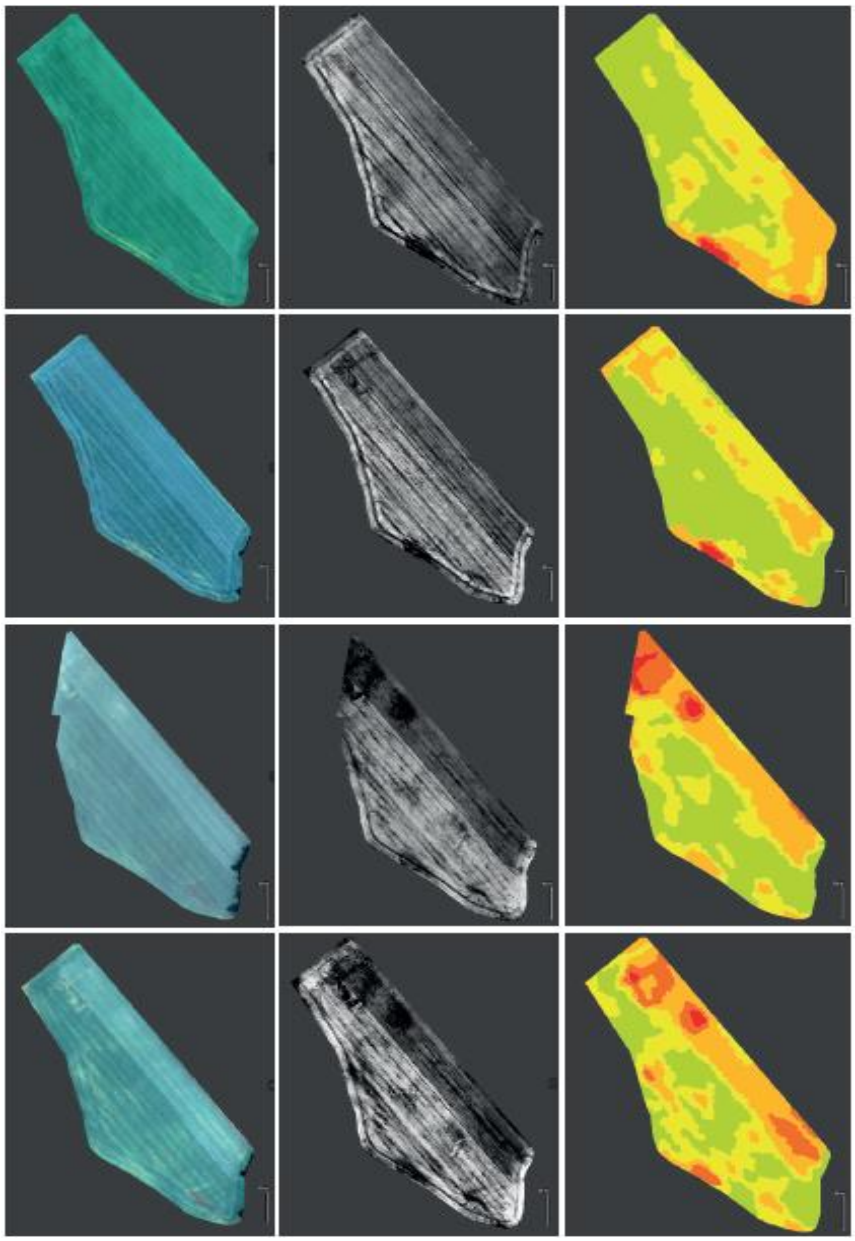
Technické prostředky obrazové analýzy

Lukáš Jan, Kroulík Milan, Raimanová Ivana, Vašková Hana



VÚRV
Výzkumný ústav rostlinné výroby
Poznatky pro udržitelné zemědělství

Publikace vychází za podpory Ministerstva zemědělství ČR při České technologické platformě pro zemědělství

Obsah

Obrazová analýza 4
1. Úvod 4
2. Potřebné vybavení pro obrazovou analýzu 4
2.1. Příklady využití jednotlivých přístrojů pořizující digitální záznam 4
2.1.1. Fotoaparát 4
2.1.2. Kamera 5
2.1.3. Mikroskop 5
2.1.4. Scaner 7
2.1.5. Termokamera 8
3. Digitální snímek 8
4. Možnosti pořízení obrazu 9
5. Spektra použitelná pro obrazovou analýzu 9
6. Úprava snímků 9
7. Software 9
7.1. ImageJ 64
7.2. SigmaScan 67
7.3. Flir 67
7.4. Výnosové mapy 67
7.5. N- senzor 67
7.6. EthoVision XT 67
8. Umělá inteligence – rozpoznávání 70
9. Problémy s využívaním obrazové analýzy 71
10. Budoucnost obrazové analýzy 72
11. Závěr 73
12. Použitá literatura 74

Cílem této publikace se přiblížit zemědělské praxi obrazovou analýzu. Její možné využití v praxi, nutné vybavení, problémy s obrazovou analýzou spojené a její budoucnost. Na následujících stránkách jsou uvedeny příklady, kterými se autoři zabývají. Věříme, že obrazová analýza v budoucnu napomůže ke zjednodušení práce zemědělců.

Obrazová analýza

1. Úvod

S rozvojem a dostupností moderních technologií se do zemědělství postupně dostává i obrazová analýza (také Analýza obrazu nebo anglicky Image Analyses). Jedná se o analýzu pořízeného snímku (např. listů rostlin), které je prováděná v různých časech, spektrech, nebo prostorovém uspořádání. K obrazové analýze je vždy zapotřebí zařízení, které digitalizuje obraz, a software, který je schopen provést analýzu daných snímků. Snímky jsou v dnešní době nejčastěji 2D, ale je zřejmé, že se v budoucnosti budeme setkávat i s vytváření 3D snímků a tzv. digital twins.

Různé metody obrazové analýzy jsou v dnešní době na vzestupu především díky možnosti kvalitativního sběru dat. Kvalitní fotoaparáty nebo kamery jde oproti dobám minulím koupit za rozumnou cenu. Dále k rozvoji obrazové analýzy přispívá vzestup IT - rychlé zálohování dat a možnost zpracování velkého množství dat během krátké doby.

Díky obrazové analýze může dojít k rozpoznávání poškození a chorob rostlin, chování zvířat.

Nesmíme však zapomínat, že obrazová analýza ještě není plně rozvinutá metoda. Má dva hlavní faktory, které ovlivňují její kvalitu. Těmi jsou kvalita procesu pořizování obrazu (dochází ke zkreslení) a metody pro přímou analýzu (software, který je použit). Tyto dva faktory se vzhledem k pokroku stále zmenšují a jejich efekt už není tak zřetelný.

2. Potřebné vybavení pro snímání obrazu

K pořizování digitálního obrazu jsou nejčastěji používány fotoaparáty a kamery, nicméně je možné využít i klasický kancelářský scaner.

2.1. Příklady využití jednotlivých přístrojů pořizující digitální záznam

2.1.1. Fotoaparát

2.1.2. Kamera

2.1.3. Mikroskop

Je potřebný pro zvětšování celé řady druhů, které se v zemědělství vyskytují. Může nám pomoci s detekcí šíření organismů, které jsou tak malé, že je nejsme schopni zachytit jiným zařízením. Dnes existuje celá řada mikroskopů – optické mikroskopy, stereomikroskopy, fluorescentní mikroskopy nebo elektronové mikroskopy. Nesmíme však zapomínat, že k mikroskopu musí být vždy připojeno zařízení, které obraz snímá – může to mít zařízení na snímání jak fotografií, tak videí.

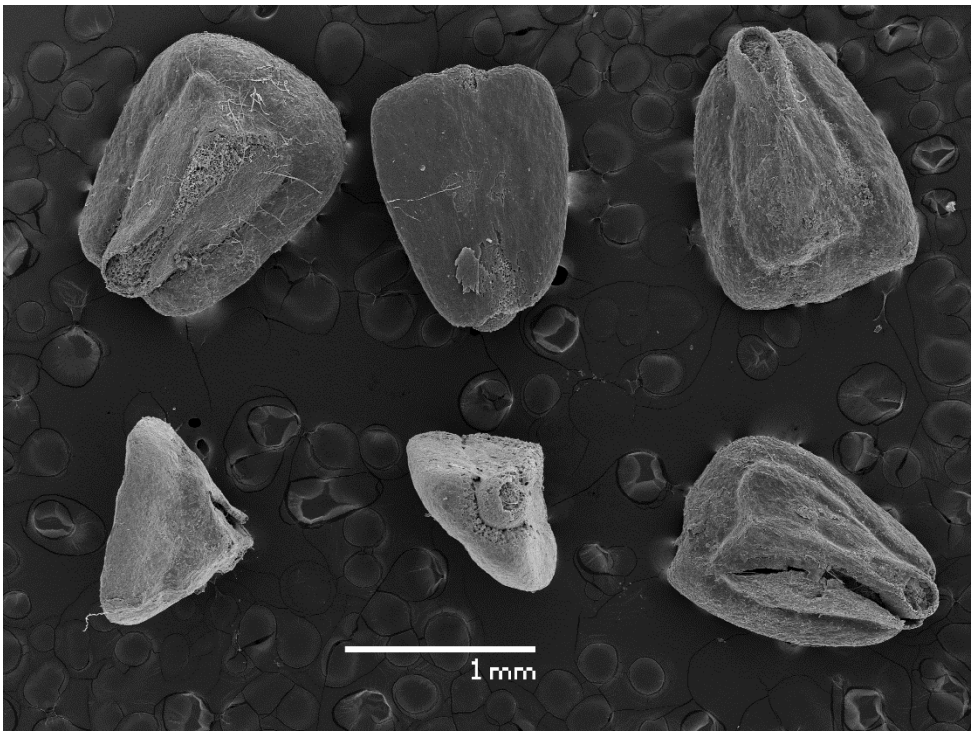
Optický mikroskop je asi nejběžnějším mikroskopem, který si každý představí, při použití slova mikroskop. Tyto mikroskopy mají soustavu dvou čoček, díky kterým dochází ke zvětšení zkoumaného objektu. Své jméno získaly po bílém světle, které se využívá jako zdroj záření. Toto světlo prochází přes vzorky. Vzorky jsou nasvicovány ze spodu. Oproti tomu stereomikroskopy (OBR. Zz, velmi často nazývané binolupy) mají světelný zdroj nad vzorkem. Díky tomu je poměrně velký prostor mezi vzorkem a osvětlením. Tento prostor může být použit pro manipulaci se vzorkem, proto se velmi často používají pro pitvání malých vzorků, ale své uplatnění mohou najít i v obrazové analýze.

Obr. ZZ: Binolupa

Dalším typem mikroskopu je fluorescentní mikroskop, který umožňuje zobrazení fluoreskujících látek ve vzorku.

Elektronový mikroskop je obdobou optických mikroskopů, jen je v něm proud fotonů (světla) vyměněn proud elektronů. Tento mikroskop má oproti klasickému mikroskopu výhodu v rozlišení je na něm možné zvětšení až 1 000 000:1. Díky takovému rozlišení jsme schopni rozpoznat i viry nebo spory hub. Existují dva typy elektronových mikroskopů SEM (rastrovací (scanovací) elektronový mikroskop) a TEM (transmisní elektronový mikroskop). V TEM mikroskopech elektrony procházejí skrz vzorek a až pak jsou detekován z tohoto důvodu musí být vzorky velmi tenké (10–500 nm). To se zajišťuje pomocí nařezání vzorů na plátky pomocí přístroje nazvaného ultramikrotom. V SEM mikroskopech neprochází elektrony skrz vzorek, ale jeho princip se založen získání informace, kde elektrony dopadnou na vzorek, protože část elektronů (tzv. sekundární elektrony) dopadají na vzorek v jinou dobu, snímky z tohoto mikroskopu vypadají jako 3D snímky (obr TT). Z těchto snímků ne možné měřit velkosti zkoumaných vzorků.

Obr. TT: Snímek ze SEM mikroskopu – shluk semen karabince evropského, na kterém jsou vidět hyfy hub.



2.1.4. Scaner

Další možností zařízení pro pořizování snímků je scaner, mnohdy stačí běžně dostupný kancelářský scaner. V zemědělství se tedy hodí pro pořizování snímků listů nebo kořenů. Ve VÚRV takto byla stanovena listová plocha šťovíků (*Rumex*), kterou jsou schopni sežrat mandelinky ředkvičkové (*Gastrophysa viridula*). Málo známé je využívání scaneru pro prostorové objekty, jako jsou těla hmyzu, ale i části rostlin (plody, hlízy). Je tak možné zjišťovat např. strupovitosti bramboru (obr. XX). Limitujícím faktorem hloubka ostrosti, která se pohybuje v řádu několika centimetrů a je velmi rozdílná mezi jednotlivými výrobci.

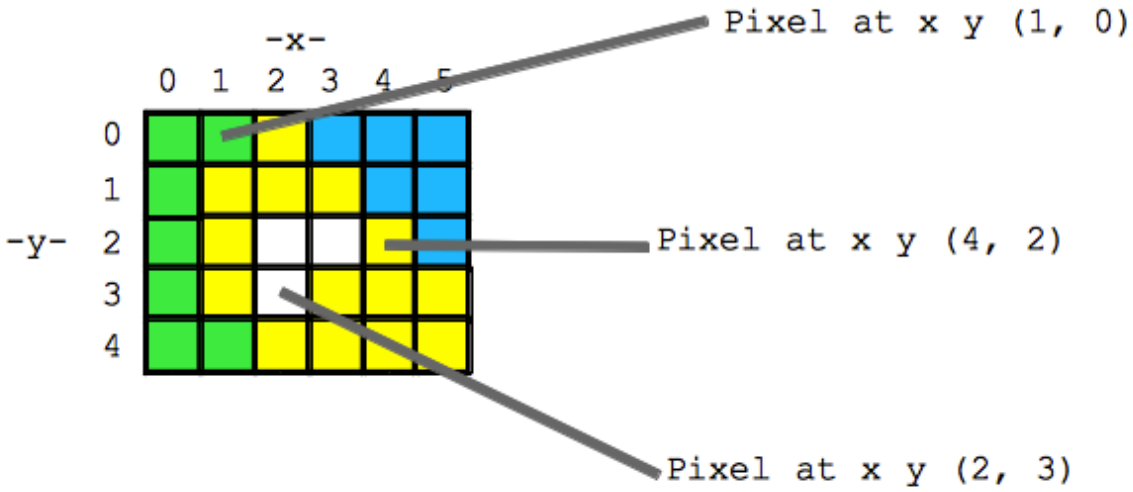
Obr.: Vzorek bramboru při scanování pro následnou obrazovou analýzu.

2.1.5. Termokamera

Další možností, jak získávat informace o vzorcích může být termokamera. Ta nám je schopná zaznamenat teplotní rozdíly mezi jednotlivými vzorky. V praxi se termokamera s obrazovou analýzou může například používat na detekci a postupné mrznutí vzorků nebo na rozšíření se zánětu v tělech živočichů. Tato obrazová analýza se již používá pro záněty nohou u dostihových koní nebo v sadařství, kde je velkým problémem detekce mrznutí květů.

3. Digitální snímek

Výsledek záznamu digitálním zařízení je vždy matice obrazových bodů (pixelů, obr.XO). Tyto body jsou uvedeny v dvourozměrném souřadnicovém systému a nesou informaci o barevné hodnotě a své intenzitě. Nejčastěji se setkáváme s barvami RGB spektra (červenou, zelenou a modrou – z angličtiny Red-Green-Blue). Tyto hodnoty jsou převedeny na číselné hodnoty. Tyto hodnoty jsou následně převedeny do výsledné fotografie. Při vytváření snímků nesmíme zapomínat na možné chyby a horší kvality snímky, které jsou dané rozlišením snímače a rozlišení úrovní komprese.



Obr. XO. Barevné vyjádření pixlů.

4. Možnosti pořízení obrazu

Dron, statif, pojízdné vzorkování (skleníky), laboratoř, mikroskopy,

robotické platformy @Milan

Technikálie

5. Spektra použitelná pro obrazovou analýzu

viditelných, mikrovlné, radiová a termální HSB, HLS

6. Úprava snímků

Po pořízení obrazu je mnohdy dobré daný obraz před obrazovou analýzou upravit. Je možné udělat rozklad na barevné složky, převést snímek na černo-bílý, vytvořit konverze do jiných barevných spekter nebo vyfiltrovat nějaké barvy.

Dále následuje měření velikostí (plochy nebo délky) nebo určování barevných složek v zájmových oblastech.

7. Příklady softwaru používaného k obrazové analýze

Pro analýzu obrazu existuje mnoho softwarů. Liší se v mnoha vlastnostech a typu zpracovávaných dat (videa vs. fotografie). Dalším velkým rozdílem mezi programy může být to, zda se data mohou zpracovávat v průběhu natáčení videí, nebo zda video musí být natočeno a následně analyzováno. Díky ukládání videí nebo fotografií je potřeba mít dostatečně času na zpracovávání dat a místa na disku, kam je potřeba záznam uložit.

Některé softwary jsou volně ke stažení. Jiné softwary mají placenou verzi. Zároveň se mohou lišit v možnostech zpracovávání dat. Je tedy potřeba si vždy zvolit nejvhodnější software ke zpracovávání těchto dat. V následující části této publikace se budeme zabývat příklady softwarů, které jsou používané ve VÚRV.

Tato část se bude

soustřeďovat na popis prostředků, zařízení a postupů, kterými je 1. možno obraz získat či

zaznamenat a 2. podrobit vlastní obrazové analýze. Ve speciální části bude na příkladech z širší rostlinolékařské praxe (mykologie, nematologie, bakteriologie, entomologie, herbologie) demonstrováno použití obrazové analýzy. Tyto příklady by neměly být chápány jako kuchařka, nýbrž jako příklad či inspirace pro řešení obdobných případů týkajících se měření velikostí (oddíly 2.1, 2.2), měření ploch (oddíly 2.3, 2.4), počítání objektů (oddíl 2.5) či identifikace objektů (oddíly 2.6, 2.7). Všechny tyto studie jsou výsledkem výzkumu na jednotlivých pracovištích VÚRV, v.v.i. a odkazy na původní vědecká sdělení jsou přiloženy. Ve složce software jsou k dispozici programy pro úpravu digitálních obrazů (GIMPfreeware), pro obrazovou analýzu (ImageJ - freeware, SigmaScanPro5 – 30 denní demoverze) a software pro ovládání digitálního fotoaparátu a prostřednictvím osobního počítače (CAM2COM). Součástí některých příkladů jsou i samotné algoritmy průběhu obrazové analýzy zaznamenané ve formě maker, která lze v přiložených programech na přiložených fotografiích vyzkoušet.

1.1 ZÁZNAM OBRAZU

Získání digitálního obrazu je prvním, esenciálním krokem obrazové analýzy. Zvládnutí této fáze často determinuje rychlost, kvalitu, přesnost a složitost dalších kroků. Obrazový záznam lze získat cestou analogovou (záznam na film) nebo digitální (záznam na paměťové digitální médium). Výstupem analogového záznamu je negativ, diapozitiv, případně následná zvětšenina na fotografickém papíru. V případě analogového záznamu je k následné digitalizaci nutné použít plochý nebo filmový scanner. Přímý digitální záznam se děje prostřednictvím digitálního fotoaparátu nebo plošného scanneru.

Digitalizační zařízení:

a/ digitální fotoaparát (kompaktní nebo zrcadlovka)

Digitální zrcadlovky mají oproti kompaktním fotoaparátům některé přednosti. Použití většího snímacího senzoru přináší kvalitnější kresbu spolu s nižší hladinou šumu v obraze. Donedávna byly v těchto fotoaparátech používány senzory do poloviční velikosti kinofilmového políčka, ale v současné době někteří výrobci digitálních zrcadlovek přechází na tzv. fullframe velikost senzoru tj. velikost rovnající se velikosti kinofilmového políčka (36 x 24 mm). Výhodou je opět větší zachyceného obrazu. Nezanedbatelnou předností bývá při

terénním snímání možnost přímého pozorování fotografovaného objektu skrz objektiv fotoaparátu, pohotovost celého zařízení a možnost výměny / použití různých typů velmi kvalitních specializovaných objektivů (makroobjektivy, teleobjektivy atd.) ve spojení s dalšími přídavnými zařízeními (blesky, mezikroužky) komunikujících s automatikou fotoaparátu. Přednosti kompaktních fotoaparátů lze spatřovat především v jejich skladnosti, cenové dostupnosti, jednoduchém spojení s mikroskopy a pořizování videosekvencí, které je možno rovněž učinit předmětem zpracování prostřednictvím obrazové analýzy. Tato poslední vlastnost se v současnosti začíná aplikovat i u některých digitálních zrcadlovek a digitální zrcadlovky začínají výrobci nabízet častěji i ve spojení s mikroskopickou technikou. Digitální fotoaparáty lze využít ve spojení s vhodným programem i pro časosběrný záznam obrazu v přednastavené frekvenci snímání (např. záznam 1 fotografie / 5 minut). Většina fotoaparátů má senzor v poměrech 3:2 (tj. poměr kinofilmového políčka), ale fotoaparáty některých výrobců jako například Olympus mají senzor poměru 4:3.

b/ digitální kamera

Je nedocenitelným prostředkem umožňujícím dlouhodobý záznam biologických procesů. Velmi častá je jejich spojení s mikroskopickými zařízeními prostřednictvím redukcí s cílem poskytnout živý obraz a záznam. V terénních podmínkách se při pořizování makrozáznamů velmi osvědčují přenosné USB videokamery ve spojení s notebookem, který slouží pro

uložení dat. Tyto drobné videokamery mají v některých případech integrovány kolem objektivu do kruhu uspořádané LED diod, které „bezstínově“ nasvítí cílový objekt. Pro zpracování videozáznamu cestou analýzy obrazu existují úzce specializované programy, které jsou schopny analyzovat v reálném čase vysoký datový tok spojení s danou frekvencí snímkování. Příkladem velmi rozšířeného softwaru pro oblast zemědělství a biologie je program EthoVision.

b/ scanner (plošný) a filmový

Plošné scannery lze použit pro digitalizaci průhledných i neprůhledných objektů. U neprůhledných objektů jsou nedocenitelným pomocníkem při snímaní zejména plošných objektů typu listů. Jednoduchým způsobem lze samozřejmě digitalizovat i papírové barevné i černobílé fotografie. Obdobně lze takto získat digitální obraz různých živých či neživých

objektů plošných rozměrů, např. listových skvrnitostí, požerů a dalších biotických či abiotických poškození. Méně známo je, že lze výhodně snímat i objekty prostorové (plody, hlízy, hmyz atp.). Zde je limitujícím faktorem hloubka ostrosti, která se pohybuje v řádu několika centimetrů. Scannery různých výrobců se v tomto parametru liší. V případě průhledných objektů se jedná zejména o digitalizaci negativních filmů či diapozitivů. V tomto ohledu jsou limitními faktory rozlišení a zejména pak parametr Dmax, který udává, jak širokou jasovou škálu je schopno zařízení zpracovat. Zde by hodnoty Dmax neměla nikdy být nižší než 3.6. V opačném případě dochází při digitalizaci k nenahraditelné ztrátě informačního záznamu. Lépe bývá proto využít specializované služeb profesionálních fotografických laboratoří disponujících bubnovými scannery nebo kvalitními filmovými scannery.

7

Digitální obraz

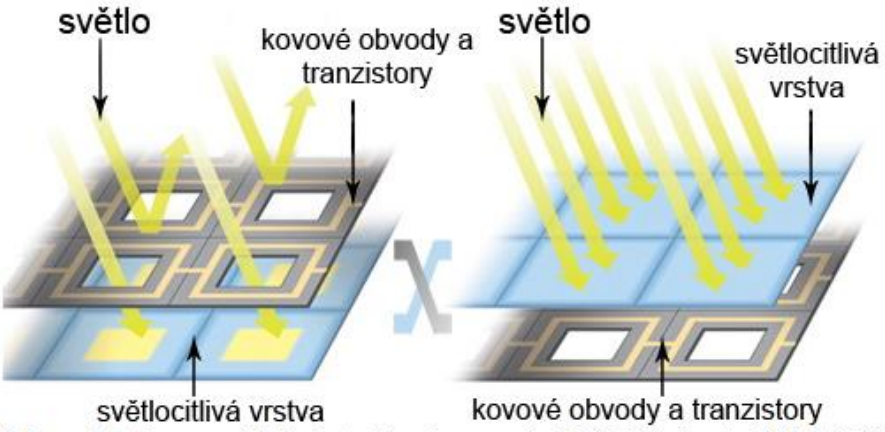
Výsledkem záznamu odrazu viditelné části spektra elektromagnetického záření snímačem digitálního zařízení je vždy matice obrazových bodů (pixelů). Jednotlivé body jsou jednoznačně určeny svojí polohou v dvourozměrném souřadnicovém systému os *x,y* a obsahují informaci o barevné hodnotě a jasu (intenzitě). Jas a barva se nemohou uvnitř pixelu měnit. Barva viditelného spektra bývá zjednodušeně definována nejběžněji třemi barevnými složkami – červenou, zelenou a modrou – RGB. Všechny tyto polohové a barevné hodnoty jsou vyjádřeny číselnými hodnotami, které jsou následně interpretovány programovým vybavením do konečné podoby digitální fotografie, která je fakticky tvořena pouze souborem čísel. Digitální fotografii si lze v tomto kontextu zjednodušeně představit jako tři barevné vrstvy, které svým smícháním vytvářejí konečný barevný vjem. Jakákoliv úprava digitální fotografie je tedy předmětem práce programu s číselnými hodnotami pomocí matematických operací, které jsou vtěleny do podob rozličných funkcí (např. filtry, úprava jasu, kontrastu atd.).

V závislosti na povaze a velikosti zaznamenávaného objektu bývá nezbytné vložit mezi koncové zařízení typu digitálního fotoaparátu jiný optický prostředek vhodný k zachycení požadovaného objektu. Tím může být například mezikroužek, předsádka, makroobjektiv, stereomikroskop, mikroskop optický, elektronový skenovací či transmisní. Již v samém počátku záznamu obrazu lze udělat mnoho chyb, které jsou v dalších

fázích v lepším případě obtížně odstranitelné. Konečný počet obrazových bodů digitální fotografie je dán rozlišením snímače a rozlišení úrovní komprese. Kvalita výstupu je dále záležitostí velkosti snímače ve vztahu k rozlišení a interního procesu zpracování obrazové informace softwarem fotoaparátu.

Obrazové snímače:

V současnosti jsou nejrozšířenější snímače typu CCD (**C**harge-**C**oupled **D**evice) a CMOS (**C**omplementary **M**etal-**O**xide **S**emicoductor), jejichž senzory pracují na principu převodu světelné energii na elektrickou. Jednotlivé „buňky“ senzorů citlivé na světlo jsou uspořádány do plošné matice, přičemž rozlišovací schopnost snímačů je dána násobkem počtu sloupců a řádků této matice. Hodnoty výsledného náboje jednotlivých buněk je následně interpretována.



Další ukázka odlišného uspořádání struktur, konvenční CMOS (vlevo), BSI CMOS (vpravo)
zdroj: fujifilm.co.uk

U systému CCD je nakumulovaný náboj ve formě analogového signálu konvertován analogově/digitální převodníkem do digitální podoby. Tento typ snímače je citlivý především na intenzitu světla a méně na barvu - získaný obrázek je černobílý. Výsledného barevného obrazu je dosaženo předřazením příslušného barevného filtru. Nevýhodou CCD detektorů je vzájemné ovlivňování nábojů v sousedních buňkách, malý rozsah intenzit a nemožnost adresovat jednotlivé buňky. Naopak výhodami tohoto detektoru oproti druhému typu je vysoké rozlišení, vysoká rychlost převodu signálu a nízký šum ve výsledném obraze.

Systém CMOS využívá technologie výroby integrovaných obvodů vysoké hustoty, která umožňuje umístit na čip velké množství MOS tranzistorů, které je poté možné adresovat pomocí označení sloupců a řádků. Produkce těchto detektorů je sériová a tedy také levnější

než u CCD prvků. Výhodou CMOS senzorů je také větší rozsah intenzit (asi o 4 řády), nízká spotřeba energie a snazší napájení, ovšem takto získané obrazy mají také cca o 1 řád vyšší šum.

Při volbě jednotlivých zařízení pro danou aplikaci je nutné brát v úvahu také další schopnosti zařízení. Jedná se například o způsob připojení přístroje k počítači (USB, FireWire), formát získaných snímků (JPEG, TIFF, RAW), schopnost snímat digitální videozáznam (AVI, MOV), možnost ovládání prostřednictvím specializovaného programu v počítači (např. CAM2COM).

Faktory ovlivňující kvalitu digitální fotografie

Důležitými parametry jsou použitá clona (ovlivňuje hloubku ostrosti a kresbu), rychlost závěrky (ovlivňuje pohybovou neostrost) a citlivost (ovlivňuje úroveň šumu). V rámci softwarového nastavení fotoaparátu lze zvolit jakoukoliv příslušnou nabízenou hladinu rozlišení vyjadřovanou v násobkem bodů os x, y (případně počtem bodů na palec – dpi – u scannerů s ohledem na výstupní velikostní formát). Úroveň komprese následně rozhoduje o kvalitě zachycených detailů (barvy nejsou ve formátu*.jpg předmětem komprese). Již zde je tedy nezbytné zvolit vhodné parametry s ohledem na účel pro který je obrazový záznam pořizován. Obecné doporučení je použít nejvyšší možné rozlišení a nejmenší dostupnou míru komprese (případně nekompresní formát *.tiff nebo *.raw). Vždy platí, že je lepší následně snižovat obrazové rozlišení a úroveň komprese než převzorkovávat na vyšší rozlišení. V tomto případě se sice obrazový počet bodů matematickým algoritmem navýší, ale žádné nové informace (detaily) takto upravená fotografie neposkytne. Hlavní pozornost při záznamu obrazu je nutné věnovat nasvícení a pozadí snímaného objektu. (v případě skeneru lze manipulovat pouze s pozadím).

Osvětlení je možno zajistit různými způsoby. Základní dělení vychází z prostředí ve kterém pracujeme. Jiné prostředky budou použity přímo v terénu a jiné při mikroskopické nebo laboratorní práci.

Terén

V terénních podmínkách lze vhodně využít dostupné světlo, případně ho doplnit nebo zcela nahradit umělým zdrojem světla z bleskového zařízení. Kritické je zvládnutí stínů, poměru přirozeného a umělého světla. Vhodně lze využívat měkké rozptýlené světlo při zatažené

obloze nebo mlze. Přímý sluneční svit lze rozptýlit pomocí odrazných nebo rozptylných ploch (např. bílá látka, čtvrtka papíru, pauzovací papír atp.).

9

Světelný mikroskop a stereomikroskop

V zásadě lze použít dva způsoby nasvícení umělým zdrojem světla nebo jejich kombinaci:

1/ nasvícení shora – využití při analýze barev či struktur

2/ nasvícení zespoda – analýzy počtu, velikosti, tvaru, plochy (v případě mikroskopu i při analýze barev a struktur)

Při nasvícení pod stereomikroskopem se nejčastěji používá bodové osvětlení pomocí jednoho nebo více párů světlovodných prvků studeného světla. Při tomto typu svícení je nejdůležitější „zkrotit“ stíny, které mohou obrazovou analýzu značně zkomplikovat či dokonce nežádoucím způsobem zkreslit výsledky. Zvládnutí tohoto typu osvětlení s ohledem na opakovatelnost nastavení není triviální. Lepé než přímé svícení se osvědčuje předsazení pauzovacího papíru pro rozptýlení a změkčení světla nebo odraz od světlých reflexních ploch. Částečně také pomáhá kombinace se spodním typem svícení.

Problém eliminace stínů a opakovatelnosti svícení asi nejlépe řeší využití kruhového osvětlení nasazeného přímo na objektiv mikroskopu. Kruhový zdroj světla poskytuje měkké rozptýlené světlo, které snímaný objekt rovnoměrně nasvítí. Pozor však u lesklých objektů – dochází k nežádoucímu odlesku, který se projeví na fotografii nasnímáním obrazu odrazu kruhového světla ve formě vypáleného bílého kroužku prostého jakékoliv obrazové informace.

Spodní osvětlení poskytuje většinou odražené světlo zrcátka nebo jiné reflexní plochy.

Pozadí snímaného objektu je vhodné volit s ohledem na dosažení maximálního kontrastu ke snímanému objektu. Nejlépe se osvědčuje jednolitý bílý nebo černý podklad, které splňují podmínku kontrastnosti. Navíc pomáhají při kalibraci bílé / černé barvy na počátku obrazové analýzy. Velmi vhodná je semišová látka, která díky své textuře stíny pohlcuje. Při určitém úhlu nasvícení při snímaní mikroskopických objektu však může tato látka naopak vytvářet rušivé pozadí. Před ostrým snímání je tedy vhodné vždy provést sérii zkušebních snímků s jejich detailním prozkoumáním v zobrazení 1:1 na monitoru počítače.

10

1.2 OBRAZOVÁ ANALÝZA

V této fázi je obraz zpracováván s ohledem na předmět analýzy, kterou chceme provádět. Jde o to, zda se budeme zaměřovat na informaci obsaženou v barevné, případně černobílé složce (struktury, textury), zda předmětem zájmu budou informace velikostní (délky, plochy, úhly) nebo četnostní.

Nejobecnější postup analýzy obrazu od získání digitálního obrazu až po interpretaci výsledků zahrnuje následující kroky:

Typická sestava potřebných technických zařízeních potřebných při prácí v laboratoři zahrnuje 1/ mikroskop, 2/ světelné zdroje, 3/ plošný scanner, 4/ digitální fotoaparát, 5 / kameru (+ grabovací kartu), 6/ osobní počítač + monitor, 7/ programové vybavení pro obrazovou analýzu, 8/ tablet.

DIGITALIZACE

PRAHOVÁNÍ (BINARIZACE)

ÚPRAVA OBRAZU

MĚŘENÍ, POČÍTÁNÍ

INTERPRETACE VÝSLEDKÜ

STATISTICKÁ ANALÝZA

11

V následujícím textu bude ve velmi hrubých obrysech představen volně dostupný program Image J, který nabízí všechny podstatné funkce, které jsou od programu pro obrazovou analýzu vyžadovány. Představeny budou nejběžněji používané nástroje ve sledu odpovídající práci při vlastní obrazové analýze (tento program byl rovněž použit v bakteriologickém příkladu uvedeném ve speciální části metodiky – viz. 2.6). Veškerá podrobná dokumentace k programu včetně široké nabídky zásuvných modulů a maker je dostupná na adrese http://rsbweb.nih.gov/ij/. Instalační soubor je umístěn ve složce programy.

1. Otevření obrazu

Otevřít v nabídce **Soubor - File/Open**. (V některých programech a při odpovídající technické konfiguraci hardwaru, je možné přímo snímat/zaznamenávat pomocí kamery nebo digitálního fotoaparátu živý obraz).

2. úprava barevného obrazu - nabídka ***Edit, Image, Process***

V nabídce *Edit* je možné provádět běžné typy úprav jako je například kopírování, vkládání,

vyříznutí, rotace, kreslení, invertování, pracovat s výběry, vytvářet masky atd.

12

Nabídka *Image* nabízí celou řadu nástrojů pro složitější úpravy snímků.

Mezi nejčastěji používané patří funkce:

· ***Type* – konvertor obrazů**

· **Oříznutí obrazu** *Image / Crop* - pokud naskenovaný obraz obsahuje objekty či pozadí, které nebudou analyzovány, je vhodné příkazem *Crop* upravit velikost obrazu tak, aby obsahoval jen ty objety, které mají být analyzovány a pokud možno minimum rušivých částí. Výběr se nastaví táhnutím myši.

· **Kontrast, světlost** *Image / Adjust / Brightness / Contrast* - Pokud se sledované detaily v obraze svou světlostí málo liší od ostatních objektů, pak je možné jejich kontrast zvýšit funkcí *Contrast* nebo *Brightness* Při posouvání hodnot kontrastu na stupnici se

13

v náhledu zobrazuje výsledek nové úpravy, kterou potvrdíme příkazem *Apply*.

· **Upravit obraz** *Image / Adjust* **a** *Image / Color* - umožňují další změny barev a intenzity v obraze, změna sytosti nebo odstínu apod.

· **Velikost / Otočit / Převrátit / Posunout** - *Image / Rotat*, **- t**yto funkce manipulují s obrazem a upravují jeho rozměry.

· **Změna velikosti** - *Image / Zoom* - přiblíží nebo oddálí obraz

V nabídce *Process* se skrývají další nástroje využitelné pro úpravy

· **Vyhladit / Zaostřit** - Tyto funkce potlačí resp. zvýrazní detaily v obraze (*Process / Smooth, Sharpen*).

14

3. Prahování

Prahování je jedna z nejdůležitějších fází obrazové analýzy během které je převáděn barevný nebo šedý obraz na binární (obraz obsahuje pouze dvě barevné hodnoty - černou a bílou). Program ImageJ dovoluje prahovat na základě jasové intenzity černobílého 8-bitového obrazu (tedy stanovit práh mezi pozadím a objekty v binárním obraze) buď manuálně nebo automaticky. V prvním případě je nejprve nutné provést konverzi z RGB barevného prostoru do 8-bitového formátu (*Image / Type / 8bit*). Teprve pak je možné provádět manuální

prahování (*Image / Adjust / Threshold*).

Automatické prahování je dostupné funkcí *Process / Binary / Make binary*.

Výhoda manuálního prahování spočívá v možnosti kontroly nad celým procesem prahování a tedy maximálně přesným výběrem oblastí, které budou následně podrobeny měření.

15

4. Editace binárního obrazu - nabídka *Process / Binary*

Editace binárního obrazu je poslední fází před fází měření. Aplikací různých filtrů či jejich kombinací dochází závěrečnému přesnému vymezení objektů zájmu.

· **Binarizace obrazu** – příkaz pro okamžitý převod obrazu na binární (*Make binary*)

·

· **Eroze / Dilatace, Otevření / Uzavření** - Tyto funkce jsou k sobě navzájem inverzní a jsou určeny výhradně pro binární obraz. Upravují objekty v obraze tak, že je zmenší nebo odstraní (*Erosion*), zvětší a příp. spojí (*Dilate*), vyhladí obrysy, odstraní malé objekty, rozpojí objekty spojené tenkou šíjí (*Open*) a spojí blízké objekty (*Close*).

· **Uzavřít díry / Zaplnit díry** - Tyto funkce se používají v těch případech, kdy chceme např. měřit plochu objektů, ve kterých vznikly během prahování a jiných úprav kvůli odlesku nebo jiným jasovým odchylkám díry. První funkce uzavře díry, které jsou v úzkém místě otevřeny a druhá funkce pak takto uzavřené díry vyplní.

· **Obrys** - funkce nalezne a zvýrazní obrysy objektů (*Outline*).

· **Morfologická separace objektů** - funkce dokáže od sebe oddělit překrývající se nebo dotýkající se objekty (*Watershed*) rozdělit objekty, které se překrývají nebo dotýkají (oddělit objekty je možné i manuálně, nakreslením čáry do obrazu - viz Vložit čáru, kruh, elipsu).

· **Zaplnění děr** – tato funkce se aplikuje v případě nutnosti vyplnit uzavřený prostor objektu – například při měření plochy (*Fill holes*)

· **Kostra obrazu** – tato funkce je zvláště vhodná například pří práci s vláknitými strukturami (např. hyfy hub), kdy se její aplikace projeví vytvořením kostry objektů (*Skeletonize*).

16

7. Měření - nabídka **Analyze**

V případě provádění interaktivního měření délek, ploch nebo úhlů je nejprve provést kalibraci měřítka (tj. nastavit kolik pixelů odpovídá např. 1cm) (*Analyze/Set scale*).
Následně je možné naměřené hodnoty odečítat (při použití nástroje úsečka nebo úhel) z oblasti spodní části hlavního panelu nabídky, kde se zobrazují. V případě definování složitějších tvarů, pomocí nástrojů elipsa, obdélník, mnohoúhelník , lze vyvolat naměřené údaje funkcí *Analyze / Measure* nebo přímo klávesovou zkratkou CTRL+M.
Pracujeme-li s již definovanými objekty, které byly definovány prahováním, je nezbytné nastavit jaká měření mají být na objektech provedena (*Analyze / Set measure*). Naměřené údaje se vyvolají opět funkcí *Analyze / Analyze particles (*použití *Analyze / Measure* (CTRL+M) zobrazí 1 sumární údaj pro každý měřený parametr vztahující se ke všem objektům jako celku). Základní statistika naměřených hodnot (střední hodnota, směrodatná odchylka, maximum, minimum) vyvoláme příkazem *Analyze / Summarize*.

17

8. Vytvoření makra - nabídka *Plugins / Macros*

Makro je uživatelem vytvořená nová funkce tvořená sledem funkcí a jejich nastavením (algoritmem), který byl uživatelem během procesu analýzy obrazu sestaven. Slouží k tomu, aby při opakovaných analýzách nemusely být všechny použité funkce nastavovány a aplikovány manuálně. Celý optimalizovaný algoritmus tak může být spuštěn jedním kliknutím.

· **Záznam makra** – Spustí se aktivací *Plugins / Macros / Record*, které vyvolá okno, ve kterém se sled funkcí a jejich nastavení zaznamenává.
Makro je vhodné hned na počátku celé akce pojmenovat. Po skončení záznamu se makro vytvoří stiskem tlačítka *Create* a uloží *File / Save*.

· **Editace makra –** vytvořené makro je možné editovat stejně jako text. Lze volně mazat či přidávat další funkce či měnit jejich parametry. Změny v řádce je vhodné nechat zkontrolovat příkazem CTRL+E.

18

· **Spuštění makra -** vytvořené makro se spustí buď z kontextové nabídky *Macro* okna *Macros / Run* nebo klávesovou zkratkou CTRL+R.

2. SPECIÁLNÍ ČÁST

2.1. Metodika využití digitální analýzy obrazu při určování a charakterizaci fytopatogenních druhů hub na základě mikromorfologických znaků

Úvod

Digitální analýza dat nachází v mykologii, včetně fytopatologické mykologie, velké množství uplatnění, protože tradiční determinace hub je postavena na morfologických znacích, které lze měřit. Použití je také při využití molekulárně-genetických metod při determinaci a charakterizaci hub, což ale není náplní této části metodiky.

Jako mikromorfologické znaky hub označujeme ty znaky, které je možné zkoumat pomocí mikroskopu nebo stereomikroskopu (např. velikost a tvar spor vzniklých při pohlavním a nepohlavním rozmnožování). Makromorfologické znaky jsou ty, které je možné hodnotit bez pomoci mikroskopu nebo stereomikroskopu.

Modelem pro využití digitální analýzy obrazu bude v této metodice známý fytopatogenní druh houby *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds, který je nepohlavním stadiem *Glomerella acutata* J. C. Gerber & J. C. Correll (Ascomycota, Ascomycetes, Sordariomycetidae, Glomerellaceae). Tomuto druhu je příbuzný a morfologicky podobný druh *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk s anamorfní stadiem *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.

C. acutatum se vyskytuje a patogenně působí na různé druhy rostlin a to jak bylin tak dřevin. Z hlediska zemědělství je nejvýznamnější jako původce anthraknózy jahodníku, jejímiž příznaky jsou nekrotické skvrny na listech a stoncích, redukovaný kořenový systém, nekróza a hniloba plodů a způsobuje hnilobu plodů višní. EPPO (Evropská a středozemní organizace ochrany rostlin) jej původně řadila mezi druhy karanténní, ale nyní je již řazen pouze mezi druhy sledované.

Při kultivaci *C. acutatum* na bramborovo-dextrosovém agaru (PDA) jsou kolonie bílé, krémové, šedé nebo růžovo-oranžové před sporulací, revers krémový až oranžový s hnědými skvrnami. Rychlost růstu při 25 °C je okolo 7,5 mm za den. Konidie jsou 1-buněčné, hyalinní, cylindrické, 11,3-19,7 × 3,6-5,5 µm. Většina konidií je zašpičatělá na jednom nebo obou koncích, appresoria jsou hnědá, kulovitá až ellipsoidní, 5,0-7,5 × 5,0-6,2 µm, sklerotia nejsou.

Identifikace je možná na základě morfologických znaků (tvar a velikost konidií, rychlost růstu při 25 °C na PDA), pomocí imunodiagnostických metody (PTA ELISA) a molekulárně genetických metod (PCR s specifickými primery ITS4 a CaInt2, sekvence ITS oblasti DNA).

20

Rostlina jahodníku infikovaná druhem *Colletotrichum acutatum* a vykazující příznaky anthraknózy jahodníku vyvolané touto houbou.

Infikovaná rostlina jahodníku

Kořenový systém napadené rostliny

Plody s příznaky napadení

21

Oranžové acervulátní konidiomata s konidiofory a s masou konidii.

Kolonie *Colletotrichum acutatum* na PDA - líc Kolonie *Colletotrichum acutatum* na PDA - rub

22

C. acutatum – konidiogenní buňky se vznikajícími konidiemi

C. acutatum – konidie →

↓ *Colletotrichum gloeosporioides* - konidie

23

MATERIÁL A POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Použité přístroje: Mikroskop Olympus BX51 s Nomarským kontrastem, fotoaparát Olympus C7070 a Olympus E-510, software QuickPhoto 2.2. nebo 2.3. (v současné době je dostupná verze 2.3., která plně nahrazuje verzi předchozí verzi 2.2.), stolní počítač, počítačový program Microsoft Excel, kalibrační destičku, krycí a podložní sklíčka

Ukázka je založena kmenu druhu *Colletotrichum acutatum*, který byl izolován na jižní Moravě a v současné době je uchováván ve Sbírce fytopatogenních hub a referenčních

protilátek, Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i. pod číslem CPPF 266.

VYBAVENÍ NUTNÉ PRO VYUŽITÍ METODIKY.

Počítačový program QuickPhoto 2.3. nebo 2.2., mikroskop na němž fotografovat digitálním fotoaparátem, digitální fotoaparát, který je schopen komunikovat se softwarem QuickPhoto 2.3. a 2.2., počítač (PC nebo notebook) na kterém lze využívat program QuickPhoto 2.3. nebo 2.2., v případě hodnocení při zvětšením 100-krát imerzní olej, počítačový program Microsoft Excel, krycí a podložní sklíčka, injekční jehly nebo preparační jehly pro přípravu preparátů, lihový nebo jiný plynový kahan pro přípravu preparátů.

POPIS METODIKY

PŘÍPRAVA PREPARÁTU

Preparát si připravuje do média, které se používá pro studium dané taxonomické skupiny hub. Nejčastěji to je destilovaná voda nebo laktofenol. Pro ukázkové měření *Colletotrichum acutatum* byla mediem destilovaná voda.

1) Na podložní sklíčko kápneme pomocí injekční stříkačky s jehlou kapku vody o průměru 6-7 mm

2) Ze živé kultury nebo ze sebraného materiálu s houbou (např. list s kolonií houby) nebo herbářové položky odebereme injekční jehlou, nejlépe o síle 0,25 mm a délce 40 mm kousek kultury nebo houby kterou chceme zkoumat

3) Pod stereomikroskopem (lze i bez něj) rozdělíme pomocí dvou injekčních jehel přenesený objekt na několik částí, tak aby bylo možné co nejlépe pozorovat mikroskopické struktury objektu a opatrně přiklopíme krycím sklíčkem.

SNÍMÁNÍ

Program Quick Photo 2.3. nabízí měření délek, ploch, obvodů zachycených těles, měření úhlů, počítání objektů, měření fází. Z uvedených možností se v mykologii využije jednoznačně nejvíce měření délek zachycených těles. Další možnosti se využijí podstatně méně. Snímaní je možné přes mikroskop s trinokulární hlavicí

1) Zapneme mikroskop a vložíme preparát.

2) Pomocí mikroskopu zjistíme, zda mikroskopické morfologické struktury, které chceme měřit a hodnotit jsou v připraveném preparátu.

3) Spustíme program QuickPhoto.

4) Zapneme fotoaparát. V případě některých fotoaparátů např. zrcadlovek třídy E je velmi užitečné mít k dispozici náhradní nabitou baterii, protože tyto fotoaparáty fungují pouze na baterie.

5) Kliknutím na ikonu „Nasnímat“ propojíme fotoaparát s počítače a získáme živý obraz označený jako „Ovládací panel *fotoaparátu XY*“.

6) Na spodním okraji „Ovládacího panelu *fotoaparátu XY*“ máme ve 4 záložkách nabídku k provádění různých úprav pro snímaní, z nichž nejvíce využijeme záložku

„Nasnímat“. Z nabídky na jmenované záložky využijeme jednak funkci „Kvalita“, kterou si předurčíme (formou volby nabízených možností) jak velký bude snímaný obrázek a v případě některých fotoaparátů v jakém formátu budou obrázky ukládány. Čím kvalitnější bude rozlišení a tedy čím větší bude obrázek, tím pomaleji se obrázek bude ukládat. Při použití digitální zrcadlovky je užitečné využít funkci „Předsklopení zrcadla“, kterým snížíme třes fotoaparátu způsobený zrcadlem. (U kompaktních fotoaparátu tato volba není, protože tyto přístroje jsou bez zrcadla.)

7) Zaostříme na objekty, které chceme fotografovat. Objekty musí být ostré v mikroskopu nikoliv na monitoru. Co nejvíce snímaných objektů musí být v jedné rovině, aby při zaostření bylo co nejvíce z nich ostrých.

8) Zmáčknutím ikony „Nasnímat“, vyfotografujeme objekty. Po dobu fotografování se tlačítka funkcí na „Ovládacím panelu *fotoaparátu XY*“ stávají hluchými a nelze je ovládat.

9) Získaný obraz se uloží do paměti počítače a zobrazí se na levé svislé liště výchozího panelu programu QuickPhoto pod pracovním označením **P00XY*.

10) U každého pořízeného snímku uvedeme při jakém zvětšení byl pořízen a to pomocí výběru v nabídce ikony „Zvětšení“ .

KALIBRACE MIKROSKOPU

Pro vyhodnocení informací (např. délky, plochy, aj.) nasnímaných obrázků je potřeba vědět kolik jeden pixel na obrázku znamená ve skutečnosti při určitém zvětšení.

1) Zapneme mikroskop, vložíme kalibrační destičku (= objektivní mikrometr), zapneme PC, spustíme program QuickPhoto, zapneme fotoaparát.

2) Kliknutím na ikonu „Nasnímat“ propojíme fotoaparát s počítače a získáme živý obraz označený jako „Ovládací panel *fotoaparátu XY*“.

3) Na horní liště v nabídce „Měření“ vybereme volbu „Správa kalibrací“.

4) Otevřeme volbu „Správa kalibrací“ a v ní určíme jakou kamerou (při prvním měření přidáme název kamery) bude (tlačítkem přidat) měření pořízeno.

5) Objeví se nabídka „Výběr snímku“ a vybereme zda úsek kalibrační destičky vyfotíme (volba „Získat snímek z aktuálního snímacího zařízení“) nebo zda použijeme již snímek dříve pořízený.

6) V případě volby „Získat snímek z aktuálního snímacího zařízení“ se dojde k aktivaci živého obrazu, zaostřím a vyfotografujeme co nejdelší úsek kalibrační destičky.

7) Vybereme jeden z dílků na měřítku, najedeme na něj kurzorem a levým tlačítkem myši označíme začátek úsčky, tlačítko držíme a táhneme myší až na dílek měřítka, kde chceme úsečku ukončit. (Snažíme se aby úsečka byla co nejdelší.)

8) V nabídce „Skutečná délka úsečky“ uvedeme skutečnou velikost vyfotografované úsečky a ve volbě „Jednotky“ zvolíme zda se jedná o milimetry nebo mikrometry.

9) Zmáčkneme tlačítko „Další“ a otevře se panel na němž zmáčkneme volbu „Dokončit“. Tím je kalibrace hotova.

SBĚR DAT PROGRAMEM

Vyfocené objekty je možné fotografovat jak ihned po nasnímání tak i po jakékoliv době od pořízení.

1) Ze skupiny pořízených snímků vybereme a otevřeme ty které chceme analyzovat (na horní panelu složka Soubor/Otevřít/snímek P001-PXYZ) (VIZ TABULE Č. 1)

2) Pro měření se zmáčkne tlačítko . (VIZ TABULE Č. 2)

3) Kurzorem se ťukne na první konec měřeného objektu a táhne se kurzorem na cílové místo. (VIZ TABULE Č. 2)

4) Výsledně se zobrazí úsečka, která udává naměřenou délku (hodnota délky je napsána nad nebo pod nebo vedle této úsečky). (VIZ TABULE Č. 2)

5) Naměřená délka je automaticky zaznamená do tabulky v dolní části panelu. (VIZ TABULE Č. 2.)

6) Po změření délky objektu přejdeme ihned k měření šířky. Měřená úsečka je většinou nejkratší spojnicí podélných stran v nejširším místě objektu. Většinou je úsečka šířky kolmá na délku. (VIZ TABULE Č. 3)

7) Kurzorem se ťukne na první podélnou stranu měřeného objektu a táhne se kurzorem na druhou podélnou stranu měřeného objektu. (VIZ TABULE Č. 3)

8) Výsledně se zobrazí úsečka, která udává naměřenou šířku objektu (hodnota šířky je napsána nad, pod nebo vedle této úsečky). (VIZ TABULE Č. 3)

9) Naměřená délka je automaticky zaznamenána do tabulky v dolní části panelu.

10) Uvedený postup v rámci jednoho snímku opakujeme dokud buď neprovedeme potřebný počet měření nebo nezměříme všechny objekty u nichž měření potřebujeme provést nebo neukončíme z jiného důvodu. (VIZ TABULE Č. 4)

11) Všechny naměřené úsečky jsou automaticky zaznamenáván do tabulky v dolní části panelu. (VIZ TABULE Č. 4)

12) Uvedený postup provedeme u tolika snímků kolik potřebujeme. (VIZ TABULE Č. 5)

13) Všechny naměřené délky jsou automaticky zaznamenávány do tabulky v dolní části panelu. Ke každému snímku vznikne samostatná tabulka s naměřenými hodnotami. (VIZ TABULE Č. 5)

ANALÝZA A VYHODNOCOVÁNÍ DAT V PROGRAMU EXCEL.

1) V souboru programu Excel jsou zaznamenány všechny naměřené hodnoty. Při výše popsaném postupu jsou střídavě zachyceny délka a šířka. Program QuickPhoto do tabulky automaticky uvedl typ měřené veličiny, počet měření, střední hodnotu a směrodatnou odchylku souboru měření. (VIZ TABULE Č. 6)

2) Pomocí vzorců *„=KDYŽ(D3>10;D3;" ")*“ a *„=KDYŽ(D4<10;D4;" ")*“rozdělíme naměřené hodnoty na délku a šířku měřených objektů. (VIZ TABULE Č. 7)

3) Hodnoty délky ponecháme ve výchozím řádku a hodnoty šířky přesuneme o řádek výše do sloupce vedle sloupce s hodnotami délky (VIZ TABULE Č. 7)

4) Vzorcem „*J3=H3/I3*“ vypočítáme poměr délky a šířky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 7)

5) Vzorcem *„=PRŮMĚR(J3:J??)*“ vypočítáme průměr z vypočítaných hodnot poměru délky a šířky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 8)

6) Vzorcem „ *=MEDIAN(J3:J??)*“ vypočítáme medián z vypočítaných hodnot poměru délky a šířky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 8)

7) Vzorcem „ *=MAX(J3:J??)*“ zjistíme nejvyšší hodnotu poměru délky a šířky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 8)

8) Vzorcem „ *=MIN(J3:J??)*“ zjistíme nejmenší hodnotu poměru délky a šířky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 8)

9) Vzorcem „ *=STDEVPA (J3:J??)*“ vypočítáme standardní odchylku v rámci souboru z vypočítaných hodnot poměru délky a šířky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 8)

10) Vzorcem „ *=PRŮMĚR(H3:H??)*“ vypočítáme průměrnou hodnotu délky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 9)

11) Vzorcem „ *=MEDIAN(H3:H??)*“ vypočítáme medián hodnot délky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 9)

26

12) Vzorcem „ *=MAX(H3:H??)*“ zjistíme nejvyšší naměřenou hodnotu délky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 9)

13) Vzorcem „ *=MIN(H3:H??)*“ zjistíme nejnižší naměřenou hodnotu délky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 9)

14) Vzorcem „ *=STDEVPA (H3:H??)*“ vypočítáme standardní odchylku v rámci souboru naměřených hodnot délky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 9)

15) Vzorcem „ *=PRŮMĚR(I3:I??)*“ vypočítáme průměrnou hodnotu šířky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 10)

16) Vzorcem „ *=MEDIAN(I3:I??)*“ vypočítáme medián hodnot šířky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 10)

17) Vzorcem „ *=MAX(I3:I??)*“ zjistíme nejvyšší naměřenou hodnotu šířky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 10)

18) Vzorcem „ *=MIN(I3:I??)*“ zjistíme nejnižší naměřenou hodnotu šířky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 10)

19) Vzorcem „ *=STDEVPA (I3:I??)*“ vypočítáme standardní odchylku v rámci souboru naměřených hodnot šířky hodnocených objektů. (VIZ TABULE Č. 10)

27

SBĚR DAT PROGRAMEM – *PŘÍKLAD MĚŘENÍ NASNÍMANÝCH OBJEKTŮ – TABULE Č. 1*

Měření nasnímaných

objektů

Konidie

Colletotrichum

acutatum

vyfotografované při

použití 100-krát

zvětšujícího

objektivu a

Nomarského

kontrastu.

Číslo smínku

↑

↓ *Zvětšení*

28

SBĚR DAT PROGRAMEM – *PŘÍKLAD MĚŘENÍ NASNÍMANÝCH OBJEKTŮ – TABULE Č. 2*

1) Pro měření se

zmáčkne tlačítko

.

2) Kurzorem se

ťukne na první.

konec měřené

konidie a táhne se

kurzorem na druhý

konec konidie.

3) Výsledně se

zobrazí úsečka, která

udává naměřenou

délku konidie
(hodnota délky je
napsána nad nebo
pod nebo vedle této
úsečky).
4) Naměřená délka
je automaticky
zaznamená do
tabulky v dolní části
panelu.

29

SBĚR DAT PROGRAMEM – *PŘÍKLAD MĚŘENÍ NASNÍMANÝCH OBJEKTŮ – TABULE Č. 3*

1) Po změření délky dané
konidie přejdeme ihned
k měření šířky. Měřená
úsečka je nejkratší
spojnicí podélných stran
v nejširším místě konidie
(pokud je požadováno při
hodnocení jiných druhů
hub měření jinde, např.
v první třetině délky jak je
to u zástupců rodu
Fusarium, tak měříme na
předem daném místě).
Většinou je úsečka šířky
kolmá na délku konidie.
2) Kurzorem se ťukne na
první stranu měřené
konidie a táhne se

kurzorem na druhý stranu
konidie.
3) Výsledně se zobrazí
úsečka, která udává
naměřenou šířku konidie
(hodnota šířky je napsána
nad, pod nebo vedle této
úsečky).
4) Naměřená délka je
automaticky zaznamenána
do tabulky v dolní části
panelu.

SBĚR DAT PROGRAMEM – *PŘÍKLAD MĚŘENÍ NASNÍMANÝCH OBJEKTŮ – TABULE Č. 4*

1) Uvedený postup
v rámci jednoho
snímku opakujeme
dokud buď
neprovedeme
potřebný počet
měření nebo
nezměříme všechny
konidie u nichž
měření potřebujeme
provést nebo
neukončíme z jiného
důvodu.
2) Všechny
naměřené délky jsou
automaticky

zaznamenáván do

tabulky v dolní části

panelu.

31

SBĚR DAT PROGRAMEM – *PŘÍKLAD MĚŘENÍ NASNÍMANÝCH OBJEKTŮ – TABULE Č. 5*

1) Pokud je potřeba,

uvedený postup

provedeme u tolika

snímků kolik

potřebujeme.

2) Všechny

naměřené délky jsou

automaticky

zaznamenávány do

tabulky v dolní části

panelu. Ke každému

snímku vznikne

samostatná tabulka

s naměřenými

hodnotami.

32

ANALÝZA A VYHODNOCOVÁNÍ DAT V PROGRAMU EXCEL - *PŘÍKLAD ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH ÚDAJŮ – TABULE Č. 6*

.

V souboru programu

Microsoft Excel jsou

zaznamenány

všechny naměřené

hodnoty. Při výše

popsaném postupu

jsou střídavě zachyceny délka a šířka. Program QuickPhoto do tabulky automaticky uvedl typ měřené veličiny, počet měření, střední hodnotu a směrodatnou odchylku souboru měření

33

ANALÝZA A VYHODNOCOVÁNÍ DAT V PROGRAMU EXCEL - *PŘÍKLAD ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH ÚDAJŮ – TABULE Č. 7*

1) Pomocí dvou vzorců =KDYŽ(D3>10;D3; " ") a =KDYŽ(D4<10;D4; " ") rozdělíme naměřené hodnoty na délku a šířku (hodnota 10 je stanovena na základě analýzy naměřených hodnot, kdy se ví, že délka konidie dosahuje vždy větší hodnoty a šířka konidie

dosahuje vždy nižší

hodnoty.

2) Hodnoty délky

ponecháme ve

výchozím řádku a

hodnoty šířky

přesuneme o řádek

výše do sloupce

vedle sloupce

s délkou

3) Vzorcem =H3/I3

vypočítáme poměr

délky a šířky

ANALÝZA A VYHODNOCOVÁNÍ DAT V PROGRAMU EXCEL - *PŘÍKLAD ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH ÚDAJŮ – TABULE Č. 8*

Pro výpočet

následujících

informací o poměru

délky a šířky konidií

použijeme

následující vzorce:

Průměr

J103=PRŮMĚR(J3:J

102)

Medián

J104=MEDIAN(J3:J

102)

Nejvyšší hodnota

J105=MAX(J3:J102

)

Nejnižší hodnota

J106=MIN(J3:J102)

Standardní odchylka

v souboru

J107=STDEVPA(J3:

J102))

35

ANALÝZA A VYHODNOCOVÁNÍ DAT V PROGRAMU EXCEL - *PŘÍKLAD ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH ÚDAJŮ – TABULE Č. 9*

Pro výpočet

následujících

informací o délce

konidií použijeme

následující vzorce:

Průměr

H103=PRŮMĚR(

H3:H102)

Medián

H104=MEDIAN(

H3:H102)

Nejvyšší hodnota

H105=MAX(H3:H

102)

Nejnižší hodnota

H106=MIN(H3:H

102)

Standardní

odchylka v

souboru

H107=STDEVPA(

H3:H102)

ANALÝZA A VYHODNOCOVÁNÍ DAT V PROGRAMU EXCEL - *PŘÍKLAD ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH ÚDAJŮ – TABULE Č. 10*

Pro výpočet následujících informací o šířce konidií použijeme následující vzorce:

Průměr

I103=PRŮMĚR(I3:I102)

Medián

I104=MEDIAN(I3:I102)

Nejvyšší hodnota

I105=MAX(I3:I102)

Nejnižší hodnota

I106=MIN(I3:I102)

Standardní odchylka v souboru

I107=STDEVPA(I3:I102)

2.2 Měření nejdůležitějších znaků háďátek rodu *Xiphinema* pomocí obrazové analýzy

ÚVOD

Fytoparazitická háďátka rodu *Xiphinema* (Nematoda: Longidoridae) jsou polyfágní a volně žijící. Tato háďátka způsobují přímé škody rostlin napadením jejich kořenových buněk. Některé druhy jsou i přenašeči nepovirů a jsou ekonomicky významné (Taylor a Brown, 1997). Identifikace druhů *Xiphinema* je založena hlavně na morfologických znacích a morfometrických datech samiček (Loof a Luc, 1990; 1993; Loof a kol., 1996). Tato dlouhá

háďátka (1 až 6 mm) se odlišují od dalších parazitických háďátek dlouhým styletem (89-336 μ m), s vidlicovitým odontostyletem a odontoforem s bazálními křídly. **Odontofor s bazálními křídly je rozlišujícím znakem rodu *Xiphinema* (viz obr. 3)**

Tradičně se měření diagnostických znaků háďátek provádí pod světelným mikroskopem za pomoci okulárového měřítka. Tato metoda je sice relativně přesná, nicméně je časově náročná a vyžaduje při měření manipulaci s vlastním cenným preparátem. Metoda obrazové analýzy umožňuje oddělit od sebe proces zachycení obrazu digitálním fotoaparátam od vlastního měření. Měření tak může být provedeno nezávisle na manipulaci s preparátem a může být kdykoliv dle potřeby opakováno. Po digitalizaci jiných obrazových předloh (fotografií, fotografií z knih, vědeckých separátů), skenování a kalibraci měřítka je možné provádět měření i na těchto typech předloh nebo zaslaných souborech. Klíčovým předpokladem je v tomto případě znalost měřítka pro kalibrační účely.

METODIKA – ZÍSKÁNÍ OBRAZU A OBRAZOVÁ ANALÝZA

· Preparáty háďátek

· Optický mikroskop Olympus BX51 s Normanskiho kontrastem (DIC, Normanski)

· Digitální fotoaparát Olympus C4040

· Osobní počítač (PC s Windows XP)

· Software pro obrazovou analýzu Olympus DP-soft

K určování háďátek byl použit světelný mikroskop Olympus BX51, vybavený digitálním fotoaparátem C4040 a Normanskiho kontrastem (DIC, Normanski). Po nasnímání digitálního obrazu preparátů s háďátky a kalibraci měřítka je provedeno měření velikostních parametrů nejdůležitějších znaků háďátek pomocí obrazového softwaru (Olympus DP-soft). Měření se

provádí jednoduchým měřícím nástrojem , který funguje na principu roztahování úsečky. Pomocí myši se označí počáteční bod měření a tažením myší vytyčíme koncový měřící bod. Následně se automaticky zobrazí naměřený velikostní parametr v příslušných jednotkách. Sled měření lze řetězit tak, aby bylo možné zjistit i velikostní parametry, které nelze vymezit jedinou úsečkou (viz např. obr. 1)

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ MĚŘITELNÉ ZNAKY

K determinaci druhů se používají determinační klíče (Loof a Luc, 1990; 1993; Loof a kol.,

1996). Tyto klíče jsou založeny na morfometrických a morfologických znacích. Mezi nejdůležitější morfometrické a morfologické znaky patří:

- Délka těla (L) (obr.1) a šířka těla (obr. 2)
- Vzdálenost od ústního otvoru po vodící kroužek (obr. 3)
- Délka odontostyletu (obr. 4)
- Tvar a délka ocasu (obr. 5)
- Tvar oblasti pysků
- Délka spikuly (obr.6)
- Počet přídatných kopulačních orgánů (obr.7)
- De Manovy symboly

koeficient a = celková délka těla /šířka těla v jeho středu

koeficient b = celková délka těla/délka jícnu

koeficient c = celková délka těla /délka ocasu

koeficient c´ = délka ocasu / šířka těla v oblasti anusu (obr. 5)

pozice vulvy (V%) = délky těla od předního konce x 100/ celková délka těla

39

MĚŘENÍ NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH ZNAKŮ HÁĎÁTEK RODU *XIPHINEMA*

Obr 1. Délka těla (L)

Obr. 2 Šířka těla

40

Obr. 3 Vzdálenost od ústního otvoru po vodící kroužek

41

Obr. 4 Délka odontostyletu

Obr. 5 Délka ocasu a průměr těla u anusu

42

Obr. 6 Délka spikuly

Obr. 7 Identifikace přídatných kopulačních orgánů

43

2.3 **Využití obrazové analýzy pro zjištění míry kontaminace lepových lapačů skladištními škůdci pomocí programu SigmaScan Pro 5**

ÚVOD

Monitorování výskytu škůdců je považováno za základní kámen integrované ochrany před škůdci v sadech, sklenících, polních porostech, skladech, v urbánním prostředí i potravinářských provozech (e.g. Stejskal 1993; Hagstrum, Subramanyam, 2000; Campbell, et al. 2002; Schal& Hamilton, 1990). Jednou z nejpoužívanájších metod je sledování výskytu škůdců pomocí lapačů. Některé strategie (např. “mass-trapping” or “trapping-out” strategies) jsou dokonce využívány jako přímý nástroj pro snížení populační hustoty cílových škůdců v sadech (Sternlicht, 1990), lesním hospodářství (Weslien & Lindelow, 1990; Barclay & Van den Driesche, 1984), urbánním prostředí (Appel, 1998) a v potravinářských provozech (Trematerra & Battani, 1987).

Klíčovou podmínkou pro úspěšné snižování výskytu cílového škůdce pomocí lapačů nebo sledování jejich výskytu je detailní znalost kritických podmínek při kterých danný lapač dosahuje optimální účinnosti (e.g. Campbell & Hagstrum, 2001; Stejskal, 1995). Kapacita lapače náleží mezi nejdůležitější charakteristiku určující účinnost lapače neboť ta může být významně snížena s narůstající obsazeností lapače škdůdci. Tento aspekt monitorávání pomocí lapačů je často přehlížen, což může vést k dezinterprataci výsledků, zvýšeným nákladům na monitorování (Stejskal, 2002b) nebo snížené účinnosti odchytu. Dříve bylo obtížné měřit plochu lepového lapače obsazenou škůdci nebo kontaminovanou jinými činiteli pomocí dostupných metod (Hargrove, 1988; Benjamin et al, 1968), především pak v terénních podmínkách. V současnosti však masová dostupnost digitální fotografické techniky (Spring, 2000, Weyda, 2002) ve spojení s programy pro obrazovou analýzu (e.g. Richardson et al., 2001; Daniel et al., 1995) poskytuje novou, levnou a rychlou cestu pro odhad okamžité kapacity lapačů.

Cílem této metodiky je demonstrovat způsob jakým lze analyzovat aktivní a neaktivní (obsazená / kontaminovaná) velikost plochy lepových lapačů pomocí techniky digitální fotografie ve spojení s obrazovou analýzou.

Vyvinutou metodiku demonstrujeme na dvou různých typech lapačů určených pro monitorování zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*) a rusa domácího (*Blattella germanica*).

MATERIÁL A METODIKA – ZÍSKÁNÍ OBRAZU

· Feromonové lapače typu Ekovet

· Lepové destičky (LoLine)

· Papírový rámeček velikosti obou typů lapačů

· Plochý scanner

· Osobní počítač (PC, Windows XP)

· Program pro obrazovou analýzu SigmaScan Pro

· Program Gimp nebo Photoshop

· Program Excell

Feromonové lapače typu Ekovet® (lepová plocha 7,3 x 19,5 cm) byly použity pro odchyt zavíječů. Lepové destičky (LoLine® - lepová plocha 6,7 x 18,5 cm)s potravní návnadou (GP2) byly použity pro monitorování výskytu rusů.

Digitální obrazy lepových lapačů byly získány prostřednictvím plochého scanneru (Umax Astra 1200S). Lepové lapače byly fixovány do papírových rámečků tak, aby nedošlo k přímému kontaktu lepové plochy se sklem scanneru. Lapače byly skenovány v rozlišení 300dpi, s barevnou hloubkou 16.7 milionů barev a uloženy v kompresním formátu JPEG (joint photographic experts group, .jpg) pro další zpracování. Vlastní digitální obrazy byly analyzovány pomocí programu SigmaScanPro 5 (SPSS Inc., 1999). Po nezbytné úpravě obrazu s cílem odstranit nerovnoměrnost nasvícení, drobné defekty, zvýraznit důležité aspekty v obraze a rozpoznat vlastní objekty analýzy byly aplikovány měřící nástroje zjišťující počet obrazových bodů (pixelů) svázaných s přítomností těl motýlů a jejich šupinek. Počet takto zjištěných bodů byl vydělen celkovým počtem bodů odpovídajících iniciální aktivní ploše lapače pro zjištění procentického pokrytí plochy těly a šupinkami motýlů. Celkem byly odhadovány 4 parametry lapače: celková aktivní plocha lapače, okamžitá aktivní plocha, okamžitá kontaminace lapače a okamžitá obsazenost lapače. "**Celková aktivní plocha lapače" (CAPL)** byly definována jako celková lepová plocha čerstvého nepoužitého lapače (žlutý rámeček). **"Okamžitá obsazenost lapače"** (**OOL**) byly definována jako lepová plocha lapače obsazená těly hmyzu v momentě snímání obrazu lapače (zelená plocha). **"Okamžitá kontaminace lapače" (OKL)** byla definována jako lepová plocha lapače kontaminovaná nečistotami produkovanými škůdcem jako například šupinkami křídel nebo

výkaly hmyzu v momentě sejmutí obrazu lapače (červená plocha). **“Okamžitá aktivní plocha lapače”(OAPL)** byla definována jako volná lepová plocha lapače, která nebyla obsazena ani kontaminována ve chvíli snímání obrazu lapače (bílá plocha). Takže:

OAPL = CAPL - (OOL + OKL) (1)

OAPL OKL OOL

45

METODICKÝ POSTUP – ÚPRAVA OBRAZU A OBRAZOVÁ ANALÝZA

Nová metody měření obsazenosti a kontaminace lepových lapačů.

Zavíječi. Obrazová analýza za použití programu SigmaScan Pro5 sestává z následujících kroků:

· úprava kvality obrazu

· separace barevných vrstev (kanálů)

· filtrování

· prahování

· měření

Úprava kvality obrazu sestává z úpravy kontastu, světlosti (*Image / Intensity – Brightness, Contrast*) a eliminace nerovnoměrného nasvětlení (*Image / Clearfield – Generate pseuodoclearfield, Perform equalization*) (Obr.1a). Separace Red-Green-Blue (RGB) barevných vrstev byla aplikována pro odstranění nežádoucího/rušivého pozadí lapače v podobě síové mřížky (*Image / Color – Separate RGB*). Jako dominantní barva pozadí byla pomocí barevné analýzy kapátkem v programu Photoshop detekována červené komponenta v rozsahu od 128 do 225 (průměr=180, SO=22,78). Naopak červená komponenta těl zavíječů byla v rozsahu od 1 do 99 (průměr=65,6, SO=19,65). Na základě této analýzy byl vybrán červený obrazový kanál (Obr. 1b) pro zpracování posterizačním filtrem (*Image / Filter-Posterize – Number of color levels = 2, Iterations = 1*). Počet barev obrazu byl tak redukován pouze na dvě, kde černá barva reprezentuje celkovou plochu pokrytou těly zavíječů a křídelními šupinkami. Těla zavíječů byla detekována stejným postupem, pouze před aplikací posterizačního filtru byl kontrast obrazu zvýšen na maximální hodnotu (*Image / Intensity – Histogram stretch – Maximize contrast*). Oba získané obrazy byly zkombinovány pomocí logické operace průměrování do třetího obrazu (*Image / Image math – average*), ve kterém

byly separovány samotné křídelní šupinky. Plocha odpovídající tělům motýlů, šupinkám a volné ploše byla identifikována prahovací operací (*Image / Threshold – intensity threshold*). Zelená (*overlay green*) byla přiřazena tělům zavíječů (Obr. 1c), červená křídelním šupinkám (*overlay red*) (Obr. 1d) a modrá (*overlay blue*) jejich součtu (Obr. 1e).

46

Obr. 1 Na obrázku je lepový feromonový lapač Ekovet s chycenými dospělci zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*), který je podroben sekvenci kroků obrazové analýzy v programu SigmaScan Pro.

A

B

C

D

E

47

Rusové. Procedura pro rusy je odlišná. Prvním krokem je odstranění defektů pomocí vyvážení kontrastu, světlosti (*Image / Intensity – Brightness, Contrast*)spolu s eliminací nerovnoměrného nasvícení (*Image / Clearfield – Generate pseuodoclearfield, Perform equalization*) (Fig.2a). Následně je barevné rozlišení redukováno na úroveň 1 bitového obrazu (*Image / Color – change resolution – 1bit/pixel*). Černá barva odpovídá celkové ploše pokryte těly rusů a jejich výkaly. Po procesu prahování (*Image / Threshold – intensity threshold*) odpovídá tomuto modrá barva (*overlay blue*) (Fig. 2e). Výkaly (červená barva - *overlay red*) jsou detekovány pomocí funkcí vyhledávání hran (*Measurements / Track - edges*) spolu s binárním filtrem zaplňujícím díry (*Image / Overlay filters - fill holes*) aplikovaných manuálně (Fig 2c). Získané obrazy jsou následně zkombinovány logickou funkcí průměrování (*Image / Image math – average*) do třetího obrazu, který představuje samotná těla rusů – zelená barva (*overlay green*) po prahování (Fig. 2d).

Obr. 1 Na obrázku je lepový lapač LoLines chycenými jedinci rusa domácího (*Blatella germanica*), který je podroben sekvenci kroků obrazové analýzy v programu SigmaScan Pro.

a b c d e

ANALÝZA VÝSLEDKŮ

Obsazenost a kontaminace lepových lapačů rusy a zavíječi.

Zavíječi. Digitální obrazová analýza, že poměr mezi těly zavíječů a křídelními šupinkami byl v průměru 1,32 (SO=0,38) (Tabulka 1). Tento poměr byl stabilní v rámci porovnávaných lapačů (Obr. 2). Jeden chycený zavíječ odpovídal přibližně snížení lepové plochy lapače o 0.8%. Výsledky této studie ukázaly, že zavíječi náleží mezi silné kontaminátory, neboť plochy pokrytá šupinkami odpovídala téměř ploše kterou zaujímala samotná těla zavíječů. Pro *Ephestia kuehniella* (EK) může být OAPLEK odhadnuta následovně:

OAPLEK ≈ CAPL – 1.81 x OOLEK (2)

nebo přibližně

OAPLEK ≈ CAPL - 2 x OOLEK (3)

Tab 1. Obsazenost a kontaminace, monitorovacích lapačů Ekovet, vyjádřená počtem obrazových bodů (px)

lapač plocha těl zavíječů [px] plocha šupinek [px] poměr

1 482599 333452 1,45

2 217981 223361 0,98

3 556867 489630 1,14

4 431791 306190 1,41

5 266424 239422 1,11

6 335796 278603 1,21

7 205373 238851 0,86

8 123524 81623 1,51

9 201588 91087 2,21

Obr. 2 Poměr mezi těly a křídelními šupinkami zavíječe moučného (Ephestia kuehniella) na jednotlivých analyzovaných lapačích

0%

20%

40%

60%

80%

100%

1 2 3 4 5 6 7 8 9

lapač

poměr

těla motýlů šupinky motýlů

49

Detailní výsledek analýzy obsazenosti / kontaminace (39 motýlů *Ephestia kuehniella*) na příkladu jednoho středně obsazeného/kontaminovaného lapače, kde zavíječi zabrali 24 % z aktivní plochy lapače, zatímco křídelní šupinky kontaminovaly 16% z aktivní plochy lapače je znázorněn v tabulce 2.

Tab. 2 Analýza středně obsazeného / kontaminovaného lapače Ekovet zavíječem moučným (*Ephestia kuehniella*) – vyjádřeno absolutně v počtech obrazových bodů (pixelů), resp. relativně v procentech.

Počet pixelů

Plocha lapače %

Celková aktivní plocha lapače

2 037 075

100

Obsazenost (těla motýlů) 482 599 24

Kontaminace (šupinky motýlů) 333 452 16

Okamžitá aktivní plocha lapače 1 384 649 60

Rusové. Digitální obrazová analýza ukázala, že poměr mezi těly rusů a výkaly byl v průměru 48,7 (SD=1,93) (Tab. 3). Tento poměr byl stabilní v rámci porovnávaných lapačů (Obr. 3). Výsledky přesvědčivě ukazují, že rusové jsou slabými kontaminátory lapačů, neboť plocha kontaminovaná jejich výkaly zabírala méně než 2% plochy obsazenou těly rusů. Pro *Blatella germanica* (BG) může být OAPLBG odhadnuta následovně:

OAPLBG ≈ CAPL - 1.021x OOLBG (4)

nebo přibližně

OAPLBG ≈ CAPL - OOLBG (5)

Tab. 3 Obsazenost a kontaminace, monitorovacích lapačů LoLine rusem domácím (*Blatella germanica*) a jeho výkaly, vyjádřená počtem obrazových bodů (px)

lapač plocha-rusové [px] plocha-výkaly [px] poměr

1 865987 17113 50,60

2 1529227 32079 47,67

3 1044078 21564 48,42

4 967854 18634 51,94

5 345786 7425 46,57

6 463277 9835 47,10

50

Obr. 3 Poměr mezi těly a výkaly rusa domácího (*Blatella germanica*) na lepových lapačích LoLine.

0%

20%

40%

60%

80%

100%

1 2 3 4 5 6

lapač

poměr

těla rusů výkaly

Detailní výsledek analýzy obsazenosti / kontaminace jednoho středně obsazeného/kontaminovaného lapače LoLine rusem domácím a jeho výkaly ukazujeme, že těla rusů obsadila 48 % z aktivní plochy lapače, zatímco výkaly kontaminovaly pouze 1% z aktivní plochy lapače (Tab. 4).

Tab. 4 Analýza středně obsazeného / kontaminovaného lapače LoLine rusem domácím (*Blatella germanica*) – vyjádřeno absolutně v počtech obrazových bodů (pixelů),

resp. relativně v procentech.

Počet pixelů

Plocha lapače %

Celková aktivní plocha

lapače

1 797 987 100

Obsazenost (těla rusů) 865 987 48

Kontaminace (výkaly

rusů) 17 113 1

Okamžitá aktivní plocha

lapače 914 887 51

Zjistili jsme, že skladištní zavíječi snižují okamžitou aktivní plochu lapačů rychleji než rusové. Důvodem je výrazná kontaminace lepového lapače šupinkami z křídel zavíječů. Plocha kontaminovaná šupinkami je téměř shodná s plochou, kterou zaujímají samotní zachycení motýli. Oproti tomu rusové kontaminovali lapače svými výkaly výrazně méně. Plocha kontaminovaná výkaly byla menší než 2% plochy, kterou zabírali samotní rusové. Výsledky naznačují, že zavíječi jsou silnější kontaminátoři lepových lapačů než rusové.

2.4 Využití obrazové analýzy při detekci virózy obilnin z terénních podmínek

ÚVOD

V ČR v poledních letech dochází k epidemickému výskytu virových chorob obilnin a to zájmena viru žluté zakrslosti ječmene (BYDV) (obr. 1) a viru zakrslosti pšenice (WDV) s komplexním názvem virové zakrslosti obilnin. Tyto viry jsou schopné infikovat veškeré pěstované obilnin u nás. Virus žluté zakrslosti ječmene je ssRNA viru čeledi *Luteoviridae,* a je přenášen okolo 25 druhy mšic. V podmínkách ČR jsou hlavní vektory BYDV mšice střemchová (Rhopalosiphum padi), kyjatka osenní (Sitobion avenae) a kyjatka travní (Metopolophium dirhodum). Tento virus má v současnosti osm kmenů, v ČR jsou známé kmeny PAV, PAS a MAV. Virus zakrslosti pšenice je ssDNA viru čeledi *Geminiviridae* a je přenášen pouze křískem polním (*Psammotettix alienus* Dahlb.). WDV se vyskytuje ve třech

kmenech: pšeničný, ječný a ovesný, u nás byli identifikovány pouze pšeničný a ječný kmen. Oba tyto viry mohou infikovat obilniny buď samostatně nebo jako směsné infekce. Příznaky na obilninách u obou virů jsou dosti podobné, infikovaný porost zpravidla bývá žlutooranžově zbarvený a je doprovázený zakrslostí rostlin, které postupně odumíraji. Infekce ozimých obilnin jsou razantnější, dochází buď k lokální ohniskovité infekci nebo infekci v celém porostu. Při pozvolné infekci dochází zpravidla k vysokým výnosovým ztrátám (až 100%). Charakter infekce a příznaky virové zakrslosti obilnin jsou dobře hodnotitelné pomocí obrazové analýzy porostu, při které je možné určit míru, a intenzitu napadení virózami v rámci celku. Na základě těchto analýz se dá vyhodnotit míra škodlivosti působení viróz v obilninách.

Obr. 1 Virus žluté zakrslosti ječmene BYDV

(zdroj: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WIntkey/Images/c2.gif)

52

METODIKA – ZÍSKÁNÍ OBRAZU A OBRAZOVÁ ANALÝZA

· Porost ječmene

· Digitální fotoaparát

· Osobní počítač (PC s Windows XP)

· Software pro obrazovou analýzu SigmaScanPro 5

· Tabulkový program MS Excel

Digitální fotografie byla pořízena v terénních podmínkách na pozemku obilnin infikovaném virovou zakrslostí. Předmětem obrazové analýzy bylo určení míry a intenzity napadení porostu na snímku pořízeném z pohledu a úhlu stojícího pozorovatele.

Po spuštění programu SigmaScanPro 5 byl otevřen digitální fotografie (*File / Open – Image*) (Obr. 2). V selekčním módu byla vybrána vlastní zájmová oblast zahrnující výhradně polní porost a proveden ořez nadbytečných částí příkazem *Image / Crop* (Obr. 3). Pro zvýraznění oblastí postižených virovou zakrslostí a potlačení ostatních částí obrazu byla použita procedura upravy histogramu *Image / Intenzity / Histogram stretch – maximize contrast* následovaná *Image / Lookup Tables / Monochrome – standard* (Obr. 4). Pro selekci nejvýraznějí postižených částí porostů bylo prahováno na základě intenzity jasů na úrovní 158-255 (červená barva) (obr. 5) a pro selekci všech zasažených rostlin na úrovni 137-255

(žlutá barva) (obr. 6). Nezasažené části porostu byly identifikovány operací *Image / Overlay math –source 1(overlay red) – source 2 (overlay yellow)- destination (overlay green) - operation NOT* a zvýrazněny zelenou barvou (Obr. 7). Při absenci měřítka byla plocha v prahovaných vrstvách zjišťována způsobem stanovení množství obrazových bodů (*Measurements / Settings/Measuremensts – Number of pixel*) v dané vrstvě (*Measurements / Settings/Overlays – Source overlay).* Tento způsob umožňuje efektivní poměrné porovnání při s vyjádřením v procentickém zasoupení.

53

Obr. 2 Otevření souboru s analyzovanou fotografií v programu SigmaScanPro 5.

Obr. 3 Fotografie po oříznutí nadbytečných partií.

Obr. 4 Zvýraznění zájmových částí a převod do černobílého módu.

54

Obr. 5 Prahování nejintenzivnějších projevů zakrslosti.

Obr. 6 Prahování všech částí zasaženého porostu

55

Obr. 7 Zobrazení všech identifikovaných složek porostu.

Obr. 8 Zjištění velikostí prahovaných ploch prostřednictvím množství obrazových bodů.

56

ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Data získaná měřením počtu pixelů v jednotlivých naprahovaných vrstvách byla zpracována do podoby následujícího grafu v programu MS Excel. Graf ukazuje procentický podíl nezasažených, intenzivně a méně zasažených částí porostu virovou zakrslostí.

73%

15%

12%

nazasažený porost (343719px)

nejintenzivnější projevy napadení (72394px)

méně intenzivní projevy napadení (56635px)

Je zřejmé, že vzhledem k perspektivě, ze které byla digitální fotografie porostu pořízena, je kvantifikace podílů jednotlivých hodnocených částí porostů zkreslena. Pro korektní

kvantifikaci by bylo nutné použít půdorysný snímek. A to buď celého porostu z ptačí perspektivy při použití, leteckých nebo družicových snímků. Jinou možností je použití stativu ve spojení se širokoúhlým objektivem pro nasnímání série fotografií (vzorků) o konstantní

57

známé ploše (obr. 9) (kalibrace pomocí měřítka; je nezbytné zachovat vždy stejné parametry snímání – tj. vzdálenost od povrchu, úhel vůči povrchu, ohnisková vzdálenost objektivu, expoziční hodnoty) a jejich ořez velikost odpovídají skutečnému 1m2. Pro výběr je nezbytné podřídit následnému statistickému zpracování a dodržet všechny zásady, které jsou s korektním vzorkováním spojené (Binns, 2000).

Obr. 9

58

2.5 **Kvantifikace roztočů a pisivek pomocí metody obrazové analýzy**

ÚVOD

Ve skladovaném obilí, domácím prachu či půdě dominují členovci mikroskopické velikosti. Ekologické studie a různé strategie ochrany před škůdci jsou často konfrontovány s problematikou kvantifikace velkého množství těchto mikroskopických členovců. Například skladované obilí může obsahovat několik tisích takových individuí v pouhých 100g vzorku (e.g. Stejskal et al., 2003; Kučerová et al., 2003; Hubert et al., 2006). Spojení mikroskopické velikosti členovců s jejich velkým množstvím činní proceduru kvantifikace a determinace velmi obtížnou a časově náročnou. Mikroskopičtí členovci jsou obvykle z kontaminovaného obilí, prachu a půdy extrahování v laboratoři pomocí Tullgrenů (Krizkova-Kudlikova et al, 2007). Tímto způsobem získaný biologický materiál je dále analyzován za pomoci stereomikroskopu a kvantifikován formou přímého počítání. Lidská vizuální percepce je předmětem četných psychologických a behaviorálních studií (Wolfe, et al.) dokládajících , že počítání a hodnocení založené na vizuálním vjemu je náchylné na předpojatost a chybovost vázanou na konkrétní osobu provádějící tuto analýzu. Solmon (1945) se vypracoval metodu pro kvantifikaci velkého množství mikroskopických členovců (zoztočů) založenou na použití speciálních disků rozdělených do sektorů, ve kterých se počítání provádí a zpětně statisticky přepočítává na původní velikost vzorku. Jiná metoda kvantifikace roztočů ja založena na použití analogové fotografie (Asquish, 1965, Sircom, 2000). Ani tato poslední metoda však

zcela neodbourala činitel vizuální kvantifikace jako faktor, který je zdrojem chybovosti. Současné možnosti digitální fotografické techniky ve spojení s digitální obrazovou analýzou nabízejí jedinečnou možnost rychlé, spolehlivé a opakovatelné kvantifikace tohoto typu vzorků (Spring 2000; Erickson et al., 2001; Weyda, 2002). V UK byl vyvinut počítačový systém pro zpracování digitálního obrazu (DAISY) pro automatickou determinaci muchniček (Weeks, et al., 1999). Jiný automatický systém obrazového rozpoznávání byl vytvořen pro kvantifikaci chvostoskoků (Krogh et al., 1998), háďátek (Brieri, et. al, 1987) a biomasy hub (Morgan et. al., 1991). Navzdory pokroku v této oblasti (e.g. Panneton & Drummond, 1991; Lukáš, Stejskal, 2004; Fornal et al., 2007), zůstává mnoho důležitých oblastí doposud nepodchyceno

Cílem tohoto příkladu je demonstrovat aplikaci digitální obrazové analýzy pro kvantifikaci mikroskopických členovců způsobujících škody na skladovaných produktech a porovnat účinnost této techniky s tradiční vizuální kvantifikací. Jako modelové druhy byly zvoleny skladištní škůdci *Acarus siro* a *Liposcelis bostrychophila.*

59

MATERIÁL A METODIKA – ZÍSKÁNÍ OBRAZU

· *Acarus siro*

· *Liposcelis bostrychophila*

· Destičky Iwaki Mikroplate

· Stereomikroskop SZX12 s objektivem Olympus PF PLFL 0.3x

· Digitální fotoaparát Olympus C-7070 WZ

· Osobní počítač (PC, Windows XP)

· Program pro obrazovou analýzu SigmaScan Pro

· Tabulkový program Excell

Biologický material a příprava vzorků

Skladištní roztoč *Acarus siro* a pisivka *Liposcelis bostrychophila* byly použity jako modelové druhy. Známé množství těchto druhů druhů bylo umístěno do destičky s důlky o průměru 2cm naplněných 1ml vody. Tato situace simuluje stav po separaci těchto druhů Tullgrenovým přístrojem.

Pořízení digitálních fotografií

Všechny digitální snímky roztočů a pisivek byly pořízeny s pomocí stereomikroskopu Olympus SZX12 (objektiv Olympus PF PLFL 0.3x, zvětšení 25x) osazeným digitálním kompaktním fotoaparátem Olympus C-7070 WZ. Spodní světlo mikroskopu bylo nastaveno na maximální hodnotu a všechny snímky byly exponovány s korekcí -1.7 pro dosažení maximálního kontrastu. Snímky byly uloženy ve formátu JPEG (rozlišení 3072x2304 pixelů, barevná hloubka 16.7 miliónů barev) a uloženy do počítače pro další zpracování pomocí obrazové analýzy.

METODICKÝ POSTUP – ÚPRAVA OBRAZU A OBRAZOVÁ ANALÝZA

Obrazová analýza za použití programu SigmaScan Pro5 sestává z následujících kroků:

· změna barevnosti

· úprava kvality obrazu

· filtrování

· prahování

· počítání

Liposcelis bostrychophila.

Nejprve byly barevné fotografie byly konvertovány na černobílé (*Image / Color – Convert to grey scale*). Následovaly logické operace s obrazy (tzv. aritmetiky s obrazy) mající za cíl odstranit z fotografií veškerý nežádoucí šum a rušivé elementy pomocí sekvence příkazů vzájemného přidávání a násobení obrazů (*Image / Image math – multiply, add*). Pomocí posterizačního filtru bylo černobílé rozlišení redukováno na 2 výsledné barvy (černou a bílou) *Image / Filter- Posterize – Number of color levels = 2, Iterations = 1*). Objekty zájmu byly definovány procesem prahování kdy černé barvě byla přiřazena červená vrstva - barva (*Image / Threshold – intensity threshold, overlay red*). Pro přesnou identifikaci jedinců v této vrstvě byly použity binární filtry: (*Image / Overlay filters - delete edge object*) a (*Image / Overlay filters* - delete residues). Tímto způsobem byly odstraněny objekty dotýkající se krajů obrazů a část velmi malých nežádoucích nečistot. Dále byly opět aplikovány binární erozní

filtry s cílem oddělit dotýkající se jedince (*Image / Overlay filters – erosion, split objects - value 2*) a (*Image / Overlay filters – erosion, preserve shape - value 20)*. Zbytky červené vrstvy byly dále upraveny další aplikací binárních filtrů (*dilatation - value 10; erosion*

preserve shape filter - value 10); erosion - split object filter - value 8; dilatation residues filter - value 5) pro odtranění zbývajících nečistot a bublin. Posledním krokem byla vlastní kvantifikace jedinců ve vzorku (*Measurements / Count objects*).

Pro urychlení zpracování byl finální odladěný algoritmus zaznamenán ve formě následujícího makra (*Macro / New macro / Start recording / Stop recording / Run Macro*):

```
Sub Main
Dim App As Object
Set App = CreateObject("SigmaScan.Application")
Dim Worksheet As Object
' Recorded macro begins...
```

A B

C D

61

```
Dim A32 As Object
Set A32 = App.OpenImage("C:\Images\Liposcelis\A4.JPG")
ResultCode = A32.SetZoomLevel(0.250)
ResultCode = A32.ConvertToGrayScale
ResultCode = App.Combine(A32, A32, 768)
ResultCode = App.Combine(A32, A32, 1536)
ResultCode = App.Combine(A32, A32, 768)
ResultCode = App.Combine(A32, A32, 1536)
ResultCode = App.Combine(A32, A32, 1536)
ResultCode = App.Combine(A32, A32, 768)
ResultCode = App.Combine(A32, A32, 768)
ResultCode = A32.Posterize(1, 2)
ResultCode = A32.ChangeColorResolution(8, 4)
ResultCode = A32.ConvertToGrayScale
Dim Left0(1) As Long
Left0(0) = 0
Dim Right1(1) As Long
```

```
Right1(0) = 0
ResultCode = A32.IntensityThreshold(1, 1, Left0, Right1)
ResultCode = A32.FilterOverlay(10, 1, 1, 1, 2)
ResultCode = A32.FilterOverlay(8, 1, 1, 1, 2)
ResultCode = A32.FilterOverlay(2, 1, 1, 2, 2)
ResultCode = A32.FilterOverlay(3, 1, 1, 20, 5)
ResultCode = A32.FilterOverlay(6, 1, 1, 10, 5)
ResultCode = A32.FilterOverlay(3, 1, 1, 10, 5)
ResultCode = A32.FilterOverlay(2, 1, 1, 8, 5)
ResultCode = A32.FilterOverlay(6, 1, 1, 5, 5)
Set Worksheet = App.GetWorksheet
Worksheet.Show
Worksheet.MakePermanent
A32.MakePermanent
Worksheet.SetCellText("A",1,"pocet (ks)")
Worksheet.SetCellText("B",1,"vzorek")
ResultCode = A32.CountObjects(1)
'Recorded Macro Ends
End Sub
```

Acarus siro

Fotografie byly nejprve konvertovány na černobílé (*Image / Color – Convert to grey scale*), následovala 2x opakované logické operace s obrazy (*Image / Image math – multiply, add*), pomocí posterizačního filtru bylo černobílé rozlišení redukováno na 2 výsledné barvy (černou a bílou) a prahováním byly definovány objekty zájmu v obraze (*Image / Threshold – intensity threshold, overlay red*).

Pro přesnou identifikaci jedinců v této vrstvě byly použity binární filtry: (*Image / Overlay filters - delete edge object*) a (*Image / Overlay filters* - delete residues). Dále byly opět aplikovány binární erozní filtry s cílem oddělit dotýkající se jedince (*Image / Overlay filters – erosion, split objects - value 2*) a (*Image / Overlay filters – erosion, preserve shape - value 2).* Zbytky červené vrstvy byly dále upraveny další aplikací binárních filtrů (*dilatation - value 2;*

erosion preserve shape filter - value 3); erosion - split object filter - value 3; dilatation residues filter - value 2) pro odstranění zbývajících nečistot. Posledním krokem byla vlastní kvantifikace jedinců ve vzorku (*Measurements / Count objects*).

Pro urychlení zpracování byl finální odladěný algoritmus zaznamenán ve formě makra (*Macro / New macro / Start recording / Stop recording / Run Macro*):

```
Sub Main
Dim App As Object
Set App = CreateObject("SigmaScan.Application")
Dim Worksheet As Object
' Recorded macro begins...
Dim A32 As Object
Set A32 = App.OpenImage("C:\Images\Acarus\4D.JPG")
ResultCode = A32.SetZoomLevel(0.250)
ResultCode = A32.ConvertToGrayScale
ResultCode = App.Combine(A32, A32, 768)
```

A B

C D


```
ResultCode = App.Combine(A32, A32, 1536)
ResultCode = App.Combine(A32, A32, 768)
ResultCode = App.Combine(A32, A32, 768)
ResultCode = A32.Posterize(1, 2)
ResultCode = A32.ChangeColorResolution(8, 4)
ResultCode = A32.ConvertToGrayScale
Dim Left0(1) As Long
Left0(0) = 0
Dim Right1(1) As Long
Right1(0) = 0
ResultCode = A32.IntensityThreshold(1, 1, Left0, Right1)
```

```
ResultCode = A32.FilterOverlay(10, 1, 1, 1, 2)
ResultCode = A32.FilterOverlay(8, 1, 1, 1, 2)
ResultCode = A32.FilterOverlay(2, 1, 1, 2, 2)
ResultCode = A32.FilterOverlay(3, 1, 1, 2, 5)
ResultCode = A32.FilterOverlay(6, 1, 1, 2, 5)
ResultCode = A32.FilterOverlay(3, 1, 1, 3, 5)
ResultCode = A32.FilterOverlay(2, 1, 1, 3, 5)
ResultCode = A32.FilterOverlay(6, 1, 1, 2, 5)
Set Worksheet = App.GetWorksheet
Worksheet.Show
Worksheet.MakePermanent
A32.MakePermanent
ResultCode = A32.CountObjects(1)
'Recorded Macro Ends
End Sub
```

Porovnání kvantifikačních technik (verifikace metody obrazové analýzy)

Pro srovnání přesnosti a rychlosti nově vyvinuté metody s tradičním vizualním počítáním byl proveden sleepy experiment , kterého se účastnily nezávisle 3 osoby. Jedna osoba připravovala vzorky, druhá prováděle vizuální kvantifikaci na mřížce s velikostí ok 0.5x0.5 cm a třetí osoba aplikovala na tyto vzorky proceduru obrazové analýzy. Finální výsledky z obou způsobů kvantifikace byly konfrontovány se skutečným počtem jedinců obou druhů. Pomocí regresní analýzy byla vyhodnocena přesnost a časová náročnost obou postupů ze souboru 15vzorků.

ANALÝZA VÝSLEDKŮ

Počet jedinců Acarus siro zjištěný metodou obrazové analýzy byl statisticky shodný se skutečným počtem jedinců , neboť sklon nebyl průkazně odlišný od 1 ($p>0.05$) při průsečíku rovnému 0. V kontrastu s tím se skutečný počet jedinců lišil statisticky významně od počtu zjištěného vizuální kvantifikací ($p<0.05$). (Obr. 2).

Obr . 2 Lineární regresní analýza mezi skutečným počtem jedinců *Acarus siro* ve vzorcích a

počtem zjištěným vizuálním počítáním (prázdné body/ přerušovaná čára) a pomocí metody digitální obrazové analýzy (plné body/plná čára).

Žádný statisticky průkazný rozdíl nebyl zjištěn při porovnání skutečného množství pisivek zjištěných vizuálně či metodou obrazové analýzy ($p>0.05$) (Obr. 3).

Skutečný počet *Acarus siro*

Zjištěný počet *Acarus siro*

0

50

100

150

200

250

300

350

400

450

0 50 100 150 200 250 300 350 400 450

65

0

10

20

30

40

50

0 10 20 30 40 50

Obr . 3 Lineární regresní analýza mezi skutečným počtem jedinců *Liposcelis bostrychophila* ve vzorcích a počtem zjištěným vizuálním počítáním (prázdné body/ přerušovaná čára) a pomocí metody digitální obrazové analýzy (plné body/plná čára).

Skutečný počet *Liposcelis bostrychophila*

Zjištěný počet *Liposcelis bostrychophila*

Srovnání časové náročnosti vizuálního počítání s metodou obrazové analýzy v závislosti na počtu jedinců ve vzorcích ukazuje obrázek 4. Čas potřebný pro vizuální kvantifikaci rostl s počtem jedinců ve vzorcích (čas= 0.55*velikost vzorku +23.9), zatímco metoda obrazové analýzy byla z hlediska času zpracování na počtu jedinců ve vzorcích nezávislá (čas = -0.006*velikost vzorku + 33.9).

Obr. 4: Porovnání časové náročnosti vizuální kvantifikace (prázdné body/přerušovaná čára) s metodou kvantifikace pomocí obrazové analýzy (plné body/plná čára) v závislosti na počtu jedinců ve vzorcích

Přesnost a doba zpracování vzorků metodou obrazové analýzy byla obdobná jako při tradiční vizuální kvantifikaci v případě, že v hodnoceném vzorku bylo méně než 100 jedinců. Nicméně, jakmile bylo ve vzorku vice nž sto jedinců, metoda obrazové analýzy se ukázala být významně statisticky přesnější a rychlejší. V tomto případě přímá vizální kvantifikace konzistentně podhodnocovala počet jedinců ve vzorku. Další výhodou metody obrazové analýzy je, že časová je stejná při jakémkoliv počtu jedinců ve vzorcích (například při 500 jedincích *Acarus siro* ve vzorku byla metoda obrazové analýzy 10x rychlejší než tradiční vizuální kvantifikace). Zřejmá konsekvence je možnost rutinního zpracování velkého množství vzorků bez předchozí kvantifikátorovy zkošenosti a možnost opakování měření kdykoliv v budoucnosti.

0

100

200

300

400

500

600

0 200 400 600 800

Skutečný počet *Acarus siro*

Čas potřebný pro analýzu (sec)

2.6 Aktinomycetová strupovitost bramboru – použití obrazové analýzy pro hodnocení stupně napadní

ÚVOD

V minulosti byla aktinomycetová (aktinobakteriální) strupovitost považována za jednu chorobu, ale v posledních letech byly předloženy doklady o tom, že jde o několik chorob (3-5), které mají odlišnou etiologii, symptomatologii, škodlivost, i odlišné nároky na prostředí a vyžadují tudíž i jiné přístupy k ochraně. V Evropě má největší význam obecná strupovitost a síťovitá strupovitost.

Obecná i síťovitá strupovitost snižuje tržní hodnotu postižených konzumních brambor, ředkvičky a mrkve. Síťovitá strupovitost hlíz je spjata s nekrózami na kořenech, což má za následek pokles výnosu hlíz.

Strupovité příznaky jsou projevem obranné reakce na pronikání hyf patogena do povrchových vrstev nezralé hlízy v místě lenticel (obr. 1). V místě pronikání se zpočátku objevují hnědé léze asi 1 mm velké, které se s růstem hlízy postupně zvětšují. Později se vzhled lézí různí v závislosti na druhu a kmenu patogena, odrůdě hostitele, vlhkosti a teploty půdy.

Obecná strupovitost - léze mohou být povrchové, vyvýšené nebo prohloubené. Většina lézí má vyvýšený, drsný, korkovitý vzhled. Okolo prohloubených lézí buď je, nebo není zvýšený okraj. Strupovité léze mohou splývat a pokrývat větší či menší část povrchu hlíz.

Obr. 1 Strupovitost na hlíze bramboru způsobená *Streptomyces scabiei* [fotoarchiv VÚRV Praha-Ruzyně]

Při mírné formě obecné strupovitosti je porušena jen slupka. Projevem silné reakce na napadení je tvorba korkových vrstev a ztloustnutí (hyperplazie) povrchových pletiv. Prohloubeniny (jemné krátery) vznikají následkem kolapsu hostitelských pletiv působením toxinu (tzv. thatoxinu) vylučovaného patogenem.

Síťovitá strupovitost - léze na hlíze jsou pouze povrchové. Slupka (periderm) je zhnědlá a ztlustlá, síťovitě popraskaná. Kromě hlíz mohou být napadeny i ostatní orgány, tj. kořeny a neztlustlé stonky v podobě nekrotických lézí.

Patogen je běžným obyvatelem půdy, kde je s to žít mimo hostitelská pletiva rostlin. Strupovité matečné hlízy mají pravděpodobně nepatrný význam jako zdroj inokula.

V některých pokusech se však prokázalo, že použití sadbových hlíz infikovaných původcem síťovité strupovitosti mělo za následek zpomalené vzcházení, snížení počtu stonků na trs a pokles výnosu. Napadení dceřinných hlíz je však závislé především na zdroji nákazy v půdě. 68

Optimální teplota růstu je 30 °C. Růst je možný v rozmezí pH 4,8-8,5. Napadení hlíz bývá silnější na propustných štěrkovitých nebo alkalických a vápněných půdách. Choroba se vyvíjí při půdních teplotách mezi 13 a 25 °C a nejvíce lézí se tvoří při 20 °C. Četnost populace patogena v půdě, a tím i četnost a intenzita napadení hlíz, může být ovlivněna: předplodinou; vápněním pro ječmen; přídatným zeleným hnojením; orbou pastviny (*S. scabiei* může běžně osídlovat kořeny trav); četností pěstování náchylných hostitelských plodin a náchylností pěstovaných odrůd.

K infekci může dojít, když v době, kdy jsou lenticely mladé, trvá suché počasí. K infekci nedojde ve vlhké půdě, a to ani tehdy, když je v ní patogen ve velkém množství přítomen. Předpokládá se, že ve vlhké půdě se uplatňuje v okolí lenticel antagonismus bakterií proti aktinomycetům.

Ochrana je zaměřena jednak na snížení množství inokula na sadbových hlízách a v půdě, jednak na zabránění infekce. Ke snížení půdní populace patogena se používá zelené hnojení (např. zelené žito) nebo se do půdy aplikuje řepkové semeno, sójová moučka nebo rostliny sóje, aby se zvýšila kyselost a vlhkost půdy nebo pomnožili antagonisti. Je-li populace patogena příliš velká, jsou tato opatření obvykle neekonomická a většinou i neúčinná. Kde je možná závlaha, je výhodné zavlažovat v kritickém období během 5-6 týdnů po začátku tvorby hlíz.

Odrůdy se liší hladinou náchylnosti k původcům strupovitosti; žádná z odrůd není vysoce rezistentní. Rezistence k síťové strupovitosti není v korelaci s rezistencí k obecné strupovitosti.

Cílem tohot příspěvku je demonstrovat možnost vytvoření kalibrační stupnice napadení bramborových hlíz fytopatogenní druhy rodu *Streptomyces* pomocí obrazové analýzy pro účely rychlého rutinního zpracování a hodnocení velkého množství vzorků.

METODIKA – ZÍSKÁNÍ OBRAZU A OBRAZOVÁ ANALÝZA

· Bramborové hlízy napadené *Streptomyces scabiei*

· Plochý scanner

· Osobní počítač (PC-Windows XP)

· Software ImageJ

Digitální obrazy bramborových hlíz (odrůdy Gourmandine, Salome a Vales esmerald) byly získány prostřednictvím plochého scanneru (Umax Astra 1200S). Pro získání maximálního kontrastu mezi skenovaným objektem a pozadím byla použita černá látka (dyftýn.). Bramborové hlízy byly skenovány v rozlišení 600dpi, s barevnou hloubkou 16.7 milionů barev a uloženy v kompresním formátu JPEG (joint photographic experts group, .jpg) pro další zpracování. V případě takovéoto typu snímání digitálního obrazu je nezbytné věnovat maximální pozornost přípravě vzorků a procesu samotného skenování. Nerovnoměrné nasvícení, odlesky látky pří zmuchlání, nečistoty nebo nedostatečná hloubka ostrosti velmi ztěžují optimalizaci algoritmu pro analýzu obrazu.

Obrazová analýzy byla provedena pomocí programu ImageJ v následující sekvenci kroků:

Otevření analyzovaného obrazu

open("G:\\metodika\\brambory\\black\\vitesse 2.jpg");

Automatická uprava kontrastu, světlosti a barevnosti

run("Brightness/Contrast...");

run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");

run("Window/Level...");

run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");

run("Color Balance...");

run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");

Odstranění drobných defektů vyhlazením

run("Smooth");

Zvýšení kontrastu

run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");

Vyhledání hran

run("Find Edges");

Binarizace obrazu

run("Make Binary");

Aplikace binarizačních filtrů

run("Close-");

run("Dilate");

run("Close-");

run("Dilate");

run("Close-");

Odstranění tmavých nečistot do velikosti 30px s tolerancí 5px

run("Remove Outliers...", "radius=30 threshold=5 which=Dark");

Prahování

//run("Threshold...");

setAutoThreshold();

ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky obrazové detekce projevů aktinomycetové strupovitosti na hlízách bramboru jsou shrnuty na obrázku 2. Použitý algoritmus věrně detekoval rozložení a intenzitu napadení na hlízách. Při podrobném porovnání zdrojových obrazů s výsledky obrazové analýzy (červená barva vs. předloha) je patrné, že shoda není dokonalá. Zdrojem nepřesností je zejména nedostatečná hloubka ostrosti použitého scanneru – okrajové partie hlíz jsou neostré – algoritmus detekce hran v těchto oblastech nefunguje optimálně. Dále je nezbytné zohledňovat i odlišné zabarvení slupky u různých odrůd brambor. Pomocí výše napsaného algoritmu je možné vytvořit podrobné kalibrační sady pro různé odrůdy. Výsledky takto provedené analýze je možné podrobit dalšímu zpracování – například formou měření ploch nebo počítaní odlišných typů lézí prostřednictvím nástrojů (*Analyze / Measure* a *Analyze particles*). Tento typ analýzy byl podrobněji demonstrován v jiných příspěvcích v této metodice.

Obr. 2 Detekce projevů aktinomycetové strupovitosti na hlízách bramboru třech různých odrůd s odlišnou mírou napadení.

Vales esmeralde

Gourmandine

Salome

71

2.7 Využití analýzy obrazu pro identifikaci zaplevelení porostu kulturních plodin pomocí dálkového snímkování

ÚVOD

Technologií, která je využívána v precizním zemědělství ale i v zemědělství obecně, je dálkové snímkování porostů. Snímkování je podle druhu nosiče satelitní, letecké, z řiditelných modelů letadel a vrtulníků a pozemní. Podle použité či zaznamenané části elektromagnetického spektra mohou být snímky panchromatické (viditelné světlo), infračervené a blízké infračervenému spektru (NIR) a radarové. Při použití multispektrálních nebo hyperspektrálních kamer tvoří jednotlivé snímky pro určitý spektrální rozsah samostatné informační vrstvy, které lze vzájemně kombinovat. Snímkováním na základě odrazu záření porostem různých vlnových délek (spektrální charakteristiky) lze usuzovat na druhové složení, jeho stav (obsah vody, chlorofylu, výživný stav), na objem (nárůst biomasy) a plochu asimilačního aparátu (pokryvnost listové plochy), zdravotní stav, napadení porostu škůdci a zaplevelení. Z odrazu záření porostem při různých vlnových délkách (RGB) se také dopočítává normalizovaný vegetační index (NDVI) který charakterizuje celkový stav vegetace a používá se pro další odhady příslušných charakteristik porostu včetně výnosu.

V současné době se využívají v převážné míře technologie digitálního záznamu obrazu ať už ve viditelném spektru, nebo v jednotlivých spektrálních pásmech. Výsledkem je digitální obrazový záznam, který má podobu matice, složené z jednotlivých obrazových bodů – pixelů (*pixel* = picture element). Digitální záznam umožňuje jeho zpracování technologií obrazové analýzy. Software pro obrazovou analýzu umožňuje další zpracování dat včetně statistického zpracování a identifikaci zón s homogenním spektrálním odrazem.

Jednou z možností využití obrazové analýzy je též identifikace stavu zaplevelení porostu. Na základě snímku porostu v určité fenologické fázi lze odlišit podle specifických spektrálních charakteristik významné plevele. V porostech obilnin lze dobře odlišit např. širokolisté plevele, v širokolistých plodinách (cukrovka, brambory, řepka) lze dobře odlišit plevele jednoděložné. Plevele se často vyskytují v hnízdech, ve shlucích a jejich specifické

spektrální charakteristiky umožňují jejich identifikaci a rozlišení od kulturní plodiny i v případě nižší rozlišovací úrovně.

Z obrazu určitého zájmového území je možné identifikovat základní odlišnosti porostu pouhým vizuálním porovnáním obrazu. Podrobnější analýzu provedeme na základě analýzy obrazu a jeho úpravou (variantní barevné syntézy), identifikaci jejich vnitřních nehomogenit a vytvořením doplňkových informačních vrstev. Analýza může být provedena buď na základě významně odlišného NDVI, nebo při použití radiometru odlišných identifikačních spekter porostu. Na základě odlišné odrazivosti různých plodin lze identifikovat plevele v případě, že jejich rozšíření dosahuje významného stupně. Lze dobře např. identifikovat hnízda vytrvalých plevelů. V současné době má dálkový průzkum pro lokálně specifickou ochranu proti plevelům zatím jen malý význam. Rozlišení satelitních snímků není prozatím dostačující k tomu, aby bylo schopné zachytit plevele v časných růstových fázích. Kromě toho nejsou vždy v době ošetření pěstiteli k dispozici vhodné snímky. Monitoring pomocí letadla či vrtulníku (event. řiditelných modelů) je pro své vyšší rozlišení výhodnější. Z multispektrálních snímků lze pomocí odpovídajících algoritmů odlišit plevele od kulturní rostliny, případně i stanovit druhovou příslušnost plevelných rostlin. Tyto postupy jsou náročné a pracují doposud relativně pomalu, díky ukládání a georeferenci snímku však umožňují vytváření map zaplevelení. Chybí však doposud vyhodnocovací algoritmy pro odvození potřeby herbicidních opatření na základě zachycených dat.

Stupeň zaplevelení porostu je určován na základě vizuálního posouzení porostu a event. vzorkováním. Na větších pozemcích nelze však hodnotit kontinuálně celou plochu, ale je nutné omezit se pouze na vzorky z jednotlivých bodů v určité odběrové síti. Shlukovitý

výskyt plevelů zvyšuje nároky na počty odebíraných vzorků a tím značně zvyšuje časovou náročnost mapování. I uvnitř určitého ohniska však dochází k variabilitě v počtu plevelných rostlin. Tato mikrovariabilita může mít za následek, že vzorkovaná ploška nebude vzhledem ke svému okolí reprezentativní. Při optimalizaci vzorkovací strategie je proto důležité kromě dostatečné hustoty vzorkovací sítě zvolit vhodnou velikost a počet vzorkovaných ploch při zachování přijatelné časové náročnosti.. Hustota vzorkovací sítě a velikost odběrových plošek do značné míry závisí na konkrétních počtech vyskytujících se plevelů. Při vysokých počtech

plevelů by hustší síť a větší odběrové plošky vedly k neúměrně dlouhé době potřebné k hodnocení. Naopak při nízkých počtech plevelů má malá vzorkovaná plocha za následek vysokou variabilitu a zvýšený podíl nulových hodnot. U druhů s vysokým prahem škodlivosti bude pravděpodobně postačující velikost vzorkované plochy 2 x 0,25 m2 pro každý bod vzorkovací sítě. U druhů s nižším prahem škodlivosti a nižší početností jako je např. svízel přítula je nutné použít většího vzorku, minimálně 2 x 1 m2. Hustota rastrovací sítě je uváděna od 10x10m až po 50x50m. Pro svízel přítulu a pcháč oset je ke spolehlivému mapování nutné volit hustější síť, a to zejména ve směru kolmém na kolejové řádky. Žádné obecné doporučení bez znalosti konkrétní situace zaplevelení však není možné. Manuální způsoby mapování pro svoji časovou náročnost neumožňují na větších plochách zachovat dostatečnou intenzitu vzorkování a proto se hledají cesty, jak tyto časově a pracovně náročné operace nahradit metodami nepřímými.

Metody leteckého snímkování a obrazová analýza mohou podstatně snížit počet potřebných odběrů a analýz porostu. Pozemní pozorování potom potvrzuje anomálie zjištěné analýzou příslušného snímku.

METODIKA – ZÍSKÁNÍ OBRAZU A OBRAZOVÁ ANALÝZA

· Multispektrální snímek družice QuickBird

· Experimentální pole 12 ha

· pcháč oset (*Cirsium arvense* (L.)

· Rastrovací síť 18x18m

· GPS přístroj

· Osobní počítač (PC-Windows XP)

· Software ArcGis 9.1 a GS+ 5.1.1.

· Software SigmaScanPro 5

Experimentální pole 12 ha pole (Obr. 1) bylo rozděleno vzorkovací sítí s 18x18m oky, přičemž jednotlivé uzly ok byly zaměřeny pomocí GPS přístroje. V rámci vzorkovací sítě byly prováděny kontrolní odběry z ploch o velikosti 0.25 m2 pro zjištění populační hustoty pcháče osetu (*Cirsium arvense* (L.). Zjištěné hodnoty byly následně přepočteny na plochu 1m2. Kromě tohoto pravidelného vzorkování bylo provedeno i zaměření hnízd výskytu pchače v porostu pomocí GPS.

Pro konfrontaci se zjištěnou situací byl pro doplnění obrazové analýzy použit satelitní multispektrální snímek družice QuickBird ze srpna 2002 (rozlišovací schopnost 60 cm u panchromatických dat, v multispektrálním módu rozlišení 2,4 – 2,8 m (Obr. 3).

Pro obrazovou analýzu družicového snímku byla použita metoda prahování na intenzitu jasů v rozpětí hodnot 45-90 (*Image / Threshold – Intensity threshold*).

Obr. 1 Celková situace – družicový pohled

73

ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Získaná data byla zpracována pomocí programu pro tvorbu konturových (vrstevnicových) a plošných map, kde k jednotlivým bodům určeným zeměpisnými souřadnicemi jsou přiřazeny hodnoty spojené se zjištěnou populační hustotou pcháče. Interpolace mezi jednotlivými body (uzly) byla provedena metodou lineárního krigingu. V konečné rastrové mapě jsou s šedou škálou spojeny různé hustoty výskytu pcháče, přičemž izolinie spojují stejné hodnoty (analogie vrstevnic) (Obr. 2). Na základě této mapy bylo následně provedené selektivní ošetření herbicidy, zohledňující intenzitu výskytu spojenou s konkrétním umístěním na experimentálním pozemku (Obr. 4). Z porovnání situace zjištěné vzorkováním na pozemku v konotaci s družicovým snímkem je zřejmá vysoká míra schody jak v detekci prostorového výskytu pcháče, tak intenzity zaplevelení (Obr. 5). Tato skutečnost je o to významnější, že zpracovávaný snímek je ve velmi nízkém rozlišení s vysokou mírou komprese, což vnáší do obrazové analýzy systémovou chybu. Vyšší rozlišení by dovolilo detailnější analýzu situace zejména s ohledem na místní intenzitu zaplevelení (jemnější prahování v různých jasových vrstvách spojené s kalibrací barevné nebo šedé stupnice).

Obr. 2 Konturová mapa zobrazující výskyt pcháče na experimentálním pozemku.

74

Obr. 3 Snímek z družice Quickbird, NDVI index srpen 2002

Obr. 4 Obrazová analýza družicového snímku.

75

Obr. 5 Aplikační mapa herbicidů

.

76

V. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány (pokud existují), případně výstupy z určité znalosti, jestliže se jedná o originální práci.

Kůdela, V., Novacky, A., Fučíkovsky, L. (2002): Rostlinolékařská bakteriologie. Praha, Academia, 347 p.

Kumari, S., Decreamer, W. (2006): A female of *Xiphinema vuittenezi* (Nematoda: Longidoridae) with two vulvae and abundant numbers of males in a soil sample. *Nematology*, 8(6), 943–947.

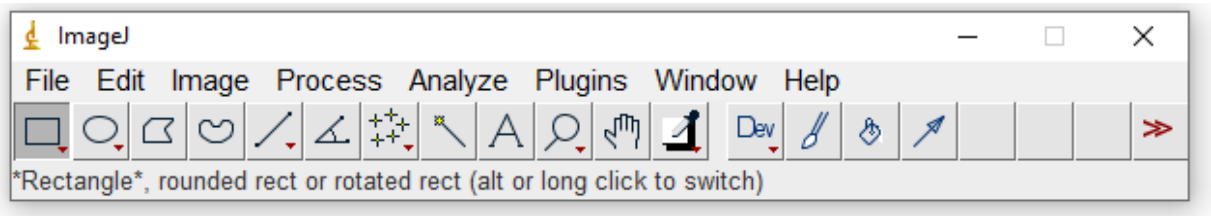
Kumari, S. (2006): *Xiphinema simile* (Nematoda: Longidoridae) in the Czech Republic and a note on other *Xiphinema* species. *Helminthologia*, 43(1), 43–50.

Novotný, D., Křížková, I., Krátká J., Salava J.(2007): First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum acutatum* on Strawberry in the Czech Republic – Plant Disease 91(11): 1516

7.1. ImageJ

ImageJ je software, který umí zobrazovat, upravovat, analyzovat a zpracovávat fotografie. Tento software je volně ke stažení na webové stránce https://imagej.nih.gov/. Kromě toho, že je volně dostupný jedná se o software, který je tzv. open architecture – je možné editovat program podle svých požadavků, nebo jej používat v základním nastavení. Autor tohoto programu je Wayne Rasband působící na Research Services, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA. Tento program je velmi efektivní a v rámci upgradu jeho verzí se jeho rozhraní uživatelsky zlepšilo (obr. ZY), bohužel pro české uživatele může být nevýhodou jeho jazyk. Čeština není možná.

Obr.ZY: Uživatelské rozhraní softwaru ImageJ.

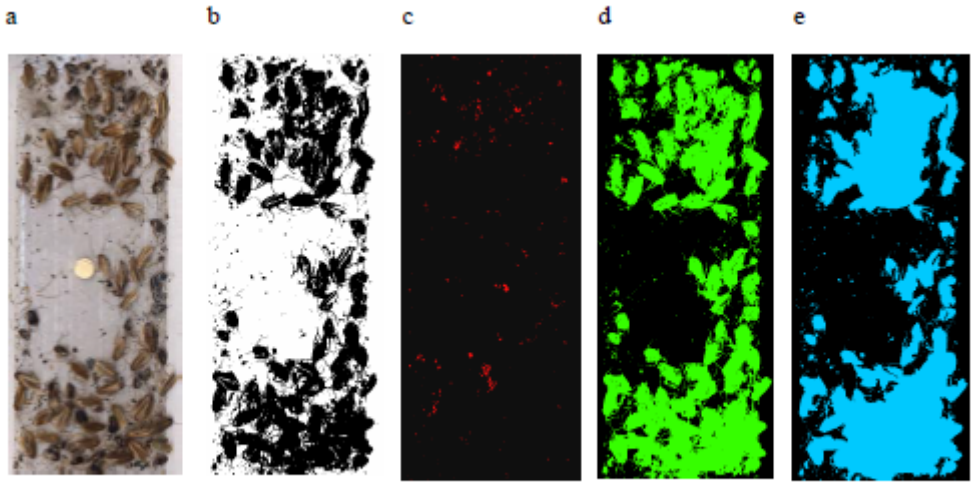


Velkou výhodou tohoto programu je to, že je schopný zpracovávat data v celé řadě formátů (TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS). Kromě zpracovávání jednotlivých snímků je možnost zpracovávat celou sérii obrázků, tedy sekvenci, která je zaznamenána v různém čase. Tato možnost nám velmi usnadní práci, nicméně nesmíme zde zapomínat, že daný snímek musí nacházet stále na stejném místě a ve stejných podmínkách, protože jinak by mohlo dojít k analyzování jiné části (např. při foukání větru se listy pohybují a mohlo by tak dojít k měření jiného listu nebo části snímku, kde není žádný list).

Dalším benefitem tohoto programu je jeho více vláknovost, kdy je možné nastavit zpracovávání paralelních operací, které jsou časově velmi náročné (např. čtení obrazových souborů a analýza již načtených dat).

Kromě zpracovávání dat je možné v softwaru manipulovat se zpracováním obrazu. Je možné různě měnit kontrast (obr. RT), doostřovat, vyhlazovat nebo detekovat hrany obrazů. Tyto postupy nám velmi často usnadní další analýzy. Dále je software schopný vytvářet různé geometrické transformace, jako je změna měřítka, rotace a převrácení. Obraz lze zvětšit až na 32:1 oběma směry. Důležitým krokem při přípravě dat je prahování. Jedná se o proces, kdy je obraz převáděn barevný nebo šedý obraz na binární.

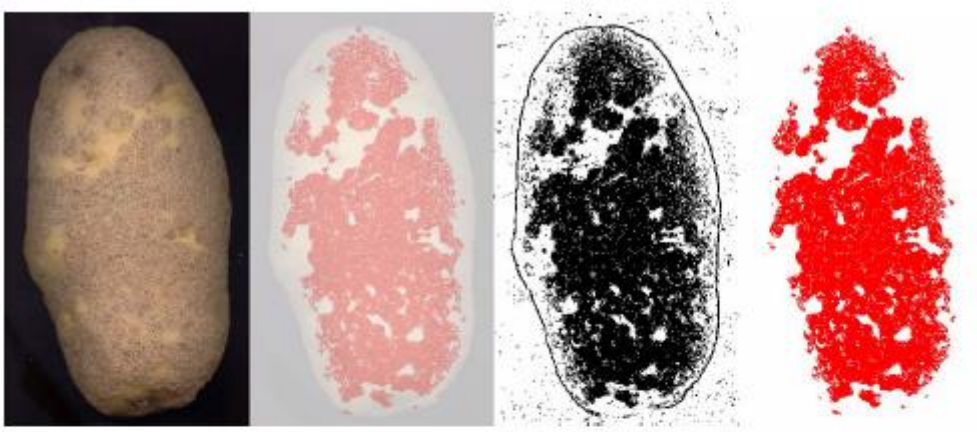
obr. RT: V softwaru ImageJ je možné měnit kontrasty pořízených snímků. Na obrázku vidíme lepový lapač s chycenými jedinci rusa domácího (*Blatella germanica*), který je prohnaný přes jednotlivá barevná spektra.



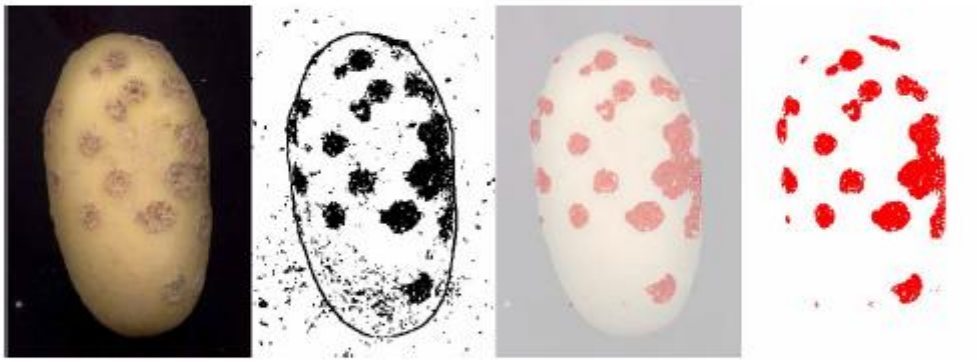
Podíváme-li se na možnosti analyzování dat, software umí změřit hodnot plochy (obr. ER) a pixelů uživatelsky definovaného výběru. Výběry jsou myšleny body, které uživatel na začátku zadá nebo nějaké kontrastní hrany nebo plochy. Díky velmi jednoduché kalibrace je schopný následně převést výsledky do reálných velkostí tedy na běžně používané jednotky délky a plochy.

obr. ER: Jednou možností je analýza ploch, na kterých je poškození. Na obrázku je vidět, jak velké mohou být rozdíly v intenzitě aktinomycetové strupovitosti bramboru mezi jednotlivými odrůdami.

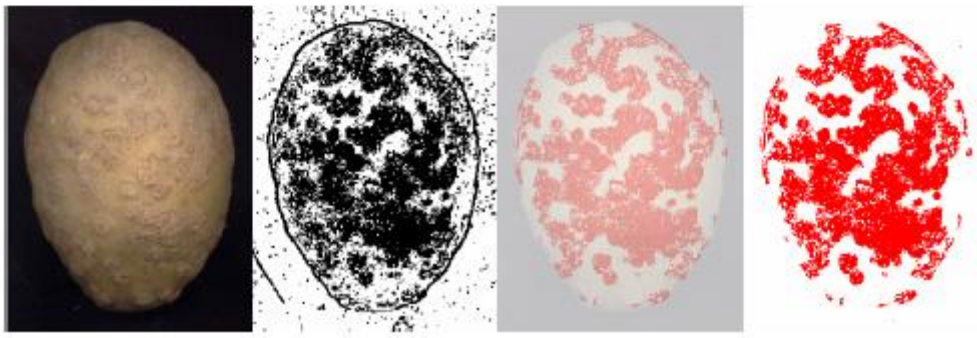
Vales esmeralde



Gourmandine



Salome



Díky vlastnostem tohoto softwaru jsme schopní zjistit poškozenou listovou plochu. V praxi je tak možné zjistit jak je účinné skeletování listů šťovíku mandelinkou ředkvičkovou v biologické ochraně trvale travních porostů (obr. ZU). Nebo k jak velkému poškození praporcových listů došlo kohoutky. V budoucnu by tak tato analýza mohla být použita na snížení počtu insekticidu, a k jeho použití až ve chvíli, kdy dochází k ekonomickým ztrátám.

obr. ZU: List šťovíku - A - fotografie listu pořízena ve scanu, B – upravená fotografie listu šťovíku do černo – bílého spektra.

7.2. SigmaScan

Velmi podobný program ImageJ je SigmaScan. Tento software umí měřit a analyzovat již pořízené obrazy. Dále je schopný spočítat počet jedinců živočichů nebo počtu a distribuce kolonií na agarovém substrátu. Tento způsob může velmi zjednodušit práci, což může být v praxi použito např. pro lepové desky nebo petriho misky (Obr. XC). Kromě mikrosnímků, ale je schopný provádět obrazovou analýzu i na snímcích ze satelitů.

Obr. XC Původní fotografie (smínek A) byla pořízena na stereomikroskopu osazeným digitálním kompaktním fotoaparátem. Následovaly kroky změna barevnosti, úprava kvality obrazu, filtrování (snímek B), prahování (snímek C) a počítání (snímek D).

7.3. Flir

7.4. ? Výnosové mapy

7.5. N- senzor

N-senzory jsou senzory, které jsou schopné zjistit potřeby rostlin na množství dusíku. Díky senzoru je možné variabilní hnojení napříč pozemkem. Ve výsledku se jedná také o obrazovou analýzu, která je upravená do běžné praxe. Senzor vyhodnotí odrazivosti světla z rostlin (barevné spektrum), to se v zařízení analyzuje a podle potřeby dodá určité množství hnojiva do porostu.

7.6. EthoVision XT

Je jeden z nejvíce rozšířených softwaru, který umožnuje sledovat a analyzovat chování, pohyb a aktivitu zvířat. Nejčastějším modelovým organismem jsou hlodavci, ale jeho využití je možné i pro objekty, které jsou mnohonásobně větší, ale i mnohem menší. Je možné sledovat i hmyz, ale i objekty, které se nachází ve vodě. Běžně jsou detekované ryby zebřičky. Před zahájením experimentu je vždy potřeba si správně zvolit, o jaký typ zvířete se jedná (obr.QW).

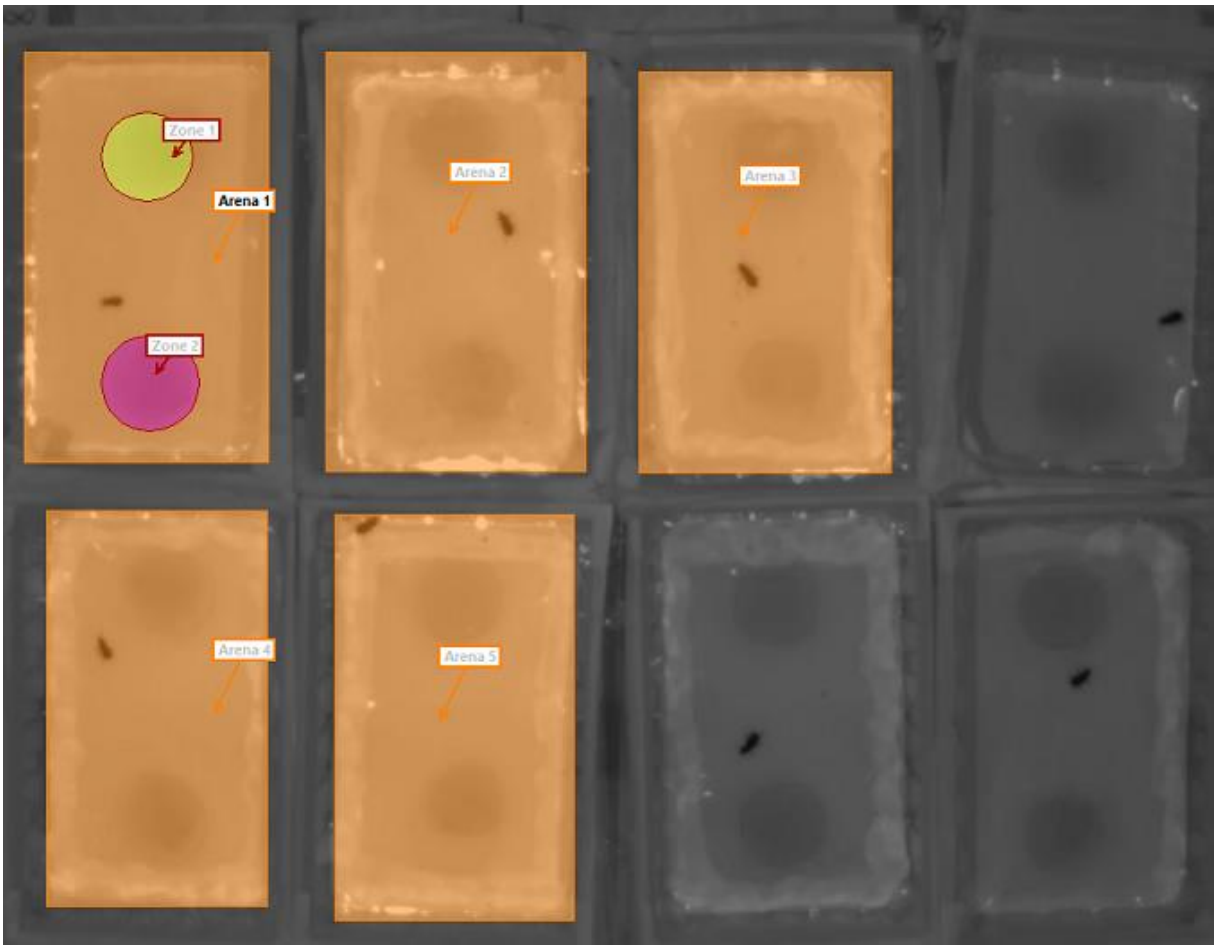
obr.QW. Rozhraní softwaru Ethovision a volba analyzovaného zvířete.

Tento software funguje na změně barvy pixlů, tedy pohybu zvířete z pořízeného videa. Je proto naprostou nutností správně zvolit kontrast mezi zvířetem a podkladem, kde se vyskytuje. Jinak by mohlo dojít ke splynutí zvířete s podkladem a ke ztrátě dat. Další možnou chybou je využití podkladu, do kterého se zkoumaný jedinec zahrabe a my jej po část videa nemůžeme najít.

Při správném nastavení je tento software plně automatizován. Díky čemuž je možné analyzovat několik videí najednou. Ve videích je vždy zapotřebí si nadefinovat arénu (obr. WE), kde se zkoumaný objekt nachází. Na jednom videu můžeme mít až 99 arén. Jejich velikost se odvíjí od velikosti zkoumaného zvířete, a zároveň od kvality videa, které chceme analyzovat.

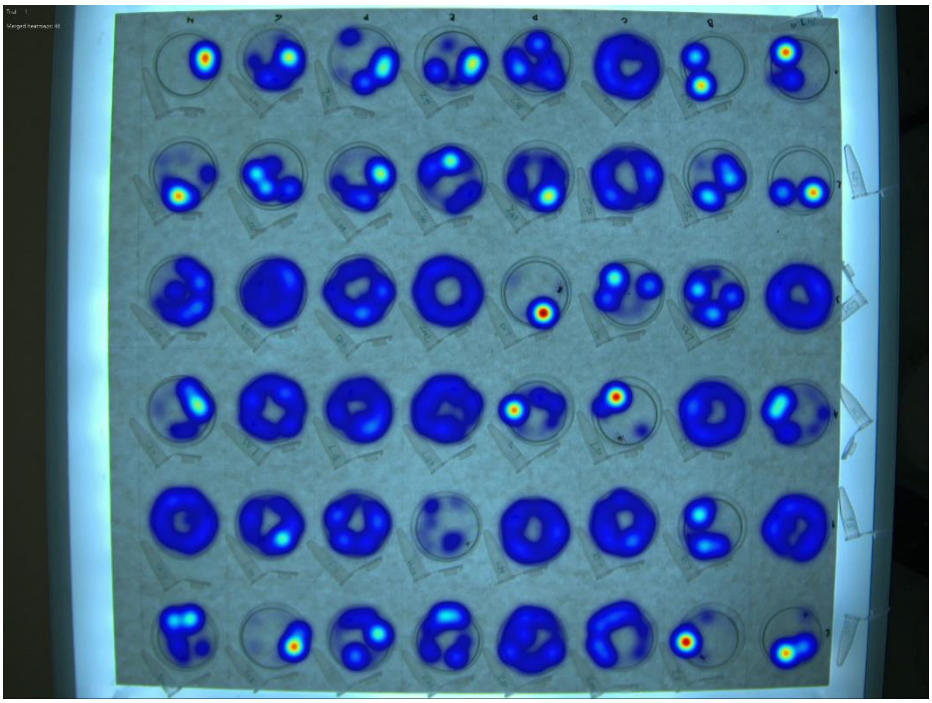
V prvotních pokusech s tímto softwarem bylo používáno Morrisovo vodní bludiště a potkani. V něm bylo zjišťováno, jak dlouho se vyskytují na ploše, která byla málo hluboká a zda jsou schopni si vzpomenout, kde tato plocha byla v předchozím experimentu. V našich experimentech nás zajímá, kde se zvířata vyskytují. Jestli jsou na ploše s nějakým postřikem, nebo se těmto místům vyhýbají. Dále nás zajímá, zda zvířata jsou v místě, kde se nachází jejich potrava nebo v místě, kde je stín oproti přímému slunci.

Obr. WE: Nadefinování arén a zón, kde se vyskytuje potrava, ke které se zvíře nemůže dostat.



Kromě zjištění místa výskytu jsme schopni zajistit trajektorii pohybu. K tomu dochází, změnou barevnosti pixlů, při pochybu na videu. Při tomto převodu je program schopný vypočítat maximální a minimální rychlost, dobu v pohybu nebo uběhnou vzdálenost. Jak již bylo zmíněno, tento program byl vyvinut původně pro chování hlodavců, díky tomu je software schopný analyzovat jednotlivé vzorky chování hlodavců (ale i rybiček) z videí. Detekovat je možné žraní, napájení, čištění, spánek nebo hraní. V budoucnosti je zřejmé, že budeme schopni detekovat celou řadu zvířat.

Ethovision XT vytváří tzv. Heating mapy (obr. KK). Heating mapy jsou grafem, který zobrazuje, v jakém místě se zvíře vyskytovalo nejvíce. Díky tomu jsme schopni analyzovat prostorové preference zkoumaného zvířete. Tento nástroj je velmi nápomocný především ve chvílích, kdy zakládáme nové pokusy, a nevím, zda se nám daný jedinec nebude pohybovat po okraji arény. Jednalo by se pak o nevhodně založený pokus a jeho výsledky by nemusely odpovídat reálnému světu.



Obr. KK: Výsledný obraz pohybu pavouků po střetu s esenciálními látkami. V miskách, kde jsou červené tečky je vidět, že se zvířata skoro nepohybovala a zůstala na jednom místě po celou dobu natáčení. Dále je vidět, že se zvířata nejčastěji pohybovala při okrajích misek. Je tedy zřejmé, že tato zvířata ujdou mnohem větší vzdálenost a bylo by vhodné jim ji při pokusem zajímajících se jejich chováním dopřát.

V původních verzích Ethovision XT bylo možné sledovat pouze jednoho jedince v jedné aréně. Nyní je možné snímat až 12 jedinců v jedné aréně. To je velmi výhodné pro pokusy, kde se snažíme vysvětlit interakce mezi jedinci. Například zda dochází k jejich kooperaci nebo zda se sobě vzájemně vyhýbají, nebo zda jedinec A nesežral jedince B. Nesmíme však zapomenout na nějaké označení těchto zvířat, aby se nám nestalo, že později nebudeme vědět, kdo je jedinec A, a kdo B. Zároveň by i software nemusel správně rozlišit mezi jedinci. Nejjednodušším a efektivním řešením je využití nějaké barvy na záda jedinců.

Výhodou tohoto softwaru může být, že je schopný analyzovat pohyb jedinců přímo z videa, které se natáčí, není tedy zapotřebí ukládat dlouhá videa, která mají velkou kapacitu.

8. Umělá inteligence – rozpoznávání

Díky pokroku umělé inteligence a strojovému učení již existuje celá řada aplikací, které umožnují identifikovat organismy z fotografií. Záleží na volbě aplikace, ale je možné rozpoznávat houby, rostliny i zvířata. Jednotlivé aplikace se od sebe liší cenou (některé jsou volně stažitelné, za jiné se musejí platit) nebo kvalitou rozpoznávání (jistota rozpoznávání nemusí být vysoká). Jistota rozpoznání se udává v procentech. To znamená na kolik procent si je program jistý, že daný organismus určil správně.

V zemědělství se již můžeme setkat s aplikacemi, které nám jsou schopny rozpoznat symptomy chorob, poškození škůdci, nebo plevelné rostliny. Jednou z aplikací, která rozpoznává rostliny, nejen plevelné je aplikace FlowerChecker nebo PlantID.

Tyto aplikace byly vytvořeny ve společné závislosti. FlowerChecker je aplikace, která správně určovala rostliny a vytvořila databázi rostlin. Aplikace PlantID je pak aplikací, která určuje na základě neuronové sítě a strojového učení z již vytvořené databáze. Je tedy schopná určovat rostliny automaticky. Na rozdíl od první aplikace, kde jednotlivé snímky vyhodnocují botanici.

Velkou výhodou aplikace PlantID je okamžité rozpoznání. Dalším plusem je odkaz na wikipedii, kde se o dané rostlině můžeme dozvědět více informací. Zatím je aplikace schopná rozpoznávat pouze jednu rostlinu na snímku. Firma se však nyní snaží vyvinout software, který by uměl z jedné fotografie určovat více rostlin. Díky tomu, že se jedná o českou firmu je pro uživatele jistě benefitem jazyk, kterým je čeština a rozhraní tohoto softwaru je od jiných velmi intuitivní (obr. CV).

Obr. Cv. Ukázka softwaru plant.id. Na ukázce je vidět funkčnost softwaru, kdy software rozpoznal rostlinu merlíku bílého (*Chenopodium album*). Dále je vidět, že software nabízí další možnosti, o jakou rostlinu by se mohlo jednat. Dále tento software také říká, zda rostlina vypadá zdravě či nemocně. Pokud je rostlina nemocná, snaží se detekovat její symptomy a příčiny chřadnutí.

9. Problémy s využívaním obrazové analýzy

Chyby, kterých se dopouštíme během obrazové analýzy, mohou být hned od začátku a mohou nás provázet po celou dobu řešení. Velmi často si neuvědomíme některé velmi důležité faktory ovlivňující obrazovou analýzu v dalších krocích. Těmi jsou nejčastěji špatná kompozice (tvar zkoumaného objektu, nevhodné venkovní podmínky), nevhodně zvolená sekvence snímků, nízká kvalita záznamu. Dalším problémem může být nekompatibilita mezi jednotlivými softwary a formáty snímků. U fotoaparátů se nejčastěji používají formáty TIFF, JPEG, BMP.

U videí se nejčastěji používají AVI a MPEG. U jednotlivých formátů může dojít k různým kompresím, které mohou být výhodou pro ukládání velkého objemu dat, ale na druhou stranu takto může dojít k snížení kvality daných záběrů.

Podíváme-li se na kompozici snímku, velmi častou chybou je, špatná volba zkoumaného objektu s jeho podkladem. Můžu jím být např. Hnědý brouk pobývající po hnědém substrátu, kdy nejsme schopni zajistit rozlišení mezi broukem a substrátem.

Dalším problémem kompozice může být zastínění zkoumaného objektu objektem jiným. Tím je myšleno, že hledaný objekt není vidět. Nejmarkantnější to může být u detekce plevelů v porostech plodin, které již jsou výrazně vzrostlé. Snažíme-li se detekovat plevele klíční fázi, mohou být mnohdy schovány pod jiným porostem. Při selhání včasné detekce plevelů může v pozdějších fázích dojít nefunkčnosti herbicidního ošetření.

Další chybou kompozice jsou odlesky a celkové zkreslení obrazu. Odlesky samy mohou být mnohdy vyhodnoceny jako součást zkoumaného objektu nebo pokud se jedná o analýzu videa, mohou být brány jako další pohyblivý objekt. V našich pokusech to byl odraz laboranta, který zajišťoval průběh pokusu. Ke zkreslení obrazů často dochází na okrajích fotografií nebo videí. Pokud máme několik např. Petriho misek vedle sebe a začneme je snímat. Misky na okraji nemusejí být vždy na snímku kulaté jako v realitě, ale stanou se spíše oválnými. K tomu dochází z důvodu ???. Řešením tohoto problému může být??

Problematické je získání záběru ve venkovních podmínkách. Kvalita výstupu ve venkovním prostředí může být ovlivněna sluncem a osvětlen zkoumaného objektu, větrem nebo dešťovými kapkami.

Hra světla a stínů není pro obrazovou analýzu výhodou spíš naopak, ať už jde zastínění objektu jiným objektem nebo polojasným dnem, kdy máme chvíli slunečno a pak pod mrakem. Tyto faktory významně ovlivňují barevné spektrum zkoumaného objektu.

Za větrného dne může také dojít k chybovosti měření za pomocí obrazové analýzy. Vítr může rozpohybovat různé předměty a ty nám do našeho snímku můžou vrhat stín. Díky tomu může dojít ke změnám zkoumaných hodnot. Mimo rozpohybování cizího objektu může vítr také rozpohybovat zkoumaný objekt. Při automatizaci obrazové analýzy tak může dojít ke ztrátě objektu ze záběru, a tak velmi jednoduše naměříme hodnoty úplně jiného předmětu.

I déšť nebo voda můžou při obrazové analýze způsobit neplechu. Kapky vody mohou proměnit naměřené hodnoty.

Potíže s venkovními podmínkami jdou mnohdy vyřešit rekalibrací snímacích zařízení. Problémem je, že rekalibrace trvá i několik minut a během nich se zase mohou podmínky změnit. Tak se velmi snadno můžeme dostat bludného kruhu.

10. Budoucnost obrazové analýzy

11. Závěr

Obrazová analýza je velmi dobrým nástrojem, ale zatím není na takové úrovni, abychom se mohli spoléhat jen na ni. Nesmíme proto zapomínat na agronomický cit.

12. Použitá literatura

Soille, Pierre.2004. Morphological Image Analysis: Principles and Applications. Springer Science & Business Media. ISBN: 3662039397

Spink, Andrew & Tegelenbosch, Ruud & Buma, Marc & Noldus, Lucas. (2001). The EthoVision video tracking system: A tool for behavioral phenotyping of transgenic mice. Physiology & Behavior. 73. 731-44. 10.1016/S0031-9384(01)00530-3.

*Použitá literatura je dostupná k nahlédnutí u autora publikace