

文章编号: 1005-0906(2009)01-0147-05

ImageJ 图象处理软件在测量玉米子粒大小中的应用

白光红^{1,2}, 张义荣², 刘弋菊², 邢鸿雁², 严建兵²,
彭惠茹², 章建新¹, 李建生²

(1. 新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052;

2. 中国农业大学 / 国家玉米改良中心 / 农业部作物基因组学与遗传改良重点实验室, 北京 100094)

摘要: 介绍了基于 ImageJ 软件处理数字图像辅助测量子粒大小的新方法。分别用图像处理和游标卡尺两种方法测量了 70 份玉米材料的子粒大小, 图像处理法测量的相对误差均小于 2%。对粒长、粒宽和粒厚成组数据进行 t 测验, 两种测量方法间差异不显著。相关性分析表明, 两种测量方法间呈极显著的线性相关。与游标卡尺法相比, ImageJ 软件处理图像法更方便快速, 可用于玉米等作物种子大小的实际测量工作。

关键词: 玉米; 图像处理法; 测量; 子粒

中图分类号: S513

文献标识码: A

Application of ImageJ Analysis Software In Measuring Kernel Size of Maize Seeds

BAI Guang-hong^{1,2}, ZHANG Yi-rong², LIU Yi-ju², LI Jian-sheng², et al.

(1. College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052;

2. National Maize Improvement Center of China, Key Lab of Crop Genomics & Genetic Improvement of Ministry of Agriculture, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Kernel size is one of the important economically characters of maize and traditional vernier caliper measurement is time-consuming. In this study, a new method was developed to measure seed size by ImageJ software. Totally, 70 maize materials were used and ImageJ method and vernier caliper method were employed to measure seed size, respectively. Relative error for the two methods were less than 2%. Based on t-test for the data of seed length, widths and thicknesses under the two measurements, $t_{0.05(138)}$ value are less than 1.977 3, indicating that there was no significant difference between the two methods. According to correlation analysis, the correlative coefficients of the seed length, widths and thicknesses measured by the two methods were 0.994 2, 0.994 5 and 0.994 5, respectively, reaching to highly significant levels. As compared to the vernier method, the ImageJ method could be more convenience and could be used for measuring not only for maize seeds but also for other crops.

Key words: Maize; ImageJ Analysis; Measure; Kernel

子粒大小是玉米重要的经济性状, 近年来控制

作物子粒大小 QTL 分离与克隆的研究受到广泛重视。在作物子粒大小的基因组学研究中, 表型性状的简便、快速与准确测量至关重要。通常, 玉米粒长、粒宽和粒厚用游标卡尺测量, 随着计算机与软件技术的飞速发展, 数字图像处理技术应用的日益广泛, 使得借助软件处理图像测量子粒大小成为可能。

美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, USA)开发的用于图像处理和分析的 ImageJ 软件, 具备许多图像处理和析功能。王银改等用该软件进

收稿日期: 2008-11-15

基金项目: 中国农业大学西部地区高校博士研究生访学项目(F-0704)、教育部创新团队项目

作者简介: 白光红(1972-), 男, 乌鲁木齐人, 讲师, 在读博士, 从事玉米育种研究。Tel: 13899955132

E-mail: bgh126@126.com

李建生为本文通讯作者。Tel: 010-62732422

E-mail: lijn@163bj.com

行网织红细胞计数和血清蛋白电泳图谱分析;Lamb J.C.等用该软件辅助拉直显微成像的玉米染色体;Ohto M-A 等用该软件处理图像测量成熟的拟南芥种子子叶的面积;Cunniff J 等将叶片成像后用该软件处理获取植物单株总叶面积。本研究用 ImageJ 软件处理图像法和传统的游标卡尺法测量同一套玉米材料的子粒大小,分析测量结果,验证利用软件处理图像方法测量子粒大小的可行性。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选 70 份不同大小子粒的玉米杂交种,每份材料随机数 10 粒作为一个重复,每个材料取 3 个重复,共 30 粒种子。供试材料见表 1。供试材料来源于同一年份同一地点随机取样的玉米杂交组合子粒,材料名称相同的是同一组合田间不同的重复。

1.2 测量方法

1.2.1 游标卡尺测量法

10 粒玉米种子分别按照长、宽、厚方向摆放,用游标卡尺测量。根据 3 个重复的平均计算单粒长、

宽、厚。

1.2.2 ImageJ 软件处理图象测量法

1.2.2.1 拍照

10 粒种子分别按照长、宽、厚方向摆放,固定数码相机高度和拍摄模式后垂直拍照。拍完同一批次种子照片后,再拍一把有刻度的直尺,作为“标尺”用于在该拍照模式下像素值与距离值的转换。相机的高度可根据所拍摄子粒的多少进行调节,只要数码相机取景窗口能装下即可,但拍摄同一批次的种子时要用同样的高度。在满足测量要求的情况下,尽量选用较低的图像分辨率,以提高处理图像的速度。

1.2.2.2 图像处理

运行 ImageJ 软件(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>),打开“标尺”图像,完成像素值与距离值的转换。打开种子图像,将彩色图像转换成背景为白色、子粒为黑色的黑白二值图像,输入分析命令,软件输出结果,数据保存在 Excel 电子表格中。图 1 是软件处理后得到种子的轮廓,箭头所示最远两个像素点之间的直线距离为 10 粒玉米子粒的长度值。

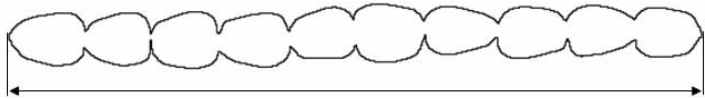


图 1 软件处理后的子粒轮廓图

Fig.1 Picture of kernels contour taken by ImageJ analysis

1.2.2.3 批量处理图像

该软件提供了“stack”功能,可以把一系列相关的图片以“stack”的形式显示在同一窗口内,通过一条命令就可以处理整个“stack”的所有图片。

1.3 数据处理和统计分析方法

用 Excel 2000 进行 t- 测验,并绘制散点图和分析两种方法的相关性。

2 结果与分析

2.1 供试材料子粒大小的变异

用游标卡尺法和图像处理法分别测量的玉米子粒大小平均值见表 1。70 份材料粒长变幅为 $9.50 \times 10^{-3} \text{ m} \sim 13.50 \times 10^{-3} \text{ m}$, 粒宽变幅为 $8.0 \times 10^{-3} \text{ m} \sim 10.0 \times 10^{-3} \text{ m}$, 粒厚变幅为 $3.50 \times 10^{-3} \text{ m} \sim 5.50 \times 10^{-3} \text{ m}$,表明供试材料的子粒大小有相当的差别。

2.2 图像处理法测量的相对误差

计算出用图像处理法测量的绝对误差和相对误差(表 1),相对误差均小于 2%,绝大多数相对误差小于 1%,这说明用 ImageJ 软件处理图像法测量玉米子粒大小精度完全能够达到测量要求。

表 1 图像处理法测量玉米子粒大小绝对误差及相对误差

Table 1 Detection the maize kernel size relative error and absolute error using image processing 10⁻³ m,%

材料 Material		粒长 Length				粒宽 Width				粒厚 Thickness			
编 号	名 称	卡尺法	图像法	绝对误差	相对误差	卡尺法	图像法	绝对误差	相对误差	卡尺法	图像法	绝对误差	相对误差
No.	Name	Caliper method	Image law	Absolute error	Relative error	Caliper method	Image law	Absolute error	Relative error	Caliper method	Image law	Absolute error	Relative error
1	农大 108	11.42	11.47	0.04	0.39	8.55	8.63	0.08	0.95	4.54	4.53	-0.01	-0.12
2	496A/127	12.28	12.26	-0.03	-0.22	9.06	9.06	0.01	0.09	4.33	4.35	0.02	0.36

续表 1 Continued 1

材料 Material		粒长 Length				粒宽 Width				粒厚 Thickness			
编 号 No.	名 称 Name	卡尺法 Caliper method	图像法 Image law	绝对误差 Absolute error	相对误差 Relative error	卡尺法 Caliper method	图像法 Image law	绝对误差 Absolute error	相对误差 Relative error	卡尺法 Caliper method	图像法 Image law	绝对误差 Absolute error	相对误差 Relative error
3	B394/F349	12.24	12.25	0.01	0.07	9.40	9.44	0.04	0.41	4.99	4.96	-0.03	-0.63
4	B394/488A	11.04	10.96	-0.08	-0.72	8.19	8.35	0.15	1.85	4.25	4.24	-0.01	-0.25
5	B394/489	11.69	11.66	-0.03	-0.23	8.91	8.98	0.07	0.74	4.52	4.49	-0.02	-0.47
6	B394/490A	11.61	11.65	0.04	0.32	8.70	8.76	0.06	0.70	4.50	4.51	0.01	0.15
7	B394/496A	11.43	11.46	0.04	0.32	8.68	8.72	0.04	0.43	3.97	4.0	0.03	0.68
8	吉 853/490A	11.49	11.46	-0.03	-0.28	9.47	9.62	0.14	1.52	4.96	4.90	-0.05	-1.05
9	豫 87-1/485	11.65	11.68	0.03	0.22	8.18	8.29	0.10	1.27	4.51	4.57	0.06	1.31
10	豫 87-1/490A	12.27	12.29	0.02	0.19	8.60	8.67	0.06	0.73	4.33	4.36	0.02	0.56
11	豫 87-1//497	11.95	12.03	0.08	0.66	8.83	8.90	0.07	0.77	4.35	4.42	0.07	1.69
12	郑单 958	12.66	12.58	-0.08	-0.63	8.76	8.78	0.02	0.25	4.25	4.27	0.02	0.40
13	昌 72/480A	12.18	12.19	0.01	0.04	9.09	9.11	0.03	0.30	4.10	4.10	0.00	0.00
14	昌 72/488A	11.92	11.97	0.04	0.36	8.61	8.66	0.05	0.57	4.01	4.05	0.04	1.06
15	昌 72/490A	12.72	12.65	-0.07	-0.54	8.10	8.16	0.06	0.75	4.06	4.08	0.02	0.39
16	127/490B	12.94	12.93	-0.01	-0.04	8.88	8.95	0.07	0.76	4.21	4.26	0.06	1.40
17	127/490A	12.95	12.92	-0.02	-0.19	8.73	8.80	0.07	0.80	4.22	4.28	0.05	1.26
18	127/491C	11.23	11.34	0.11	0.97	9.66	9.70	0.04	0.41	4.55	4.57	0.02	0.52
19	127/495A	12.20	12.22	0.01	0.12	8.36	8.44	0.08	0.98	4.66	4.70	0.04	0.88
20	481C/127	11.93	12.0	0.07	0.61	8.97	9.02	0.04	0.50	4.38	4.40	0.02	0.48
21	F349/127	11.95	12.02	0.07	0.61	9.06	9.19	0.12	1.37	4.73	4.69	-0.04	-0.77
22	1127/H32	11.74	11.75	0.01	0.07	8.20	8.29	0.09	1.10	4.33	4.39	0.05	1.22
23	1614/H32	11.88	11.91	0.03	0.26	9.05	9.08	0.03	0.33	4.13	4.16	0.03	0.72
24	TZ31/T138	11.62	11.65	0.03	0.23	8.98	8.96	-0.02	-0.19	3.93	3.94	0.01	0.34
25	郑单 958	12.24	12.21	-0.04	-0.30	8.74	8.72	-0.01	-0.15	4.23	4.26	0.04	0.86
26	TZ31/T138	11.39	11.45	0.06	0.54	8.30	8.38	0.07	0.90	4.27	4.31	0.04	0.91
27	TH78/T138	11.15	11.20	0.05	0.44	8.95	9.08	0.13	1.45	4.00	4.0	0.00	0.04
28	T7922/TMO17	11.49	11.60	0.11	0.95	8.75	8.89	0.14	1.62	4.58	4.59	0.01	0.15
29	T7922/TMO17	11.63	11.71	0.08	0.68	8.71	8.75	0.04	0.48	4.56	4.54	-0.02	-0.51
30	TH79/T7922	9.62	9.78	0.16	1.65	9.54	9.62	0.08	0.87	5.06	5.09	0.03	0.61
31	TH79/T7922	9.94	10.03	0.10	1.0	9.52	9.70	0.18	1.89	5.14	5.18	0.05	0.93
32	TH78/T178	10.14	10.23	0.09	0.89	8.81	8.89	0.08	0.86	4.58	4.63	0.05	1.19
33	TMO17/T87-1	12.59	12.62	0.03	0.25	8.48	8.58	0.10	1.15	4.21	4.26	0.05	1.23
34	TMO17/T87-1	12.64	12.65	0.01	0.11	8.43	8.56	0.12	1.47	4.19	4.17	-0.02	-0.43
35	TZ31/T87-1	12.11	12.20	0.09	0.71	8.68	8.76	0.08	0.87	4.36	4.37	0.00	0.08
36	502/127	11.81	11.96	0.15	1.30	9.21	9.28	0.07	0.74	4.24	4.22	-0.02	-0.38
37	502/127	11.36	11.53	0.17	1.47	9.39	9.47	0.08	0.90	4.20	4.26	0.06	1.45
38	白色糯玉米	11.87	11.95	0.08	0.66	9.28	9.37	0.09	0.97	4.36	4.39	0.02	0.55
39	黄色糯玉米	11.57	11.68	0.11	0.99	9.12	9.22	0.10	1.09	4.69	4.67	-0.02	-0.49
40	B393/490A	11.36	11.49	0.13	1.12	8.78	8.89	0.11	1.23	4.90	4.89	0.00	-0.02
41	498/127	12.47	12.47	0.00	0.01	9.27	9.35	0.08	0.83	4.60	4.62	0.02	0.38
42	7137/349	12.87	12.93	0.06	0.44	9.63	9.68	0.05	0.55	4.77	4.81	0.04	0.74
43	7137/349	12.72	12.67	-0.05	-0.39	9.75	9.78	0.03	0.32	4.65	4.69	0.03	0.75
44	486A/ 郑 58	12.65	12.69	0.05	0.37	9.43	9.47	0.04	0.39	4.60	4.64	0.04	0.90
45	490B/127	13.23	13.19	-0.03	-0.24	8.86	8.95	0.09	1.04	4.24	4.24	0.00	-0.02
46	497B/127	12.24	12.29	0.05	0.39	8.48	8.56	0.08	0.93	4.28	4.30	0.02	0.45
47	农大 108	11.92	12.01	0.09	0.79	8.43	8.56	0.12	1.47	4.47	4.48	0	0.06

续表 1 Continued 1

材料 Material		粒长 Length				粒宽 Width				粒厚 Thickness			
编 号 No.	名 称 Name	卡尺法 Caliper method	图像法 Image law	绝对误差 Absolute error	相对误差 Relative error	卡尺法 Caliper method	图像法 Image law	绝对误差 Absolute error	相对误差 Relative error	卡尺法 Caliper method	图像法 Image law	绝对误差 Absolute error	相对误差 Relative error
48	7248/F349	11.95	12.01	0.06	0.54	8.84	9.01	0.17	1.97	4.72	4.71	-0.01	-0.22
49	395/ 豫 87-1	11.87	11.91	0.04	0.34	8.83	8.95	0.12	1.39	4.41	4.41	-0.01	-0.17
50	395/ 豫 87-1	11.96	11.98	0.02	0.19	9.08	9.19	0.12	1.30	4.47	4.46	-0.01	-0.21
51	396/F349	11.99	12.11	0.12	1.01	8.98	9.12	0.15	1.63	4.67	4.67	-0.01	-0.17
52	391A/ 豫 87-1	11.06	11.18	0.12	1.08	8.88	9.0	0.12	1.32	4.65	4.72	0.06	1.39
53	391A/ 郑 58R	11.74	11.83	0.09	0.75	8.82	8.92	0.10	1.16	4.86	4.88	0.02	0.42
54	391A/489	11.65	11.74	0.09	0.74	8.60	8.66	0.06	0.69	4.0	3.97	-0.03	-0.81
55	农大 108	11.61	11.66	0.05	0.42	8.62	8.66	0.04	0.47	4.61	4.60	-0.01	-0.24
56	394/480A	11.40	11.60	0.20	1.76	9.28	9.39	0.10	1.12	4.64	4.66	0.03	0.60
57	394/480A	11.64	11.71	0.07	0.59	9.22	9.27	0.05	0.55	4.67	4.70	0.03	0.71
58	398/F349	12.34	12.37	0.04	0.31	9.37	9.40	0.03	0.37	4.92	4.93	0.01	0.12
59	398/F349	12.36	12.43	0.07	0.56	9.66	9.72	0.06	0.66	4.82	4.89	0.08	1.62
60	486A/127	12.76	12.73	-0.03	-0.26	9.01	9.10	0.09	1.03	4.54	4.56	0.02	0.40
61	490B/K12	12.23	12.24	0.01	0.09	9.08	9.15	0.07	0.81	4.58	4.57	-0.01	-0.25
62	490B/K12	11.58	11.62	0.04	0.33	8.33	8.41	0.08	0.92	4.98	4.95	-0.03	-0.66
63	郑单 958	12.50	12.48	-0.02	-0.13	8.94	8.94	0.01	0.06	4.24	4.19	-0.05	-1.28
64	484/127	12.54	12.55	0.00	0.01	9.60	9.68	0.08	0.88	4.27	4.30	0.02	0.52
65	496B/127	12.79	12.79	0.00	-0.02	8.64	8.75	0.11	1.31	4.16	4.19	0.03	0.67
66	496B/127	12.37	12.44	0.07	0.53	8.65	8.72	0.07	0.84	4.33	4.31	-0.02	-0.51
67	497A/ 郑 58R	12.08	12.13	0.05	0.41	8.77	8.90	0.13	1.49	4.55	4.56	0.01	0.15
68	488B/S05-03	12.50	12.52	0.02	0.18	8.68	8.75	0.07	0.86	4.11	4.15	0.04	0.85
69	农大 108	12.10	12.18	0.08	0.65	8.58	8.66	0.08	0.96	4.42	4.44	0.02	0.44
70	N6/127	10.15	10.24	0.09	0.92	9.16	9.16	0.00	0.04	5.08	5.12	0.04	0.80

2.3 两种测量方法测量的子粒大小总体平均数比较

用 Excel 2000 对测得的粒长、粒宽、粒厚的总体平均数分别进行成组数据双尾 t- 测验(表 2)。

表 2 子粒大小总体平均数的比较
Table 2 The compare of kernel size total average value

项 目 Item	粒长 Length		粒宽 Width		粒厚 Thickness	
	游标卡尺法 Caliper method	图像处理法 Image law	游标卡尺法 Caliper method	图像处理法 Image law	游标卡尺法 Caliper method	图像处理法 Image law
平均值(10 ⁻³ m)	11.90	11.95	8.90	8.98	4.47	4.48
自由度	138		138		138	
t	0.39		1.15		0.30	

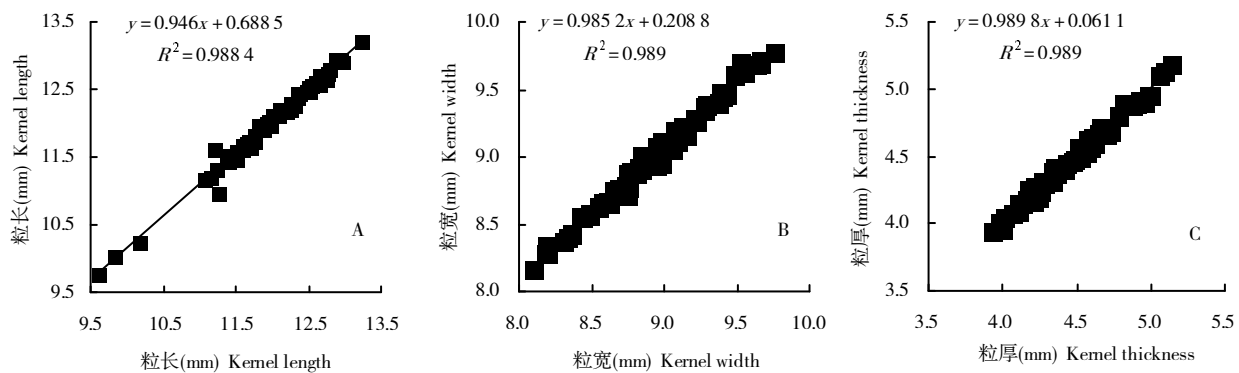
注: $t_{0.05(138)} = 1.977\ 3$ 。

两种方法分别测量同一套材料的长、宽、厚总体平均值很接近, 统计分析得到的 3 个 | t | 均小于 $t_{0.05(138)}=1.977\ 3$, 表明两种方法测量值间差异不显著。

2.4 两种测量方法的相关分析

用 Excel 2000 计算相关系数并绘出散点图(图 2)。如图所示, 游标卡尺法与图像处理法测得的粒长

之间相关系数为 0.994 2**, 粒宽之间相关系数为 0.994 5**, 粒厚之间相关系数为 0.994 5**。经统计检验, 3 个实得 r 值均大于 $r_{0.01(68)}=0.325$, 表明两种方法之间呈极显著的相关性, 图像处理法可用于种子大小的实际测量工作。



注:A、B、C 分别代表粒长、粒宽、粒厚散点图,横坐标为游标卡尺法测量值,纵坐标为图像处理法测量值。

Note: A shows means seed length; B shows seed width; C shows seed thickness; abscissa denote measurement by Vernier caliper; y-axis denote measurement by image processing method

图 2 游标卡尺法与图像处理法测量的玉米子粒大小相关关系散点图

Fig.2 Correlation plot of maize kernel size measured by vernier caliper and image processing method

3 讨 论

ImageJ 软件提供了一种快速、准确测定玉米子粒大小的方法。根据实验室的对比,用图像处理法测量 100 份每份 20 粒玉米材料的子粒大小,一个人 8 h 可以完成。按照玉米子粒长宽厚摆放,用游标卡尺每次测量 10 粒,至少需要 24 h,若单粒测量则需要更长的时间。图像处理法测量的另一个优势是,得到的数据自动保存在 Excel 表中。

对于子粒较小作物,ImageJ 软件处理图像法测量有更显著的优越性。如大麦、水稻,用游标卡尺单粒测量很困难,用图像处理法测量相对容易,并可以大规模快速测定。像菠菜、萝卜等更小粒的种子,子粒近圆形,子粒长宽难以用游标卡尺测量,用 ImageJ 软件处理图像法可以较容易的测定种子的粒径。甜玉米子粒大小是很重要的加工和鲜食指标,采用 ImageJ 软件处理图像法测量对于甜玉米的质量评定和育种选择均具有重要意义。

在利用 ImageJ 软件测量子粒大小时,为了得到准确的测量结果,拍照时应注意将样品放在固定的位置拍照;拍摄的子粒照片不能有阴影;拍摄同一批次的材料时,数码相机高度和拍照模式要一样;直尺放在放置样品的位置拍照。

参考文献:

- [1] 陆学军,丁万志,张世煌,等.我国玉米杂交种子产业实施“走出去”战略的研究[J].种子世界,2006(7):1-3.
- [2] 戴景瑞.浅谈我国玉米育种目标和发展思路[J].中国农业科技导报,2004,6(增刊):13-16.
- [3] 叶常丰,戴心维.种子学[M].北京:中国农业出版社,1994.
- [4] Fan C C, Xing Y Z, Mao H L, et al. GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein[J]. Theor. Appl. Genet., 2006, 112: 1164-1171.
- [5] Song X J, Huang W, Shi M, et al. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase [J]. Nature Genetics, 2007, 39(5): 623-630.
- [6] Ohto M-A, Fischer R L, Goldberg R B, et al. Control of seed mass by APETALA2[J]. PNAS, 2005(2): 3123-3128
- [7] 王银改,王清改,翟素平. ImageJ 软件辅助分析在网织红细胞计数中的应用[J].临床检验杂志,2005,23(3):210-211.
- [8] 王银改. ImageJ 软件在检验医学图像分析处理中的应用[J].中华检验医学杂志,2005,28(7):747-748.
- [9] Lamb J C, Meyer J M, Corcoran B, et al. Distinct chromosomal distributions of highly repetitive sequences in maize[J]. Chromosome Research, 2007, 15: 33-49.
- [10] Cuniff J,Osborne C, Ripley B, et al. Response of wild C4 crop progenitors to subambient CO₂ highlights a possible role in the origin of agriculture[J]. Global Change Biology, 2008, 14, 576-587.

(责任编辑:尹 航)