

# 用扫描仪及 Image J 软件精确测量 叶片形态数量特征的方法

戴志聪, 杜道林\*, 司春灿, 林英, 郝建良, 孙凤

(海南师范大学 生命科学学院, 海口 571158)

**摘要:** 传统的纸样称重法用来测量离体叶片的面积, 烦琐、耗时、精度不高。为寻求一种适合的方法, 我们对离体叶片采用扫描仪获取叶片的数字图像, 利用 Image J 软件测量叶片的长、宽、周长、面积及叶柄的长, 并与传统的纸样称重测定叶面积法进行比较。结果表明, 此方法具有低成本、快速、精确等特点, 适用于植物形态学、植物生理生态学、林学及农业等对叶片形态特征的测量研究工作。

**关键词:** 叶片形态分析; 图像处理; Image J

**中图分类号:** Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)03-0342-06

## A method to exactly measure the morphological quantity of leaf using Scanner and Image J Software

DAI Zhi-Cong, DU Dao-Lin\*, SI Chun-Can,  
LIN Ying, HAO Jian-Liang, SUN Feng

(College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

**Abstract:** The conversational paper-weighting method in measuring the leaf area departed from the arbor is trivial, time-consuming and precision-inferior. A method for morphological analyses of leaf was developed by obtaining the digital photo of the real leaf depart from the arbor with the scanner and measuring the length, weight, perimeter and area of leaf and the length of leafstalk with Image J software. The measured data from digital photos were compared with the values from paper cut method. The results showed that this method could be used for measuring large number of samples with the advantages of low price, expeditiousness and exactness in plant morphology, plant physiological ecology, forestry and agriculture research.

**Key words:** morphological analyses of leaf; image processing; Image J.

叶片是植物的重要组成部分, 是植物光合作用和蒸腾作用的主要器官, 也是光合作用进行干物质积累的主要器官, 受水分、温度、光照等环境因子的影响显著; 叶片面积作为叶片形态特征中最重要的指标, 也是评价环境因子效应的重要生长指标(肖春旺等, 2002; 肖强等, 2005; 李素艳等, 2006)。遗传变

异体现在不同水平上, 从表型性状上来检测遗传变异是最古老也是最简便易行的方法(Schaal等, 1991)。而植物形态变异主要表现为叶外部形态的变化、叶厚度的变化及叶内部解剖结构的差异等(郭玉华等, 2004)。在自然居群中, 植物的大多数形态性状是多基因决定的数量性状, 往往具有适应和进

收稿日期: 2008-01-18 修回日期: 2008-10-26

基金项目: 国家自然科学基金(30260024); 教育部新世纪优秀人才支持计划; 教育部科学技术研究重点项目(204157); 海南省 515 人才计划项目 [Supported by the National Natural Science Foundation of China(30260024); Excellent Talents Supported Program in New Century of Education Ministry; Key Scientific Technology Project of Education Ministry(204157); Foundation of "515" Talents Project of Hainan Province]

作者简介: 戴志聪(1983-), 男, 福建泉州人, 硕士研究生, 主要从事生物多样性研究及保护, (E-mail) daizhicong@163.com.

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: ddl@hainnu.edu.cn; daolin99@163.com)

化意义(Schwaegerle 等,1986;Schaal 等,1991)。而目前常用来计算叶形指数(叶面积与叶长和叶宽乘积的比值)的叶面积的测量方法主要有:传统的方法,如纸样称重法(侯义龙,1992;王伯荪等,1996);线性代数法,如叶面积指数回归方程法(刘贯山,1996);叶面积仪法(姚瑞玲等,2007);图像处理法(肖强等,2005;黄燕等 2006)。

其中,纸样称重法虽然比较常用,但繁琐且花费时间长;叶面积指数回归方程法相对不精确,并且只能针对某一特定的品种;叶面积仪法,则成本相对太高;目前,随着数码产品(数码相机、扫描仪等)的普及,利用图像处理法来测量叶片形态特征,特别是叶面积,则集成了以上各种方法的优点,成本低、精度高、方便快捷。之前多数的图象处理法,大多用 Photoshop 软件或其他编程软件来处理图片,相对来说还是有点繁琐或需要具备一定的计算机编程基础,并且,不能处理多片叶片。本文在现有的数值图像处理法的基础上,介绍了一种快捷、精确、连续测量多枚离体叶片的形态特征的方法——扫描仪+Image J 软件法,为植物形态学、植物生理生态学、林业及农业等研究提供便捷、廉价而准确的服务。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

从采集的 20 株青皮(*Vatica mangachapoi*)中,每株随机选取 25~30 片完整的、大小各异的青皮叶片,共计 594 片青皮叶片。

### 1.2 设备与工具

1.2.1 扫描仪 一般扫描仪,本次试验用的扫描仪为清华紫光公司的产品,型号为 Uniscan A686。

1.2.2 电脑 以能满足安装扫描仪及 Image J 软件的要求即可,本次试验所用为 Lenovo 旭日 125C 笔记本电脑。

1.2.3 软件 本次试验所用的扫描软件为“文晟扫描 1.0”(下载地址:<http://dlc2.pconline.com.cn/filedown.jsp?dclid=2513&linkid=52133>);图象处理软件为 Image J 1.36b(下载地址:<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>)。

### 1.3 测定方法及步骤

分别采用纸样称重法(王伯荪等,1996)及 Image J 软件测量法。其中,纸样称重法为:使用白纸,剪取一定面积( $S_0$ ),烘干后称质量( $G_0$ ),则可求得

这种纸的单位质量面积  $D=S_0/G_0$ 。然后将已描好叶片轮廓的纸按叶片轮廓小心地剪下来,烘干后称质量( $G$ ),根据叶面积  $S=DG$  可求出叶片的面积。

1.3.1 扫描仪及扫描软件设置 将多片(通常为 2~6 片,以叶片之间不互相重叠为宜)青皮叶片平整置于扫描仪上后,盖上扫描仪盖板,使叶片完全平整地展开;打开“文晟扫描”软件(界面见图 1),设置软件的各个参量:选择图像来源-Uniscan A686(扫描仪),扫描页面(作为参照面积)-A4,分辨率-150 dpi,颜色-彩色,文件名根据实际需要自行修改,定义草稿区——即选择图像扫描后自动保存的位置。之后,按“扫描”键开始扫描。

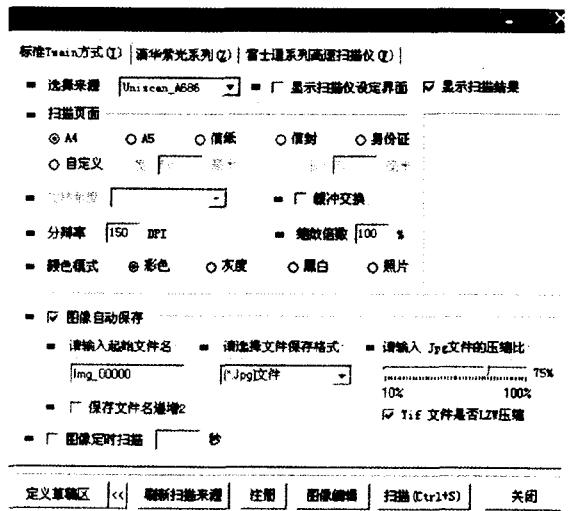


图 1 文晟扫描软件界面  
Fig. 1 The window of Wensheng scanner software

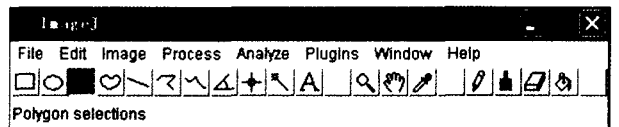


图 2 Image J 软件界面  
Fig. 2 The window of Image J software

1.3.2 用 Image J 测量叶片形态各特征参量 打开 Image J 软件(界面见图 2)。点击“File”-“Open”-选择扫描好的叶片图像。

选“line selections”工具,默认设置,测叶片的长度像素点数(叶柄基部与叶片相交处至叶尖的距离)或宽度像素点数(叶片最宽处与叶轴垂直的距离)(Niinemets 等,2007),单位均为 dot。用“line selections”工具,选取叶柄基部与叶片相交处至叶尖的

距离(图 3),然后选择软件的"Analyze"-“Measure”(图 4),就会出现图 5 的窗口。测多个叶片,可以连续操作,结果自动记录在"Results"窗口里。测完所有的叶片后,点击"Results"窗口的"File"-“Save as”-选择保存位置并重命名,即在该位置产生一个 Excel 文件,可以方便地进行数据处理操作。

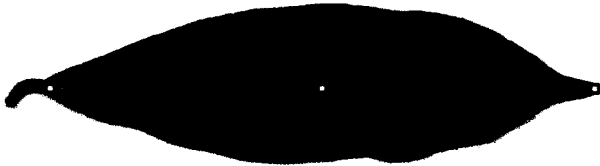


图 3 测叶片的长  
Fig. 3 Measuring the length of leaf

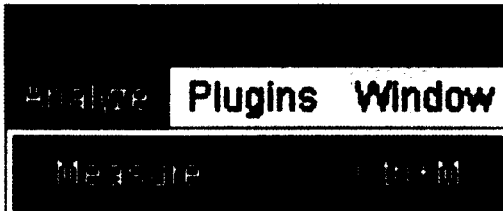


图 4 获取结果  
Fig. 4 Obtaining the results

1	82.417	57.843	210	-1.474	544.180
2	77.843	51.674	118.33	0.821	558.057
3	73.107	49.887	150.06	5.061	544.121

图 5 长度测量结果  
Fig. 5 Results of the length

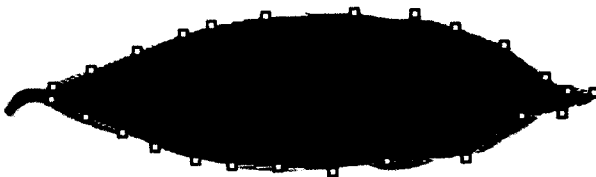


图 6 测叶片的面积、周长  
Fig. 6 Measuring the area and circle of leaf

选“polygon selections”工具,设置参数,“Analyze”-“Set Measurements”-选择“Area”、“Perimeter”及“Feret’s Diameter”,测叶片的面积像素点数、周长像素点数,直径长像素点数,单位均为 dot。用“polygon selections”工具,沿着叶片的边缘(图 6)选取整个叶片的外部轮廓(选取的点越多则越精确),然后选择软件的“Analyze”-“Measure”(图 4),就会出现“Results”窗口。测多个叶片,操作同测量叶片长度的操作一样。

1.4 测量数据换算的算法

根据需要换算分辨率单位, dpi (即 dot per inch)表示每英寸长度内的像素点数,本次试验所用的扫描仪的分辨率设置为 150 dpi,即每英寸长度内有 150 个像素点数(dot),换算一下,则一个像素点(dot)相当于(1/150)inch。又 1 inch=2.54 cm(黄燕等,2006),则 1 个像素点相当于(2.54/150) cm。各个参量的换算公式如下:

实际长度(cm) = 测得的长度像素点数 × (2.54/扫描仪分辨率);实际面积(cm<sup>2</sup>) = 参照面积 × (实际面积像素点数/参照面积像素点数)。本文中的扫描仪分辨率设置为 150 dpi,参照面积取为 A4 大小,因此,实际叶片的长(cm) = 测得的叶片的长度像素点数 × 2.54/150;实际叶片的宽(cm) = 测得的叶片的宽度像素点数 × 2.54/150;实际叶片的周长(cm) = 测得的叶片的周长像素点数 × 2.54/150;实际叶片面积(cm<sup>2</sup>) = 实际测得的点数 × 0.000286738。

以上换算,在 Excel 2003 里建立公式,处理起来非常方便、快捷。

1.5 分析方法

采用方差分析(SAS,2002)对以上不同测量方法所得结果进行了比较分析,其中 2.1 采用 Mixed Model,因为植株是随机选择的而作为随机效应因子,测量方法或测量次数或测量人为固定效应因子,考虑植株和测量方法或测量次数或测量人的交互作用,固定效应检验使用 Type III 测算;检验统计量用 Type I 测算,LSMean 差异比较采用 Tukey 法校正。

2 结果与分析

2.1 数字图像处理方法(扫描仪+Image J)与常规方法(纸样称重法)的比较

选取了来自不同种群的 20 株青皮作为试验对

象,其中每株再随机选择 30 片完整的、大小各异的青皮叶片,共计 594 片(其中有一株青皮的树叶在扫描过程中出现错误,扫描重复了一组,故缺了 6 片)青皮叶片。

当不考虑测量方法与植株来源之间的交互作用时,叶片各特征指标的方差分析结果显示,Image J 和纸样称重法两种方法测量的结果不存在显著差异(表 1),说明了,Image J 软件处理方法适用于叶片形态数量特征的测定。而考虑了测量方法与植株来

源之间的交互作用时,平均值的统计结果显示,各项指标,除了叶长,Image J 法测得的值相对纸样称重法测得的值稍高;但方差分析的结果(表 1)则显示,除了叶宽存在极显著差异外,其他各项指标,用纸样称重法与 Image J 法测量所得的值无显著差异。这主要是在测量有卷曲的叶片的叶宽时,利用 Image J 法,扫描仪能将叶片完全平整地展开,而利用纸样称重法则未能将叶片完全展开。因此,利用 Image J 法比纸样称重法的测量精确度高。

表 1 不同测量方法测量青皮叶型系数、叶片长、叶片宽和叶面积结果之间的方差分析

Table 1 Variance analysis of the two methods in measuring the coefficient of leaf shape,length,width and leaf area of *Vatica mangachapoi*

项目 Item	叶型系数(LS Mean±SE) Coefficient of leaf shape	叶长(LS Mean±SE) Length of leaf	叶宽(LS Mean±SE) Width of leaf	叶面积(LS Mean±SE) Area of leaf
Image J 法平均值 (Measure J)	0.7579±0.02263	11.4141±0.2859	3.9208±0.1024(不考虑交互作用时为 3.9212±0.1049)	34.6591±1.8270
传统方法平均值 (Measure P)	0.7326±0.02263	11.4716±0.2859	3.8469±0.1024(不考虑交互作用时为 3.8466±0.1049)	33.3203±1.8270
Image J 法和传统方法 LS Mean 差异显著性(Adjustment p of Tukey-Kramer)	0.3742	0.1184	<0.0001 ** (不考虑交互作用时为 0.1049)	0.1771

注: \*\* 表示差异极显著。

Note: \*\* shows the difference is extremely significant.

## 2.2 Image J 软件测量法可重复性/稳定性比较

2.2.1 同一个人利用 Image J 软件测量可重复性比较 同一个人不同的时间对同一片叶片的处理(因为所选择的结点的随机性)对图像像素的结果产生一定的影响,为了探讨这种影响的显著性,试验设置了同一个人使用 Image J 软件对扫描的 90 片青皮叶的图片的叶片长、叶片宽、叶柄长、叶片周长及叶片面积分别测量了 5 次,得到 5 组上述形态特征参量的数值。用准确度(LS Mean)±精确度(Standard Error)来考察相同的人在不同次数对相应叶片指标测量得到的值之间的差异性(即同一测量目标重复测量的稳定性,差异性越小,则稳定性越好),方差分析(表 2)表明,测量次数对上述各个参量总体上均不存在显著性影响;进一步检验获得的 5 次形态特征参量的 LS Mean(表 3),也未发现存在显著性差异。这都说明了 Image J 软件测量法稳定性好,可重复性高,不受使用者主观因素的影响;一般测定一次即可。

2.2.2 不同的人利用 Image J 软件测量对结果的影响 同样地,不同的人,在操作过程中,在对图片的处理上也会(因为所选择的结点的随机性)对图像

像素的结果产生一定的影响,因此,试验设置了 2 个人分别在相同软件参数设置条件下,对选定的 90 片叶片扫描图片进行了测量。

表 2 同一个人五次使用 Image J 软件测量各个叶片指标的方差分析(1)

Table 2 Variance analysis (1) of the results getting by one person using the same Image J to measure the leaf indexes for five times

项目 Item	影响因子 Effect	Num DF	DN DF	F Value	Pr > F
叶长 Leaf length	重复次数	4	8	2.62	0.1151
叶宽 Leaf width	重复次数	4	8	0.93	0.4942
叶柄长 Stem length	重复次数	4	8	0.73	0.5956
叶周长 Circle	重复次数	4	8	2.65	0.1124
叶面积 Square	重复次数	4	8	0.76	0.5810

通过比较分析(表 4)发现,不同的人在使用该软件时,只要对相应指标的选取标准一致,所采集到的数据不存在显著差异,也就是说,使用该软件所测得的值不受不同使用者的影响,具有较高的稳定性。

## 2.3 Image J 软件中不同工具/方法对测叶片长的影响

在 Image J 软件中,通过设置不同的参数还可以利用不同的工具(line selections 与 polygon sele-

**表 3 同一个人五次使用 Image J 软件测量各个叶片指标的方差分析(2)**  
Table 3 Variance analysis (2) of the results getting by one person using the same Image J to measure the leaf indexes for five times

重复次数 Repeat time	叶长 (LSMean±SE) Leaf length	叶宽 (LSMean±SE) Leaf width	叶柄长 (LSMean±SE) Stem length	叶片周长 (LSMean±SE) Circle	叶面积 (LSMean±SE) Square	
1	10.7909±0.3291	3.6727±0.3143	1.1003±0.08202	24.0499±0.8309	29.1303±3.5653	
2	10.7934±0.3291	3.6754±0.3143	1.1073±0.08202	24.0427±0.8309	29.1811±3.5653	
3	10.7942±0.3291	3.5339±0.3143	1.2362±0.08202	24.0017±0.8309	29.1908±3.5653	
4	10.8011±0.3291	3.6957±0.3143	1.1007±0.08202	24.0153±0.8309	29.1773±3.5653	
5	10.8045±0.3291	3.6775±0.3143	1.0972±0.08202	24.0332±0.8309	29.1896±3.5653	
不同重复次数 的差异比较	LSMean	Adjustment p of Tukey-Kramer	Adjustment p of Tukey-Kramer	Adjustment p of Tukey-Kramer	Adjustment p of Tukey-Kramer	
1	2	0.9862	1.0000	1.0000	0.9922	0.7254
1	3	0.9620	0.6280	0.6660	0.1227	0.5946
1	4	0.3275	0.9991	1.0000	0.3424	0.7743
1	5	0.1385	1.0000	1.0000	0.8614	0.6110
2	3	0.9998	0.6129	0.7044	0.2150	0.9991
2	4	0.5601	0.9995	1.0000	0.5430	1.0000
2	5	0.2636	1.0000	1.0000	0.9789	0.9995
3	4	0.6475	0.5007	0.6681	0.9261	0.9967
3	5	0.3214	0.6009	0.6493	0.4210	1.0000
4	5	0.9587	0.9997	1.0000	0.8323	0.9977

**表 4 不同人使用 Image J 软件测量各个叶片指标的方差分析**

Table 4 Variance analysis of the results getting by different people using the same Image J to measure the leaf indexes

项目 Item	叶长 (LSMean±SE) Leaf length	叶宽 (LSMean±SE) Leaf width	叶面积 (LSMean±SE) Square
第一个人 First person	10.8237±0.3239	3.7374±0.3231	29.1303±3.5751
第二个人 Second person	10.8448±0.3239	3.7216±0.3231	29.1811±3.5751
两个不同人测定值差异比较 (Adjustment p of Tukey-Kramer)	0.4832	0.3827	0.3752

**表 5 Image J 软件中不同工具测叶片长的方差分析**  
Table 5 Variance analysis of the results getting using different instruments of Image J to measure the length of leaf

项目 Item	叶片长 (LSMean±SE) Leaf length (LSMean±SE)
Fere 测量法 Measure method Fere	702.50±32.5696
Line 测量法 Measure method Line	691.16±32.5696
Fere 测量法 Line 测量法差异性比较 (Adjustment p of Tukey-Kramer)	0.3581

ctions)求叶片长,实践操作中,我们发现,利用后者,在求面积的时候顺便求得叶片长,这样将更加便捷,更加节省时间。为了比较这两个工具所测得的数据之间的差异性,我们利用上述 2 种方法,比较了 259 片青皮叶长的测量结果,发现两种工具所求得

### 3 讨论

与一些传统的方法比较,用“扫描仪+Image J

软件扫描法”具有诸多优点。比如,相对于叶面积仪(即使是国产的价格也在¥15 000~25 000 之间),本文介绍的方法在硬件上只需一台普通扫描仪(本文所用市面价格约¥300)及一台普通计算机(一般实验室都有配备),而软件则可免费下载,因此,此方法具有十分明显的成本优势;在获取的叶片形态特征的数据时,经过我们的实践统计,测量 30 片树叶,即使是在比较熟练的情况下,3 个人直接测量叶片长、宽及叶柄长和纸样称重法测叶片面积平均需要花费 1 h,后期的数据输入计算机约需 0.5 h;而利用本文介绍的方法只需要 1 个人进行操作,扫描 30 片树叶只需要 2.5~3 min,利用本文介绍的方法测量叶片长、宽及叶柄长约花费 10 min,测量面积和周长花 10 min,总共不到 30 min,不仅花费的人力及时间都比传统方法少,获得了更多的数据量(叶片周长)。并且在测量叶片面积时,相对于繁琐的纸样称重法(变异系数为 12.5%)及较为昂贵的叶面积仪法(变异系数为 11.0%),数值图像处理技术法(变异系数为 5.0%)表现出较高的精确度、稳定性

(柏军华等, 2005)。另外, 本文介绍的方法又具有方便快捷的特性, 很适合大量离体叶片(特别是不规则的树叶)的多叶测量; 并且, 相对于当前大多已报道的图象法, 此法除了测量叶面积以外还能同时测量叶片的其他形态特征指标, 特别是叶片的周长。因此对于已采集了大量叶片的植物形态学和生理生态学、林业及农业(特别是精细农业上)在叶片形态特征的相关研究工作, 本文所介绍的方法可以很方便、快捷而较为精确地解决。而且, 对于非破坏性的连续观察叶片的需要(比如对植物的生长规律研究的需要), 也可以通过采用数码相机取代扫描仪的方案加以解决。

### 参考文献:

- 王伯荪, 余世孝. 1996. 植物群落学实验手册[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 37—40
- 中国科学院生物多样性委员会. 1994. 生物多样性研究的原理与方法[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 123—140
- Bai JH(柏军华), Wang KR(王克如), Chu ZD(初振东), *et al.* 2005. Comparative study on the measure methods of the leaf area (叶面积测定方法的比较研究)[J]. *J Shihezi Univ(Nat Sci)*(石河子大学学报·自然科学版), **23**(2): 216—218
- Guo YH(郭玉华), Cai ZQ(蔡志全), Cao KF(曹坤芳), *et al.* 2004. Leaf photosynthetic and anatomic acclimation of four tropical rainforest tree species to different growth light conditions (四种热带雨林树种光合和形态解剖特征对不同生长光强的适应)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **(22)**: 240—244
- Hou YL(侯义龙). 1992. Comparison on different measuring methods of pear leaf area(梨树叶面积测定几种方法比较)[J]. *Northern Hort*(北方园艺), **(4)**: 24—25
- Huang Y(黄燕), Ren GH(任光辉). 2006. Investigation on the measuring method of leaf area based on image processing(基于图像处理的叶面积测定方法的研究)[J]. *J Agric Mechan Res* (农机化研究), **(9)**: 192—193
- Li SY(李素艳), Hu H(胡昊), Sun XY(孙向阳), *et al.* 2006. Paulownia leaf modal traits and their correlation in a whole growth season(生长季节中泡桐叶形态特征及其相关性研究)[J]. *Fore Res*(林业科学研究), **19**(5): 660—664
- Liu GS(刘贯山). 1996. A comparative study on various measuring methode of tobacco(*Nicotiana tabacuma*) Leaf Area(烟草叶面积不同测定方法的比较研究)[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), **24**(2): 139—141
- Niinemets U, Portsmouth A, Tobias M. 2007. Leaf shape and venation pattern alter the support investments within leaf lamina in temperate species; a neglected source of leaf physiological differentiation[J]. *Functional Ecol*, **21**, 28—40
- SAS Institute. 2002. SAS/STAT User's Guide, Version 6. 12. SAS Institute, Cary, North Carolina
- Schaal BA, O Kane SL, Rogstad SH. 1991. DNA variation in plant populations[J]. *Trends Ecol Evol*, **6**: 329—333
- Schwaegerle KE, Garbutt K, Bazzaz FA. 1986. Differentiation among nine populations of Phlox. I. Electrophoretic and quantitative variation[J]. *Evolution*, **40**, 506—517
- Xiao CW(肖春旺), Zhou GS(周广胜), Ma FY(马风云). 2002. Effect of water supply change on morphology and growth of dominant plants in Maowusu Sandland(施水量变化对毛乌素沙地优势植物形态与生长的影响)[J]. *Acta Phytocol Sin*(植物生态学报), **26** (1): 69—76
- Xiao Q(肖强), Ye WJ(叶文景), Zhu Z(朱珠), *et al.* 2005. A simple non-destructive method to measure leaf area using digital camera and Photoshop Software(利用数码相机和 Photoshop 软件非破坏性测定叶面积的简便方法)[J]. *Chin J Ecol*(生态学杂志), **24**(6): 711—714
- Yao RL(姚瑞玲), Fang SZ(方升佐). 2007. The variation comparison of leaf morphological and physiological characteristics among different provenances of *Cyclocarya paliurus* seedlings(不同种源青钱柳幼苗叶片形态、生理特征的差异性比较)[J]. *J Nanjing Fore Univ(Nat Sci)*(南京林业大学学报·自然科学版), **31**(1): 106—110