

MAKRO EWVA - UČINKOVITO ORODJE ZA ANALIZO PREVODNIH ELEMENTOV RANEGA LESA VENČASTOPOROZNIH LISTAVCEV MACRO EWVA - AN EFFECTIVE TOOL FOR ANALYSIS OF EARLYWOOD CONDUITS OF RING POROUS SPECIES

Jernej JEVŠENAK¹, Tom LEVANIČ²

(1) Dobrava 13a, SI – 3214 Zreče, jernej.jevsenak@gmail.com

(2) Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, tom.levanic@gozdis.si

IZVLEČEK

V članku je predstavljena uporabnost programa ImageJ v lesni anatomiji. Njegova glavna prednost sta prosta dostopnost ter možnost vključevanja dodatnih vtičnikov in makrov. Program ImageJ smo uporabili kot platformo za razvoj makra EWVA za avtomatizirano prepoznavanje ranega lesa ter hitro in učinkovito analizo trahej venčastoporoznih listavcev. Uporabnost makra EWVA predstavljamo na primeru dveh dobov iz sestoja v Mlačah. V zaključku razpravljamo o prednostih in slabostih uporabljenih metode.

Ključne besede: lesna-anatomija, *Quercus robur*, traheje ranega lesa, prevodni elementi, ImageJ, makro, EWVA, Slovenija

ABSTRACT

In this paper, program ImageJ and its application in tree-ring anatomy is presented. The main advantage of the program is its availability and possibility to add additional tools and macros. Platform of ImageJ programme was used to develop macro EWVA for automatized recognition of earlywood and effective analysis of vessels of ring porous species. Use of EWVA macro is presented in a case study of two pedunculate oaks from the Mlače stand. Advantages and disadvantages of the presented method are discussed.

Key words: tree-ring anatomy, *Quercus robur*, earlywood vessels, conductive elements, ImageJ, macro, EWVA, Slovenia

GDK 811+812:176.1(045)=111
Prispelo / Received: 05. 12. 2014
Sprejeto / Accepted: 15. 12. 2014

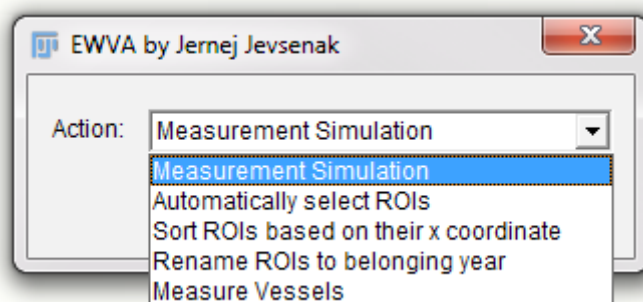
1 UVOD

1 INTRODUCTION

Drevo se v času svoje rasti odziva na okolje in informacije odziva so shranjene v lastnostih elementov branine. Širina branine je največkrat uporabljeni parameter v dendrokronoloških raziskavah (Schweingruber, 1988). Poleg širine branine se pogosto uporabljajo tudi širina ranega in kasnega lesa (García-González in sod., 2003), gostota lesa (Schweingruber, 1988) ter stabilni izotopi ogljika, kisika in vodika (Schleser in sod. 1999). S hitrim tehnološkim razvojem na digitalnem področju v zadnjih nekaj desetletjih so se razširile tudi možnosti za analize lesno-anatomskih parametrov branine; le-te se navadno osredotočajo na anatomske značilnosti, kot so npr. velikost in gostota prevodnih elementov, debelina celične stene, delež prevodnega tkiva ipd. (Fonti in sod., 2010). Obstaja širok nabor potencialnih ciljnih spremenljivk (Sholz in sod., 2013), najpogostejše analiziran lesno-anatomski parameter pa so še vedno

prevodni elementi venčastoporoznih listavcev. Kljub vsemu zahtevajo meritve trahej ranega lesa in sestava kronologij lesno-anatomskih parametrov precej časa in natančnosti. Poleg časovne porabe ovira razvoj tudi draga programska oprema za analizo slik.

Med pogosto uporabljenimi programi za analizo lesno-anatomskih elementov so ROXAS (von Arx in Dietz, 2005; von Arx in Carrer, 2014), WinCell (Regent Instruments, Kanada), AnalySIS (Soft Imaging Systems, Nemčija), Image-Pro plus (MediaCybernetics, Silverspring, MA, ZDA) in Visilog® image analysis system (NOESIS, Les Ulis, Francija). Omenjeni programi so visoko specializirani in ponujajo širok nabor možnosti ter funkcij analize lesno-anatomskih elementov. Tudi Adobe Photoshop in Adobe Photoshop Elements (oba Adobe Systems, San Jose, ZDA) ponujata možnosti merjenja različnih objektov, vendar to ni njuna primarna naloga. Vsi naštetni programi so plačljivi in razmeroma dragi, ali pa zahtevajo plačljivo platformo (npr. ROXAS).



Slika 1: Uporabniški vmesnik makra EWVA ponudi možnost izbire med petimi moduli

Fig. 1: Macro EWVA user interface offers a choice of five different modules

Na drugi strani obstaja alternativa za analizo slike – program ImageJ in njegova izpeljanka FIJI. ImageJ so razvili Nacionalni inštituti za zdravje (*ang: National Institutes of Health*) iz Marylanda (ZDA) in je prosto dostopen na spletu (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>), tako da omogoča samostojno razvijanje in vključevanje Java-vtičnikov in makrov. Prosta dostopnost in možnost dodajanja lastnih vtičnikov (*ang: plug-ins*) je naredila program ImageJ izjemno zanimiv za številne raziskovalce, saj lahko sami razvijejo funkcionalnost, ki jih v osnovnem programu ni.

Makro EWVA (EarlyWood Vessels Analysis) je napisan v makro jeziku programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/developer/macro/macros.html>) in omogoča avtomatizirano analizo trahej po predhodni samodejni identifikaciji posameznih branik. Makro je nastal zaradi potrebe po analizi velikega števila branik dobov v kratkem času.

Uporabnost makra EWVA prikazujemo na primeru analize prečnih prereзов dveh različno vitalnih dobov (*Quercus robur* L.), ki smo jih vzorčili leta 2012 na rastišču *Querco-Carpinetum luzuletosum* v Mlačah blizu Slovenskih Konjic za potrebe magistrske naloge (Jevšenak, 2014).

2 METODE

2 METHODS

Za preučevanje lesno-anatomskih značilnosti branik je ključna kvalitetna priprava površine vzorca (izvrtka ali koluta). Zagotovimo jo z brušenjem ali odrezovanjem. Brušenje se začne z grobim brusnim papirjem (granulacije 180) in konča s zelo finim (granulacije 800 in več). Ponekod pa pripravljajo površino vzorcev z odrezovanjem s posebnim diamantnim rezilom, kjer je vzorec vpet na posebno težko mizo z blažilniki (Spiecker in sod., 2000), ali pa z mikrotomom za dolge vzorce (Gärtner in sod., 2010). Ne glede na način priprave površine vzorca sledi zapolnjevanje prevodnih elementov s kontrastnim sredstvom, ki poudari traheje in jih tako barvno loči od drugih lesnih elementov. Kot

kontrastno polnilo se največkrat uporabljajo kreda, vossek, magnezij ali titanov oksid. Faza polnjenja trahej s polnilom je kritična, kajti v tej fazi pogosto nastanejo težave, ki vplivajo na kvaliteto zajema slike. Traheje je treba namreč v celoti zapolniti z medijem, prav tako pa moramo ves preostali material skrbno odstraniti s površine, da kasneje ne bomo imeli težav pri analizi slike.

Pred pričetkom dela s programom ImageJ je treba zajeti slike v veliki ločljivosti, da bodo kasneje uporabne za analizo. Različni programi za zajem slik so navedno priloženi tehnični opremi (mikroskop, digitalne kamere, skenerji ipd.). Vsako sliko lahko analiziramo posebej, ali pa jih združimo v eno večjo, kar pospeši analizo. Spajanje slik (*an. stitching*) smo opravili v programu ImageJ z vtičnikom *Stitching* (Preibisch in sod., 2009).

2.1 Funkcionalnost makra *Earlywood vessel analysis* – EWVA

2.1 Features of macro *Earlywood vessel analysis* – EWVA

Makro EWVA omogoča avtomatizirano analizo trahej po predhodni samodejni identifikaciji posameznih branik. Makro ter podrobna navodila za uporabo v angleškem in slovenskem jeziku so dostopna na spletni strani JDendro (<http://www.jdendro.com>).

Po zagonu makra uporabniški vmesnik uporabniku ponudi možnost izbire med petimi moduli – slika 1. Modul *Measurement Simulation* simulira celotno analizo; uporabnik preveri, ali so traheje pravilno prepoznane in če so potrebne dodatne izboljšave slike. Modul *Automatically select ROIs*¹ na podlagi izbranih parametrov prepozna branike ranega lesa, ki jih z modulom *Sort ROIs based on their x coordinate* ustrezno razvrstimo; kasneje jim pripišemo še ustrezno leto z modulom *Rename ROIs to belonging year*. Z izbiro modula *Measure Vessels* opravimo meritve trahej in analiza je zaključena.

1 ROI (*angl. Region of interest*) ponazarja območje analize – v našem primeru vse traheje ranega lesa enega leta.

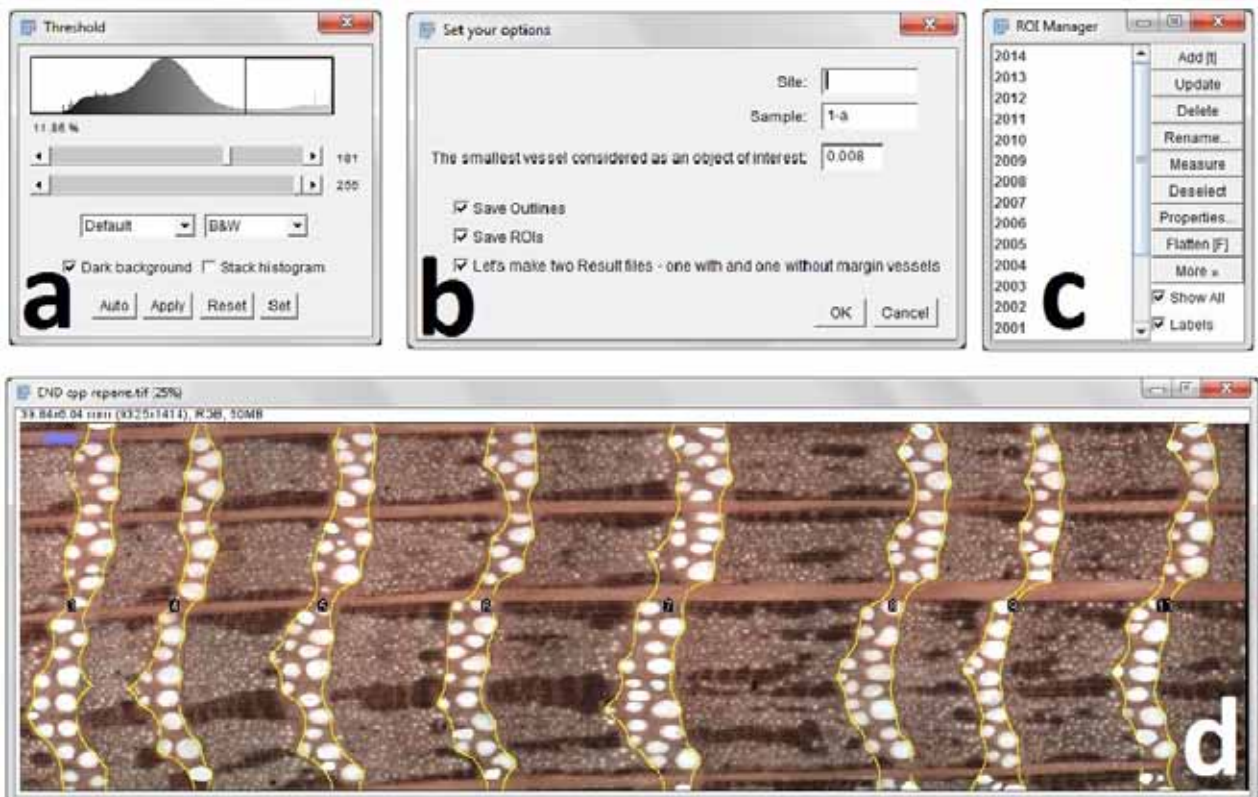


Slika 2: Spojene slike omogočajo hitrejšo analizo (a). Z uporabo binarizacije slike uvrstimo sivine v bele in črne kategorije in dobimo binarno sliko z belimi prevodnimi elementi na črnem ozadju (b).

Fig. 2: Stitched images enable us a faster analysis (a). Using threshold function, binary image is given, where white conductive elements are exposed on a black background (b).

V prvem koraku odpremo sliko in jo umerimo za merjenje dolžin. Potrebujemo predmet znane velikosti, ki ga posnamemo pod isto povečavo kot analizirano sliko, ali pa uporabimo merilno skalo, ki jo v sliko zapišejo nekateri programi. Za kalibracijo uporabimo funkcijo *Set Scale* v zavihku *Analyze*. Nato določimo območja analize ali ROI, ki predstavljajo vse traheje ranega lesa posameznega leta. ROI lahko izberemo ročno, tako da z orodjem za označevanje izberemo vse traheje enega leta ter pritisnemo tipko »t«. Ker je ta postopek zamuden, smo v makro vgradili možnost avtomatske prepoznave posameznih ROI. Za to smo uporabili funkcijo *Automatically select ROIs*, ki temelji na ustrezni nastavitvi ločitvenih parametrov za binarizacijo slike

(angl. *thresholding*) – sliki 2 in 3a. Binarizacija slike je metoda uvrščanja sivih odtenkov slike v belo ali črno kategorijo. Postopek opravimo tako, da s pomikanjem drsnih gumbov izberemo najbolj optimalno razmerje med belimi in črnimi kategorijami (slika 3a). Rezultat je binarna slika, ki vsebuje le črne in bele slikovne elemente. Tako ločimo traheje, zapolnjene z belim medijem od temnejšega ozadja; pokaže se, ali je bila površina vzorca ustrezno pripravljena in ali so traheje do popolnosti zapolnjene s kontrastnim sredstvom. Če smo površino slabo pripravili, so prepoznane površine trahej bodisi premajhne, ali pa so traheje med seboj spojene, kar onemogoča kvalitetno in korektno analizo. V tem primeru površino ponovno pripravimo



Slika 3: Vmesnik za binarizacijo slike (a), vmesnik za nastavitve meritev trahej (b), ROI Manager (c) in avtomatično prepoznane branike z označenim in oštevilčenim ranim lesom (d)

Fig. 3: User interface for thresholding (a), user interface to set options for *Measure Vessels* (b), ROI Manager (c) and automatically recognized rings with marked and numbered earlywood (d)

in zajamemo nove slike, nekatere rešitve pa so opisane v zaključku tega prispevka.

Ko imamo definirane vse ROI, jih moramo v *ROI Managerju* (slika 3c) razvrstiti po vrstnem redu glede na položaj na sliki od leve proti desni. Zato ponuja makro možnost *Sort ROIs based on their X coordinate*. S funkcijo *Rename ROIs to their belonging year* preimenujemo posamezen ROI glede na pripadajoče leto. Poznati moramo le leto najmlajše branike – tiste, ki leži tik pod skorjo. Nato izberemo funkcijo *Measure Vessels*, ki je zadnji korak v naši analizi. Makro nas povpraša še po lokaciji oz. rastišču, zaporedni številki vzorca, morebitni mejni velikosti traheje, ki naj jo program še upošteva, izberemo tudi med različnimi možnostmi shranjevanja rezultatov; izbiro potrdimo in sledi analiza (slika 3b).

Program ponuja možnost ločene obravnave robnih trahej, ki imajo zaradi svojega položaja na sliki premajhno površino. Rezultati so shranjeni v tekstovni datoteki v direktoriju, kjer je prikazana izvorna slika izvrtka. Za nadaljnjo analizo je treba podatke odpreti v ustreznem statističnem programu (npr. programu R), ki ima možnost odpiranja in združevanja več tekstovnih (ASCII) datotek.

Izmerjene spremenljivke smo primerjali s povprečnimi mesečnimi temperaturami, ki smo jih dobili iz evidenc javno dostopnih podatkov Agencije RS za okolje (Arhiv, 2014).

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Primer izhodne tabele z rezultati, pridobljenimi z makrom EWVA

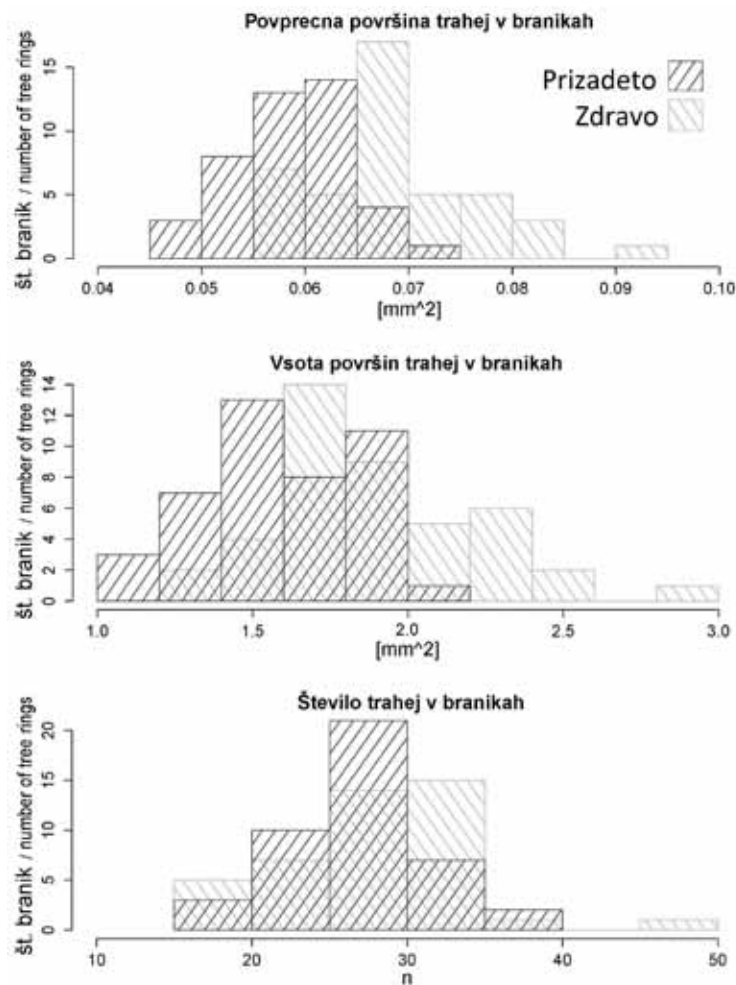
3.1 Example of the output table with results from macro EWVA

Predstavljeni makro omogoča izmero širokega nabora spremenljivk, ki jih uporabimo v lesno-anatomskih analizah slik in izvrtkov. V našem primeru smo se osredotočili na površino posamezne traheje, nato pa smo razvili zaporedja s *povprečno površino trahej* (*PovpP_T*), s *skupno površino trahej* (*VsotaP_T*) in s *številom trahej na braniko* (*Stev_T*). Program med drugim omogoča merjenje tudi koordinat x in y objektov, obsega in premera trahej (slika 4). Z uporabo koordinat lahko določimo vence prve in druge vrste ter jih ločeno analiziramo.

	Area	X	Y	Perim.	Feret
1	0.0506	37.2827	0.2553	0.8819	0.3223
2	0.0704	37.2655	0.5242	1.0398	0.3796
3	0.0150	36.9313	0.5284	0.4553	0.1490
4	0.0252	37.1775	0.8049	0.6062	0.2213
5	0.0859	37.2538	1.0780	1.1584	0.4130
6	0.0275	36.8933	1.2721	0.6164	0.2003
7	0.0629	37.1884	1.3651	0.9554	0.3264
8	0.0490	36.9980	1.7274	0.8452	0.2936
9	0.0224	36.7262	1.7282	0.5599	0.1855
10	0.0871	37.1609	2.0129	1.1551	0.4032
11	0.0261	36.7421	2.0538	0.6097	0.2067
12	0.0529	36.9859	2.2684	0.9011	0.3330
13	0.0321	36.7047	2.4240	0.6762	0.2282
14	0.0769	37.1008	2.5063	1.0736	0.3646
15	0.0488	36.8600	2.6616	0.8588	0.3151
16	0.0238	36.2262	3.0754	0.5901	0.2121
17	0.0362	36.1369	3.2764	0.7275	0.2582
18	0.0506	36.4738	3.2986	0.8527	0.2951
19	0.0400	36.0135	3.5827	0.7623	0.2714
20	0.0898	36.3455	3.6912	1.1607	0.4097
21	0.0913	36.2657	4.0219	1.1988	0.4230
22	0.0511	36.1188	4.2456	0.8719	0.3239
23	0.0658	36.2593	4.4860	1.0082	0.3617
24	0.0814	36.4112	4.8827	1.1017	0.3864
25	0.0380	36.4087	5.3125	0.7306	0.2542
26	0.0414	36.5939	5.7675	0.8085	0.2811

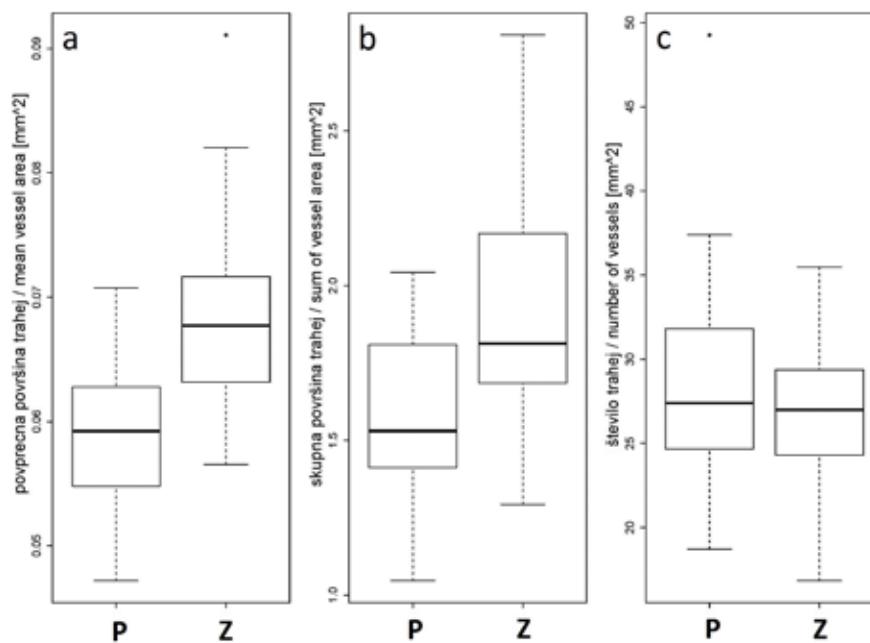
Slika 4: Izhodna datoteka, iz katere je razvidno število izmerjenih trahej, njihova površina (*Area*), koordinati x in y, obseg (*Perimeter*) in premer (*Feret*) za naključno izbrano braniko

Fig. 4: Output table showing number of measured vessels, their area, coordinates, perimeter and diameter (*Feret*) for a random tree ring



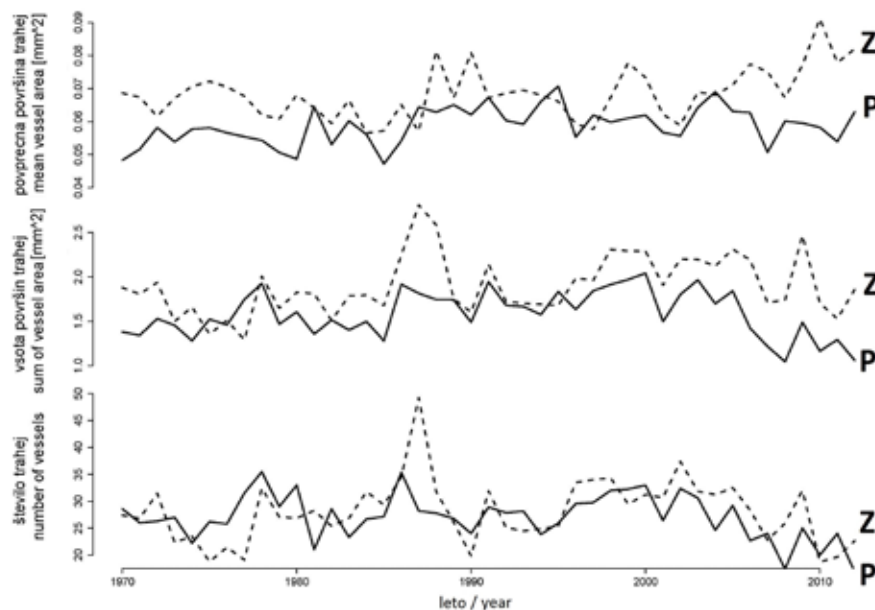
Slika 5: Primer frekvenčnih porazdelitev analiziranih parametrov za zdravo (Z) in prizadeto (P) drevo

Fig. 5: Frequency analysis of analyzed parameters for vital (Z) and declining (P) trees



Slika 6: Primer prikaza podatkov za zdravo (Z) in prizadeto (P) drevo z uporabo grafa okvir z ročaji (angl. *box and whiskers plot*).

Fig. 6: Box and whiskers plot illustration of data for vital (Z) and declining (P) trees



Slika 7: Primer kronologij analiziranih parametrov za zdravo (Z) in prizadeto (P) drevo

Fig. 7: Example of chronologies for analyzed parameters for vital (Z) and declining (P) trees

3.2 Grafična predstavitev spremenljivk

3.2 Graphical illustration of measured variables

Vsi grafični prikazi meritev rabijo izključno za demonstracijo možnosti analize z makrom EWVA. Skupaj smo izmerili 1164 trahej zdravega in 1208 trahej prizadetega drevesa. Časovni okvir meritev sega od leta 1970 do 2012. S kvantilnim prikazom podatkov in uporabo *okvirja z ročaji* smo pokazali srednje vrednosti parametrov *PovpP_T*, *VsotaP_T* in *Stev_T* za zdravo (Z) in prizadeto (P) drevo (slika 6). Skupno *število trahej* med obema drevesoma se bistveno ne razlikuje (slika 6c).

S frekvenčno analizo demonstriramo možnost prikazovanja frekvenčnih razredov izmerjenih trahej po posameznih skupinah (slika 5). Razrede lahko poljubno oblikujemo glede na cilje raziskave. Na sliki 7 prikazujemo kronologije parametrov *PovpP_T*, *VsotaP_T* in *Stev_T* za zdravo (Z) in prizadeto (P) drevo.

Preglednica 1: Korelacijski koeficienti med spremenljivkami *PovpP_T*, *VsotaP_T* in *Stev_T* za zdravo (Z) in prizadeto (P) drevo. Statistična značilnost razlik: * ... $p \leq 0,05$; ** ... $p \leq 0,001$.

	<i>PovpP_T</i> (P)	<i>PovpP_T</i> (Z)	<i>VsotaP_T</i> (P)	<i>VsotaP_T</i> (Z)	<i>Stev_T</i> (P)	<i>Stev_T</i> (Z)
<i>PovpP_T</i> (P)	-					
<i>PovpP_T</i> (Z)	0,20	-				
<i>VsotaP_T</i> (P)	0,36*	-0,26	-			
<i>VsotaP_T</i> (Z)	0,34*	0,00	0,51**	-		
<i>Stev_T</i> (P)	-0,25	-0,40*	0,82**	0,31*	-	
<i>Stev_T</i> (Z)	0,18	-0,52**	0,54**	0,84**	0,45*	-

3.3 Korelacijska analiza spremenljivk

3.3 Correlation analysis of measured variables

Odnos med neodvisnimi spremenljivkami je pomemben pri sestavi linearnih modelov. V model lahko vključimo le tiste neodvisne spremenljivke, ki med sabo ne korelirajo, kar smo preverili s Pearsonovim korelacijskim koeficientom. Vse tri izmerjene spremenljivke so med sabo povezane (preglednica 1). Slednje je razumljivo, saj so spremenljivke med sabo tudi matematično povezane; *povprečna površina trahej* je kvocient med *vsoto površin trahej* in *število trahej*.

3.4 Korelacije med povprečnimi mesečnimi temperaturami in izmerjenimi spremenljivkami

3.4 Correlations between mean monthly temperatures and measured variables

Večina dendroklimatoloških raziskav išče odvisnosti med različnimi parametri branike ter klimatskimi

Table 1: Correlation coefficients for variables *PovpP_T*, *VsotaP_T* and *Stev_T* for vital (Z) and declining (P) trees. Statistical significance of differences: * ... $p \leq 0.05$; ** ... $p \leq 0.001$.

Preglednica 1: Korelacijska matrika med povprečnimi mesečnimi temperaturami in parametri *PovpP_T*, *VsotaP_T* and *Stev_T* zdravo (Z) in prizadeto (P) drevo. Statistična značilnost razlik: * ... $p \leq 0,05$; ** ... $p \leq 0,001$.

	mar	apr	maj	jun	jul	avg
<i>PovpP_T</i> (P)	0,26	0,25	0,05	0,12	0,46**	0,18
<i>PovpP_T</i> (Z)	0,26	0,46**	0,28	0,25	0,42**	0,29
<i>VsotaP_T</i> (P)	-0,01	-0,11	-0,02	0,00	-0,16	-0,01
<i>VsotaP_T</i> (Z)	-0,17	0,28	0,10	0,22	0,23	0,16
<i>Stev_T</i> (P)	-0,16	-0,29	-0,07	-0,09	-0,47**	-0,14
<i>Stev_T</i> (Z)	-0,30*	0,00	-0,08	0,06	-0,02	-0,03

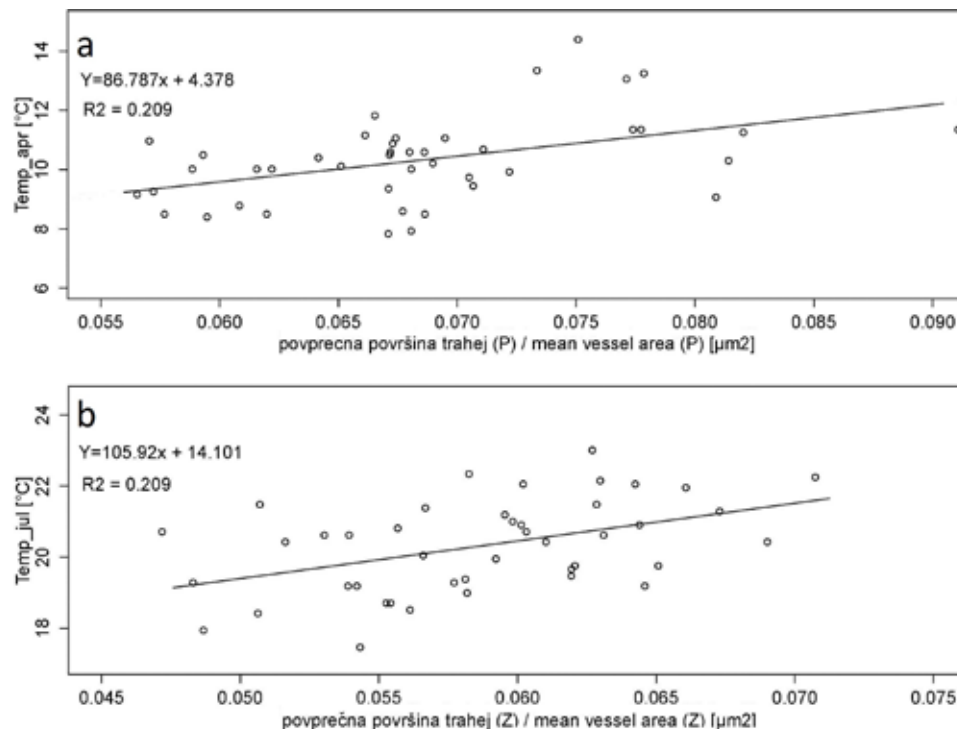
podatki. S podatki, ki jih pridobimo v makru EWVA, lahko opravimo analizo odvisnosti lesno-anatomskih parametrov od različnih klimatskih parametrov. V našem demonstracijskem primeru smo primerjali različne parametre trahej ranega lesa s povprečnimi mesečnimi temperaturami za obdobje od marca do avgusta (preglednica 2). Največje korelacijske koeficiente smo dobili med parametri *povprečna površina trahej* in povprečnimi aprilskimi in junijskimi temperaturami.

V primeru dovolj velikih korelacij med enim izmed izmerjenih parametrov in meteorološkimi meritvami lahko razvijemo linearni model za rekonstrukcijo klime v preteklost, kar prikazuje slika 8.

4 ZAKLJUČEK

4 CONCLUSIONS

Poznavanje značilnosti prevodnih elementov omogoča dodaten vpogled v fiziologijo venčastoporoznih drevesnih vrst ter razumevanje njihove rasti. V prispevku smo predstavili metodo za učinkovito merjenje prevodnih elementov z uporabo prosto dostopnega programa ImageJ in namensko razvitega makra EWVA. Makro EWVA omogoča avtomatizirano prepoznavanje posameznih branik, kar pospeši celotno analizo. ImageJ omogoča merjenje trahej tudi z uporabo nekaterih drugih dodatkov, npr. *Cell counter* ter *Multimeasure* (Scholz in sod., 2013).



Slika 8: Primerjava med *povprečno površino trahej* (Z) glede na *povprečno temperaturo aprila* (a) in porazdeljevanje *povprečne površine trahej* (P) glede na *povprečno temperaturo julija* (b)

Fig. 8: Comparison between *mean vessel area* (Z) and *mean April temperature* (a) and distribution of *mean vessel area* (P) comparing to *mean July temperature* (b)

Uporabnost razvitega makra smo predstavili na primeru dveh različno vitalnih dobovih dreves. Za demonstracijo smo s pomočjo meritev izdelali prikaze okvirja z ročaji (slika 6), frekvenčno porazdelitev (slika 5) in razvili kronologije s *povprečno površino trahej*, s *skupno površino trahej* in s *številom trahej* (slika 7). S pridobljenimi podatki je bilo možno izračunati korelacije med posameznimi spremenljivkami in izdelati regresijski model odvisnosti med trahejami ranega lesa in klimatskimi podatki, kar lahko uporabimo v okoljskih študijah.

Zdi se, da je kritična faza podobnih analiz priprava površin vzorcev. Tudi v našem primeru je ročno izboljševanje vidnosti prevodnih elementov zahtevalo največ časa. Ročno brušenje pogosto ne zagotavlja zadostne natančnosti za uporabo avtomatiziranega načina zajema slik. Težava je v valoviti oziroma neravni površini, ki nastane pri pripravi vzorca in je praktično ni mogoče odpraviti, zato so potrebne ročne prilagoditve ostrine pri zajemu slik.

ImageJ ter velika večina drugih programov temelji na binarizaciji slike, ki sliko pretvori v črne in bele slikovne elemente in tako loči svetle objekte od temnega ozadja. Kljub optimalni pripravi lahko nastanejo manjše razlike v najprimernejših nastavitvah ločitvenih parametrov zaradi svetlejše beljave ter temnejše jedrovine (slika 2b). Omenjeni problem lahko rešimo z razrezom slike na manjše enote. Razlike med pravilno in napačno izbranimi nastavitvami ločitvenih parametrov za binarizacijo so razvidne iz slike 9.

Avtomatizirano prepoznavanje trahej ranega lesa posameznih let je pomemben korak v lesno-anatomskih analizah. Ob uporabi funkcije *Automatically select ROIs* program na podlagi izbranih nastavitv ločitvenih parametrov za binarizacijo slike poišče objekte ter jih poveže na podlagi izbrane maksimalne razdalje med objekti. Težava se pojavi pri zelo ozkih branikah in branikah, ki so presekanke s širokim strženovim trakom.

V teh primerih je treba izbrisati napačno prepoznane ROI in jih ročno dodati. Velja poudariti, da tudi ROXAS ni 100-odstotno zanesljiv pri prepoznavanju branik (von Arx in Dietz, 2005).

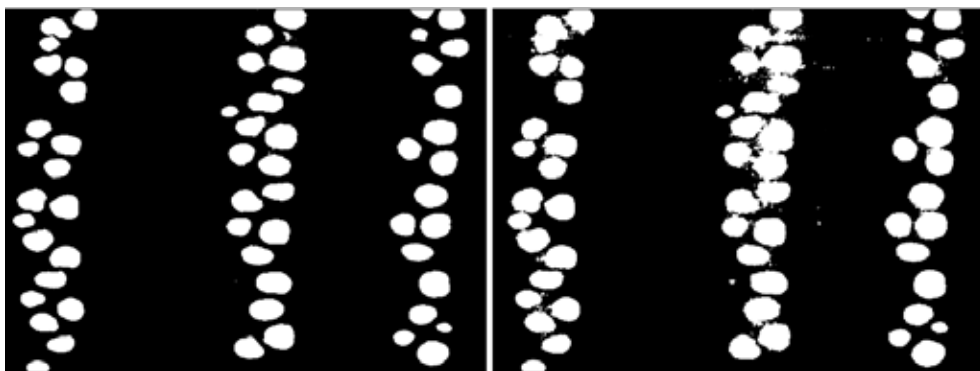
Makro EWVA se pri analizi trahej ranega lesa kaže kot dobra alternativa komercialnim programom in ga nameravamo razvijati glede na naše raziskovalne potrebe. Želimo izboljšati način avtomatiziranega prepoznavanja branik ter vključiti nove možnosti analize, kot je npr. samodejni izračun površine branike, gostote trahej ipd. Posebno pozornost bo treba posvetiti tudi tehniki priprave površine vzorcev.

5 POVZETEK

5 SUMMARY

During growth, tree responses to environment are stored in the annual rings. Ring width is the commonest variable used in dendrochronological studies. Beside ring width, also earlywood width, latewood width, density and stable isotopes of carbon, oxygen and hydrogen are common. With technological digital improvements in recent decades, wood-anatomical parameters are more and more in use as well. However, those studies are limited by the time consumption and expensive software.

Programs used in wood-anatomical studies are ROXAS (Von Arx and Dietz, 2005; von Arx and Carrer, 2014), WinCell (Regent Instruments, Canada), AnalySIS (Soft Imaging Systems, Germany), Image-Pro plus (MediaCybernetics, Silver Spring, MA, USA) and Visilog® image analysis system (NOESIS, Les Ulis, France). Also Adobe Photoshop and Adobe Photoshop Elements (both Adobe Systems, San Jose, ZDA) have functions that enable some wood-anatomical analysis, which is not their primary function. All mentioned programs are relatively expensive or they demand expensive platform (e.g. ROXAS). On the other hand, program ImageJ, which was developed by the National Institu-



Slika 9: Primerjava med pravilno (levo) in napačno (desno) izbranim ločitvenim pragom za binarizacijo slike

Fig. 9: Comparison between correctly (left) and falsely (right) chosen threshold for image analysis

tes of Health (Maryland, USA), is free and available online (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>). The main advantage of ImageJ is its free-source nature and ability of adding plugins and macros.

The aim of this article is to present the open-source program ImageJ and macro EWVA (EarlyWood Vessels Analysis), written in ImageJ macro language (<http://rsb.info.nih.gov/ij/developer/macro/macros.html>). We developed macro EWVA to offer a free alternative to highly specialized and payable software. Usefulness of ImageJ and macro EWVA is demonstrated in the case study of two pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) of different vitality.

In the wood-anatomical analysis, sample surface has to be sanded. Conductive elements have to be filled by chalk, wax and magnesium or titanium oxide to improve the contrast between anatomical elements. Sample surface preparation is therefore the crucial phase for the following analysis. High-resolution images are usually captured with specific program added to the hardware equipment (microscope, scanners or digital camera). Each image could have been analyzed separately, but we recommend to stitch images with a stitching tool in ImageJ (Preibisch et al., 2009). After calibration, Regions of interest (ROIs) have to be defined. Step could be done manually with selection tool, or automatically using macro EWVA.

When macro EWVA is opened, it offers to run five different modules (Figure 1). Module *Measurement simulation* is aimed to verify whether the image is ready for the analysis. After this module is run, an image with recognized rings is opened. Module *Automatically select ROIs* is based on a proper selection of the threshold filter and selected maximal distance between the objects. Recognized earlywood rings will be shown in ROI Manager (Figure 3c). After all ROIs are selected, they have to be sorted based on their location (use module *Sort ROIs based on their X coordinate*). Next, module *Rename ROIs to their belonging year* will give each ROI a proper name (year). Only the year of the outermost ring has to be known. Finally, the module *Measure vessels* is the last step in the analysis. Site and sample identification have to be entered (Figure 3b); both are later used in names of output files. The smallest vessel size has to be selected; also different saving options are available. Margin objects could be treated differently. Results are saved in a text format and located in the same folder as a source image.

The method was introduced in the case study of two pedunculate oaks (*Quercus robur*) from Mlače. Only two cores were used, since the aim of the article was to present the method and its extensive use.

Three parameters were developed: *mean vessel area* ($PovpP_T$), *sum of vessel area* ($VsotaP_T$) and *number of vessels* ($Stev_T$). Some correlations among the variables were significant (Table 1), what is reasonable, since variables are also mathematically related: *mean vessel area* is the quotient of *sum of vessel area* and *number of vessels*. Some high correlations were observed between *mean vessel area* and mean monthly temperatures in April and July. For stronger conclusions, sample size should be enlarged.

The critical phase of wood-anatomical studies is still preparation of the sample surface, which was also the bottleneck of time consumption in our study. Manual sanding often does not ensure demanded precision due to uneven sample surface. Automated image acquisition is therefore often not possible – even if there are only a few micrometers of difference between the beginning and the end of the sample, manual adjustment of sharpness is needed. Moreover, it is difficult to ensure the optimal threshold settings for the whole sample. Sapwood and hardwood have different colour and brightness.

Automatized selection of earlywood rings is an important step forward in the wood-anatomical analysis. Function *Automatically select ROIs* is based on a proper selection of threshold filters. Objects are found and combined into a group (earlywood) based on a selected maximal distance between objects. Problems appear, when narrow rings or rings with wide pith rays are analyzed. In those cases, wrongly recognized rings should be deleted and once again manually selected. Respectively, also ROXAS does not ensure 100% effective ring recognition (von Arx and Dietz, 2005).

We intend to upgrade described method in the near future. Macro EWVA will be further developed and new functions added. The automatized recognition of earlywood should be improved. Surface preparation method has to be improved as well. In most cases, ring porous species are used in studies due to easier surface preparation. As diffuse porous species and latewood of ring porous species carry important environmental information, the sample surface preparation seems to be a bigger challenge. Macro is available on the internet site JDendro (<http://www.jdendro.com>) with detailed English description on how to use macro EWVA.

6 ZAHVALA

6 ACKNOWLEDGEMENT

Jernej Jevšenak se zahvaljuje Pahernikovi ustanovi, ki je odobrila sredstva za dodatne meritve v okviru magistrske naloge (Jevšenak, 2014) in tako omogočila testiranje programa ImageJ ter razvoj makra EWVA.

Dodatna testiranja s strani T. Levaniča so potekala v okviru raziskovalnih nalog programske skupine P4-0107 »Gozdna biologija, ekologija in tehnologija«.

7 VIRI

7 REFERENCES

- Arhiv – opazovani in merjeni meteorološki podatki po Sloveniji. 2014. Agencija Republike Slovenije za okolje (ARSO). <http://meteo.arso.gov.si/met/sl/archive/> (13. 12. 2014).
- Fonti P., Arx G., García-González I., Eilmann B., Sass-Klaassen U., Gärtner H., Eckstein D. 2010. Studying global change through investigation of the plastic responses of xylem anatomy in tree rings. *New Phytologist*, 185: 42-53.
- García-González I., Eckstein D. 2003. Climatic signal of earlywood vessels of oak on a maritime site. *Tree Physiology*, 23: 497-504.
- Gärtner H., Nievergelt D. 2010. The core-microtome: A new tool for surface preparation on cores and time series analysis of varying cell parameters. *Dendrochronologia*, 28: 85-92.
- ImageJ. 2014. ZDA <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>
- ImageJ Macro Language. 2014. ZDA <http://rsb.info.nih.gov/ij/developer/macro/macros.html>
- JDendro. 2014. <http://www.jdendro.com>
- Jevšenak J. 2014. Dendrokronološke in lesno-anatomske posebnosti različno vitalnih dobov (*Quercus robur* L.): magistrsko delo (2. stopnja). (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire). Ljubljana, samozaložba.: 65 str.
- Preibisch S., Saalfeld, S., Tomancak P. 2009. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics*, 25, 11: 1463-1465.
- Scholz A., Klepsch M., Karimi Z., Jansen S. 2013. How to quantify conduits in wood? *Frontiers in Plant Science*, 4: 1-11.
- Schleser G. H., Helle G., Lücke A. in Vos H.. 1999. Isotope signals as climate proxies: the role of transfer functions in the study of terrestrial archives. *Quaternary Science Reviews*, 18: 927-943.
- Schweingruber F. H. 1988. Tree rings: basics and applications of dendrochronology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 276 str.
- Spiecker H., Schinker M. G., Hansen J., Park Y., Ebding T., Doll W., Park Y. I. 2000. Cell structure in tree rings: novel methods for preparation and image analysis of large cross sections. *IAWA Journal*, 21: 361-373.
- von Arx G in Carrer M. 2014. ROXAS - a new tool to build centuries-long tracheid-lumen chronologies in conifers. *Dendrochronologia*, 32: 290-293.
- von Arx G. in Dietz H. 2005. Automated image analysis of annual rings in the roots of perennial forbs. *International Journal of Plant Sciences*, 166: 723-732.