

# 运用SmartRoot测量橡胶树细根

刘季<sup>1,2</sup> 安锋<sup>2</sup> 袁坤<sup>2</sup> 陈秋波<sup>2</sup> 王真辉<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>海南大学农学院, 海口 570100; <sup>2</sup>中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南儋州 571737

**摘要** SmartRoot是基于开放源ImageJ的免费根系分析软件, 通过软件分析根系照片可得到细根长度、表面积、体积和平均根直径等指标。该文以橡胶树(*Hevea brasiliensis*)细根为例, 探索利用SmartRoot分析细根不同形态特征的可能性。用不同拍照距离与分析方式的对比确定橡胶树细根适合的研究方法, 用WinRhizo软件分析结果验证结果的准确性。结果表明, 不同拍照高度下对应的细根长度、表面积、体积和平均根直径等指标的标准均方根误差(NRMSE)分别为2.87%、15.73%、32.38%和16.88%; 手动分析与半自动分析相同照片细根长度、表面积、体积和平均根直径等指标的NRMSE分别为3.06%、21.00%、40.96%和11.64%; 用WinRhizo软件验证SmartRoot分析细根长度、表面积、体积和平均根直径等指标结果NRMSE分别为5.31%、9.37%、9.61%和5.77%。本研究表明, 在适当方法下, 拍照法结合SmartRoot软件分析测量橡胶树细根细根长度、表面积、体积和平均根直径等指标有较高的准确度, 可用于橡胶树细根指标的分析。

**关键词** 细根, 橡胶树, 图像分析, SmartRoot

## Application of SmartRoot system for determining morphological parameters of fine roots of *Hevea brasiliensis*

LIU Ji<sup>1,2</sup>, AN Feng<sup>2</sup>, YUAN Kun<sup>2</sup>, CHEN Qiu-Bo<sup>2</sup>, and WANG Zhen-Hui<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570100, China; and <sup>2</sup>Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural, Danzhou, Hainan 571737, China

### Abstract

**Aims** Our objective was to examine the possibility of using SmartRoot, free software based on ImageJ, for the measurement of fine root length, surface area, volume and diameter of *Hevea brasiliensis*.

**Methods** Photos were taken at heights of 15 and 40 cm from the fine root samples before the samples were subjected to comparison for accuracy of measurement of fine root length, surface area, volume and diameter of *H. brasiliensis*. The same images were analyzed manually and semi-automatically as well. Then the results obtained from SmartRoot were compared with those from WinRhizo, an expensive, popular, professional software for root analysis.

**Important findings** The average normal root mean square errors (NRMSE) between 15 and 40 cm height for fine root length, surface area, volume and diameter were 2.87%, 15.73%, 32.38% and 16.88%, respectively. In addition, the NRMSE between manual and semi-automatic analysis for the same morphological parameters were 3.06%, 21.00%, 40.96% and 11.64%, respectively. Furthermore the NRMSE between SmartRoot and WinRhizo on fine root length, surface area, volume and diameter were 5.31%, 9.37%, 9.61% and 5.77%, respectively, signifying a high consistency between the two software systems. The results indicated that it is feasible to employ the SmartRoot system for determination of fine-root morphological parameters of *H. brasiliensis* due to its satisfactory accuracy, reliability, easy operation and time-saving advantages. For better accuracy, photos are recommended to be taken at the height of 15 cm and analyzed with the semi-automatic method.

**Key words** fine root, *Hevea brasiliensis*, image analysis, SmartRoot

细根(fine root), 通常被定义为直径 $\leq 2$  mm的根, 其中也包括菌根(Persson, 1978; 张小全等, 2000; 房秋兰和沙丽清, 2005)。细根生物量占根系

总生物量的比例因样本、取样方法以及环境的不同而不同, 有资料表明其比例为3%–30% (Vogt *et al.*, 1996)。由于其有巨大的吸收表面积, 生理活性强,

多数具有菌根侵染, 是树木吸收水分和养分的主要器官, 是根系中最活跃和最敏感的部分(张小全等, 2000; 林希昊等, 2008)。

以往常用直接法测定根长、染色法测根表面积、排水法测根体积(Tennant, 1975; Wang & Zhang, 2009)。近年来, 由于新技术的发展, 图像分析方法较为广泛地应用于根系研究, 并已成为根系形态特征指标数据获取的重要工具, 相对于传统方法, 图像分析方法效率更高, 同时具有一定的精度(Zobel, 2008; Wang & Zhang, 2009; 顾东祥等, 2010; Pang *et al.*, 2011; Tajima & Kato, 2011; Putranto *et al.*, 2012)。但这些软件大多通过加密授权等方式向用户开放, 而且价格昂贵, 其中以加拿大Regent公司的WinRhizo软件应用较为广泛(张小全等, 2000; Wang & Zhang, 2009; Pang *et al.*, 2011)。SmartRoot是一种专门为根系测量而开发的、基于ImageJ软件平台的免费半自动化图像分析软件(Lobet *et al.*, 2011)。而ImageJ软件是由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, USA)开发的一个开放结构图像处理和分析软件, 具备许多图像处理和分析功能, 支持用户自定义插件和宏(白光红等, 2009; 高建昌等, 2011; de Vylder *et al.*, 2012)。运用SmartRoot插件能把复杂的根系生长和根系结构进行简化, 并通过对图片的分辨率(dpi, dot per inch, 指的是每英寸中像素数目, 1英寸= 2.54 cm)进行合理的定量分析, 来实现对细根长度等指标的估算。该软件可以处理TIFF、GIF、JPEG、BMP、DICOM、FITS等图像格式。

研究橡胶树(*Hevea brasiliensis*)细根生长与周转, 对提高橡胶树对水分及养分的利用有重要意义(房秋兰和沙丽清, 2005; 林希昊等, 2008)。采用土钻法观测橡胶树细根生长与周转, 虽然所获得的细根样品数量较大, 但同时样品之间差异也较大, 传统方法难以快速准确地对细根指标进行测量。本文旨在以橡胶树细根为例, 通过对SmartRoot软件测量橡胶树细根指标使用方法和准确性的探讨, 确定该软件用于细根研究的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验样地和材料

试验区主要位于海南省儋州市中国热带农业科学院试验场六队(19°32' N、109°28' E), 橡胶林样

地为第二代胶园, 品种为‘热研7-33-97’, 单一人工群落, 群落结构简单, 采用宽行密植模式, 株行距为3 m × 7 m, 林下以多年生草本植物及当年生草本植物居多, 如弓果黍(*Cyrtococcum patens*)、巢蕨(*Neottopteris nidus*)、叶下珠(*Phyllanthus urinaria*)、假臭草(*Eupatorium catarium*)、地胆草(*Elephantopus scaber*)、竹叶草(*Oplismenus compositus*)等, 极少见灌木、亚灌木。

用土钻法对橡胶树细根进行取样。样品取回后, 小心将土冲洗干净, 挑选出直径≤2 mm的橡胶树根作为测量对象。

### 1.2 不同分析方式和拍摄距离对细根测量结果的影响

SmartRoot软件描绘细根的模式分为两种: 手动模式和半自动模式。手动模式是指手动将一条细根用节点工具描绘出来; 半自动模式是指软件依照用户指定分析对象, 每次将所指定的那一条细根用节点工具自动描绘出来。

为验证不同分析方式和拍摄距离对细根测量结果的影响, 随机选取已清洗出来的细根( $n = 39$ ), 分散放置于水平白色背景之上, 添加标尺(已知长度参照物)后将同一组细根分别在相机高度为15 cm和40 cm处垂直拍摄图片, 所得照片分别用SmartRoot软件半自动模式估算不同拍摄高度照片中细根根长、根表面积、根体积、平均根直径等数据, 用以分析不同拍摄距离对细根测量结果的影响。将在相机高度为15 cm垂直拍摄的照片用SmartRoot软件半自动模式和手动模式估算照片中细根根长、根表面积、根体积、平均根直径等数据, 用以分析不同分析模式对细根测量结果的影响。

### 1.3 基于SmartRoot软件的细根测量准确性验证

在15 cm垂直高度拍摄添加标尺的细根样品照片( $n = 122$ ), 采用半自动分析方式获取相关数据。之后将同批样品用WinRhizo Basic软件扫描后分析。用WinRhizo Basic软件结合扫描仪获取图片时, 选择阈值为默认数值, 图像分辨率为400 dpi。用WinRhizo Basic软件分析后可得到根长、根表面积、根体积、平均根直径等数据。将两种软件的相应指标进行对比, 用以验证SmartRoot软件分析橡胶树细根的可靠性。

### 1.4 数据处理

分别用WinRhizo Basic和SmartRoot软件对橡胶

树细根根长、根表面积、根体积、平均根直径等指标进行测定。所得结果采用SAS 9.0进行回归分析。采用均方根误差(root mean square error, *RMSE*)、标准均方根误差(normal root mean squared error, *NRMSE*)等统计值进行分析和验证。

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (O_i - S_i)^2}{n}} \quad (1)$$

$$NRMSE = RMSE \times \frac{100}{\bar{O}} \quad (2)$$

式中,  $O_i$ 、 $S_i$ 和 $n$ 分别表示 $x$ 轴值、 $y$ 轴值和样本容量,  $\bar{O}$ 为 $x$ 轴指标的平均值。当*NRMSE*值小于10%, 表示两结果之间的一致性非常好; 10%–20%之间为较好, 20%–30%表明两结果一致性一般; 若大于30%则两结果之间偏差较大(顾东祥等, 2010)。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同分析方式与拍摄距离对细根测量结果的影响

由图1可知, 在手动和半自动模式下, 以Smart-Root软件分析拍摄高度为15 cm的橡胶树细根照片

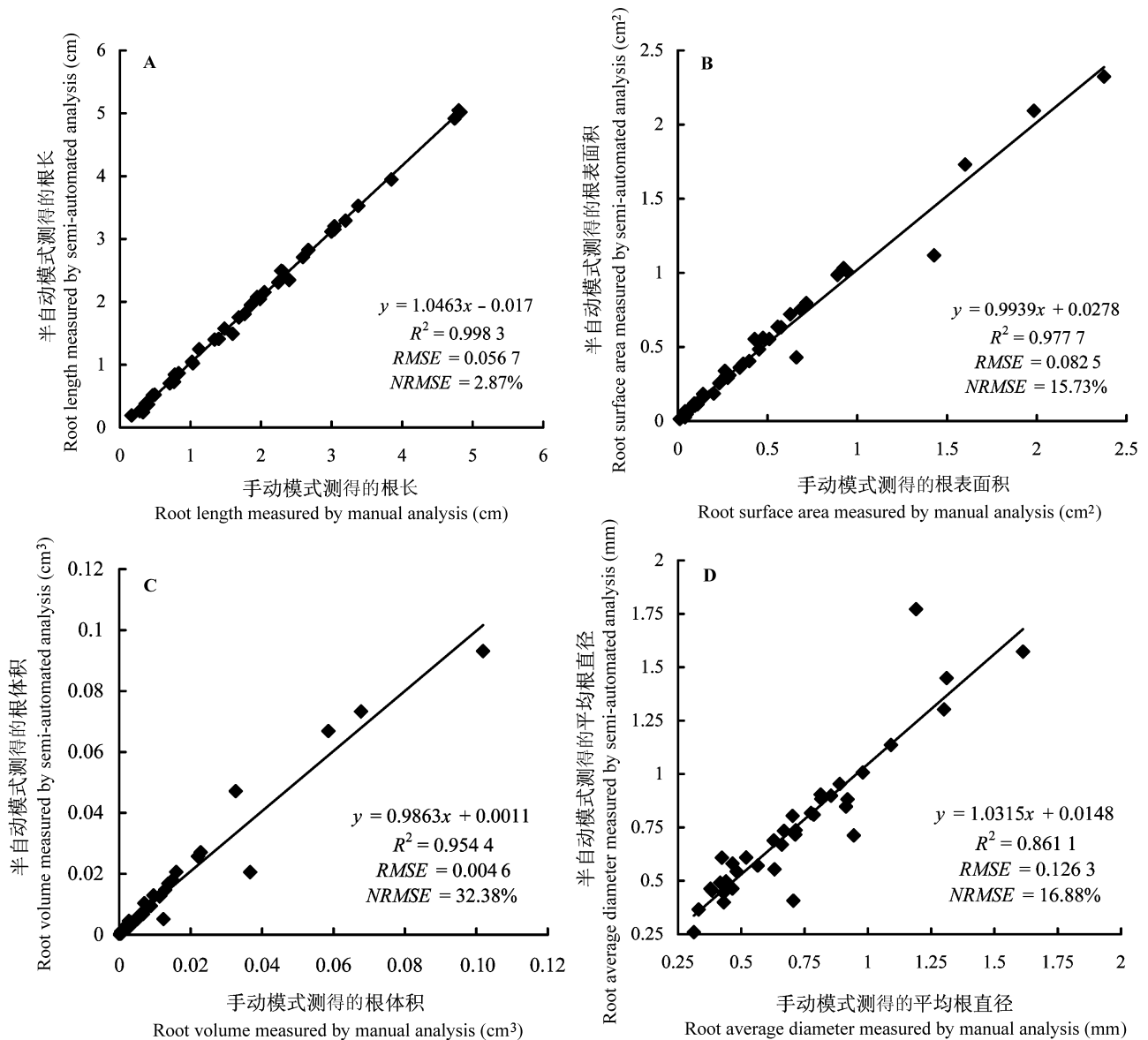


图1 手动与半自动模式测得的细根指标比较。

Fig. 1 Comparison of fine root indices measured by manual and semi-automated analysis.

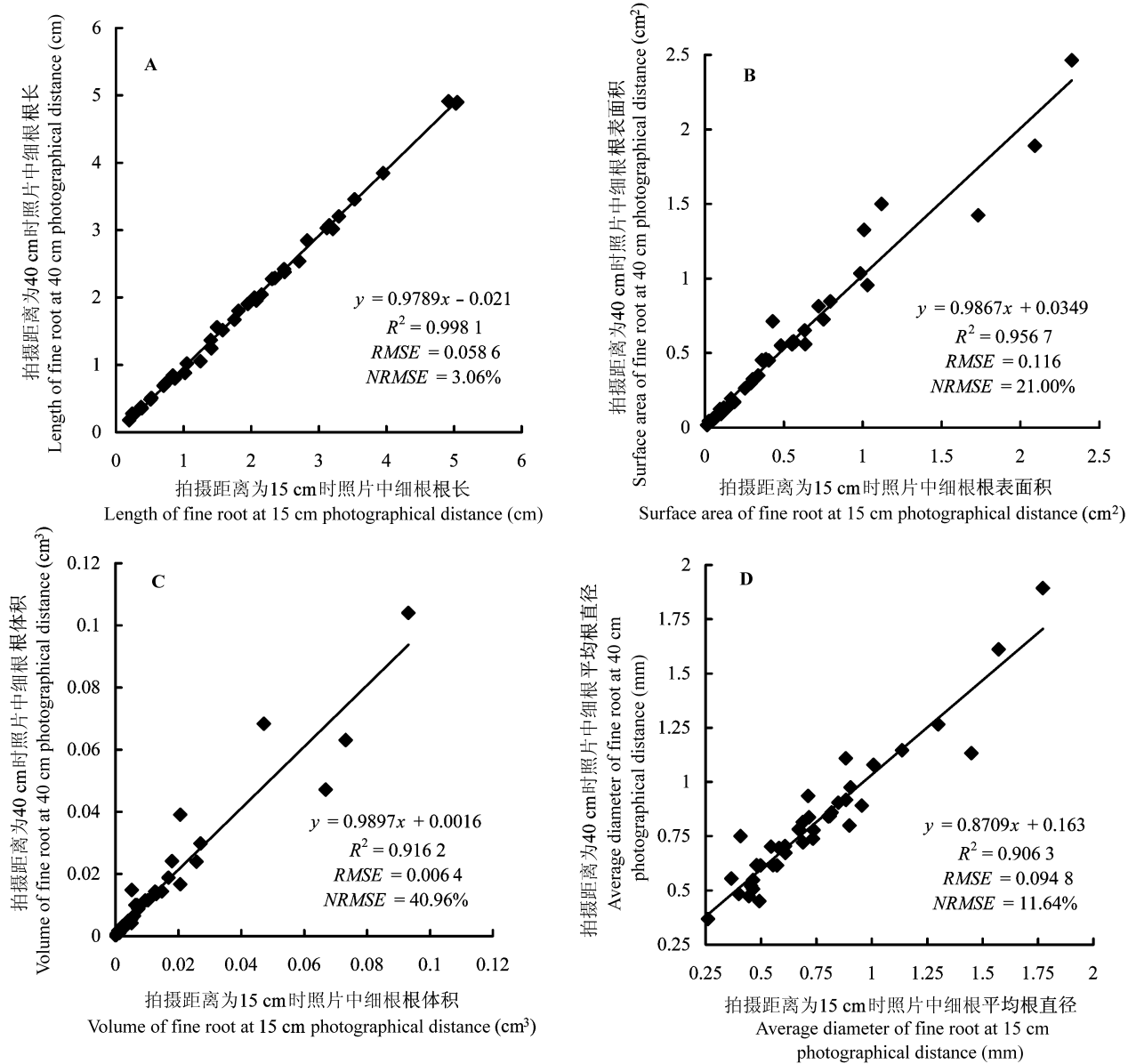


图2 不同距离的图片测得的细根指标比较。  
 Fig. 2 Comparison of fine root indices measured by different distance.

所测量的细根长度结果具有较好的一致性，其 *NRMSE* 为 2.87% (图1A)。测定根表面积与根平均直径一致性有所下降，其 *NRMSE* 分别为 15.73% (图1B) 和 16.88% (图1D)。而测定出的根体积结果误差较大，其 *NRMSE* 为 32.38% (图1C)。由此说明，采用手动与半自动两种分析方式分析相同图片，结果受到较大影响。对于细根长度的测量结果影响较小，而对根表面积、根体积和平均根直径的影响较大，可能是由于在图片上手动描绘相关细根时，在描绘路径及节点的选择上有所误差，合理性相对较差，导致最后估算得到的相关指标差异较大。

由图2可知，在拍摄高度分别为 15 cm 和 40 cm 条件下以 SmartRoot 软件分析测定的橡胶树细根长度结果具有较好的一致性，其 *NRMSE* 为 3.06% (图2A)。测定平均直径一致性有所下降，其 *NRMSE* 为 11.64% (图2D)。而测定出的根表面积和根体积两个结果误差较大，其 *NRMSE* 分别为 21.00% (图2B) 和 40.96% (图2C)。由此说明，采用不同拍摄距离对相同细根进行拍照时，对根表面积、根体积和平均根直径的影响较大，对细根长度的测量结果影响较小。当拍摄距离从 15 cm 增加到 40 cm 时，照片中分辨率由 184 dpi 降低到 109 dpi，图像分辨率的降低会

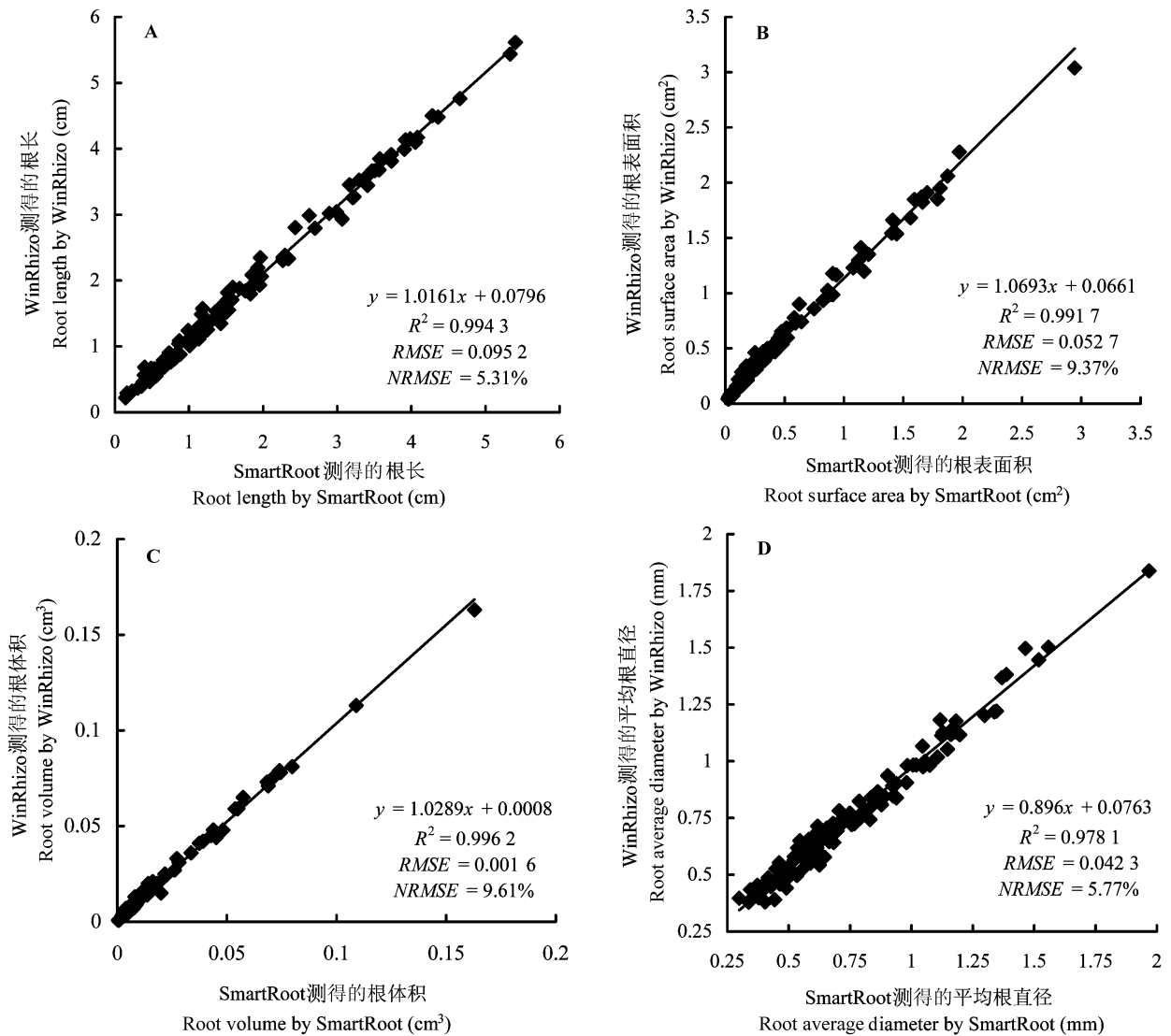


图3 SmartRoot与WinRhizo测得的细根指标比较。  
 Fig. 3 Comparison of fine root indices measured by SmartRoot and WinRhizo.

使细根指标的估算产生偏差。

### 2.2 基于SmartRoot软件下的细根测量准确性验证

用SmartRoot和WinRhizo两种软件对122条细根的分析结果表明(图3), 测量根长、根表面积、根体积和平均根直径的NRMSE分别为5.31%、9.37%、9.61%和5.77%, 其R<sup>2</sup>均大于0.97, 且NRMSE均小于10%。表明SmartRoot在适当的距离, 采用半自动分析模式分析橡胶树细根照片所获得的根长、根表面积、根体积和平均根直径等数据与平板法结合WinRhizo软件所获得的相关差异较小, 数据有较好的精度。

### 3 讨论和结论

对于图像的来源, 平板扫描仪可以获得高质量的照片, 但获得高像素的图片需要较长的时间, 不适合大规模图像采集(Pang *et al.*, 2011)。SmartRoot可用于分析低质量的图像(如相机拍摄的照片), 它可自动将彩色相片转化为灰度图, 便于将细根与背景区分开来, 有利于之后的分析。

ImageJ软件在不使用SmartRoot插件时, 可通过对图像中物体像素的分析估算出物体的长度和投影面积等指标(白光红等, 2009; 高建昌等, 2011),

因而可以用于根系长度的估算, 但未见其应用于估算细根表面积和体积的报道。有研究指出, 在一定的阈值范围内, 直接使用ImageJ对细根长度有一定的高估(Tajima & Kato, 2011)。SmartRoot不仅可用于分析细根的长度与直径, 更可用于对细根表面积和体积等指标的估算(Lobet *et al.*, 2011)。由于在不同高度下所拍摄的图片质量不同, 分析所得指标有较大的差异, 为了保证分析数据的准确性, 所拍摄图像的像素大小不能大于被测量细根直径的15%, 图片的分辨率越高, 所得到数据的准确性越高(Zobel, 2003; Tajima & Kato, 2011)。以直径为1 mm的细根为例, 当拍摄高度为15 cm时, 照片分辨率为184 dpi, 每个像素的大小约为0.138 mm, 小于0.15 mm (1 mm细根直径的15%); 当拍摄高度为40 cm时, 照片分辨率为109 dpi, 每个像素的大小约为0.233 mm, 大于0.15 mm, 用该图片估算出的细根指标必然受到影响。所以在尽可能包括标尺和全部样品的情况下近距离拍摄细根, 以提高图像的分辨率; 此外细根拍摄时还应注意光线因素, 尽量避免阴影的干扰(Zobel, 2003)。

SmartRoot分析橡胶树细根, 是基于软件中测量工具对细根的描绘这一最基础的功能之上, 细根描绘的准确度决定细根测量的精度。细根描绘是用一定数量的节点将细根串联起来, 在细根弯曲处增加节点的数量, 可以提高软件对细根长度估算的准确性, 而曲率较小的部分可以用较少的节点连接。在手动模式下, 由于描绘细根所用节点数量及分布存在较大差异, 导致细根指标估算出现较大的偏差; 半自动模式可以实现对细根节点描绘的自适应, 即用适当的节点数量与节点分布描绘细根形状, 从而更加准确地估算细根指标(Lobet *et al.*, 2011)。

根据研究目的及研究对象的不同, 每种对细根指标测量的方法都有自己的优缺点。本文以橡胶树细根为例, 采用拍照法结合SmartRoot软件测量橡胶树细根根长、表面积、体积及平均直径等指标, 成本较低、方便快捷, 而且与专业软件的结果基本一致, 具有一定的精度和可靠性, 可用于细根指标的测定分析。

**基金项目** 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-34-02A)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(1630022013003)。

## 参考文献

- Bai GH, Zhang YR, Liu YJ, Xing HY, Yan JB, Peng HR, Zhang JX, Li JS (2009). Application of ImageJ analysis software in measuring kernel size of maize seeds. *Journal of Maize Sciences*, 17(1), 147–151. (in Chinese with English abstract) [白光红, 张义荣, 刘弋菊, 邢鸿雁, 严建兵, 彭惠茹, 章建新, 李建生 (2009). ImageJ图象处理软件在测量玉米籽粒大小中的应用. *玉米科学*, 17(1), 147–151.]
- de Vylder J, Vandenbussche F, Hu YM, Philips W, van der Straeten D (2012). Rosette tracker: an open source image analysis tool for automatic quantification of genotype effects. *Plant Physiology*, 160, 49–1159.
- Fang QL, Sha LQ (2005). Study of fine roots biomass and turnover in the rubber plantation of Xishuangbanna. *Journal of Central South Forestry University*, 25(5), 40–44. (in Chinese with English abstract) [房秋兰, 沙丽清 (2005). 西双版纳橡胶林细根生物量及其周转. *中南林学院学报*, 25(5), 40–44.]
- Gao JC, Guo GJ, Guo YM, Wang XX, Du YC (2011). Measuring plant leaf area by scanner and ImageJ software. *China Vegetables*, (1), 73–77. (in Chinese with English abstract) [高建昌, 郭广君, 国艳梅, 王孝宣, 杜永臣 (2011). 平台扫描仪结合ImageJ软件测定番茄叶面积. *中国蔬菜*, (1), 73–77.]
- Gu DX, Tang L, Cao WX, Zhu Y (2010). Quantitative analysis on root morphological characteristics based on image analysis method in rice. *Acta Agronomica Sinica*, 36, 810–817. (in Chinese with English abstract) [顾东祥, 汤亮, 曹卫星, 朱艳 (2010). 基于图像分析方法的水稻根系形态特征指标的定量分析. *作物学报*, 36, 810–817.]
- Lin XH, Wang ZH, Chen QB (2008). Research advances in fine roots of *Hevea brasiliensis*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 29, 390–395. (in Chinese with English abstract) [林希昊, 王真辉, 陈秋波 (2008). 橡胶树细根的研究进展. *热带作物学报*, 29, 390–395.]
- Lobet G, Pagès L, Draye X (2011). A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant Physiology*, 157, 29–39.
- Pang W, Crow WT, Luc JE, McSorley R, Giblin-Davis RM, Kenworthy KE, Kruse JK (2011). Comparison of water displacement and WinRhizo software for plant root parameter assessment. *Plant Disease*, 95, 1308–1310.
- Persson H (1978). Root dynamics in a young Scots pine stand in central Sweden. *Oikos*, 30, 508–519.
- Putranto RA, Sanier C, Leclercq J, Duan CF, Rio M, Jourdan C, Thaler P, Sabau X, Argout X, Montoro P (2012). Differential gene expression in different types of *Hevea brasiliensis* roots. *Plant Science*, 183, 149–158.
- Tajima R, Kato Y (2011). Comparison of threshold algorithms for automatic image processing of rice roots using

- freeware ImageJ. *Field Crops Research*, 121, 460–463.
- Tennant D (1975). A test of a modified line intersect method of estimating root length. *Journal of Ecology*, 63, 995–1001.
- Vogt KA, Vogt DJ, Palmiotto PA, Boon P, O'Hara J, Asbjornsen H (1996). Review of root dynamics in forest ecosystems grouped by climate, climatic forest type and species. *Plant and Soil*, 187, 159–219.
- Wang MB, Zhang Q (2009). Issues in using the WinRhizo system to determine physical characteristics of plant fine roots. *Acta Ecologica Sinica*, 29, 136–138.
- Zhang XQ, Wu KH, Murach D (2000). A review of methods for fine-root production and turnover of trees. *Acta Ecologica Sinica*, 20, 875–883. (in Chinese with English abstract) [张小全, 吴可红, Murach D (2000). 树木细根生产与周转研究方法评述. *生态学报*, 20, 875–883.]
- Zobel RW (2003). Sensitivity analysis of computer-based diameter measurement from digital images. *Crop Science*, 43, 583–591.
- Zobel RW (2008). Hardware and software efficacy in assessment of fine root diameter distributions. *Computers and Electronics in Agriculture*, 60, 178–189.

特邀编委: 赵长明 责任编辑: 李 敏

---

## 作者更正

发表在2013年(37卷)第6期583–588的文章“如何写好数据分析和几个相关的统计问题”中, 586页3.4节第一段倒数第二句: “由于组间方差与组内方差之和是数据(即样本)的总方差, 组间方差的自由度固定, 而组内方差的自由度随实验的重复多寡而变。”其中的组间方差、组内方差和总方差应为组间平方和、组内平方和与总平方和。特此更正。