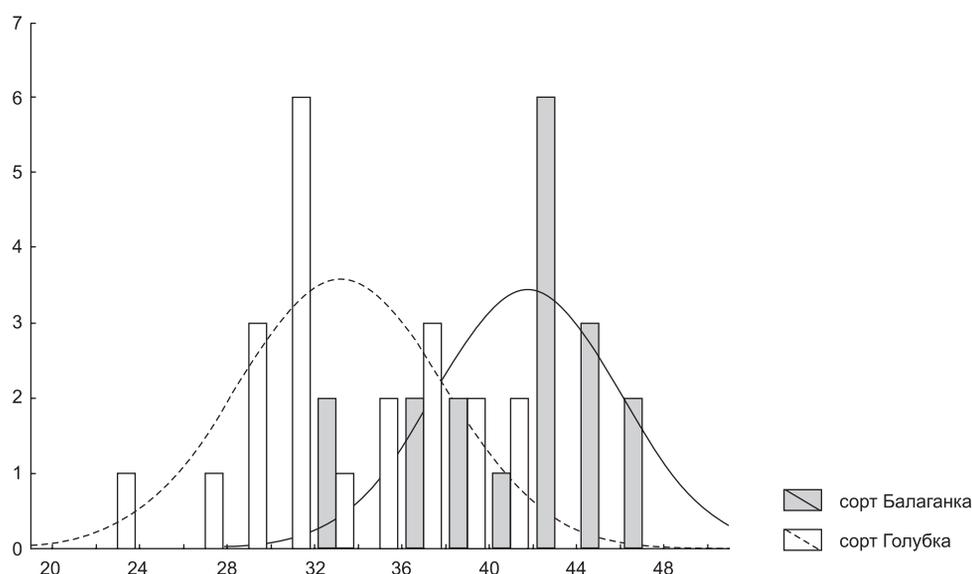


Рис. 4. Распределение числа трихом по длине в пикселях изображения для образцов листьев, принадлежащих сортам пшеницы Балаганка (темные столбцы, нормальная аппроксимация – сплошной линией) и Голубка (светлые столбцы, нормальная аппроксимация – пунктирной линией).

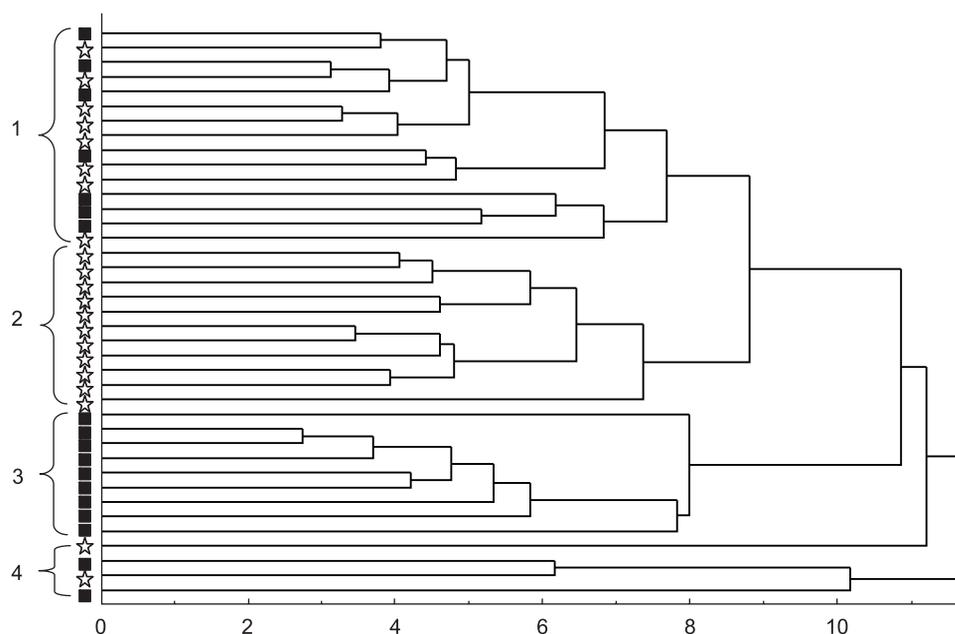


Рис. 5. Дендрограмма сходства образцов листьев растений пшеницы сортов Голубка и Балаганка по распределению длин трихом (компонент вектора n).

По оси X отложено расстояние между кластерами на дендрограмме. Слева приведены обозначения образцов: черный квадрат соответствует образцу сорта Балаганка, звездочка – образцы сорта Голубка. Фигурными скобками обозначены группы образцов.

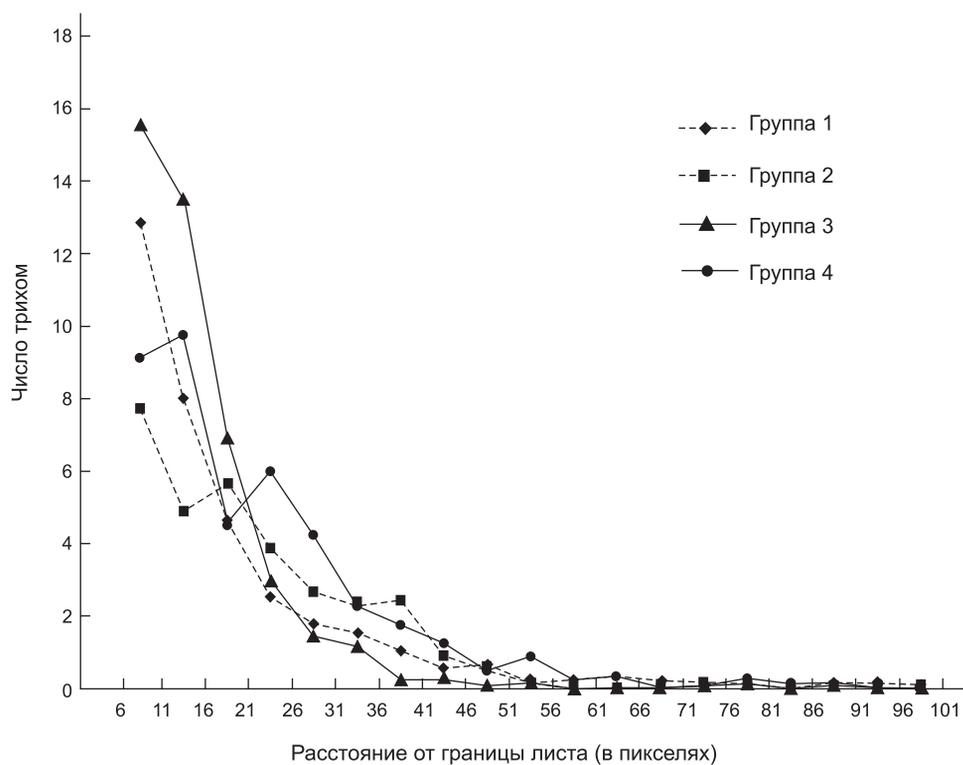


Рис. 6. Распределение трихом по длине, усредненное для образцов из четырех групп растений.

дополнительные данные о морфологии опушения листа и провести более детальную ее классификацию.

В настоящей работе мы использовали новую методику оценки морфологии опушения листа пшеницы, основанную на анализе микроизображения поперечного сгиба листа (Arsenina *et al.*, 2008). Практическое использование данной методики, представленное в настоящей работе на примере анализа образцов от растений разных сортов, выявило ряд ее положительных особенностей:

– с помощью предложенной методики удается количественно оценить плотность опушения листа;

– методика позволяет оценивать распределение трихом по длине и представлять результаты в виде числового вектора;

– для работы необходимы компьютер и оптический микроскоп, который позволяет сохранять микроизображение в цифровом виде;

– процедура получения изображений достаточно проста и не требует много времени, среднее время подготовки образца и получения изображения при настроенном микроскопе составляет около минуты;

– использование достаточно простого алгоритма анализа изображения в программе LHDetect позволяет выполнить операцию оцифровки за несколько секунд.

Дальнейшее исследование возможностей и недостатков предложенного метода позволит, по нашему мнению, улучшить точность подсчета трихом. Так, на практике оказалось, что при существующем алгоритме важную роль играет качество микроизображения. Часть нежелательных эффектов, которые затрудняют подсчет трихом, удается устранить путем подбора оптимальных условий съемки. Однако некоторые проблемы таким образом устранены быть не могут (например, перекрест или наложение трихом на микроизображении). По-видимому, часть нежелательных эффектов микроизображения можно будет в дальнейшем устранить за счет использования более совершенного алгоритма анализа.

В целом простота и низкая трудоемкость метода делают его выигрышным в задачах массового анализа морфологий опушения листьев пшеницы. Мы надеемся, что разработка подоб-

ных подходов в будущем позволит эффективно использовать огромный ресурс современных методов массового генотипирования растений в задачах поиска взаимосвязи генотип–фенотип.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке проекта № 10.7 «Компьютерное моделирование и экспериментальное конструирование генных сетей» по программе РАН «Молекулярная и клеточная биология», проекта № 18.13 «Эволюция молекулярно-генетических систем: компьютерный анализ и моделирование» по программе РАН «Происхождение и эволюция биосферы», государственного контракта 10104-37/П-18/110-327/180608/015 на выполнение НИиОКР по теме «Экосистемно-биоценотические и генетические механизмы биологической эволюции и корреляция биологических событий» по подпрограмме 2 программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Происхождение и эволюция биосферы» и гранта НШ-2447.2008.4 «Биоинформатика и системная компьютерная биология».

Литература

- Журавлева Н.А. Механизм устьичных движений, продукционный процесс и эволюция. Новосибирск: Наука, 1992. 140 с.
- Крупнов В.А., Цапайкин А.П. Опушение листьев пшеницы: генетические и экологические аспекты // С.-х. биология. Сер. «Биология растений». 1990. № 1. С. 51–57.
- Лихенко И.Е. О взаимосвязи опушения органов растений яровой мягкой пшеницы с хозяйственно и биологически ценными признаками в условиях Западной Сибири // Растениеводство и селекция. 2007. № 6. С. 25–31.
- Мирославов Е.А. Структура и функция эпидермиса листа покрытосеменных растений. Л.: Наука, 1974. 120 с.
- Arsenina S.I., Afonnikov D.A., Pshenichnikova T.A. Development of the computer program for defining leaf hairiness in wheat based on its microscope image processing // VI Intern. Conf. on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS'2008). June 22–28, 2008, Novosibirsk, Russia. Book of abstracts. Novosibirsk: Inst. Cytol. Genet, SB RAS, 2008. P. 29.
- Baenzinger S., Outstanding in their field: the phenotype

- of the 21st century plant breeder // XI Intern. Wheat Genet. Symp., 2008 (<http://hdl.handle.net/2123/3325>).
- Kaminuma E., Heida N., Tsumoto Y. *et al.* Automatic quantification of morphological traits via three-dimensional measurement of *Arabidopsis* // *The Plant J.* 2004. V. 38. P. 358–365.
- Lacape J.-M., Nguyen T.B. Mapping quantitative trait loci associated with leaf and stem pubescence in cotton // *J. Hered.* 2005. V. 96. P. 441–444.
- Luo D., Oppenheimer D.G. Genetic control of trichome branch number in *Arabidopsis*: the roles of the *FURCA* loci // *Development.* 1999. V. 126. P. 5547–5557.
- Nagata T., Todoriki S., Hayashi T. *et al.* Gamma-radiation induces leaf trichome formation in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 1999. V. 120. P. 113–119.
- Perazza D., Herzoga M., Hülskamp M. *et al.* Trichome cell growth in *Arabidopsis thaliana* can be derepressed by mutations in at least five genes // *Genetics.* 1999. V. 152. P. 461–476.
- Roberts J.J., Gallun R.L., Patterson F.L., Forster J.E. Effects of wheat leaf pubescence on the hessian fly // *J. Econ. Entomol.* 1979. V. 72. № 2. P. 211–214.
- Schillinger J.A., Gallun R.L. Leaf pubescence of wheat as a deterrent to the cereal leaf beetle, *Oulema melanopus* // *Annals Entomol. Soc. Amer.* 1968. V. 61. № 4. P. 900–903.
- Sneath P.H.A., Sokal R.R. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. San Francisco, W.H. Freeman and Co, 1973.
- Xiong L., David L., Stevenson B., Zhu J.-K. High throughput screening of signal transduction mutants with luciferase imaging // *Plant Mol. Biol. Rep.* 1999. V. 17. P. 159–170.

THE USE OF COMPUTER-BASED IMAGE PROCESSING TO LEAF HAIRINESS ANALYSIS IN WHEAT *TRITICUM AESTIVUM* L.

A.V. Doroshkov¹, S.I. Arsenina², T.A. Pshenichnikova¹, D.A. Afonnikov^{1,2}

¹Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: ada@bionet.nsc.ru;

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Leaf hairiness in wheat is of great importance for protection from pests and for adaptation to environmental factors. Study of the features of leaf hairiness morphology and identification of the corresponding genes will allow for obtaining varieties resistant to hard climatic conditions and certain pests. Using new computer-based technologies for descriptions of quantitative characteristics of leaf hairiness is the important step in this direction. In this study, the use of digital analysis of leaf folds images for leaf hairiness evaluation in wheat is offered. This technique is not time-consuming and allows analysis of hairiness density and trichomes length distribution. The suggested method appeared to be the effective approach for a large-scale analysis of leaf hairiness morphological peculiarities in individual plants.