

ДВУХМЕРНОЕ ЦИФРОВОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СЕТИ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКОЙ ПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© О. В. Иванов,¹ М. С. Игнатов²

¹ Физический институт им. П. Н. Лебедева РАН и ² Главный ботанический сад РАН, Москва;
электронный адрес: ¹ ivanov@td.lpi.ru, ² misha_ignatov@list.ru

Разработан алгоритм, позволяющий на фотографиях паренхиматических клеток, сделанных при помощи поляризационной микроскопии, автоматически распознавать контуры клеток и проводить вычисления их параметров для больших массивов данных. На примере фотографий листьев двух близких видов мхов — *Plagiomnium elatum* и *P. medium* — показаны возможности сравнения объектов и возможности экспликации признаков строения клеточной сети, в частности расположения клеток в косых рядах.

Ключевые слова: клеточная сеть, оптическая поляризационная микроскопия, размеры клеток.

Для характеристики разного рода ботанических объектов широко используются особенности взаиморасположения клеток, образующих своими стенками специфический рисунок, ниже именуемый клеточной сетью. Хотя в некоторых случаях взаиморасположение клеток получает терминологическое оформление, как например расположение клеток вокруг устьиц (аномоцитное, парацитное и т. д.), большей частью особенности строения клеточной сети с трудом поддаются словесному описанию. Изображения ее во многих публикациях, представляя строение отдельных тканей, органов или их частей, сделаны с помощью рисовальных аппаратов или фотокамер.

Для определения линейных размеров клеток применяют окулярные линейки или измеряют изображения клетки на рисунках, фотографиях или изображениях на экране компьютера. Такие методы позволяют определять численные характеристики лишь единичных клеток, массовые же измерения ограничены огромной трудоемкостью.

Новые возможности анализа изображений, появившиеся с широким распространением цифровой фотографии, позволяющей накапливать неограниченные объемы изображений, пока не решили ни проблем формализации описаний клеточных сетей, ни задач измерений клеток на массовом материале.

Существующие методы, представленные в стандартных пакетах математического обеспечения, поставляемых с микроскопической техникой, предлагают или ручное выделение объектов измерения (что сильно ограничивает их количество), или предварительную мацерацию ткани, после чего необратимо теряется информация о взаиморасположении клеток, равно как и их размерах, в интактном виде. Предшествующие работы по автоматическому распознаванию клеток на изображениях, полученных при конфокальной микроскопии с применением методов морфометрии (Zdunek et al., 2004), не получили широкого распространения. Впоследствии эти авторы представили алгоритм, позволяющий определять средние

размеры клеток без получения информации о каждой из них (Zdunek et al., 2007).

В работе Френча и соавторов (French et al., 2012) предложен метод определения линейных размеров клеток вдоль заданной линии, которая вводится пользователем. При этом другие параметры клеток не определяются. Фактически этот метод наиболее подходит к измерениям изображений, получаемых с помощью конфокального микроскопа, в которых поперечные стенки получают существенно четче продольных.

В настоящей работе предлагается компьютерный метод анализа, который позволяет перевести видимое изображение в координаты межклеточных границ и их вершин (точек, где соприкасаются 3 клетки и более). Совокупность этих координат будем называть оцифрованной клеточной сетью. После такой оцифровки расчет многих геометрических параметров клеток и их комплексов становится возможным при относительно простой математической обработке.

Для целей оцифровки необходимо отличать клеточные стенки от внутриклеточного пространства. Для этого сначала нужно отконтрастировать их с помощью физических или химических методов окраски, а затем однозначно распознать их на микрофотографиях. В качестве объекта отработки методики был выбран лист мха. Листостебельные мхи отличаются от большинства растений листовой пластинкой, которая на большей части своего протяжения в толщину однослойная, что позволяет при простом микроскопировании четко видеть клеточную сеть. Детали ее строения с самого начала развития систематики мхов были осознаны как важные таксономические признаки. С первых работ начала XIX в. и по сей день бриологические публикации содержат прорисовки клеточных сетей листьев (Hedwig, 1801; Bruch et al., 1836—1855; Игнатов, Игнатова, 2003, 2004; Zander, 2007). Анализ их, однако, всегда велся визуально, численное выражение получали только такие параметры, как длина и ширина клеток.

Изначальной мотивацией настоящей работы было желание авторов автоматизировать измерение размеров клеток в листьях листостебельных мхов, а также получить контуры клетки на основе фотографий для последующего анализа. Простым и эффективным способом контрастирования границ, использованным в настоящей работе, является поляризационная микроскопия. Она позволяет сделать изображение границ ярким и пестрым, а внутриклеточные области — темными и однородно окрашенными (рис. 1, 2), поскольку поляризованный свет легко улавливает различия в структуре и ориентации волокон целлюлозы и стенки между клетками работают как поляризационные фильтры.

Материал и методика

Объектом исследований служил гербарный материал фондов гербария Главного ботанического сада РАН (Москва). Листья мхов помещали в водную среду без окрашивания и предварительной фиксации. Если лист под покровным стеклом не оказывался относительно плоским, его разрезали так, чтобы полученные фрагменты распрямлялись и находились в фокусе микроскопа, а поперечные стенки не получались настолько скошенными, чтобы перекрывать просветы клеток. Представленные иллюстрации сделаны на двух объектах: *Plagiomnium elatum* (Bruch et al.) T. J. Кор. (место и время сбора: Московская обл., Звенигородская биостанция МГУ, Игнатов М. С. 07.07.1998) и *P. medium* T. J. (Bruch et al.) T. J. Кор. (место и время сбора: Карелия, Эссойла, Иванов #Es30068, 02.08.2007).

Конструкция микроскопа. Стандартный способ изучения объекта в проходящем поляризованном свете состоит в том, что в обычный световой микроскоп ставят два скрещенных поляризационных фильтра (один — перед конденсором, а другой — после объектива микроскопа) и, вращая объект на столике микроскопа, проводят измерения. Однако такая конструкция плохо подходит для наших целей, так как при фотофиксации результатов на матрицу фотоаппарата все время проектируются разные части объекта (в идеально настроенном случае сопоставлять можно только небольшие центральные области, и то это сопряжено с трудностями, связанными с тем, что повороты плохо представимы на прямоугольной сетке, составляющей набор фотоприемников светочувствительной матрицы фотоаппарата). Поэтому мы предлагаем схему наблюдений на неподвижном препарате и с двумя вращающимися поляризационными фильтрами. При этом приходится обеспечивать синхронность их вращения, обеспечивающую их скрещенную взаимную ориентацию. При такой схеме наблюдений автоматически обеспечивается сопоставимость заданной точки препарата и пикселя фотоприемника. Наш способ обработки информации позволяет скомпенсировать ошибки в асинхронности вращения фильтров и исключить из анализа связанную с ними общую интенсивность изображения.

Для получения изображения в поляризованном свете на микроскоп были установлены поляризатор и анализатор. При этом они были изначально установлены в скрещенное положение и вращались как единое целое вручную, а столик оставался неподвижным. Данный способ позволяет легко совмещать изображения, получаемые при различной поляризации, и полностью использовать

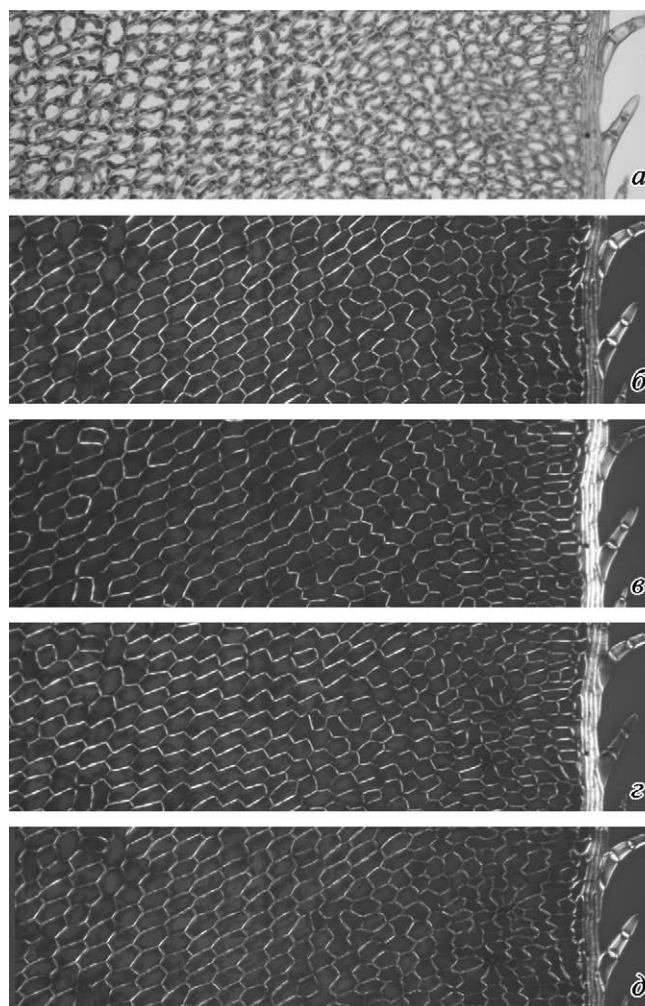


Рис. 1. Фрагмента средней части листа *Plagiomnium elatum*.

Фотографии: а — в проходящем свете; б—г — в поляризованном свете с углами 0, 30 и 60° соответственно; д — совмещенное изображение кадров б—г с прорисовкой границ клеток (увеличенный фрагмент прорисовки на рис. 4, а).

матрицу фотоаппарата. При наблюдении неполяризованного изображения поляризационные фильтры выводились из оптической цепи микроскопа.

Фотографирование производили на микроскопе Карл Цейс NU-2/е с помощью переделанной под цифровой фотоаппарат Nikon D70 штатной фотонасадки, изначально предназначенной для фотографирования на фотопластинки. Управление фотоаппаратом осуществляли с помощью персонального компьютера. Для определения выдержки анализировали гистограммы распределения интенсивности получаемого цветного изображения, а фокус определяли с визуалью. Все фотографии делали в формате RAW, позволяющем сохранить непосредственно данные с матрицы фотоприемников без компрессии, приводящей к потере информации. Использовали воздушные объективы с увеличениями 10×, 25× и 63×, что соответствует 0.35, 0.18 и 0.07 мкм на 1 пиксель матрицы фотоприемников.

Получение совмещенного изображения. Изображение, получаемое при съемке с использованием скрещенных поляризационных фильтров, зависит от угла их поворота и переходит в себя при синхронном повороте фильтров на 90°. Поэтому для каждого поля зрения пре-

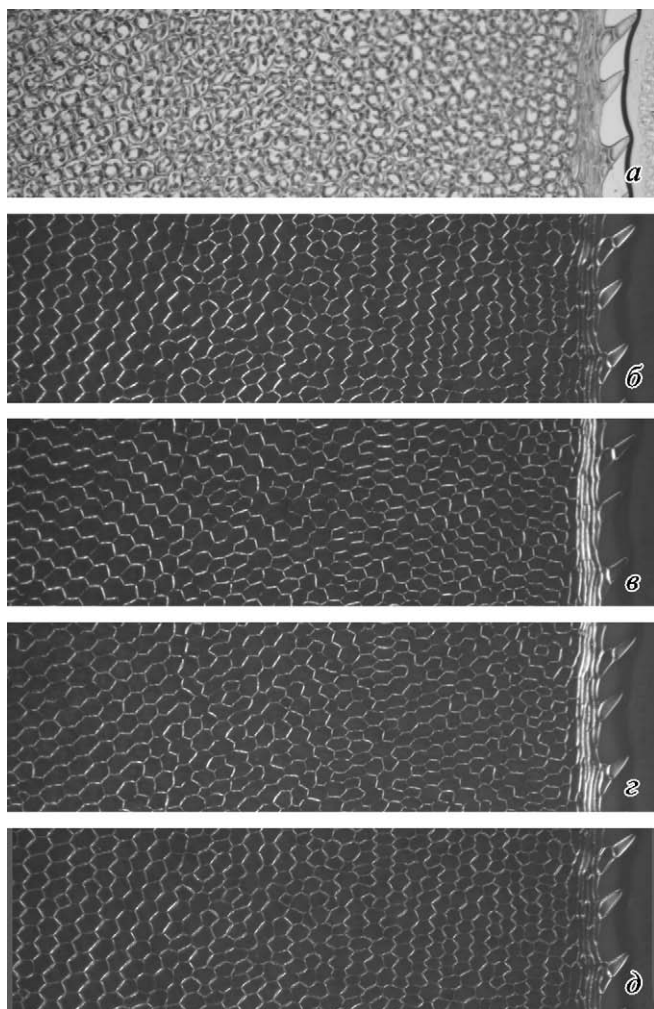


Рис. 2. Фрагмент средней части листа *Plagiomnium medium*.

Объяснения те же, что в подписи к рис. 1.

парата делаются 3 фотографии с разными углами поворота поляризационных фильтров с шагом в 30° (рис. 1, б—г; 2, б—г). Границы выглядят яркими в полосе углов примерно 45° . Поэтому трех углов поворота достаточно для того чтобы проявить границы, находящиеся под любыми углами. Поскольку столик микроскопа и объектив при съемке неподвижны, совмещение изображения осуществляется просто по координатам снимка. В дальнейшем, однако, анализируются не совмещенные фотографии, а тройки фотографий (или отдельные части, имеющие идентичные координаты).

Результаты и обсуждение

Описание компьютерного алгоритма. 1. Сначала необходимо предварительное приведение данных. Полученные цифровые фотографии в формате RAW представляют собой двумерную матрицу троек чисел, соответствующих интенсивности трех цветов — красного, зеленого и синего (red—green—blue, RGB), комбинации которых дают все разнообразие цветов и характеризуют освещение в данной точке матрицы фотоприемников. Для дальнейшей обработки, однако, тройку чисел RGB-изображения удобнее представлять в виде другой

тройки чисел — тон (hue), насыщенность (chroma) и интенсивность (lightness), используемых в представлении CIE LCh, что является стандартной процедурой в преобразованиях цифровых изображений. По нашему опыту, тон и его насыщенность практически не зависят от условий фотосъемки (выдержки и диафрагмы), особенностей препарата, а также неточности при ручной настройке фильтров. Интенсивность, которая зависит от этих параметров, из дальнейшего анализа исключена. Таким образом, изображение превращается в матрицу из двоек чисел, и только она анализируется дальше.

2. Полученное изображение клеточной сети подразделяется на квадраты со стороной 12, 16, 24, 32, 48 или 64 пикселей. Выбор стороны квадрата задается следующим образом: фотография увеличивается, так что становится видна пикселизация, и ширина более мелких клеток в пикселях делится на 5. Таким образом, внутри клетки оказывается от 30 до 100-150 квадратов (примеры таких квадратов даны на рис. 3, в, г). Алгоритм, обсуждаемый ниже, слабо чувствителен к вариациям этого параметра, и неоптимальное задание стороны квадрата быстро становится очевидным, так как заниженные размеры квадрата могут приводить к распознаванию 2 соседних клеток как 1, а завышенные — к пропуску мелких клеток, что видно при наложении реконструированного изображения на изначальную фотографию. Это позволяет легко скорректировать размер квадрата и перезапустить алгоритм с более подходящим параметром.

3. После разделения на квадраты для каждого из них (напомним, что данные берутся из трех отдельных снимков с углами поляризации 0, 30, 60 и 90, 60°) строятся две гистограммы распределения пикселей по цвету и насыщенности (рис. 3, в, е, ж). В гистограммах данные из трех фотографий (ср. на рис. 3, а и е, д) объединяются (так что для квадрата, минимального используемого для распознавания размера со стороной 12, общее число данных составит $3 \times 12^2 = 432$). В случае, если квадрат попал внутрь клетки (рис. 3, а, в), ассоциированная с ним гистограмма (рис. 3, е) будет значительно уже, чем для квадрата, попадающего на стенку клетки (рис. 3, г, д, ж). Заметим, что вид квадратов из центра клетки (рис. 3, а) практически одинаков при всех углах поляризации, тогда как квадраты, расположенные на границе клеток, существенно отличаются в зависимости от направления поляризации, что показывает оптическую активность клеточной стенки (рис. 3, д).

4. Далее строится распределение ширины гистограмм тона и насыщенности по всем квадратам (рис. 3, б), где за ширину гистограммы принимается длина отрезка ее носителя за вычетом начального и конечного участков, на которые приходится не более чем по 3 пикселя. На обоих этих распределениях (и по тону, и по насыщенности) легко видеть два пика: узкие гистограммы однотонных участков из центра клеток образуют левый пик, а широкие гистограммы квадратов, в которых проходит граница клетки, дают правый пик. Правая граница левого пика на гистограммах определяет порог, отсекающий квадраты из центра клеток от квадратов, внутри которых могут быть границы клеток. Далее эти квадраты со значением ширины меньше пороговой помечаются как внутренние (т. е. принадлежащие «просвету» клетки, а не ее границе). Если внутренние квадраты соприкасаются, они считаются принадлежащими одной клетке, и каждой клетке присваивается уникальный номер, которым помечаются все ее квадраты. Для них вновь строятся две гистограммы

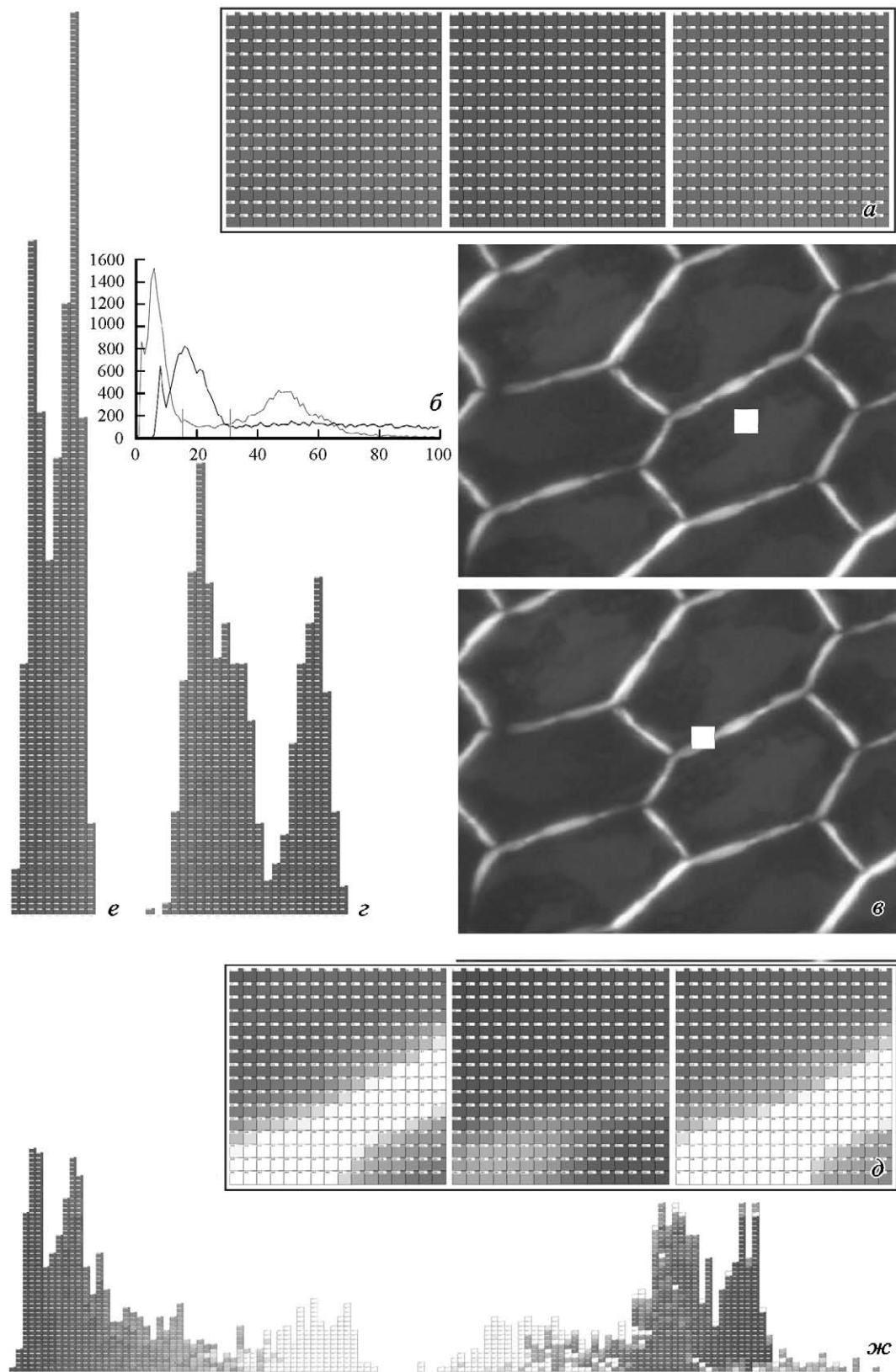


Рис. 3. Фрагменты клеточной сети листа *Plagiomnium medium*, иллюстрирующие работу алгоритма оцифровки.

δ° — два двухвершинных распределения ширины гистограмм тона (кривая с основным пиком *левее*) и насыщенности (кривая с основным пиком *правее*); вертикальными линиями обозначены пороговые значения для принятия решения о том, что квадрат находится внутри клетки. *в, г* — многократно увеличенные тройки квадратов, сфотографированные с углами поляризации 0, 30, 60 и 90, 60°, из центра клетки (место, откуда вырезана тройка *а*, показано *квадратом* на *в*) и с границы между клетками (место, откуда вырезана тройка *д*, показано *квадратом* на *г*); при этом элементам изображений на каждом маленьком квадрате на *а, д* отвечает один пиксель. *д—ж* — иллюстрация построения гистограмм тона (распределение *слева*) и насыщенности (распределение *справа*) для квадратов *в* (он же *а*) и *г* (он же *д*) и соответственно; точки на гистограммах соответствуют конкретным пикселям.

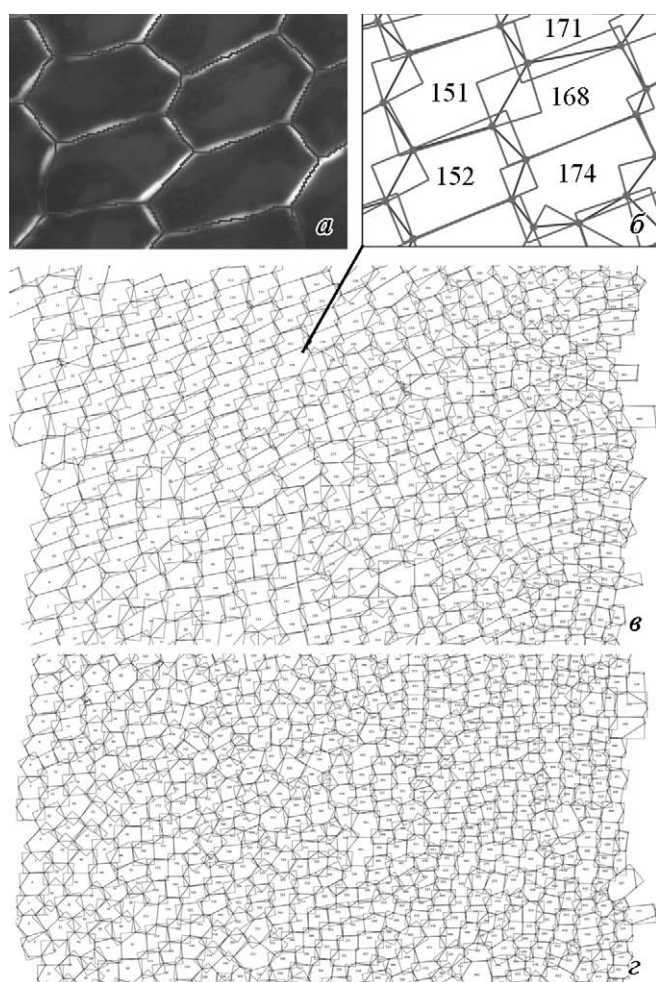


Рис. 4. Пример разметки границ и оконтуривания клеток прямоугольниками минимальной площади описанными вокруг каждой клетки.

a — фрагмент оцифрованной клеточной сети листа *Plagiomnium medium* (ср. с рис. 1, *e*); *б* — оцифрованная сеть того же листа с прямоугольниками минимальной площади, описанными вокруг клеток; *в* — то же, что *б* для *P. medium*.

(цвета и насыщенности), которые в дальнейшем именуется гистограммами клетки данного номера.

5. Затем каждый квадрат подразделяется на 4 из соотношений однородности и удобства хранения данных, причем внутренние квадраты наследуют метку своего родителя, т. е. также становятся внутренними. Далее рассматриваются вновь полученные квадраты, которые не являются внутренними. Они присоединяются к внутренним квадратам клетки в два этапа. Сначала присоединяются квадраты, которые соседствуют не менее чем с 4 внутренними квадратами одной и только одной клетки и имеют гистограмму, целиком вмещающуюся в гистограмму клетки. Квадраты считаются соседними, если они имеют общую сторону или вершину. Присоединенные квадраты также помечаются как внутренние и получают метку от своих соседей (при этом гистограмма клетки не меняется, поэтому ее пересчета не требуется). Эта операция осуществляется путем повторного просмотра списка всех квадратов, не являющихся внутренними, до тех пор пока на полном просмотре списка квадратов не произойдет ни одного присоединения. Затем следует второй этап, аналогичный первому, но с условием, что для присоеди-

нения достаточно одного соседа. Два этапа необходимы, чтобы исключить рост кластеров, приводящий к невыпуклым «рогатым» клеткам. При таком способе присоединения клетки не могут слиться, так как квадраты, соседствующие с несколькими клетками, не подходят под условие присоединения.

6. Далее квадраты делятся снова, и процедура, описанная в пункте 5, повторяется вплоть до минимального квадрата, который размером не может быть меньше пикселя и определяется требуемой точностью исследования, равно как и разрешающей способностью микроскопа и размером матрицы фотоаппарата. В приводимом здесь примере с клеточной сетью *Plagiomnium* наиболее целесообразным оказалось использование минимального квадрата со стороной 3 пикселя.

7. Следующий шаг является «страховочным» на случай, когда по каким-либо причинам остались крупные области, помеченные как внутриклеточные, что связано с наличием оптической активности загрязнителей препарата (чаще всего грибами), сильно скошенными клеточными стенками или наличием аномально мелких клеток. Эти области попадают редко, и в случае обнаружения решение по ним принимается в индивидуальном порядке. Стандартный способ такой страховки основан на нахождении областей размером больше n размеров основного квадрата и мечением их как клеток с особыми свойствами (например, их можно не использовать при подсчете статистики). Параметр n определяется из соотношений исключения ложных срабатываний на широких межклеточных границах и пропуска мелких клеток.

8. Когда внутренние области клеток оказываются помеченными, наступает завершающий этап — проведение границ клеток толщиной в сторону минимального квадрата, на котором остановился алгоритм присоединения. Это осуществляется с помощью описанного в пункте 5 алгоритма, но со снятием ограничения по вхождению гистограммы присоединяемого квадрата в гистограмму клетки. Важно, чтобы возврат каждого цикла итерации происходил после просмотра всех квадратов.

9. Полученная картина представляет собой набор внутренних квадратов, разделенных пустыми квадратами, толщиной в 1—2 длины стороны минимального квадрата. Эти пустые квадраты рассматриваются как границы между соседними клетками или вершины углов 3 клеток и более (в реальности никогда не более 4). Вид проводимых границ показан на рис. 4, *a*.

10. Вершина углов определяется следующим образом. Сначала находится квадрат минимального размера, на 2 расстояниях от которого имеется более 2 клеток. Если на стыке 3 или 4 клеток таких квадратов оказывается более одного, то их координаты усредняются и среднее арифметическое оказывается координатами точки вершины.

11. Для большинства клеток границы можно представить прямыми линиями, соединяющими вершины. Этого вполне достаточно для массовых измерений большого числа клеток (ср. на рис. 4 *a* и *б*). В случае сильно изогнутых границ необходима незначительная доработка модуля, отвечающего за получение статистической информации.

Точность метода и анализ возможных ошибок. Предлагаемый здесь метод позволяет исследовать практически любые двумерные клеточные сети, у которых изображение границ достаточно сильно отличается от внутренностей. Также существенно, чтобы внут-

ренности были однородно окрашены, в то время как границы могут быть сколь угодно пестрыми.

Для оценки точности полученных результатов следует рассмотреть источники возникновения ошибок. Они разделяются на три типа. Первый связан с размером пикселя и разрешением микроскопа (в нашей ситуации им можно пренебречь), второй — с ошибкой распознавания границ, третий — с недостаточной представительностью данных при рассмотрении одного поля зрения. Источник ошибок 3-го типа нами будет рассмотрен в следующей публикации. Здесь стоит ограничиться вопросом ошибок, связанных с точностью распознавания.

После того как клетки найдены, их границы находят с точностью до половины ширины видимых клеточных стенок, что является естественной точностью. Следует отметить, что неточность распознавания зависит от числа клеток в кадре и для 1000 паренхиматических клеток с соотношением сторон (3—4): 1 составляет, по предварительным тестам, величину меньше 1 %, что оказывается достаточным для значительного круга задач.

Возможны следующие ошибки распознавания: 1) неправильное положение границы (смещение границы внутрь одной из клеток); 2) нет распознавания клеточной границы (2 клетки сливаются); 3) лишняя граница (1 клетка распознается как 2); 4) толстая клеточная граница распознается как клетка; 4) группа клеток не распознана из-за дефекта препарата (механические или биологические повреждения объекта, загрязнение или выход препарата из плоскости фокусировки). Разработанные алгоритмы анализа и коррекции ошибок, которые будут рассмотрены в отдельной работе, позволяют практически полностью исправить ошибки, перечисленные в пунктах 1, 2 и 4, а также заметно снизить количество других ошибок (пункт 3). Таким образом, при идеальном качестве препарата доля правильного распознавания достигает 99.9 %.

Примеры использования предлагаемого метода. 1. Основные возможности оцифрованной клеточной сети. Среди прочего размеченная таким образом клеточная сеть позволяет определять площадь клеток (как количество внутренних минимальных квадратов) и аппроксимировать периметр клеток суммой расстояний между вершинами. Более точное определение периметра требует дополнительных разработок, хотя и не содержит принципиальных трудностей. Распределение клеток по числу сторон также доступно непосредственно из полученных данных. Зависимости размера клеток от числа сторон, корреляции размеров соседних клеток также легко вычисляются.

2. Определение длины и ширины клеток часто необходимо в различного рода описаниях ботанических объектов, поэтому возможность их определения у большого количества клеток несомненно поможет получению более точных данных (Ivanov, Ignatov, 2011). Вместе с тем, как бы парадоксально это ни звучало, длина и ширина клеток не являются тривиально определяемыми параметрами, так как непонятно, относительно каких направлений их следует измерять. Для придания этим понятиям точного математического смысла проведем следующее рассуждение. Понятия длины и ширины клеток однозначно определены только для прямоугольных клеток. Для клеток более сложной формы необходимо дать дополнительные определения этих понятий, которые давали бы однозначный ответ, соответствующий нашим интуитивным представлениям о размере; при этом желательно, чтобы можно было охарактеризовать отличия клетки от

прямоугольника. Мы предлагаем следующий способ решения этой задачи, вводя понятие о габаритном размере клетки. Вокруг клетки можно описать прямоугольник минимальной площади (рис. 4, б—г). Длина и ширина этого прямоугольника и определяют габаритные размеры. Отношение площади этого прямоугольника к площади клетки характеризует отличия формы клетки от прямоугольника. Для выпуклой клетки это соотношение меняется в пределах от 1 (прямоугольник) до 2 (треугольник). Стоит отметить, что для невыпуклой клетки соотношение не ограничено сверху и меняется от 1 до бесконечности; таким образом, если оно больше 2, то однозначно клетка невыпуклая, хотя невыпуклые клетки могут иметь соотношение сколь угодно близкое к 1. Степень вытянутости клеток хорошо характеризуется через отношение длины к ширине.

3. Пример использования оцифрованной клеточной сети для экспликации отдельных терминов описательной морфологии. Данный пример касается двух видов мхов из рода *Plagiomnium*, широко распространенного в бореальных экосистемах. Надежное определение их основывается на органах полового размножения, но последние далеко не всегда представлены, так что на практике используют чаще признаки гаметофита, в частности для их различия чаще всего указывают признак «клетки листа в косых рядах» у *P. elatum* или «не в косых рядах» у *P. medium* (Савич-Любичкая, Смирнова, 1970; Коронен, 1971; Игнатов, Игнатова, 2003; Smith, 2004). Определение этого признака никогда не давали, предполагая его самоочевидным из слов обиходного языка; иногда читатель отсылался к иллюстрациям, на которых были изображены типичные случаи. Хотя интуитивно этот признак понять и представить себе несложно, глядя на реальные объекты, выбор между этими состояниями признака не всегда прост: в проходящем свете многочисленные детали скрадывают даже весьма четкие ряды (рис. 1, а; 2, а). Расположение клеток в рядах гораздо более четко проявляется в поляризованном свете (рис. 1, б—г), но при такой визуализации ряды легко усматриваются и там, где они не слишком четкие (рис. 2, б—г).

Мы провели у этих двух видов *Plagiomnium* анализ зависимости площади клетки от расстояния от жилки и угла наклона клетки от расстояния от жилки, где за угол наклона принят угол, образованный стороной описанного вокруг каждой клетки прямоугольника и жилкой (на исследуемом отрезке листа жилка определенно может быть аппроксимирована прямой линией); для простоты восприятия графика угол варьировал от 0 до 90°, т. е. не учитывали, вытянута ли клетка по длине или ширине (альтернативный вариант с таким учетом, когда угол варьировал в диапазоне от 0 до 180°, принципиально картину не меняет, поскольку поперечно расширенные клетки составляют у данных видов лишь небольшую часть). Полученные картины на разных листьях исследуемых видов устойчиво различаются следующим образом: площадь клеток от жилки к краю уменьшается у *P. elatum* значительно более резко, чем у *P. medium*; угол наклона большинства клеток у *P. elatum* находится в диапазоне 50—75°, в то время как у *P. medium* сгущение точек углов наклона происходит вокруг ортогонального направления: большинство клеток ориентировано, как видно из графиков, в двух диапазонах: 0—10° и 80—90°, что по существу является одним диапазоном.

Фактически полностью подтверждая традиционные представления о наличии у *P. elatum* косых рядов и их от-

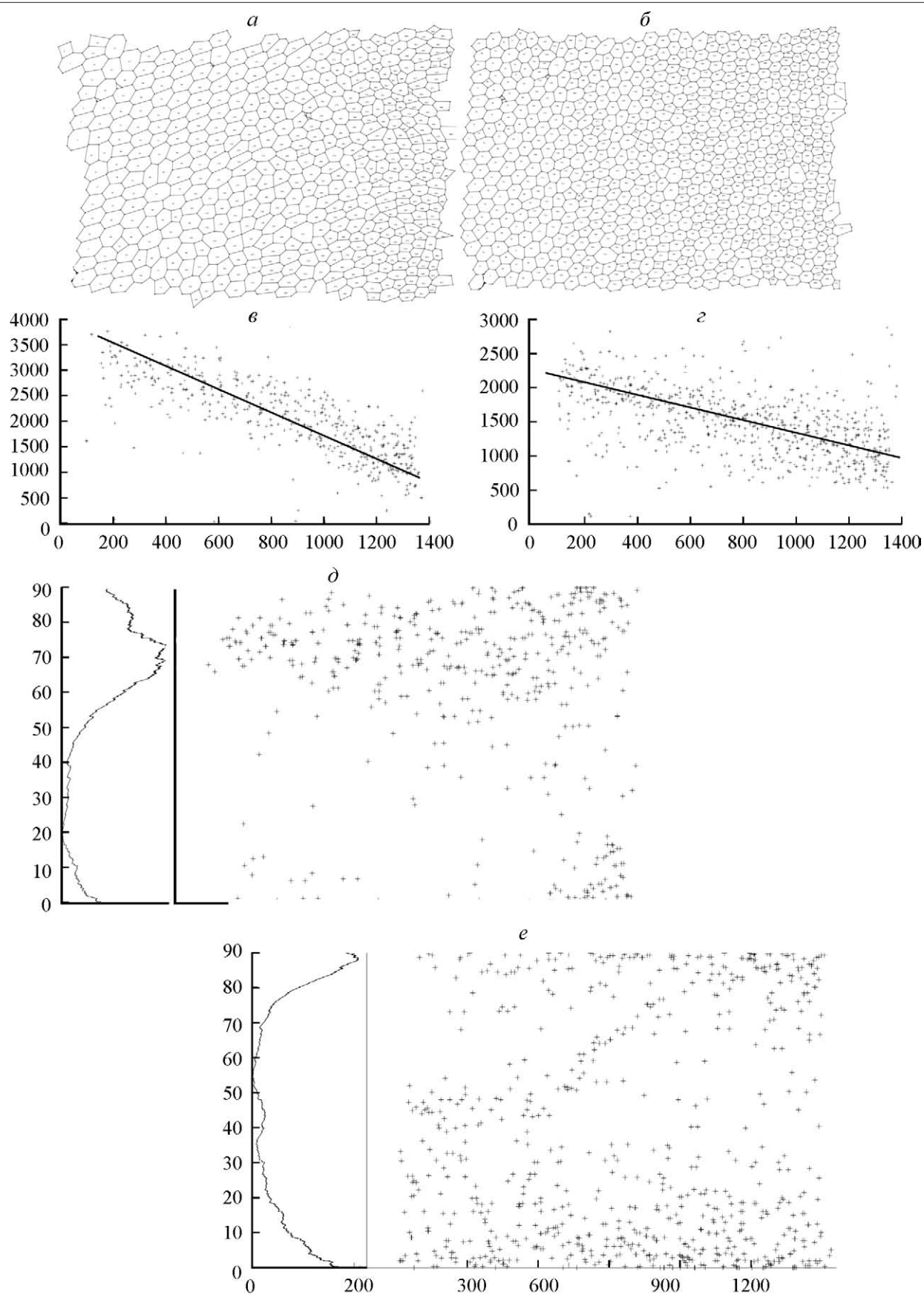


Рис. 5. Зависимости размеров клеток и их ориентации от их положения относительно жилки.

a, б — фрагменты оцифрованной клеточной сети листа *Plagiomnium elatum* и *P. medium* соответственно; *в—г* — зависимость размера клетки (ось OY, μm^2) от расстояния от жилки (ось OX, μm) *P. elatum* (*в*) и *P. medium* (*г*); *д—е* — распределение углов наклона клетки (ось Y, град) от расстояния от жилки (ось OX, μm) *P. elatum* и *P. medium* соответственно.

существовании у *P. medium*, данная картина позволяет уточнить некоторые интуитивные априорные представления о том, как более точно определить расположение клеток в косых рядах. Во-первых, представление о том, что сильное варьирование клеток по размерам делает ряды не столь четкими, оказывается неправильным. В данном случае картина противоположная, так что эта вариабельность вообще к косым рядам отношения не имеет (рис. 5, в, з). Во-вторых, угол наклона клеток, даже весьма грубо аппроксимированный прямоугольником, оказывается очень существенным: несмотря на то что некоторые фото у *P. medium* в поляризованном свете указывают на «хорошие ряды», концентрация клеток с соответствующим углом наклона около 60° оказывается минимальной (рис. 5, е), тогда как у *P. elatum* на углы в 60—70° приходится пик (рис. 5, д).

Таким образом, оцифрованная сеть позволяет эксплицировать разные признаки описательной морфологии, уточняя их смысл, измеряя их на массовом материале, а также уточняя пределы варьирования признаков.

Мы благодарны за помощь и ценные замечания, высказанные при обсуждении работы, В. Б. Иванову, А. М. Пятницкому, Б. З. Соколинскому и В. А. Нечитайло.

Список литературы

- Игнатов М. С., Игнатова Е. А. 2003. Флора мхов средней части европейской России. М.: Т-во науч. изд-ва КМК. 1: 608 с.
- Игнатов М. С., Игнатова Е. А. 2004. Флора мхов средней части европейской России. М.: Т-во науч. изд-во КМК. 2: 960 с.
- Савич-Любичская Л. И., Смирнова З. Н. 1970. Определитель листостебельных мхов СССР. Верхоплодные мхи. Л.: Наука. 822 с.
- Bruch Ph., Schimper W. Ph., Gumbel Th. 1836—1855. Bryologia Europaea, seu genera muscorum Europaeorum monographice illustrata. 1-6. Stuttgartiae: Sumptibus Librariae E. Schweizerbart. 1164 p.
- French A. P., Wilson M. H., Kenobi K., Dietrich D., Voss U., Ubeda-Tomas S., Pridmore T. P., Wells D. M. 2012. Identifying biological landmarks using a novel cell measuring image analysis tool: cell-o-tape. Plant Methods. 8 : doi : 10.1186/1746-4811-8-7.
- Hedwig J. 1801. Species Muscorum frondosorum Leipzig: J. A. Barthii. 352 p.
- Ivanov O. V., Ignatov M. S. 2011. On the leaf cell measurements in mosses. Arctoa. 20 : 87—98.
- Koponen T. 1971. A monograph of *Plagiomnium* sect. *Rosulata* (Mniaceae). Ann. Bot. Fenn. 8 : 305—367.
- Smith A. J. E. 2004. The moss flora of Britain and Ireland. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 1012 p.
- Zander R. H. (Ed.). 2007. Flora of the North America. Bryophytes: Mosses, pt. 1. New York: Oxford Univ. Press. 27 : 713 p.
- Zdunek A., Konskyy R., Cybulska J., Konstankiewicz J., Umeda M. 2007. Visual texture analysis for cell size measurements from confocal images. Int. Agrophysics. 21 : 409—414.
- Zdunek A., Umeda M., Konstankiewicz K. 2004. Method of parenchyma cells parametrisation using fluorescence images obtained by confocal scanning laser microscope, Ejpau. Electronic J. Polish Agricult. Univ. 7 (1) (<http://www.ejpau.media.pl/volume7/issue1/engineering/art-01.html>).

Поступила 28 VII 2012

2D DIGITIZING OF PLANT CELL AREOLATION BY POLARIZED LIGHT MICROSCOPY

O. V. Ivanov,¹ M. S. Ignatov²

¹ P. N. Lebedev Physical Institute RAS and ² Main Botanical Garden RAS, Moscow;
e-mail: ¹ ivanov@lpi.ru, ² misha_ignatov@list.ru

An algorithm for plant parenchymal cell delineation is developed. It works with digital photos made by polarized light microscope and allows digitize many parameter of each cell thus providing a lot of data characterizing plant tissue. Examples are given for unistratose lamina of leaves of two closely related moss species. *Plagiomnium elatum* and *P. medium*. We demonstrate a comparison of dimensional patterns in leaves and ability of formalization of such a structural character as arrangement of cells in oblique rows.

Key words: parenchyma cells, cell areolation, polarized light microscopy, cell size.