

# 植物多叶片图像目标识别和叶面积测量方法

李震, 洪添胜, 吴伟斌, 张文昭, 刘敏娟

(华南农业大学 工程学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**分析了图像处理法测量叶面积中采用 CCD 照相机和扫描仪 2 种采集设备各自的优、缺点。针对目前各种叶面积测量方法均为逐片测量的局限性,以 MATLAB 数学分析软件为平台开发了对多叶片扫描图像中各叶片进行目标识别和面积计算的算法。试验结果表明,该算法在叶片间不重叠的条件下识别准确率达到 100%,测量得到的叶面积与采用称重法得到的叶面积间的相对误差为 2.43%,决定系数( $R^2$ )为 0.999 6。试验证明,该算法可以实现对多叶片扫描图像中各叶片的准确识别和叶面积测量。

**关键词:**目标识别;叶面积;图像处理;区域标识;平台扫描仪

中图分类号:S126

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)03-0105-05

## Method of Object Identification and Leaf Area Calculation in Multi-Leaf Scanned Image

LI Zhen, HONG Tian-sheng, WU Wei-bin, ZHANG Wen-zhao, LIU Min-juan

(College of Engineering, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Both advantages and disadvantages of CCD camera and scanner used as image acquisition equipment for leaf area measurement using image processing methods were discussed in this paper. For the main limitation of currently used leaf area measuring methods, which was that only one piece of leaf could be measured separately, a novel algorithm based on MATLAB was figured out to measure each leaf area synchronously in a multi-leaf scanned image. Results of experiments were as follows: the accuracy of leaf identification when no superposition between leaves was 100%, the relative error of calculated leaf area between using this method and weighing method was 2.43%, the determination coefficient  $R^2$  was 0.999 6. Results indicated that this method can be used in the object identification and leaf area calculation in a multi-leaf scanned image.

**Key words:** target identification; leaf area; image processing; region marking; flat scanner

植物叶面积是研究植物生理生化、遗传育种、作物栽培技术等方面的重要指标。建立方便、快速、准确的叶面积测定方法,对于调整群体结构、充分利用光热资源,从而指导作物栽培密度及合理施肥以获得作物高产有重要的意义<sup>[1]</sup>。测定植物叶面积有多种方法,各有优缺点<sup>[2-5]</sup>,其中测量精度较高的是叶面积仪法。但是,叶面积仪大多为进口仪器,价格昂贵,且不适合过长、过宽的叶面积测量<sup>[6]</sup>。近年来,

随着计算机技术及数字图像采集设备的发展,基于数字图像测量植物叶面积的方法被广泛应用<sup>[7-10]</sup>。Matthew 等<sup>[11]</sup>提出在测量小面积的虫害叶片时图像处理法的精度较叶面积仪高。柏军华等<sup>[12]</sup>对包括激光叶面积仪在内的多种叶面积测定方法比较表明,采用图像处理法的测量结果变异系数最小。图像处理法主要的采集设备包括 CCD 照相机和平台扫描仪。虽然 CCD 照相机可以实现对植物叶片图像的非

收稿日期:2006-09-12

作者简介:李震(1981—),男,博士研究生;通讯作者:洪添胜(1955—),男,教授,博士, E-mail: tshong@scau.edu.cn

基金项目:广东省科技计划项目(2006B50106002);广东省农业机械化科研项目(粤农函[2005]718号)

imidyl carbonate, DSC)活化甲硝唑合成半抗原,以聚醚胺 2,2-亚乙二氧基二乙胺[2,2'-(ethylenedioxy) diethylamine]为修饰剂,用活泼酯法修饰载体蛋白,之后才将半抗原和修饰过的载体室温反应过夜进行偶联,此法所用试剂昂贵,反应步骤繁琐.本文建立的方法采用琥珀酸酐一步合成出半抗原,然后直接用活泼酯法将半抗原与载体偶联,步骤简单,而且所用试剂普通,建立了一种甲硝唑全抗原合成新方法,为进一步制备甲硝唑抗体奠定了基础.

致谢:本文的波谱解析得到协和医科大学王新立博士的热情帮助,特此致谢!

#### 参考文献:

- [1] BACCOT J D, WILSON W D, HIETALA S. Clinical pharmacokinetics of metronidazole in horses[J]. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy*, 1988, 11 (2): 417-420.
- [2] KEEFE J P, TROCK A, THOMPSON K D. Activity of metronidazole and its hydroxy and acid metabolites against clinical isolates of anaerobic bacteria[J]. *Agents and Chemotherapy*, 1982, 22(3): 426-430.
- [3] FODEY T L, CONNOLLY L, CROOKS S R H. Production and characterisation of polyclonal antibodies to a range of nitroimidazoles[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 483(1): 193-200.
- [4] POLZER J, GOWIK P J. Validation of a method for the detection and confirmation of nitroimidazoles and corresponding hydroxy metabolites in turkey and swine muscle by means of gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2001, 761(1): 47-60.
- [5] HURYAUD - PESSEL D, DELEPINE B, LAURENTIE M. Determination of four nitroimidazole residues in poultry meat by liquid chromatography - mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 882(1): 89-98.
- [6] GAUGAIN M, ABJEAN J P. High - performance thin - layer chromatographic method for the fluorescence detection of three nitroimidazole residues in pork and poultry tissue[J]. *Journal of Chromatography A*, 1996, 737(2): 343-346.
- [7] 陈新建. 免疫学技术在植物科学中的应用[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998: 56-58.
- [8] 王化录. 甲硝唑半琥珀酸酯钠和钾盐制备方法及其用途: 中国, 00103981.4[P]. 2001-09-26.

【责任编辑 李晓卉】

(上接第96页)

#### 参考文献:

- [1] ETCHES R J. Reproduction in poultry [M]. Walling UK: CAB International, 1996: 106-124; 263-278.
- [2] SHARP P J. Photoperiod control of reproduction in the domestic hen [J]. *Poultry Science*, 1993, 72: 897-905.
- [3] SHARP P J, DAWSON A, LEA R W. Control of luteinizing hormone and prolactin secretion in birds [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part C*, 1998, 119: 275-282.
- [4] SHARP P J, BLACHE D. A neuroendocrine model for prolactin as the key mediator of seasonal breeding in birds under long - and short-day photoperiods [J]. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2003, 81: 350-358.
- [5] CURLEWIS J D. Seasonal prolactin secretion and its role in seasonal reproduction: A review [J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 1992, 4: 1-23.
- [6] EL HALAWANI M E, FEHRER S, HARCIS B, et al. Incubation behavior in the domestic turkey: Physiological correlations [J]. *CRC Critical Review of Poultry Biology*, 1988, 1: 285-314.
- [7] 施振旦, 朱基美, 黄运茂, 等. 调节马岗鹅繁殖特性的初步结果和结论[J]. *中国草食动物*, 2001, 3: 12-15.
- [8] 施振旦, 黄祖汉. 家鸡催乳素放射免疫测定法的建立[J]. *核农学报*, 2000, 14: 36-39.
- [9] 施振旦. 家鸡促黄体素放射免疫测定法的建立[J]. *华南农业大学学报*, 1997, 18(增刊): 116-119.
- [10] JOHNSON A L. Reproduction in the female [M] // STURKIE P D. *Avian Physiology*. 4th ed. New York: Springer-Verlag, 1986: 403-429.
- [11] CHAISEHA Y, EL HALAWANI M E. Neuroendocrinology of the female turkey reproductive cycle [J]. *Journal of Poultry Science*, 2005, 42: 87-100.
- [12] EL HALAWANI M E, ROZENBOIM I. The ontogeny and control of incubation behavior in turkeys [J]. *Poultry Science*, 1993, 72: 906-911.
- [13] HARGITAI C, FORG V, MEZES M, et al. Seasonal and circadian fluctuation of plasma LH level and its change in the domestic goose as an effect of GnRH treatment [J]. *Acta Biologica Hungarica*, 1993, 44: 255-268.
- [14] 黄运茂. 马岗鹅繁殖活动的调控研究[D]. 广州: 华南农业大学动物科学学院, 2005.

【责任编辑 柴 焰】

进行 +ESI-MS<sup>3</sup> 鉴定, 出现碎片离子峰  $m/z = 99$  ( $[98 + H]^+$ ), 各种碎片都能合理归属 (图3), 因此  $m/z = 272$  分子离子可归属为半抗原 MNZ-SA.

对 MNZ-SA 进行 IR 分析 (图4):  $3\ 127\text{ cm}^{-1}$  为  $\nu_{\text{C-H}}$ ,  $1\ 747\text{ cm}^{-1}$  为羧酸  $\nu_{\text{C=O}}$ ,  $1\ 722\text{ cm}^{-1}$  为酯  $\nu_{\text{C=O}}$ ,  $1\ 537\text{ cm}^{-1}$  为咪唑环上  $\nu_{\text{NO}_2}$ ,  $1\ 477\text{ cm}^{-1}$  为酯和咪唑环间的  $\nu_{\text{CH}_2}$ ,  $1\ 458\text{ cm}^{-1}$  为咪唑环上的  $\nu_{\text{CH}_3}$ ,  $1\ 367\text{ cm}^{-1}$  为  $\nu_{\text{NO}_2}$ ,  $1\ 265\text{ cm}^{-1}$  为酸  $\nu_{\text{C=O}}$ ,  $1\ 163\text{ cm}^{-1}$

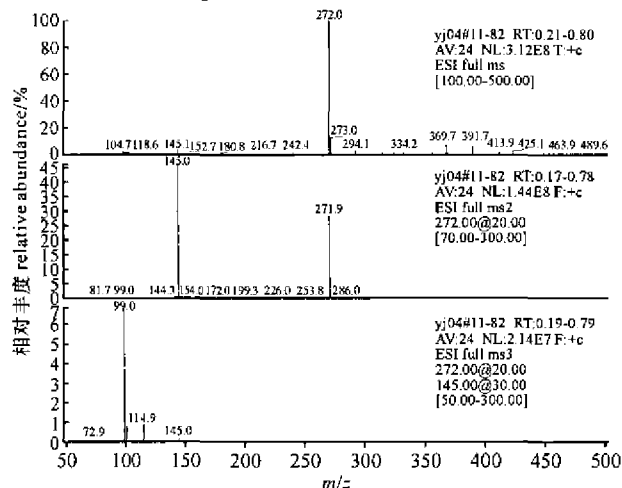


图2 半抗原甲硝唑半琥珀酸酯电喷雾离子化质谱

Fig. 2 +ESI-MS of MNZ-SA

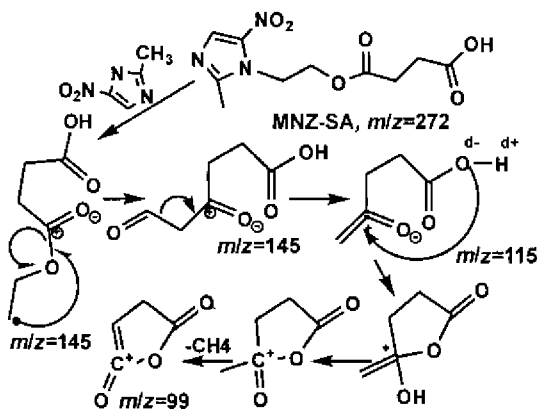


图3 半抗原甲硝唑半琥珀酸酯可能的裂解机理

Fig. 3 Possible fragmentation mechanism of MNZ-SA

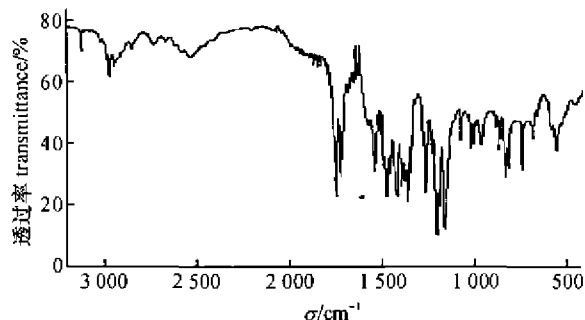


图4 半抗原甲硝唑半琥珀酸酯红外光谱

Fig. 4 Infrared spectrum of MNZ-SA

为咪唑环与硝基间的  $\nu_{\text{C-N}}$ ,  $1\ 199\text{ cm}^{-1}$  为咪唑环上 2 个双键间的  $\nu_{\text{C-N}}$ ,  $1\ 207\text{ cm}^{-1}$  为咪唑环与酯间的  $\nu_{\text{C-N}}$ , 结果表明产物结构与目标物结构吻合.

通过以上鉴定分析, 表明半抗原甲硝唑半琥珀酸酯合成成功.

## 2.2 全抗原鉴定

甲硝唑全抗原 MNZ-SA-BSA 紫外吸收光谱见图5. 在  $280\text{ nm}$  波长处, 载体蛋白 BSA 有强吸收, MNZ 在该波长吸收较弱, 而 MNZ-SA-BSA 在该波长附近有一肩峰, 推测为载体和偶联于载体上的 MNZ 的吸收累加所致;  $320\text{ nm}$  为 MNZ 的特征吸收波长, BSA 在该波长几乎无吸收, 而 MNZ-SA-BSA 在该波长却表现出与 MNZ 类似的特征吸收峰, 故该吸收峰应为连接于载体上的 MNZ 所贡献. 从而证明甲硝唑半琥珀酸酯连接在了载体蛋白上<sup>[7]</sup>, 全抗原合成成功.

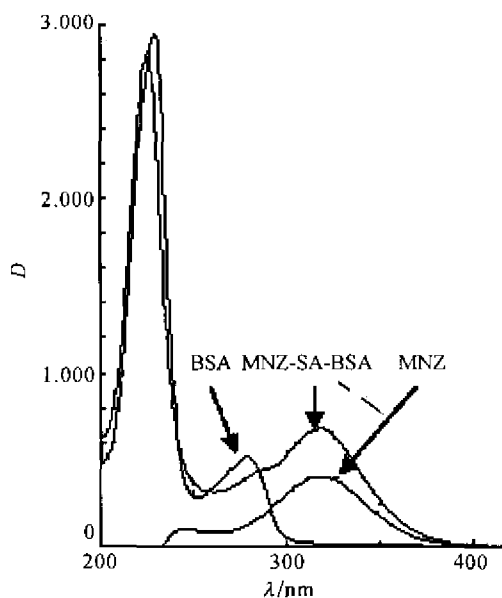


图5 甲硝唑全抗原紫外吸收光谱

Fig. 5 Ultraviolet spectrum of MNZ-SA-BSA

## 3 讨论

半抗原 MNZ-SA 合成通常采用吡啶<sup>[8]</sup> 作为反应溶剂, 室温反应过夜, 得到粗产物后重结晶. 为了提高效率, 本研究尝试微波法合成 MNZ-SA, 以琥珀酸酐为衍生剂, 以吡啶作反应溶剂, 在  $10\text{ s}$  左右即完成反应, 大大缩短了反应时间, 经简单洗涤、脱溶、结晶, 即可得到纯度很高的产物, 产物纯度得到了波谱鉴定确证. 该法操作方便, 能够满足实验室合成少量半抗原的需要.

人工抗原 MNZ-SA-BSA 合成, Fodey 等<sup>[3]</sup> 以丙酮为溶剂, 4-二甲氨基吡啶 (4-dimethylaminopyridine, DMAP) 作催化剂, 用二琥珀酰亚胺碳酸酯 (disuccin-

# 1 材料与方法

## 1.1 仪器

2550 紫外-可见分光光度计, Shimadzu 公司; DRX-400 核磁共振仪, Bruker 公司; LCQDECA 液质联用仪, Finnigan 公司; RFX-65A 傅立叶变换红外光谱仪, Analect 公司; 5WD800T 微波炉, 美的电器公司; 透析袋 (最大截留相对分子质量 6 000), 进口分装。

## 1.2 主要试剂

甲硝唑原药, 纯度 99%, 广西河池市化工制药厂; 牛血清白蛋白 (BSA) 为生化试剂, *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、二环己基碳二亚胺 (DCC) 为分析纯, 均购于 Sigma 公司; 其他试剂皆为市售分析纯。

## 1.3 方法

**1.3.1 半抗原合成** 在 10 mL 烧杯中加入甲硝唑 0.85 g、琥珀酸酐 1.25 g、无水吡啶 1 mL, 在磁力搅拌器上搅拌均匀后, 置微波炉内加热约 10 s, 沸腾后立即停止加热, 减压蒸除吡啶, 加入 5 mL 冰水, 用 4.℃ 预冷过的氯仿萃取, 减压蒸去氯仿, 室温挥干, 将所得晶体重新溶于预冷过的氯仿, 加冰水洗涤 2 次, 无水硫酸镁脱水, 减压蒸发除去氯仿, 室温挥干, 得到针状白色晶体, 即半抗原甲硝唑半琥珀酸酯 (MNZ-SA), 直接用于鉴定或偶联。

**1.3.2 半抗原鉴定** 电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 鉴定委托华南农业大学测试中心进行; 氢核磁共振 ( $^1\text{H-NMR}$ )、红外光谱 (IR) 鉴定委托中国科学院广州化学研究所进行。

**1.3.3 全抗原合成** 将 10.8 mg MNZ-SA 溶于 0.5 mL *N,N'*-二甲基甲酰胺中, 加入 31.0 mg DCC, 搅拌 10 min 后再加入 20.0 mg NHS, 室温避光搅拌反应 3.5 h, 离心除去沉淀物 (*N,N'*-二环己基脲), 取上清液逐滴加到由 0.1 mol/L、pH 8.0 的磷酸缓冲液配置的 4 mL BSA 溶液 (4.8 mg/mL) 中, 室温避光搅拌反应 2 h, 装入透析袋, 用  $\rho = 0.009 \text{ g/mL}$  的 NaCl 溶液透析 3 d, 每天换液 3 次, 即得甲硝唑全抗原 (MNZ-SA-BSA)。分装后, 保存于 -20 ℃ 冰箱中备用。

**1.3.4 全抗原鉴定** 参照文献[7]方法进行。

# 2 结果与分析

## 2.1 半抗原鉴定

图 1 是半抗原 MNZ-SA 的氢核磁共振谱。 $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.96 (s, 1H, —CH), 4.59 ~ 4.61 (t,  $J = 5.1 \text{ Hz}$ , 2H, —CH<sub>2</sub>—O—), 4.47 ~ 4.49 (t,  $J = 5.0 \text{ Hz}$ , 2H, —N—CH<sub>2</sub>—), 2.61 ~ 2.64 (m, 2H, —CH<sub>2</sub>—COOH), 2.55 ~ 2.59 (m, 2H, —CH<sub>2</sub>—COO—C—), 2.53 (s, 1H, —CH<sub>3</sub>)。

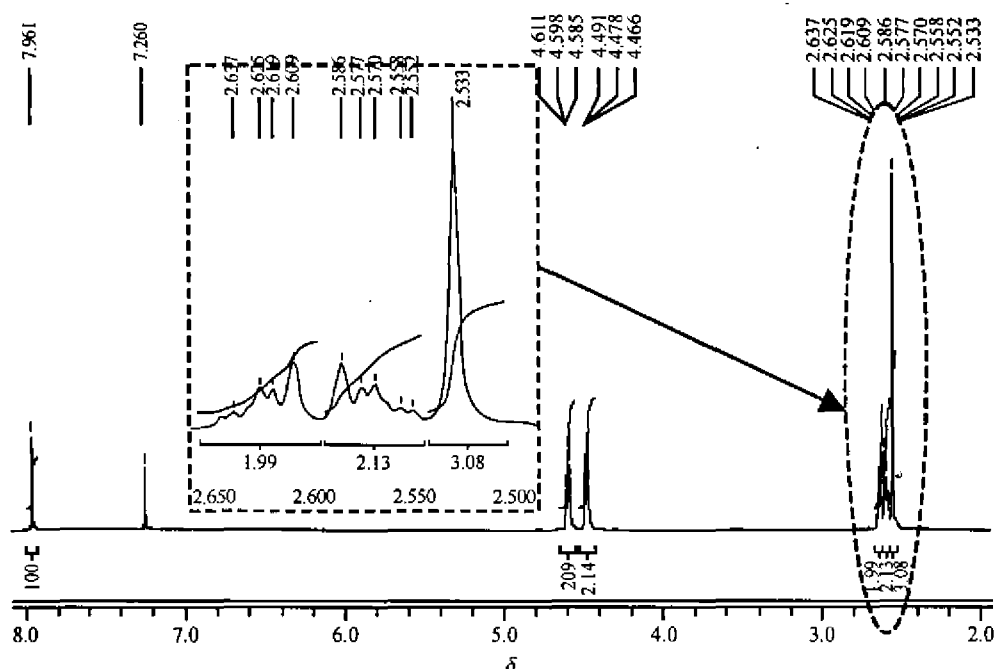


图 1 半抗原甲硝唑半琥珀酸酯的氢核磁共振谱

Fig. 1  $^1\text{H-NMR}$  of MNZ-SA

对 MNZ-SA 进行 + ESI-MS 鉴定 (图 2), 出现 MNZ-SA 分子离子峰  $m/z = 272$  ( $[271 + \text{H}]^+$ ), 对分

子离子进行 + ESI-MS<sup>2</sup> 鉴定, 出现碎片离子峰  $m/z = 145$  ( $[144 + \text{H}]^+$ ), 进一步对  $m/z = 145$  碎片离子