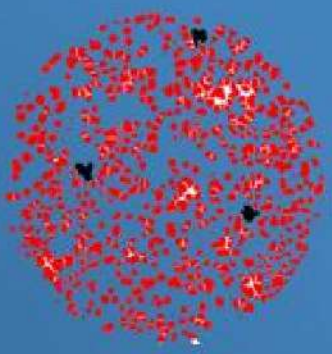
أساسيات برنامج تحليل الصور الرقمية ImageJ



تأليف وإعداد

د. لبيد عبدالله السعد   د. حليمة زغير حسين

المحتويات

المقدمة: 1

مفاهيم أساسية 2

الصورة التناظرية Analogue image: 2

الصور الرقمية Digital image: 2

البكسل Pixel: 3

نسبة الأبعاد Aspect ratio: 3

درجة الوضوح Resolution: 4

العمق اللوني Bit depth: 5

الأكداس Stacks: 7

تنزيل وتنصيب برنامج ImageJ 7

محتويات مجلد برنامج ImageJ: 10

ij.jar: 10

ImageJ.exe: 10

Macros: 10

Plugins: 10

LUTs: 10

الترقية إلى اصدار JAVA أحدث: 11

شرح واجهة برنامج ImageJ 11

أدوات تحديد المساحات Area selection tools: 12

أداة التحديد المستطيلة Rectangular Selection Tool: 12

أداة التحديد البيضوية :Oval Selection Tool 13
أداة التحديد المتعددة الأضلاع :Polygon Selection Tool 14
أداة التحديد الحرة :Freehand Selection Tool 14
أدوات التحديد الخطي :Line Selection Tools 14
أداة الزاوية :Angle Tool 15
أداة العصا السحرية :Wand Tool 17
أداة كتابة النص :Text Tool 19
أداة العدسة المكبرة :Magnification Glass Tool 20
أداة التمرير :Scrolling Tool 20
أداة التقاط اللون :Color Picker 21
العمليات الأساسية للعمل على برنامج ImageJ 22
تشغيل البرنامج 22
فتح ملف جديد 23
حفظ الصور 24
تحويل الصور من تدرج لوني إلى آخر 24
إجراء عمليات القياس والعد للأجسام الموجودة في الصور الرقمية 25
تحضير الصور الرقمية للتحليل 25
قياس الأطوال والمساحات والزوايا 27

حفظ الصور الرقمية المعالجة 31
إجراء عمليات العد في برنامج ImageJ..... 32
تقدير نسبة الضرر في النسيج النباتي..... 38
التقدير الكمي لبقع المواد على صفائح السيليكا الرقيقة High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)..... 45
استخدام الأكداس Stacks 53
استخدامات الأكداس The usage of Stacks..... 54
كيفية انشاء الكدس Create stack..... 55
استخدام الأكداس الزمنية Time series stack في دراسة نمو وتطور مزرعة فطرية 61
المصادر..... 65

المقدمة:

يعتبر برنامج ImageJ من أهم برامج تحليل الصور الرقمية المفتوحة المصدر (يمكن تشغيلها ودراسة كيفية عملها والاطلاع على شفرتها البرمجية وتطويرها وتوزيعها مجانا) المكتوبة بلغة جافا Java ويمكن العمل عليه اما على الانترنيت مباشرة أو عن طريق تنزيله على الحاسبة الشخصية وعلى أي نظام تشغيل كأن يكون Windows, Mac OS X and Linux شرط ان يحتوي على إصدار Java 1.5 أو أحدث. طور هذا البرنامج من قبل Wayne Rasband لحساب المعهد الوطني للصحة National Institute of Health (Washington, USA) .

يستطيع هذا البرنامج عرض وتنقيح او تعديل وتحليل ومعالجة وحفظ وطباعة الصور ذات الدقة اللونية 8-bit, 16-biy and 32-bit ويستطيع قراءة الصور من نوع TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS كما يدعم آلية قراءة الصور بشكل كدس Stack أي مجموعة من الصور ضمن نافذة واحدة تكدس فوق بعض تعالج بالتوازي لاختصار الوقت والجهد.

باستطاعة هذا البرنامج حساب قيم المساحات والPixles (وحدة قياس عدد النقاط المضاءة من الصورة في الانج المربع الواحد) ويحولها إلى وحدات قياس حسب تعريف الباحث لها. وباستطاعته أيضا قياس الأطوال والزوايا وانشاء مدرجات تكرارية ومخططات بيانية. ويدعم البرنامج أيضا كل آليات معالجة الصور التقليدية مثل تغيير التباين اللوني contrast manipulation والتخشين sharpening والتنعيم smoothing وتحسس الحواف edge detection وإزالة التشويش عن الصورة median filtering.

يمتلك البرنامج آليات التحويل الفراغي للصورة geometric transformations مثل التحجيم scaling والتدوير rotation والتقليب flipping كما يمكن تكبير وتصغير الصور إلى 1:32 مرة أكبر أو أصغر من حجمها مع ضمان تطبيق كل عمليات المعالجة والتحليل عند أي معامل تكبير أو تصغير. ويستطيع البرنامج العمل على أي عدد من النوافذ (الصور) في نفس الوقت ولا يحدد هذه العملية سوى مدى سعة ذاكرة الحاسوب الذي يقوم بالمعالجة (كلما كبرت الذاكرة كلما زاد عدد الصور التي يمكن ان تعالج في نفس الوقت).

يوفر البرنامج آلية المعايرة المكانية Spatial calibration لضمان توفير قياس الأبعاد الحقيقة للأجسام باستخدام وحدات القياس الفعلية لها مثل الملمترات...الخ. ويوفر البرنامج إمكانية معايرة شدة التألق Density or gray scale وهي من أهم آليات التقدير الكمي للمواد المرحلة على الهلام.

إن تصميم هذا البرنامج بهيكلية مفتوحة المصدر أتاح إمكانية كبيرة لتوسيعه باستخدام البرامج المضافة Plugins (برامجيات صغيرة تلحق بالبرنامج الأساسي لتنفيذ عمليات إضافية لم تكن موجودة في البرنامج الأساسي) والتي يمكن كتابتها بلغة جافا من قبل أي مطور برامج باستخدام محرر جافا الموجود من ضمن البرنامج وبهذه الطريقة أصبح البرنامج يمتلك قدرات هائلة في تحليل الصور الرقمية في مختلف المجالات العلمية وجعلته قادر على حل أي مشكلة تتعلق بتحليل الصور الرقمية تقريبا.

مفاهيم أساسية

الصورة التناظرية Analogue image:

هي الصورة الملتقطة باستخدام كاميرا تناظرية (اعتيادية) تحتوي على فلم مطلي بمواد كيمياوية تتفاعل مع الضوء القادم من العدسة مما يؤدي إلى تسجيل الصورة والتي يتم معالجتها وتظهيرها في المختبر وتطبع على ورق خاص. هذا النوع من الصور مخصص لكي يراه البشر ولا يمكن معالجته وتحليله واستخلاص البيانات منه لأن الصورة تكون عبارة عن مجموعة كبيرة من المسحات اللونية hue والظلال Shadows المتمازجة فيما بينها لتعطي تمثيل حقيقي للمشهد بحيث يصعب التفريق بين حدود الألوان والظلال المكونة للصورة واستخلاص البيانات منها.

الصور الرقمية Digital image:

1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	1	1	0	0	0	1
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
1	0	0	0	1	1	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

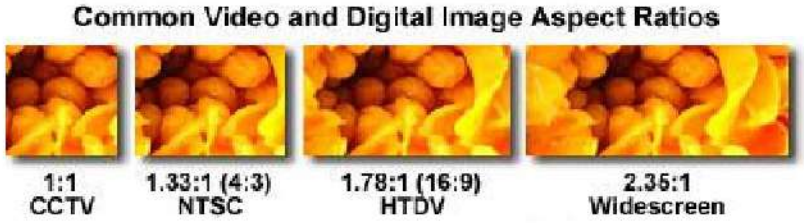
عبارة عن لقطة الكترونية تلتقط بواسطة كاميرا رقمية لمنظر معين او تؤخذ عن طريق المسح الضوئي Scanning لصورة فوتوغرافية أو مخطوطة أو نص مطبوع أو لوحة ..الخ. المهم في العملية أن الصورة تخزن على شكل مصفوفة من النقاط تسمى عناصر الصورة Picture elements (Pixels) وكل بكسل يعطى قيمة لونية معينة (أبيض أو اسود أو تدرج رمادي أو لون معين) كما في الشكل المجاور والذي يتم تمثيله برقم ثنائي Binary code (تشكيلة من صفر و واحد) والرقم الثنائي يسمى بت Bit. يتم بعد ذلك تفسير المصفوفة الرقمية للصورة من قبل الحاسوب وتحويلها إلى صورة اعتيادية Analog picture لتعرض على الشاشة أو تطبع من قبل الطابعة.

لبكسل Pixel:

البكسل هو أصغر عنصر مرئي (مكوّن) في الصورة الرقمية ويعتبر بمثابة عينة Sample ممثلة عن الصورة الحقيقية وكلما زاد عدد العينات Pixels المأخوذة فإنها سوف توفر تمثيل أكثر دقة عن الصورة الأصلية.

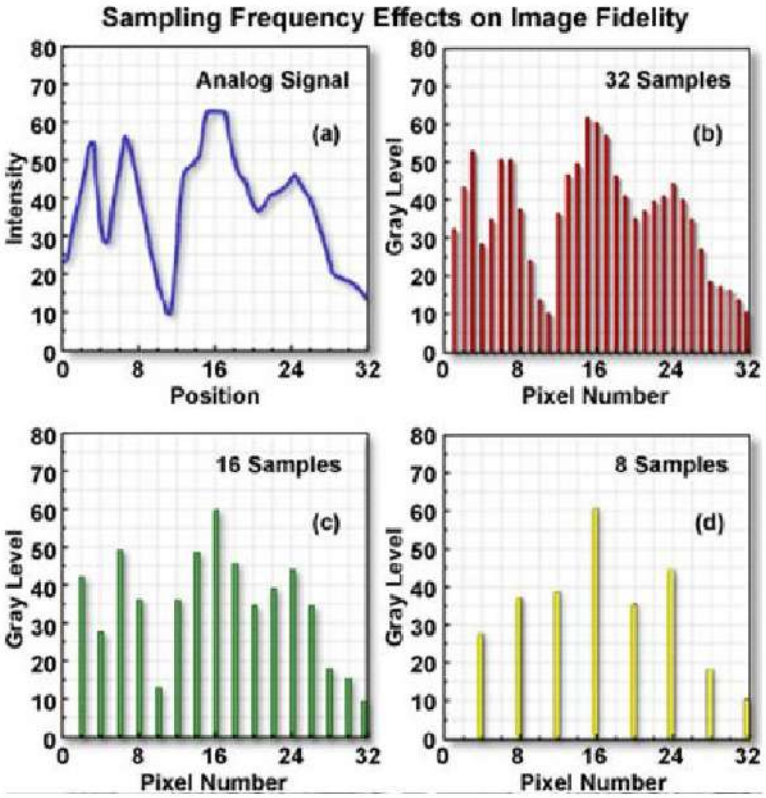
نسبة الأبعاد Aspect ratio:

وهي نسبة عرض إلى ارتفاع البكسل وتحسب من خلال قسمة العرض width على الارتفاع Height فعندما يكون البكسل مربع تماما كما في نظام CCTV تكون النسبة 1:1 بينما تكون (4:3) أو تكتب 1.33:1 في نظام NTSC (National Television System Committee) وهذه تعتبر من النسب القياسية للفيديو والتلفزيون أي ان عرض الصورة يفوق ارتفاعها بمقدار 1.33 وفي مثل هذه الصور قد تظهر الدائرة بشكل بيضوي وفي الشكل ادناه بعض اهم نسب الأبعاد المعروفة للصور:

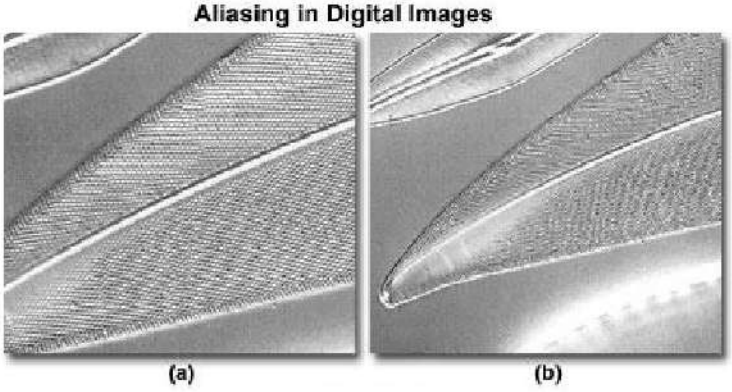


درجةالوضوح Resolution:

وهي القدرة على تمييز التفاصيل الدقيقة للصور ويعبر عنه دائما بعدد النقاط (Pixels) لكل انج مربع (dpi or ppi) dot or pixel per inch حيث انه كلما زاد عدد النقاط زاد وضوح الصورة. وهذه الميزة مهمة جدا عند التقاط الصور الرقمية تحويل الصور التناظرية إلى صور رقمية باستخدام الطرق المشار إليها أعلاه حيث تعتمد كفاءة التحويل على الكثافة المكانية للنقاط في الصورة Spatial density ومدى وضوح عدسة الجهاز المستخدم في التقاط أو تحويل الصورة كأن يكون مجهر أو ماسح ضوئي أو كاميرا رقمية ..ألخ. إن عدد البكسلات المكونة للصورة الرقمية والمسافة بين بكسل وآخر يسمى بفترة إخذ العينة Sample interval وهو دالة تؤشر مدى دقة جهاز التحويل الرقمي للصور Digitizing device أي دقة وجودة العدسات وحساسات التصوير والالكترونيات (كلما قلت هذه القيمة كلما زادت دقة الصورة) فإذا أصبحت 1 مثلا فهذا يعني أن الجهاز يمسح كل بكسل من الصورة واذا كانت 2 فهذا يعني ان الجهاز يمسح (يلتقط صورة) بكسل ويترك البكسل التالي ويمسح الذي بعده وهكذا مما يؤدي بالنتيجة إلى حدوث تشوه في الصورة الملتقطة Aliasing على شكل



خطوط طولية متوازية خصوصا عند زيادة قيمة Sample interval نتيجة فقدان بعض معلومات الصورة مما يؤدي إلى ظهورها بسطح خشن حسب درجة التشوه Aliasing كما في الشكل التالي حيث يلاحظ التشوه في الصورة (b) على شكل خطوط طولية متوازية قليلة الوضوح مقارنة بالصورة (a) التي تظهر بشكل واضح وغير مشوه.



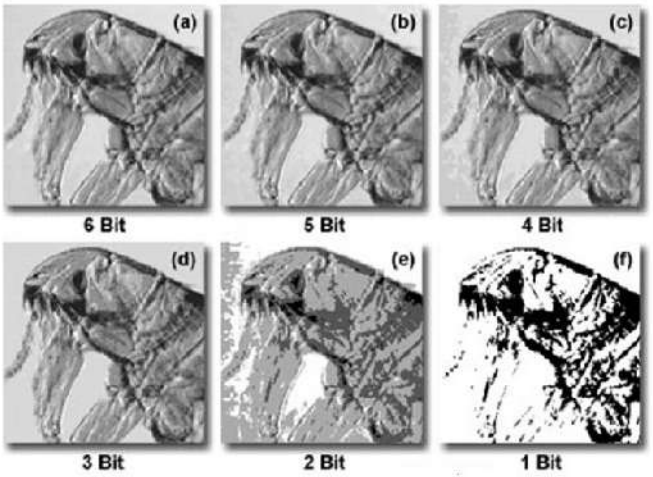
لاعمق للالوني Bit depth:

عدد المراتب العددية التي تستخدم لتمثيل النقطة او البكسل وكلما كان عدد المراتب أكبر كلما كان التدرج اللوني اكبر فمثلا الصورة الممثلة بالأبيض والأسود العمق اللوني لها 1-bit أي رقم مكون من مرتبة واحدة 0 تعني أسود أو 1 تعني أبيض أما لوكان لدي عمق لوني 2-bit والتي تساوي 2^2 أي 00 و 01 و 10 و 11 فاذا افترضنا 00 تعني اسود و 11 تعني ابيض فإن 01 تعني رمادي غامق و 10 تعني رمادي فاتح وعليه اصبح لدي اربع تدرجات لونية. وعلى هذا الأساس فإن: .

- 8-bit: صور تستطيع اظهار 256 (2^8) تدرج رمادي.
- 16-bit: صور تستطيع اظهار 65536 (2^{16}) تدرج رمادي.
- 32-bit: صور تستطيع اظهار 4294967296 (2^{32}) تدرج رمادي.

أما بالنسبة للصور الملونة RGB color فإنها تستطيع اظهار 256 تدرج لكل لون من الألوان الأساسية أي الأحمر Red والأخضر Green والأزرق Blue أي أنها صور ($2^{3\times8}$) 24-bit ويمكن أن تكون الصور الملونة 32-bit حيث تضاف 8-bit لكل بكسل لإظهار تدرج الشفافية لكل لون أساسي.

بشكل عام فإن دقة وضوح الصورة يتراوح ما بين الخشونة إلى عالية الوضوح (النعومة) وهو يعتمد أساسا على عدد مستويات التدرج اللوني Bit-depth ويطلق على هذه الميزة مصطلح التردد المكاني للصورة Spatial frequency أي **عدد مستويات تدرج اللون** حيث ان زيادة عدد المستويات يؤدي إلى زيادة نعومة الصورة كما في الشكل ادناه.



إن القيمة الرقمية لكل بكسل تمثل في الواقع كثافة اللون المرئية التي تعتمد على فترة اخذ العينة Sample interval ولذلك نجد أن خلفية الصورة تكون قيمها الرقمية ثابتة تقريبا لكل بكسل بينما العينة الموجودة في الصورة تمتلك بكسلاتها قيم تتراوح بين الغامقة جدا والفاتحة جدا. أن كفاءة جهاز التصوير الرقمي تعتمد على قدرته على التقاط معظم تفاصيل الصورة بشكل دقيق عبر قيمة فترة اخذ العينة Sample interval فإذا كانت الأشياء المرئية في المجهر مثلا أصغر من Sampling interval فإن الصورة الملتقطة قد لا تكون ممثلة للعينة بشكل دقيق وعلى هذه الأساس فإن هناك معيارين قياسيين يستخدمان لضمان دقة الصورة الرقمية وهما:

- معيار شانون Shannon's sampling theorem: والذي ينص على ان الصورة الرقمية تعتبر ممثلة للصورة الحقيقية عندما يمتلك جهاز التصوير الرقمي Digitizing device كفاءة التقاط بفترة اخذ عينة Sampling interval لا تتجاوز نصف حجم **أصغر جسم** يمكن تحسسه في الصورة أي الذي يمتلك أعلى تردد مكاني (اعلى تدرج لوني) Spatial frequency.

- معيار نيكست Nyquist criterion: لكي تعتبر الصورة ممثلة للصورة الحقيقية فإن الـ Sampling interval يجب ان يساوي ضعف أعلى معدل للتردد المكاني Spatial frequency.

أي أن المعيارين أعلاه متكافئين ويدلان على نفس الشيء بتعبيرين مختلفين يعني لو كانت دقة الميكروسكوب مثلا باستطاعتها تحسس أشياء بقطر 0.22 مايكرومتر فيجب أن يكون جهاز التحويل الرقمي Digitizer قادر على تحسس أشياء بقطر 0.11 مايكرومتر لكي نحصل على صورة دقيقة للتحليل.

ألكداس Stacks:

وهي عملية وضع الصور بشكل طبقات أو شرائح مرتبة واحدة فوق الأخرى ضمن نافذة عرض واحدة وتسمى كل صورة منها شريحة كما ان الPixel هنا يسمى Voxel (volumetric pixel) أي أن قيمة الشدة اللونية هنا تكون ثلاثية الأبعاد. وفي هذا النوع من الصور يجب ان تكون جميع الشرائح بنفس الحجم والعمق اللوني. يوفر ImageJ إمكانية التنقل بين شرائح الكدس بواسطة منزلقة تظهر أسفل نافذة الصورة أو يمكنه عرضها بالتتابع أوتوماتيكيا على شكل Slide show. هذه الألية مهمة جدا في حالة الرغبة في دراسة التغيرات التي تحدث على العنصر المدروس عند تغير الظروف المحيطة به كالتغيرات التي تحدث بتغير الزمن مثل دراسة معدل نمو كائن حي خلال فترة زمنية معينة. وتستخدم هذه الآلية بشكل كبير في حالات القياسات الثلاثية الأبعاد 3D-Stacks أو في حالة وجود أكثر من ثلاثة ابعاد Z-Stacks (Highperstacks). ولهذه الآلية تطبيقات كبيرة في مجال تحليل صور مجاهر الفلورسنت وفي تحليل التغيرات الجيولوجية خلال فترات زمنية متعددة كذلك فإنها تعتبر من الأدوات المهمة جدا في تحليل الصور الفلكية ودراسة حركة النجوم.

تنزيل وتنصيب برنامج ImageJ

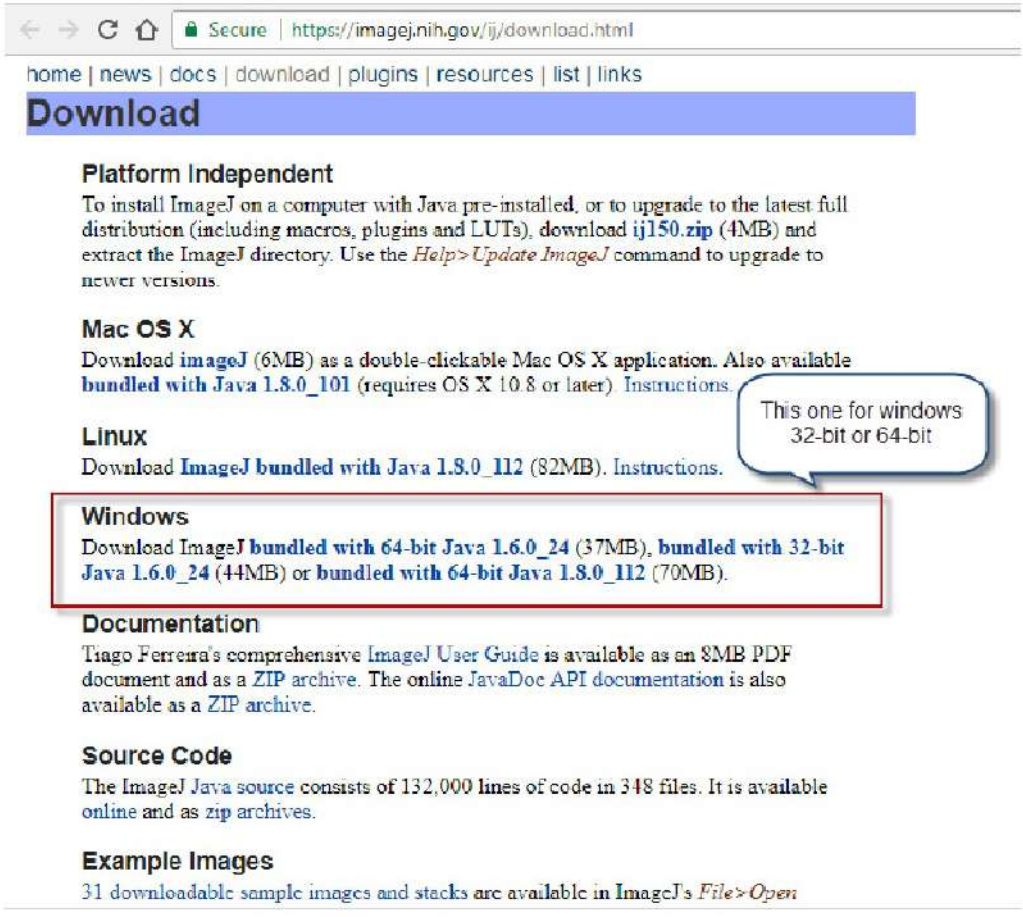
يمكن تنزيل برنامج ImageJ من موقعه على الإنترنيت على الرابط http://imagej.nih.gov/ij/download.html كما أن تفاصيل تنصيبه على أي نظام تشغيل متوفرة على الرابط التالي http://imagej.nih.gov/ij/docs/install/ .

تنصيب البرنامج الأساسي يعتبر غير كافي لأنه يحتوي فقط على العمليات الأساسية أما قوة البرنامج فتكمن في البرامج الصغيرة الملحقة به Plugins والتي يمكن تنزيلها وإضافتها اليه وحسب

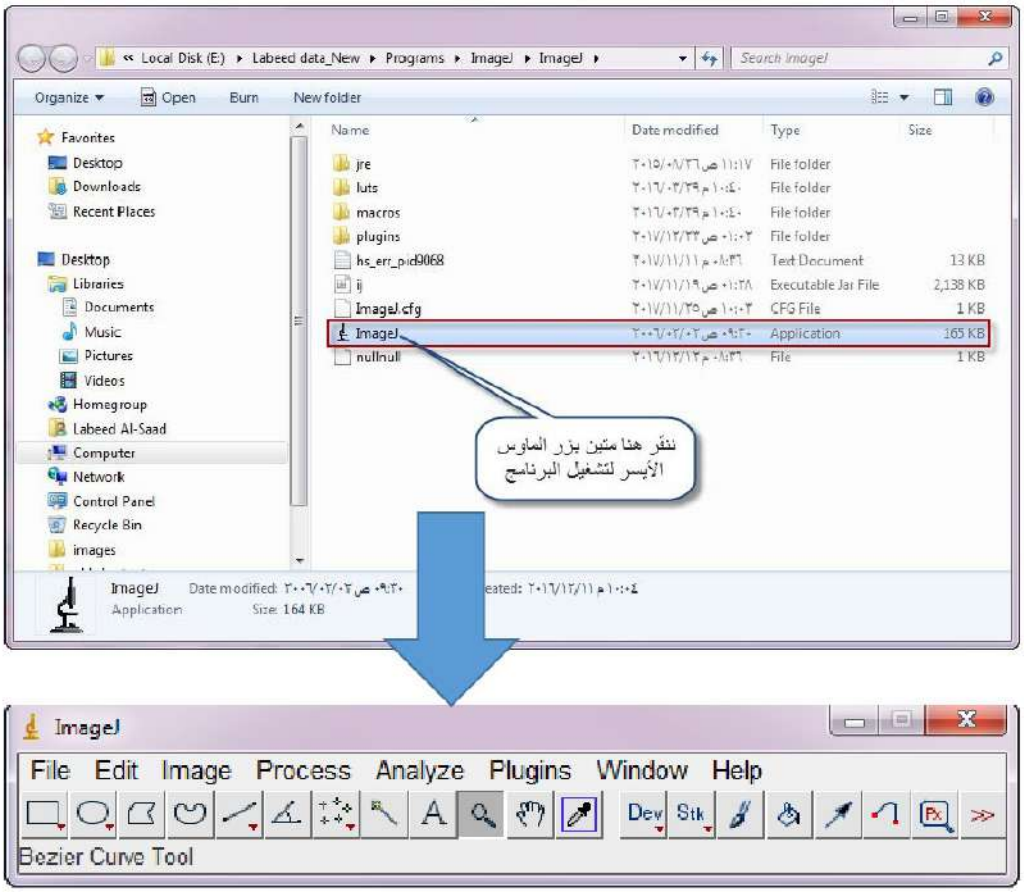
حاجة المستخدم لأنها تخدم مجالات علمية كثيرة وعلى كل باحث ان ينصب ما يحتاجه منها ويمكن تنزيلها من الرابط التالي: https://imagej.nih.gov/ij/plugins/index.html وهي كثيرة جدا وتزداد باستمرار نتيجة عمل مطورين البرامج المستمر لتصميم برامجيات تمكنهم من تحليل نتائج بحوثهم حيث انه وكما اسلفنا فان هذا البرنامج مفتوح المصدر وبإمكان أي شخص كتابة ما يشاء من البرامج الملحقة واضافتها اليه شرط أن تكون مجانية ومتاحة للجميع.

ولتنصيب البرنامج على نظام Windows نتبع الخطوات التالية:.

1. اذهب إلى الرابط التالي: http://imagej.nih.gov/ij/docs/install/ وقم بتنزيل البرنامج على حاسبتك وتأكد من اختيار الحزمة الصحيحة (32 bit أو 64 bit).



2. بعد تنزيل البرنامج على الحاسبة نقوم بفك الضغط عن الملف المنزل.
3. بعد فك الضغط نذهب إلى المجلد ImageJ ونبحث عن الملف التشغيلي ImageJ وننقر عليه مرتين بأيسر الماوس فيشتغل البرنامج.



محتويات مجلد برنامج ImageJ:

Ij.jar:

يحتوي هذا الملف على نواة برنامج ImageJ وهو الملف الوحيد الذي يتغير عند تحديث البرنامج من خلال ايعاز Help >> Update ImageJ.

ImageJ.exe:

هذا هو الملف التشغيلي المسؤول عن تشغيل برنامج ImageJ.

Macros:

يحتوي هذا المجلد على وحدات الماكرو الخاصة بالبرنامج والماكرو **عبارة عن برنامج بسيط مكتوب بلغة (IML) ImageJ Macro Language وهي لغة برمجة مدمجة ضمن البرنامج تمكن من كتابة برنامج صغير يحتوي على حزمة من ايعازات ImageJ (الموجودة ضمن القوائم والأيكونات) بحيث تنفذ مرة واحدة وبسرعة عند تشغيل الماكرو**. الملف Macros.txt الموجود في هذا المجلد يحتوي على الماكروات وادواتها التي تحمل ذاتيا عند تشغيل البرنامج. لتشغيل الماكرو، قم بسحبه وافلاته ضمن نافذة ImageJ ثم انقر على Ctrl+r أو (Plugins >> Macro >> Run Macro).

Plugins:

والـ Plugin برنامج ملحق بالـ ImageJ عند تنصيبه يضيف ميزة أو وظيفة إضافية لم تكن موجودة في البرنامج، ويكتب عادة بلغة Java. عموما يحتوي هذا المجلد على عينة من أصل مئات من هذه البرامج المتاحة للتنزيل على موقع برنامج ImageJ. كل الـPlugins والـMacros والشفرات البرمجية الموجودة في هذه المجلد والمجلدات الفرعية المرتبطة به تحمل ذاتيا عند تشغيل البرنامج.

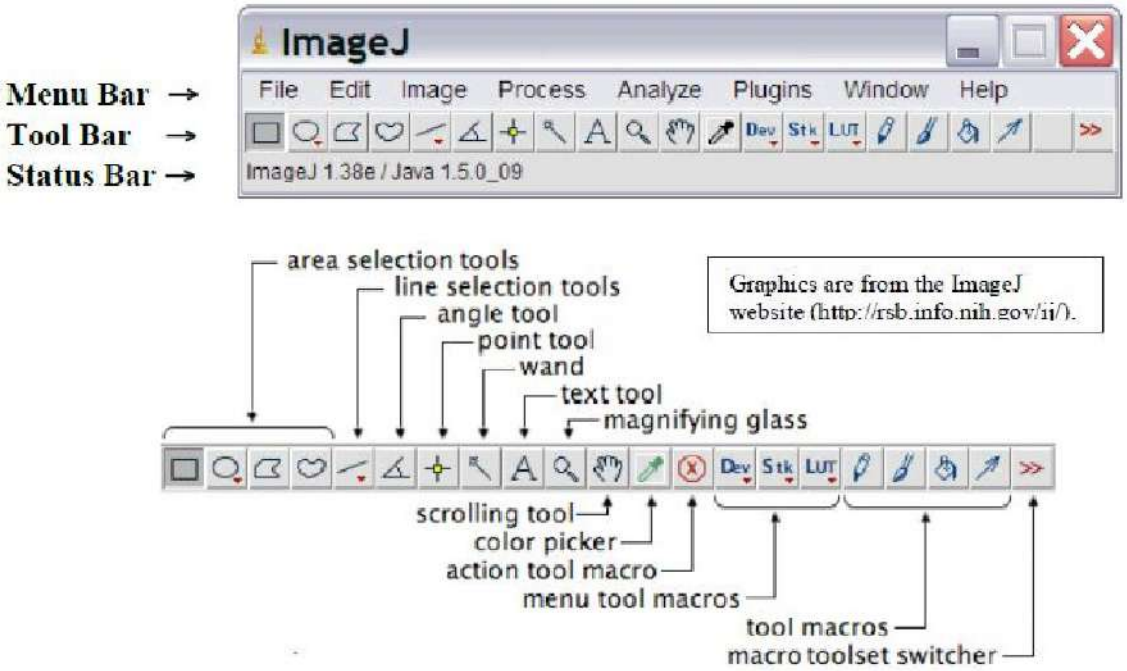
LUTs:

يحتوي هذا المجلد على الـ Look Up Tables (LUTs) وهي جداول تحتوي على معلومات مواقع توزيع التدرجات اللونية لكل صورة ولهذه الجداول أهمية كبيرة في تحويل الصور حيث يحتوي البرنامج على مجموعات قياسية من تدرجات اللون على شكل ملفات LUT يمكن استخدامها لتعديل الصور لأغراض التحليل الرقمي. ويتم تحميل جميع هذه الجداول عند بداية تشغيل البرنامج في القائمة Image >> Lookup Tables وبالإمكان استخدام الإيعاز التالي لعرض هذه المجاميع اللونية Image >> color >> Display LUTs.

الترقية إلى إصدار JAVA أحدث:

كل ما تحتاجه للترقية إلى إصدار جافا أحدث هو تنزيل وتنصيب اخر اصدار لـ JDK من الرابط: www.oracle.com/technetwork/java/javase/downloads/ بعد ذلك نذهب إلى مجلد ImageJ ونمسح أو نغير اسم مجلد jre ثم نمسح الملف ImageJ.cfg ثم نعيد تشغيل برنامج ImageJ من جديد وسيقوم بإنشاء ملف ImageJ.cfg جديد يستخدم اصدار الجافا الجديد الذي تم تنصيبه.

شرح واجهة برنامج ImageJ



تختلف واجهة برنامج ImageJ عن باقي البرامج التي تعمل ضمن بيئة Window في كونها عبارة عن نافذة مكونة من شريط قوائم وشريط أدوات وشريط لعرض الحالة تطفو على سطح المكتب أي بدون مساحة عمل Work area لتقليل الجهد على ذاكرة الحاسبة إلى أقل ما يمكن واستخدامها بأعلى قدر من الكفاءة أما بالنسبة لصور الرسوم البيانية والنتائج والقياسات فإنها تعرض في نوافذ

إضافية تفتح عند الحاجة اليها ويمكن تحريك هذه النوافذ الى أي مكان على سطح المكتب ويمكن اغلاقها بسهولة عند الانتهاء منها. والآن سنبدأ بشرح مبسط لأهم الأدوات الموجودة في شريط الأدوات الخاص بالبرنامج وكما يلي:.

أدوات تحديد المساحات Area selection tools:

وهي أول أربعة أدوات في شريط الأدوات. يتم تفعيلها للعمل بها بمجرد النقر عليها مرة واحدة بزر الماوس الأيسر كما يحتوي بعضها على اشكال إضافية يمكن اختيارها من خلال فتح القائمة المنسدلة عن طريق النقر بأيمن الماوس على السهم الأحمر المقلوب في الزاوية اليمنى السفلى من الأيكونة .

أداة تحديد المستطيلة Rectangular Selection Tool :

تستخدم هذه الأداة لتحديد المساحات المربعة والمستطيلة وتحتوي على قائمة منسدلة تعرض خيارين إضافيين هما المستطيل المستدير الحواف Rounded rectangular والمستطيل القابل للتدوير لزيادة مرونة تحديد المساحات المنتظمة. يعرض شريط الحالة خلال رسم المستطيل بهذه الأداة معلومات موقع بداية التحديد وطول وعرض المستطيل المرسوم. عند النقر على مفتاح Shift اثناء الرسم فإن المستطيل يتحول إلى مربع أما عند الضغط على مفتاح Ctrl أثناء الرسم فإن المستطيل يتوسع قطريا حول نقطة البداية كما أنه عند رسم مستطيل بأبعاد معينة ثم الضغط على Alt فإن نسبة

الأبعاد تبقى كما هي عند تكبير أو تصغير التحديد بالماوس اثناء الرسم كما يمكن تغيير حجم التحديد باستخدام مفاتيح الأسهم مع الضغط على مفتاح Alt.

أداة التحديد البيضوية Oval Selection Tool:

تستخدم هذه الأداة لتحديد المساحات المنتظمة الدائرية والبيضوية وتحتوي على قائمة منسدلة فيها خيارين إضافيين هما التحديد على شكل قطع ناقص Elliptical selection tool أو فرشاة التحديد Selection Brush tool وهذه الأخيرة ذات فائدة عظمى في تعديل تحديد الدائرة أو القطع الناقص بعد رسمه ليتلائم مع الجزء المراد تحديده من الصورة حيث تمكننا هذه الأداة من تطويع الشكل المنتظم عن طريق عمل انبعاجات من الداخل للخارج أو بالعكس أو مسح بعض خطوط التحديد ليصبح التحديد مماثل للشيء المراد تحديده وكما في الشكل أدناه:

يمكن تسهيل العمل بهذه الأداة عن طريق الضغط على مفتاح Shift أثناء الرسم ليصبح الشكل دائري منتظم، وعند الضغط على مفتاح Alt مع الرسم فإن نسبة الأبعاد (بين القطرين) تبقى ثابتة عند التكبير والتصغير وكذلك يمكن تغيير الحجم بدقة عند الضغط على مفتاح Alt مع أي مفتاح من مفاتيح الأسهم، وعند الضغط على Ctrl مع السحب بالماوس فإن الدائرة تتوسع قطريا حول نقطة بداية التحديد.

أداة التحديد لمتعددة الأضلاع Polygon Selection Tool:

هذه الأداة تمكننا من رسم شكل متعدد الأضلاع عن طريق النقر بالأيسر المتكرر وتحريك الماوس لرسم الأضلاع ثم نقرتين على نقطة البداية لقفل الشكل. عند النقر على أحد رؤوس المضلع مع الضغط على Shift فإن ضلعا جديدا سوف يضاف للشكل أما عند الضغط على مفتاح Alt مع النقر على احد رؤوس المضلع فإن الضلع الذي نقر رأسه سوف يحذف.

أداة التحديد الحرة Freehand Selection Tool:

تستخدم هذه الأداة في التحديد الحر وتعتمد على حركة اليد مع ملاحظة ان التحديد يجب ان يكون بشكل منحنى مغلق ولا يترك مفتوحا.

أدوات التحديد الخطي Line Selection Tools:

تستخدم هذه الأدوات لإنشاء تحديدات على شكل خطوط مستقيمة Straight Lines أو مضلعة Segmented Lines او حرة Freehand Lines او اسهم Arrows. وجميع هذه الأدوات تقع ضمن قائمة منسدلة واحدة عند النقر بزر الماوس الأيمن على أيكونة Line ويمكن النقر مرتين متتاليتين على أي واحدة من هذه الأدوات لتحديد مزيد من المواصفات الخاصة بها.

أداة الخط المستقيم Straight Line Tool:

تستخدم هذه الأداة لتحديد طول جسم معين في الصورة ويظهر على شريط الحالة أثناء الرسم طول وزاوية الخط المرسوم. عند الضغط على مفتاح Shift أثناء الرسم فذلك سيجبر الخط أما ان يكون أفقي او عمودي أما عند الضغط على مفتاح Alt فإن الخط يبقى ثابت الطول أثناء تحريكه من أحد نهايتيه مع بقاء النهاية الأخرى ثابتة بينما الضغط على مفتاح Ctrl يمكننا من تدوير الخط حول مركزه و/أو تغيير طوله من كلا الاتجاهين بنفس النسبة (حول مركزه).

أداة الخط المضلع Segmented Line Selection Tool:

تعمل هذه الأداة مثل أداة رسم الشكل المضلع التي تم شرحها حيث ترسم خط مكون من عدد من القطع المتصلة ببعضها عن طريق النقر بالماوس نقرة واحدة أثناء التحريك حيث أن كل

نقرة تضيف ضلع (قطعة) وعند الإنتهاء يجب النقر مرتين متتاليتين أو النقر على المربع الصغير في بداية الخط نقرة واحدة بأيسر الماوس. عند الضغط على مفتاح Shift والنقر على قمة القطعة سوف يؤدي إلى إضافة قطعة جديدة أما الضغط على مفتاح Alt والنقر على رأس أحد الأضلاع سيؤدي إلى حذف ذلك الضلع (القطعة).

أداة الخط الحر Freehand selection Tool:

تستخدم هذه الأداة لرسم خطوط حرة حسب حركة اليد وهي مهمة جدا في تحديد أطوال الأجسام الغير منتظمة الشكل وهي تختلف عن أداة التحديد الحر المشار اليها سابقا بانها لا تحتاج إلى عمل منحنى مغلق لأن هذه الأداة تستخدم لقياس الأطوال وليس المساحات.

أداة رسم الأسهم Arrow Tool:

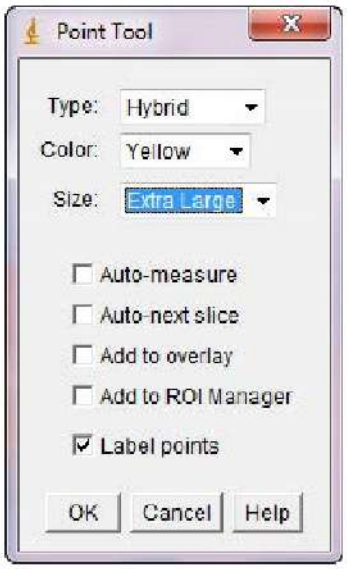
هذه الأداة قد تكون ضمن مجموعة التحديد الخطي أو تنصب ضمن شريط أدوات خاص وتستخدم لرسم سهم يمكن ان يبقى ثابتا عند النقر على مفتاح D يمتلك كل مواصفات الخط المستقيم.

أداةالزاوية Angle Tool:

تمكننا هذه الأداة من قياس أي زاوية محددة بثلاث نقاط. يتم الرسم من خلال النقر مرة واحدة بزر الماوس الأيسر لتحديد نقطة البداية ثم نقرة ثانية لتحديد مركز الزاوية ثم نقرة ثالثة لتحديد نهاية الضلع الثاني للزاوية. عند النقر على الحرف M بعد رسم الزاوية سيتم تسجيلها في نافذة النتائج.

أداة التنقيط :Point Tool

تستخدم هذه الأداة لتحديد نقطة معينة في الصورة وتستخدم هذه الأداة لِعدّ الأشياء أو لتسجيل إحداثيات البكسل المؤشَر. عند الضغط على Shift يمكننا من إضافة نقاط أخرى أي جعل التحديد متعدد النقاط. عند الضغط على مفتاح Alt والنقر على نقطة معينة فإنها سوف تحذف كذلك عند الضغط على مفتاح Alt مع رسم مربع أو دائرة سيؤدي إلى حذف مجموعة النقاط الموجودة بداخل الشكل المرسوم. وعند النقر نقرا مزدوجا على أيقونة الأداة أو الذهاب إلى Edit >> Options >> Point Tool سيؤدي إلى ظهور مربع حوار لتنظيم عمل الأداة. ويمكن شرح مكوناته كالتالي:.



- Type: من خلالها نحدد شكل الأداة هل هي دائرة أم صليب أم نقطة أم جميع هذه الاشكال مجتمعة.
- Color: لتحديد لون علامة التنقيط.
- Size: لتحديد حجمها (من الصغير إلى الكبير جدا).
- Auto-measure: عند تحفيز هذه الخاصية فان البرنامج يقوم بالعد اوتوماتيكيا عند كل نقرة ويقوم بتسجيل النتائج في نافذة النتائج.
- Auto-next slice: هذه الخاصية تعمل في حالة stack أو مكدس الصور حيث سينقل البرنامج بعد النقر من الشريحة الحالية إلى الشريحة التالية.
- Add to Overlay: تمكننا هذه الخاصية من العد ومعرفة أي الأجسام قد تم عدها لكي لا نعاود عدها من جديد.
- Add to ROI Manager: عند تحفيز هذه الخاصية فإن النقاط التي يتم تأشيرها سوف تضاف أوتوماتيكيا إلى نافذة إدارة مناطق العمل المهمة Regions of Interest Manager (ROI manager).

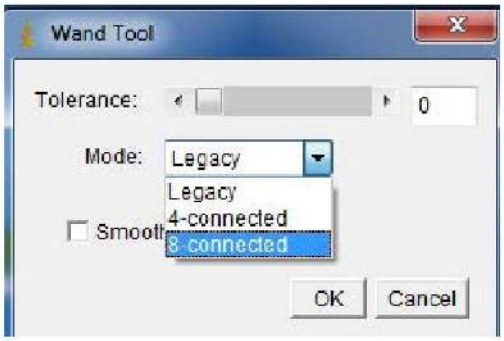
- Label Points: عند تحفيز هذه الخاصية فإن كل نقطة يتم تحديدها سيظهر بقربها رقم يمثل تسلسلها في العد.

أداة التنقيط المتعدد   :Multi-point Tool

تعمل هذه الأداة على تحديد نقاط متعدد وتسلك سلوك الأداة السابقة عندما نضغط على مفتاح Shift وعند الضغط على مفتاح Alt والنقر على أي نقطة مؤشرة فإن ذلك سيؤدي إلى خذفها كما في الأداة السابقة.

أداة العصا السحرية   :Wand Tool

تعمل هذه الأداة على تحديد منطقة معينة اعتمادا على لونها بحيث أن اللون يجب أن يكون موحد كما في حالة الصور بالأبيض والأسود أو الصور التي عملنا لها Threshold ولتحديد أي شكل ما علينا سوى النقر داخله.



عند النقر نقرتين مزدوجتين على أيقونة هذه الأداة أو الذهاب إلى Edit >> Option >> Wand Tool فإن مربع حوار تنظيم عمل الأداة سوف يفتح ويمكن شرح الخصائص التالية فيه:

- Tolerance: سوف تأخذ الأداة قيمة البكسل عند النقر كقيمة ابتدائية. ثم تتحدد منطقة مجاور لذلك البكسل بحيث أن قيمة كل بكسل في هذه المنطقة تقع ضمن مدى بين (initial value - tolerance to initial value + tolerance).

- 4-Connected: معناه فقط اربع بكسلات من البكسلات المجاور تعتبر مجاورة كما في الشكل أدناه وهذا يعني أن الأداة لا تستطيع تحديد خط مائل بعرض 1 بكسل لأن بقية مجاورات البكسل لا تقع على الخط المائل.

- 8-Connected: كل بكسل يعتبر مجاور لثمانية بكسلات كما في الشكل أدناه. وفي هذه الحالة فإن أداة الـ Wand سوف تحدد الخط المائل بسهولة وأكثر من هذا فاذا كانت هناك مساحة من لون معين قد تم قطعها بواسطة خط مائل بعرض واحد بكسل من غير لون فإن الأداة في هذه الحالة ستعبر الخط وتحدد المنطقة اللونية التي بعده.

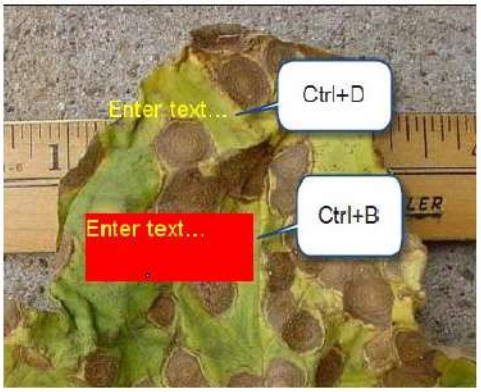
- Legacy: عند اختيار هذه الخاصية فلن يتم فحص أي بكسل مجاور ولن يستخدم أي Tolerance وهي الحالة القياسية للWand tool في برنامج ImageJ لغاية الإصدار الحالي 1.51r.

بقي أن نعرف أنه عند الضغط على مفتاح Shift مع التأشير سيؤدي إلى دمج المناطق التي تم تحديدها بينما الضغط على مفتاح Alt مع النقر سيؤدي إلى حذف تحديد المنطقة التي نقر عليها.

أداة كتابة النص Text Tool:

تستخدم هذه الأداة لإضافة نصوص إلى الصورة. تنشئ هذه الأداة مربع نص ممكن أن تكتب فيه سطر أو عدة سطور. ويمكن تعديل الخط ولونه وحجمه من خلال النقر نقرا مزدوجا على أيقونة الأداة وستفتح نافذة يمكن من خلالها اجراء التعديلات اللازمة

عند النقر على Ctrl+Y يمكنك تعديل خصائص النص المكتوب كاللون والحجم والتراصف (يمين، يسار، توسيط، ضبط)..ألخ وعند النقر على Ctrl + B فإن النص المكتوب سوف يثبت على الصورة هو وخلفيته (يمكن ان تكون باي لون ويتم اختيارها من القائمة المنسدلة Bkgd في نافذة خصائص النص أعلاه) أما لو نقرنا على Ctrl + D فإن النص المكتوب سيثبت على الصورة بدون الخلفية.



أداة العدسة المكبرة   Magnification Glass Tool:

تعمل هذه الأداة على تكبير وتصغير الصورة التي امامك. عند تنشيط الأداة والنقر بالزر الأيسر للماوس فإنها تقوم بتكبير الصورة عند كل نقرة اما عند النقر بالزر الأيمن فيحدث العكس وكذلك يتم التصغير بالضغط على مفتاح Alt ويمكن أن نكبر ونصغر الصورة عند استخدام + و – بعد تنشيط الأداة كذلك فإن استخدام Shift مع سحب الماوس سيؤدي إلى تكبير منطقة السحب والتركيز عليها.

أداة التمرير   Scrolling Tool:

تمكننا هذه الأداة من تمرير الصور التي تكون أكبر من الإطار لنتمكن من استعراضها. ينمكن تنشيط هذه الأداة في أي وقت (ما عدا في حالة العمل باداة Text Tool) وذلك من خلال الضغط على مفتاح Space وتحريك الصورة بالماوس عن طريق السحب.

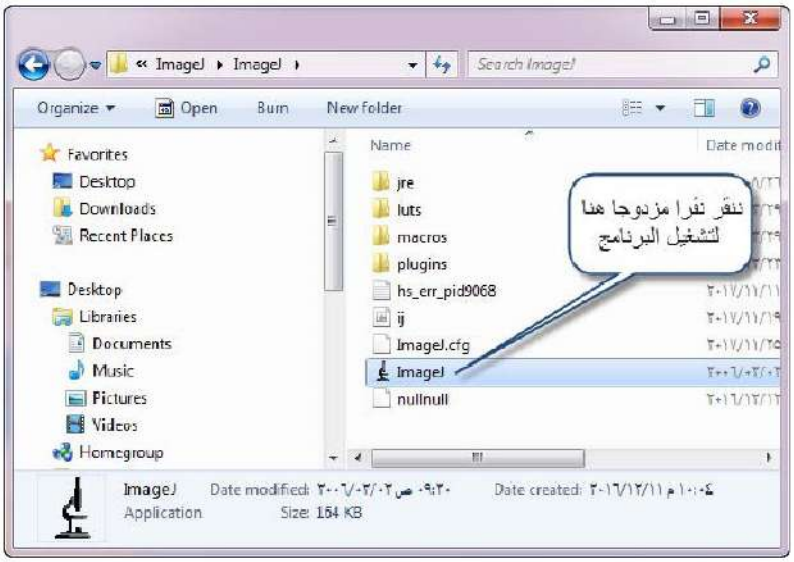
أداة التقاط اللون   Color Picker:

تستخدم هذه الأداة لالتقاط لون معين من أي صورة مفتوحة واستخدامه كلون للرسم ويمكن معرفة لون الكتابة والخلفية الحاليين من خلال ايقونة الأداة نفسها حيث يمثل لون قطارة العين لون الكتابة بينما لون إطار الأيقونة يمثل لون الخلفية. النقر المزدوج على الأيقونة سيظهر نافذة الأداة والتي نستطيع من خلالها اختيار لون كتابة وخلفية. الضغط على مفتاح Alt أثناء الالتقاط سيؤدي إلى جعل اللون الملتقط لون خلفية.

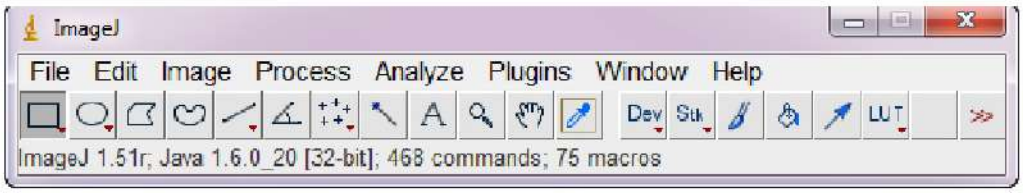
العمليات الأساسية للعمل على برنامج ImageJ

تشغيل البرنامج

يتم تشغيل البرنامج من خلال النقر المزدوج على أيقونة البرنامج في المجلد ImageJ:



فتظهر لنا نافذة البرنامج الرئيسية:



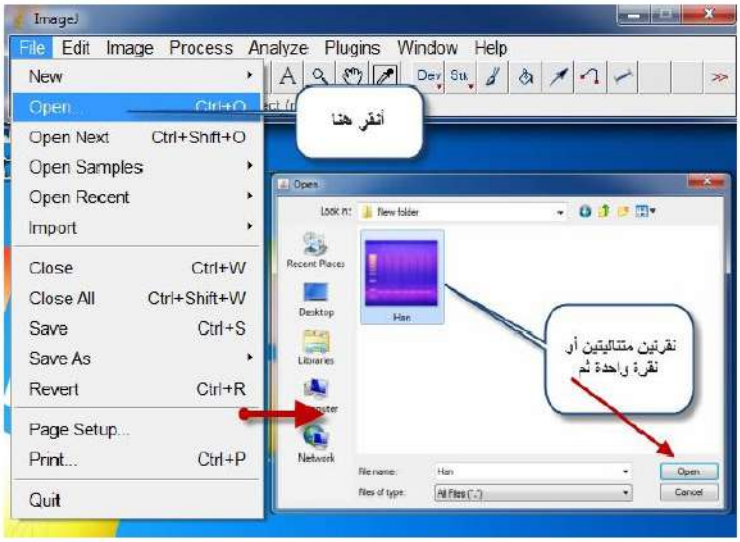
وهذه النافذة كما اسلفنا يمكن من خلالها اجراء كل العمليات اللازمة لتحليل الصور الرقمية وكما هو ملاحظ فإن هذه النافذة لا تحتوي على مساحة عمل Work area كما في باقي تطبيقات Windows حيث يتم تنفيذ كل العمليات بواسطة نوافذ منفردة تفتح وتغلق حسب الحاجة.

فتح ملف جديد

يتم فتح الملف بعدة طرق يمكن ايجازها بالتالي:

1. من خلال سحب ملف الصورة وافلاته على نافذة البرنامج.

2. عن طريق الذهاب إلى قائمة File >> Open (or Ctrl+O) ثم نذهب من خلال نافذة المتصفح إلى مكان الصورة وننقر عليها نقرا مزدوجا أو نقرة واحدة ثم ننقر على Open.



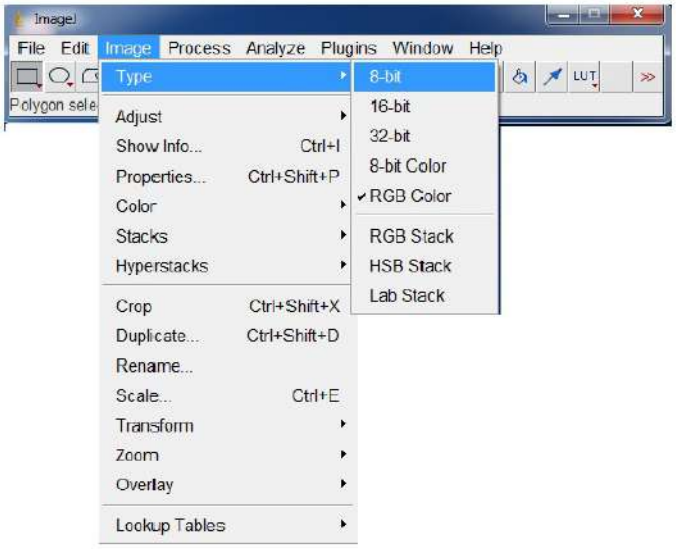
3. File >> Open Next (or Ctrl+Shift+O) يقوم بفتح ملف الصور التالي (إن وجد) في نفس المجلد الذي اختير منه الملف الحالي.
4. File >> Open Samples يفتح قائمة فرعية تحتوي على امثلة كثيرة من الصور المخزنة ضمن البرنامج والتي يمكن استخدامها للتدريب.
5. File >> Open Recent: يفتح قائمة فرعية تتضمن أسماء آخر 15 ملف تم فتحه حيث يمكن النقر على أي واحد منها بزر الماوس الأيسر ليتم فتحه من جديد.

حفظ الصور

يتم حفظ الصور من خلال الذهاب إلى File >> Save (Ctrl+S) حيث سيتم حفظها بنفس تنسيق الملف الأصلي للصورة (JPG مثلا) أما أذا اخترنا File >> Save as فيمكن حفظها بتنسيقات أخرى مثل Tiff, Ping ..ألخ حيث يمتلك البرنامج القدرة على الحفظ والتحويل لعدد كبير من تنسيقات الصور الرقمية.

تحويل الصور إلى تدرج لوني لاى آخر

يمكن تحويل الصور من صور ملونة RGB إلى تدرج الرمادي 8-bit أو 16-bit أو 32-bit فيتم ذلك بالذهاب إلى قائمة Image >> Type >> 8-bit



وهذه الخطوة عادة تعتبر الخطوة الثانية التي تلي فتح الصورة في معظم عمليات التحليل للصور الرقمية وهي من الخطوات المهمة التي تعتمد عليها كل عمليات التحديد والقياس.

إجراء عمليات القياس والعد للأجسام الموجودة في الصور الرقمية

تعد هذه العمليات من أهم عمليات تحليل الصور الرقمية في المجال البايولوجي والتي يتم من خلالها استحصال البيانات من الصور الرقمية لغرض اجراء التحاليل الإحصائية وتفسير نتائج التجارب. وبشكل عام فإن برنامج ImageJ يعتمد في تحليل الصور الرقمية على عمليتين أساسيتين يجب على المستخدم اتقانهما لضمان دقة النتائج وهما **الدقة في تحديد المنطقة التي تهمنا من الصورة Region of Interest والدقة في تعيير وحدات القياس Scaling والتي يعتمد عليها البرنامج في حساب النتائج** أي ان اساس عمل البرنامج هو التحديد والتعيير ثم القياس.

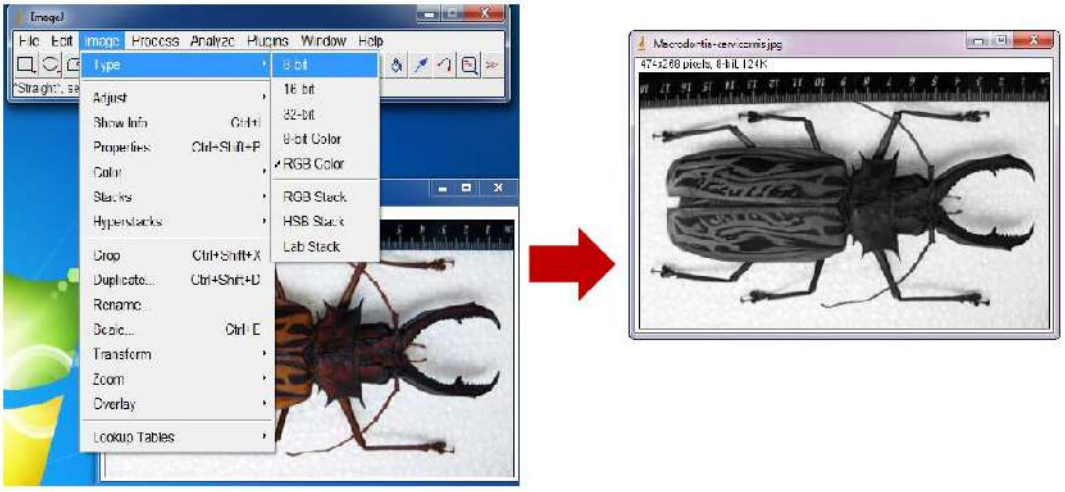
تحضير الصور الرقمية للتحليل

هناك عدة خطوات يجب إجرائها لتحضير الصور الرقمية لغرض إجراء القياسات مثل المسافة، الطول، العرض، الحجم، زاوية الميل ..ألخ للأجسام الموجودة فيها وهي كما يلي:.

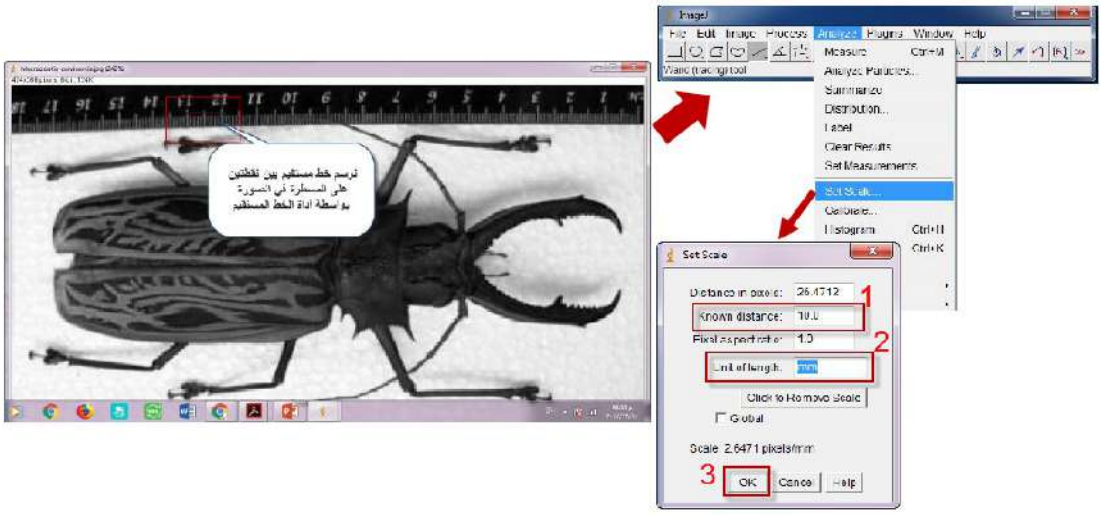
1. يجب أن تلتقط الصورة بأعلى درجة وضوح ممكنة High resolution فكلما زادت درجت الوضوح كلما زادت دقة النتائج. كما يفضل أن تكون الصورة من نوع bmp أو tiff أو أي صورة نقطية أخرى وليس jpg أو jpeg لأن هذا النوع من الصور قليل الوضوح عادة ويتلف باستمرار كلما فتح أو أعيد حفظه حيث يفقد في كل مرة جزء من دقته.

2. يجب أن تحتوي الصور على جسم معروف القياس كأن يكون مسطرة قياس عادية توضع بقرب الجسم المراد اجراء القياسات له ويصوران معا لغرض تعيير قياسات البرنامج على أساسه.

3. يتم فتح الصور بأحد طرق الفتح التي شرحت سابقا.
4. يتم تحويلها إلى صورة 8-bit أو 16-bit كحد اعلى كما تعلمنا سابقا.



5. تعيير القياسات اعتمدا على الجسم المعروف القياس في الصورة من خلال استخدام احدى أدوات تحديد المساحات والأطوال فمثلا نستخدم الخط المستقيم لتحديد 1 سم من المسطرة الموجود في الصورة ثم الذهاب إلى قائمة Analyze >> Set Scale >> ثم نكتب الطول الحقيقي في خانة Known distance ثم نكتب وحدات القياس (ملم أو سم مثلا) في خانة Unit of length ثم ننقر OK.



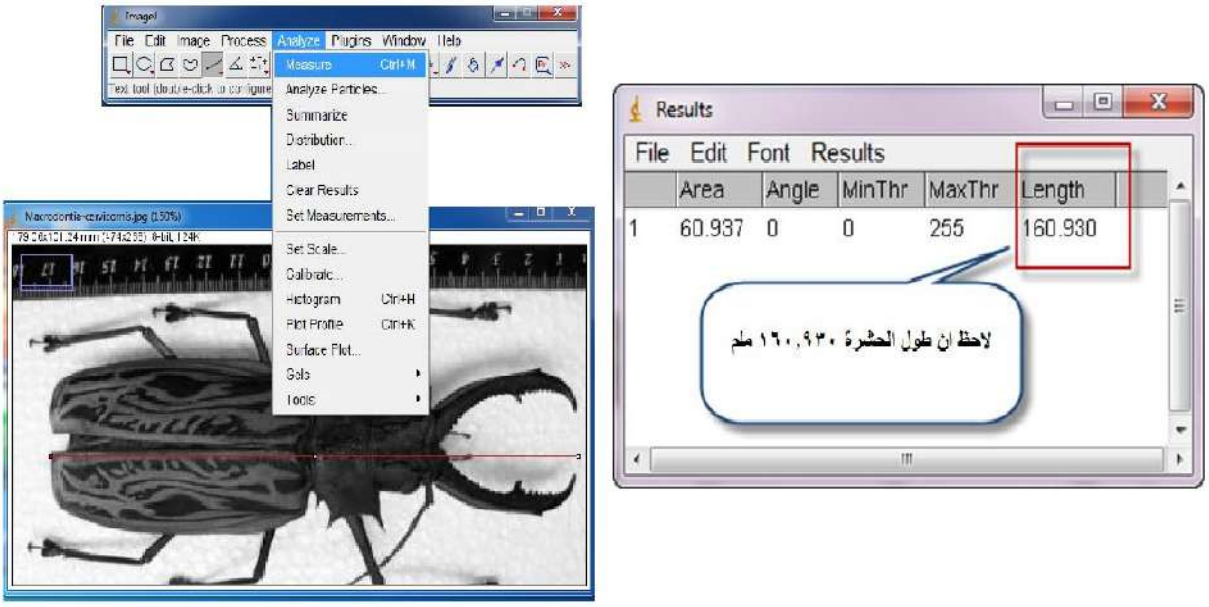
6. الآن أصبحت الصورة جاهزة لإجراء القياسات عليها.

قياس الأطوال والمساحات والزوايا

لقياس طول الحشرة نتبع ما يلي:

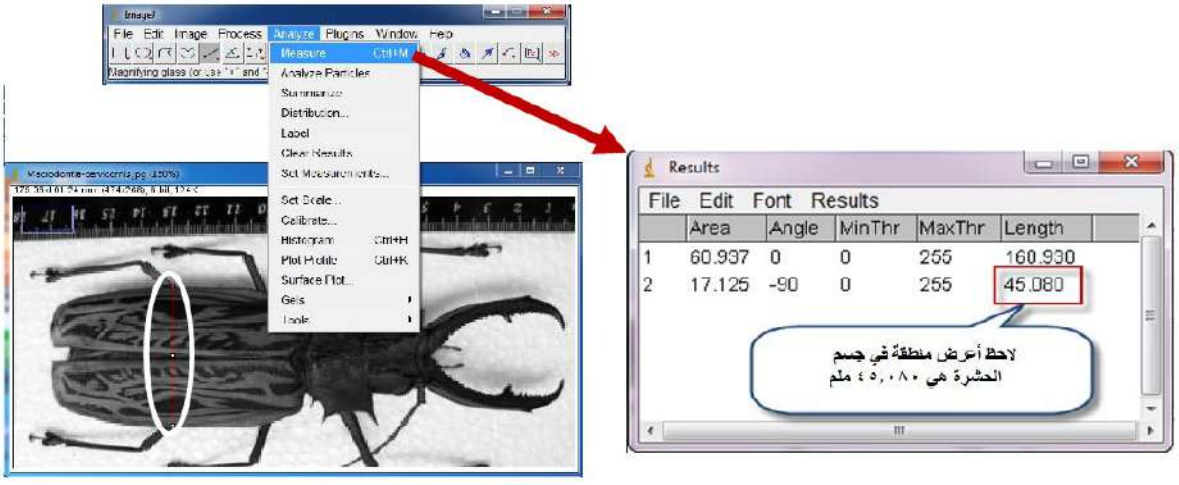
1. نرسم خط مستقيم على طول الحشرة.

2. نذهب إلى قائمة Analyze>> Measure (or Ctrl+M) وستظهر النتائج في نافذة جديدة.



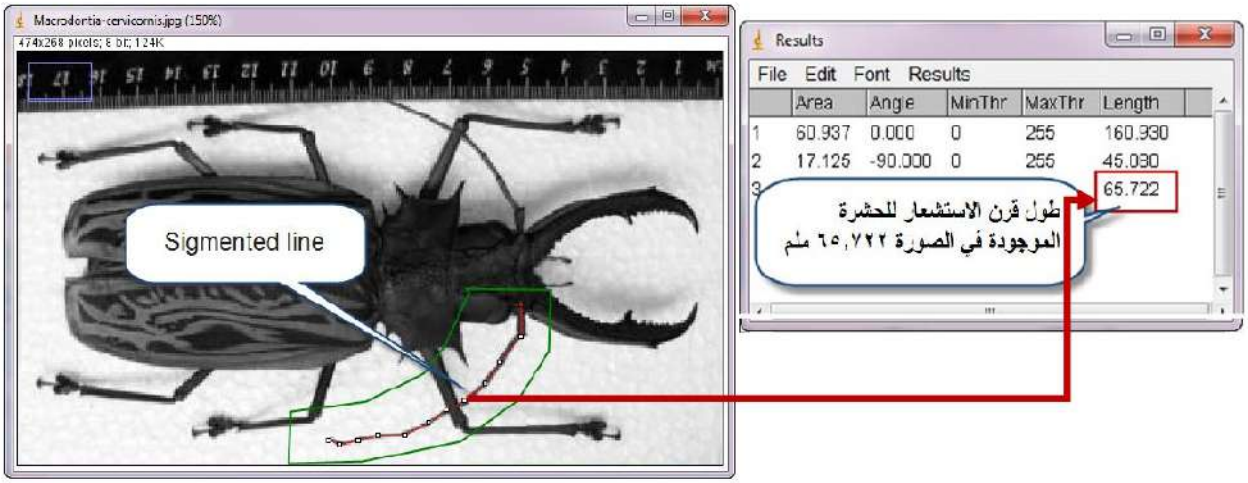
ولقياس العرض نتبع التالي:

1. نرسم خط مستقيم على طول اعرض منطقة في صورة الحشرة.
2. نذهب إلى قائمة Analyze>> Measure (or Ctrl+M) وستظهر النتائج في نافذة جديدة.



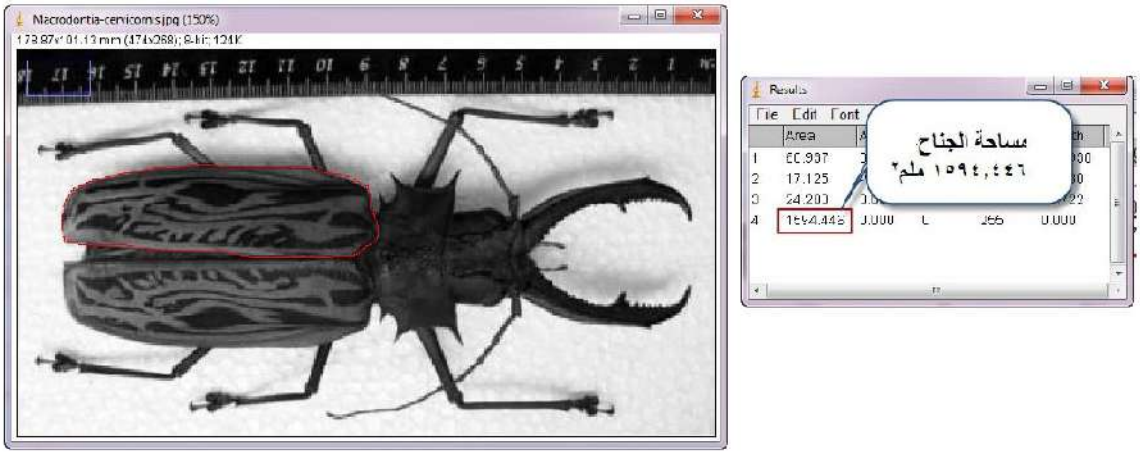
لقياس طول جسم غير مستقيم تذكر دائما وكما اسلفنا انك يجب ان تختار الأداة الملائمة للتحديد لأن عملية القياس تعتمد تماما على دقة تحديد الشيء الذي نريد قياسه وأفضل أداة لقياس طول جسم غير مستقيم هي أداة الخط المضلع Segmented Line تتم العملية كما يلي:.

1. ارسم خط مضلع على طول الجسم المراد قياس طوله ويتم اختيار الخط المضلع من خلال النقر على ايقونة Line بالزر الأيمن للماوس واختيار Segmented Line.
2. نذهب إلى قائمة Analyze >> Measure (Ctrl+M) فتظهر النتائج في نافذة النتائج المستقلة.



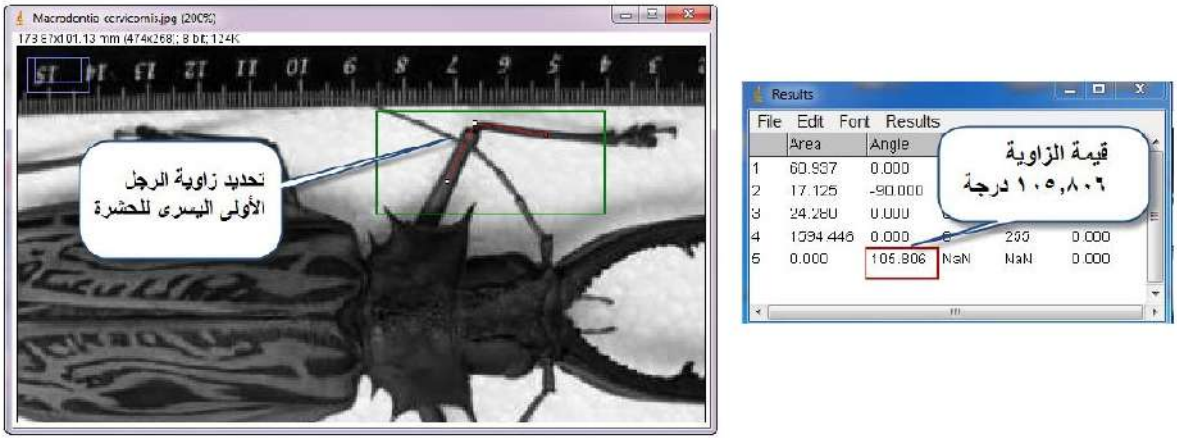
لقياس مساحة الجناح نتبع الخطوات التالية:.

1. نختار أداة التحديد الحرة Free hand selection tool ونقوم بتحديد الجناح الذي نريد قياس مساحته كما في الشكل التالي.
2. نذهب إلى قائمة Analyze >> Measure (Ctrl+M) فتظهر النتائج في نافذة النتائج.

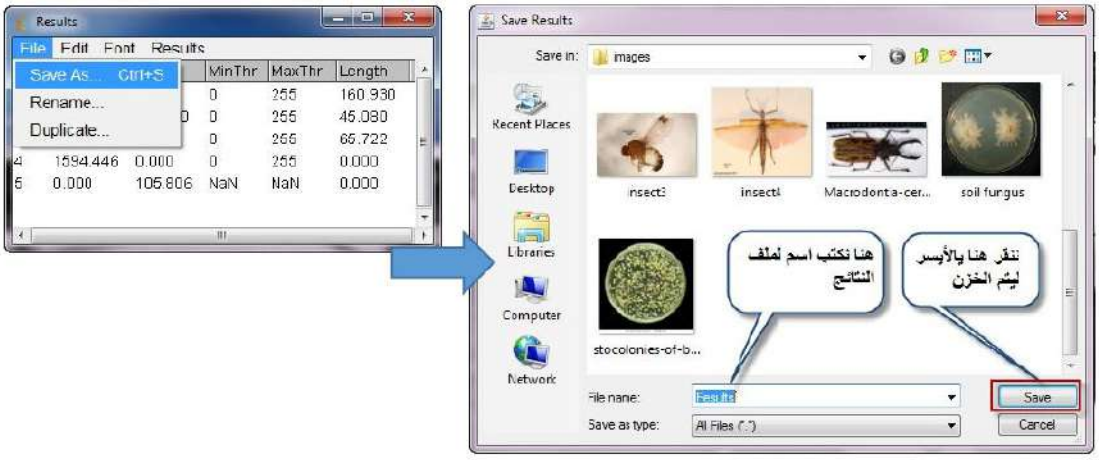


لقياس زاوية الرجل الأولى اليسرى للحشرة في مثالنا الحالي نتبع ما يلي:.

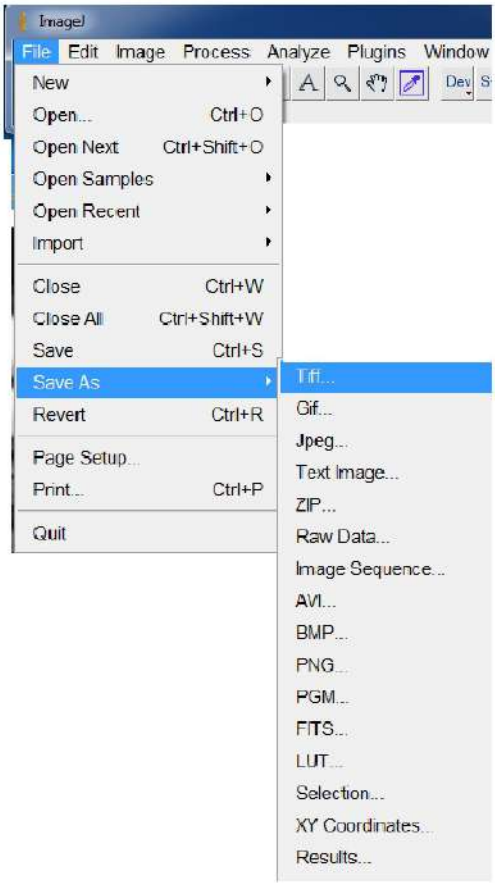
1. نختار أداة قياس الزوايا Angle tool ونرسم ضلعي زاوية مع امتداد عقلتي الرجل كما في الشكل أدناه.
2. نذهب إلى قائمة Analyze >> Measure (Ctrl+M) فتظهر النتائج في نافذة النتائج.



والآن بعد أن أصبح لدينا مجموعة من نتائج القياسات يمكننا خزنها على شكل ملف أكسل Excel Sheet من خلال الذهاب إلى قائمة File >> Save as في نافذة النتائج ثم نتصفح للمكان الذي نريد الخزن فيه وننقر على Save.



حفظ الصور الدقيقة المعالجة



الصور الرقمية الملتقطة باستخدام الكاميرات الرقمية أو أجهزة الماسح الضوئي غالبا ما تخزن على شكل ملفات JPEG وهذا النوع من الملفات كما ذكرنا سابقا يعتمد نوع من ضغط الذاكرة لتقليل حجم الصور على حساب الدقة مما يؤدي إلى ضياع جزء من بيانات الصورة وهذا النوع من الصور يفقد جزء من دقته في كل مرة يفتح أو يعدل أو يعاد خزنه لذا أصبح من الواجب خزن الصور بتنسيق ثابت الدقة مثل TIFF مثلا ويتم ذلك من خلال الذهاب إلى قائمة File >> Save as >>tiff.

إجراء عملية العد في برنامج ImageJ

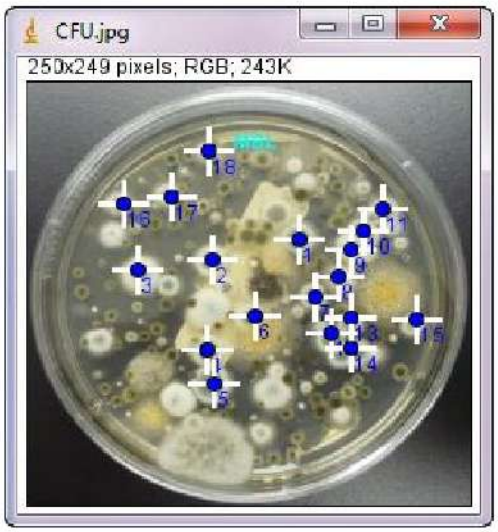
يمكن إجراء عمليات العد للأجسام الموجودة في الصورة مثل عد المستعمرات والخلايا ...ألخ أما يدويا أو اوتوماتيكيا.

لإجراء العد اليدوي نتبع الخطوات التالية:

1. نفتح الصورة.

2. نستخدم أداة التنقيط المتعدد Multipoint tool.

3. ننقر على الأجسام المراد عدها بأيسر الماوس لتعليمها.



4. بعد الإنتهاء نذهب إلى Analyze >> Measure (Ctrl+M) فتظهر النتائج في نافذة النتائج وهي عبارة عن عدد النقاط مع احداثيات موقع كل نقطة في الصورة.

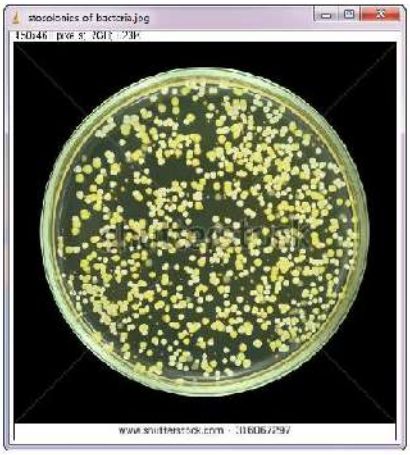
Results

File Edit Font Results

	Area	Mean	Min	Max	X	Y	IntDen	RawIntDen
1	0	127	127	127	153	92	127	127
2	0	139	139	139	104	104	139	139
3	0	184	184	184	62	110	184	184
4	0	123	123	123	101	157	123	123
5	0	124	124	124	105	177	124	124
6	0	129	129	129	128	137	129	129
7	0	126	126	126	162	126	126	126
8	0	200	200	200	175	114	200	200
9	0	184	184	184	182	98	184	184
10	0	134	134	134	189	87	134	134
11	0	145	145	145	200	74	145	145
12	0	137	137	137	171	147	137	137
13	0	152	152	152	182	138	152	152
14	0	151	151	151	182	156	151	151
15	0	208	208	208	219	139	208	208
16	0	184	184	184	54	71	184	184
17	0	177	177	177	81	67	177	177
18	0	205	205	205	102	40	205	205

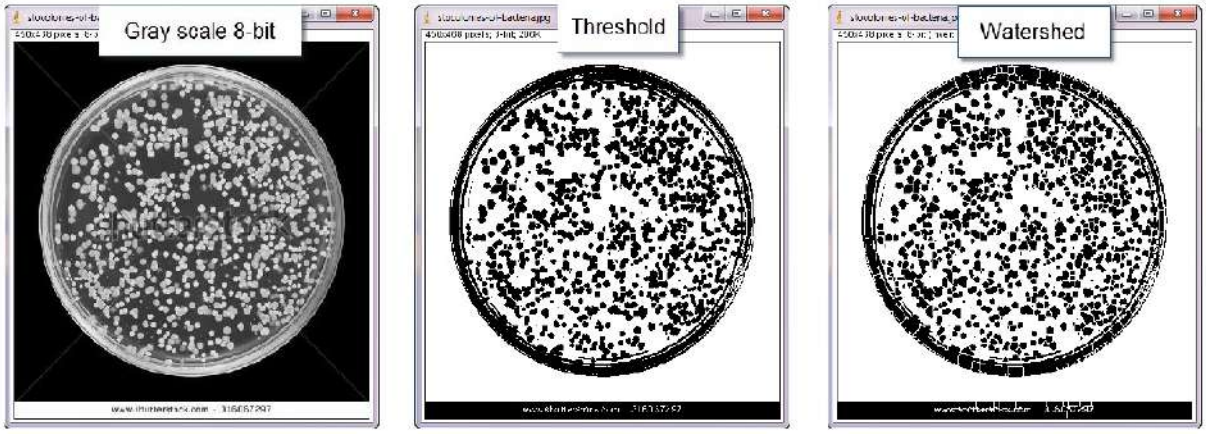
عدد المستعمرات التي تم عدها يدويا

مواقع المستعمرات في الصورة

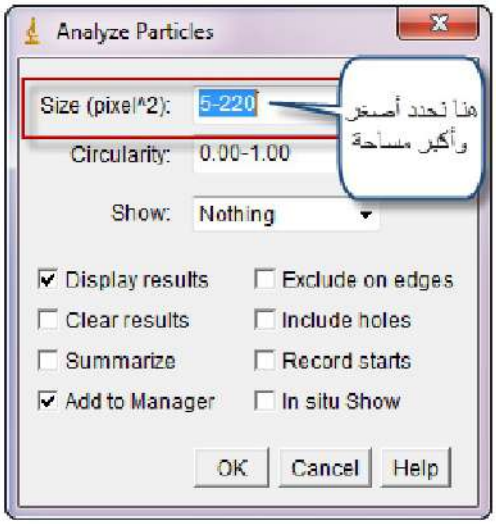


لأجراء العد الأوتوماتيكي نتبع ما يلي:.

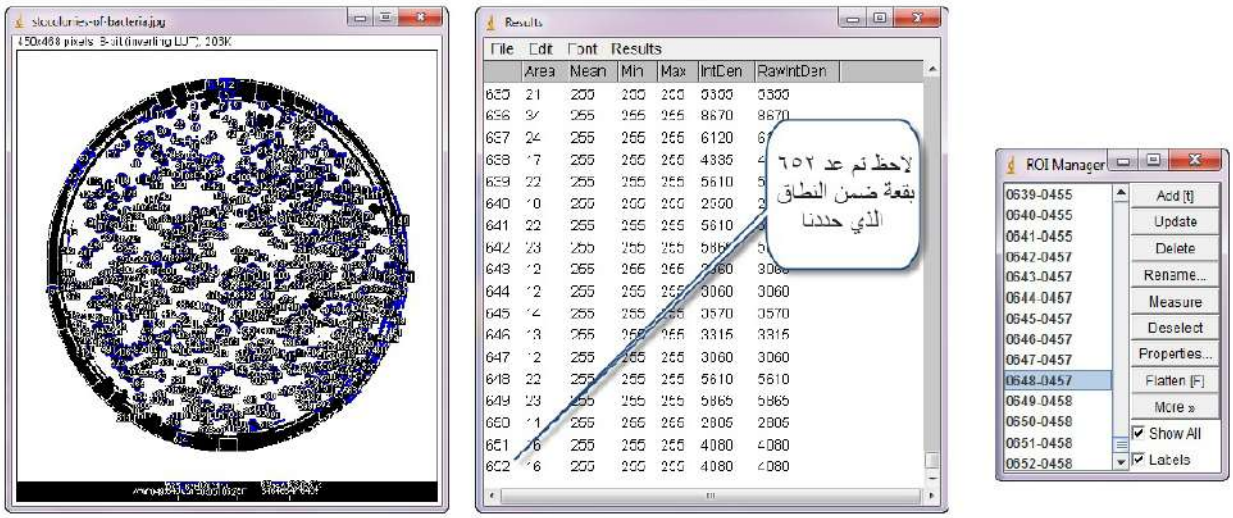
1. نفتح الصورة.
2. نحول الصورة إلى تدرج الرمادي 8-bit من خلال الذهاب إلى قائمة Image >> Type >> 8-bit .
3. نحول الصورة من الرمادي إلى الأبيض والأسود من خلال الذهاب إلى قائمة Image >> Adjust >> Threshold (Ctrl+Shift+T).



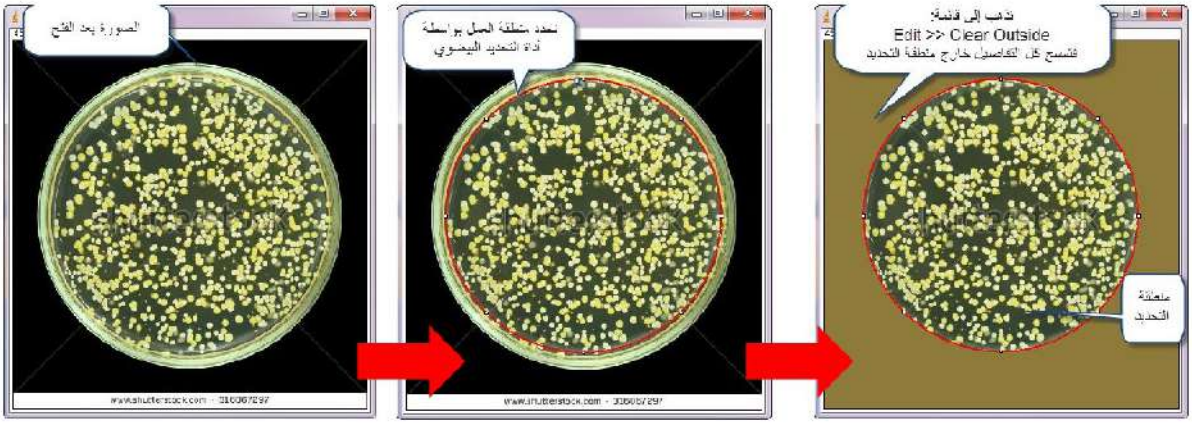
4. نعمل فصل للأجسام المندمجة مع بعضها في الصورة (مثلا اندماج مستعمرتين في الطبق) من خلال الذهاب إلى قائمة Process >> Binary >> Watershed.
5. نحدد أصغر وأكبر نقطة يمكن عدها وذلك باستخدام أداة الـ Wand Tool حيث ننقر على أصغر دقيقة نريد عدها فتقوم الأداة بتحديدها، بعدها Ctrl+M فتظهر شاشة النتائج وفيها مساحة هذه النقطة بالبكسل. نكرر العملية لعدة نقاط لتحديد أصغر وأكبر مساحة ممكن ان نعتبرها مستعمرة في الصورة ثم نغلق هذه النافذة.
6. نذهب إلى قائمة Analyze >> Analyze particles ثم نحدد أكبر وأصغر قطر جسم نريد عده.



7. ثم ننقر OK وستفتح لنا نافذة Region Of Interest manager وفيها كل مواقع الدقائق أو الأجسام التي تم حسابها كما وتضاف ارقام العد لكل جسم تم عده على الصورة نفسها إضافة إلى نافذة النتائج والتي يمكن خزنها كما تعلمنا سابقا.



بقي أن نعرف أن دقة الحساب باستخدام طريقة العد الأوتوماتيكي تعتمد بشكل أساس على تحديد منطقة العد أي المنطقة التي نهتم بها ROI وكما تلاحظ في المثال أعلاه أنه حتى حافة الطبق أصبحت من ضمن الأجزاء التي تم عدها ويمكن تلافي مثل هذه الحالة من خلال التخلص من الأجزاء غير المرغوبة في الصورة ويمكن عمل هذا الشيء عن طريق تحديد منطقة العمل (أو العد أو الاهتمام) ROI ومسح كل شيء خارجها قبل الشروع بالعمل أي بعد فتح الصورة مباشرة. وفي مثالنا أعلاه فإن ROI دائرية الشكل تماما ويمكن تحديدها بأداة التحديد البيضوي Oval Selection Tool ثم نذهب إلى قائمة Edit >> Clear Outside فيتم مسح كل تفاصيل الصورة خارج منطقة التحديد وتصبح منطقة العمل الخاصة بنا خالية من التشويش وجاهزة للعمل. بعدها نكمل باقي الخطوات كما تقدم شرحه أعلاه.



ملاحظة: أحيانا قد لا يكون الشخص الذي يقوم بالعمل دقيق جدا في تحديد مساحات الأجزاء الواجب عدها أوتوماتيكيا (المدى من أصغر مساحة إلى أكبر مساحة) بحيث تترك البقع الخارجة عن هذا المدى بدون عد ولتصحيح عملية العد يمكننا تكبير الصورة والبحث عن الأجزاء غير المحسوبة والتي نعتقد أنها مستعمرات في مثالنا أعلاه وهذا سهل جدا لأنها ستكون غير محددة وغير مرقمة كباقي الأجزاء، بعد ذلك نقوم بعدها يدويا بأداة التنقيط المتعدد ثم Ctrl+M فيضاف عددها إلى نافذة النتائج. كذلك الحال بالنسبة للمستعمرات المندمجة والتي لم يستطع البرنامج فصلها باستخدام إيعاز Process>> Binary >> Watershed حيث نستطيع عدها يدويا من خلال بأداة التنقيط المتعدد عدة مرات بعدد المستعمرات التي نعتقد أنها مدمجة. كذلك الحال بالنسبة للمساحات التي تم عدها وهي ليست مستعمرات فيمكننا عدها يدويا بهذه الطريقة وطرح عددها من العدد الكلي الذي حسبه البرنامج اوتوماتيكيا.

من الاستخدامات الأخرى لهذه الطريقة هو استخدامها في عد النجوم ضمن ROI محددة حيث يستخدم هذا البرنامج بكثرة في المجالات الفلكية لاكتشاف الأجرام التي ظهرت حديثا في نطلق معين من الفضاء، كذلك فإنها تستخدم بكثرة في تحديد عدد واقطار دقائق المركبات النانوية بعد تصويرها بالمجهر الإلكتروني وتستخدم أيضا في تحديد أقطار واحجام دقائق التربة وكذلك في تقدير عدد الأشخاص في تجمع معين (احتفال أو ما شابه). يعني ببساطة يمكن استخدام هذه الطريقة لأي صورة تحتوي اجسام يمكن تحديد مدىً (أصغر أو أكبر مساحة أو قطر) لها.

تقدير نسبة الضرر في النسيج النباتي

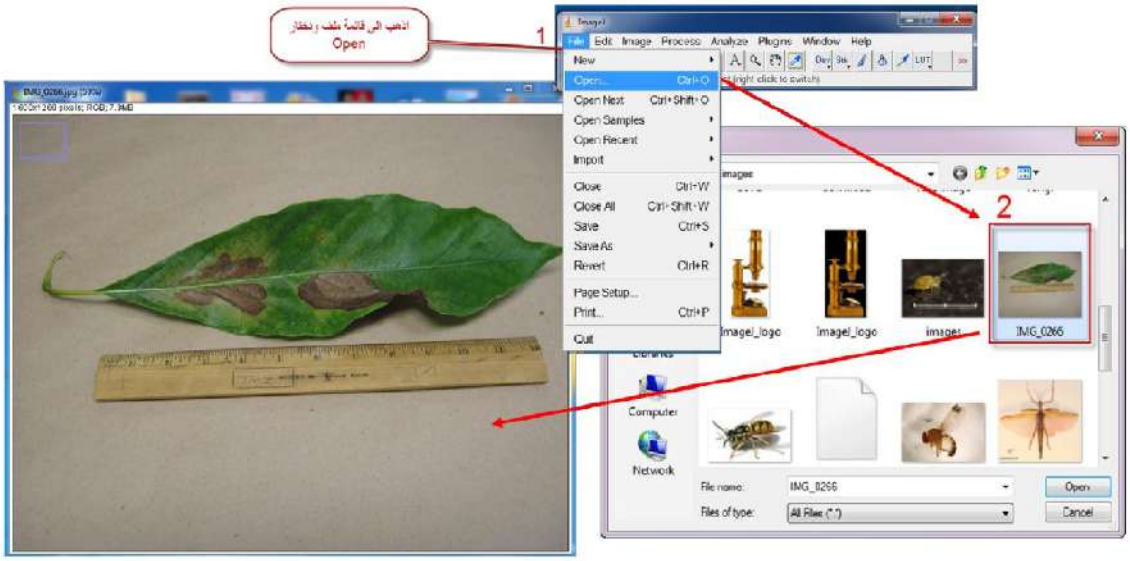
تعتبر عملية تقدير نسبة الضرر أو النسبة المئوية للضرر من الأمور المهمة في دراسة الأمراض النباتية خصوصا تلك التي تتعلق بتبقعات الأوراق والثمار حيث أنها تعتبر من المؤشرات المهمة التي يمكن من خلالها حساب مدى الضرر الذي تعرضت له الأنسجة النباتية نتيجة الإصابة بالمسبب المرضي وبالتالية تقدير شدة الإصابة. ويستخدم برنامج Image J لإجراء مثل هذه الحسابات بدقة عالية من خلال تقدير المساحة الكلية للنسيج المصاب (مساحة الورقة المصابة مثلا) ثم تقدير مساحات البقع الموجودة على النسيج النباتي وبعد ذلك يتم إجراء العملية الحسابية البسيطة في المعادلة أدناه لتقدير نسبة الضرر أو النسبة المئوية للضرر (شدة الإصابة):

النسبة المئوية للضرر = (مساحة البقع / المساحة الكلية للنسيج المصاب) × 100

ويعتمد برنامج Image J على قدرته في التحديد اللوني لتحديد البقع بدقة عالية ليتمكن بعد من حساب مساحتها لذ يصبح من اللازم أن تكون الصور ذات دقة مقبولة مع مراعاة الانتباه للخلفيات فكلما كانت داكنة أكثر يصبح تحديد النسيج في الصورة أكثر دقة كما يجب أن لا ننسى وضع جسم معروف القياس في الصورة (كأن يكون مسطرة قياس عادية) لنتمكن من معايرة البرنامج عليه كما تعلمنا سابقا لأن أي عملية حسابية تجرى في هذا البرنامج تعتمد واقعا على مبدأين، يتمثل المبدأ الأول **بتحديد الجسم أو منطقة الاهتمام ROI** وهذه تحتاج إلى الدقة والمهارة والخبرة والتي يكتسبها المستخدم من خلال التمرين، أما المبدأ الثاني فيتمثل بوجوب **وجود جسم معروف القياس في الصورة الرقمية**. علما ان هذا التكنيك يمكن استخدامه لتقدير شدة الإصابة للمساحات الحقلية الكبيرة من خلال الاعتماد على الصور الجوية أو صور الأقمار الصناعية إذا ما توفر مقياس رسم مناسب في الصور.

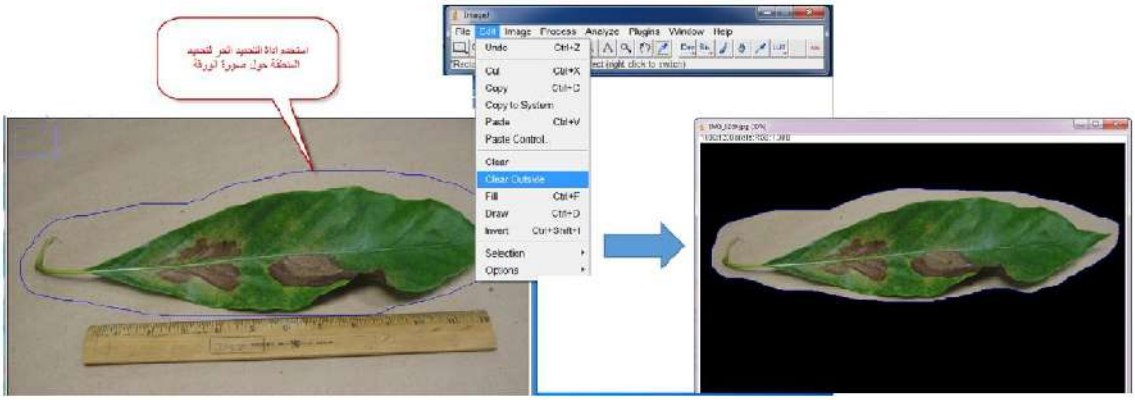
ويمكن إجمال عملية التقدير بالخطوات التالية:

1. تتضمن الخطوة الأولى فتح الصورة الرقمية قيد الدراسة من خلال الذهاب إلى قائمة File واختيار Open فتفتح نافذة المتصفح والتي من خلالها نتصفح للوصول إلى الصورة والتي يمكن فتحها بالنقر نقرتين متتاليتين عليها أو من خلال النقر على الزر Open اسفل يمن النافذة وكما في الشكل التالي:



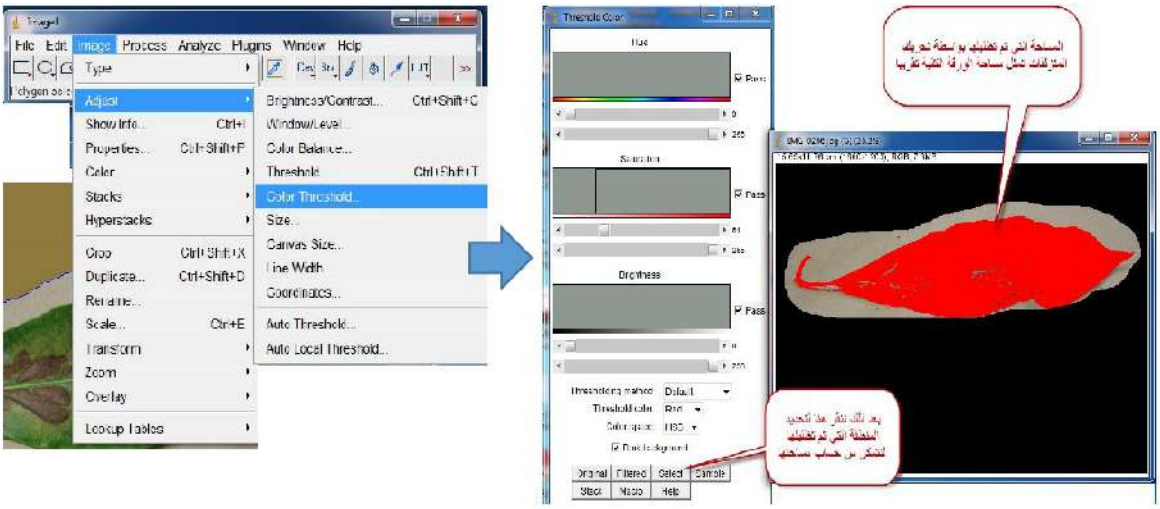
2. الخطوة الثانية تتضمن معايرة القياسات وتتم من خلال رسم خط مستقيم بين أي نقطتين على المسطرة التي في الصورة وليكن بين (1 و 2 سم) ثم الذهاب إلى قائمة Analyze ونختار منها Set scale فتظهر نافذة حوار نذهب إلى خانة known distance ونضع فيها الرقم 1 وفي خانة Unit of length نكتب cm أي نخبر البرنامج أن المسافة بين النقطتين هي 1 سم بعد ذلك ننقر على Ok فتنتهي عملية المعايرة وكما في الشكل التالي:

3. تحديد منطقة الاهتمام ROI (الورقة المصابة) ويمكن إجراء هذه العملية يدويا بإحدى طرق التحديد التي تعلمناها سابقة باستخدام أدوات التحديد البسيط خصوصا إذا كانت الورقة غير معقدة الشكل أو أن عدد العينات قليل حيث أن الهدف من هذه العملية هو تحديد الورقة بشكل كامل أولا لحساب مساحتها وبعد ذلك تحديد كل بقعة فيها وحساب مساحتهم مجتمعين لتقدير نسبة الأجزاء المصابة من الورقة (شدة الإصابة). ولتسهيل هذه العملية سنتعلم تكنيك جديد يعتمد بالأساس على التباين بين الألوان Color threshold لتحديد المناطق التي نريد حساب مساحاتها بدقة قد لا توفرها أدوات التحديد البسيط (مثل الخط أو الدائرة أو التحديد الحر ..ألخ) وتتضمن هذه العملية استخدام أداة التحديد الحر لعمل منحنى حول صورة الورقة ومسح كل ما هو خارج المنحنى من تفاصيل الصورة لتلافي التشويش الذي قد يحصل خلال هذه العملية نتيجة كثرة الألوان المتداخلة في مثل هذه الصور وتتم هذه العملية من خلال الذهاب إلى قائمة Edit واختيار Clear outside فيتم مسح كل شيء خارج المنحنى الذي تم تحديده وكما في الشكل التالي:

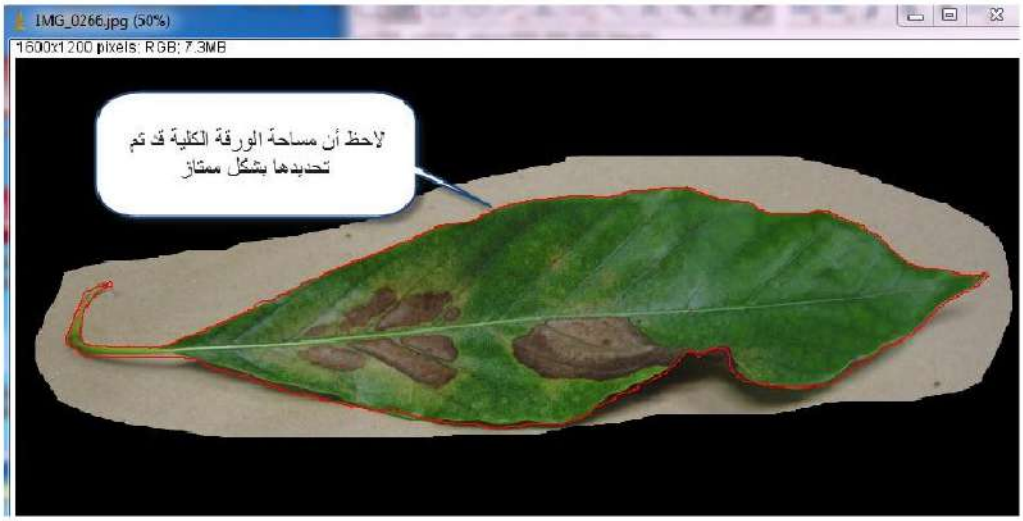


ملاحظة مهمة: تأكد من كون خلفية الصورة بعد المسح داكنة قدر الإمكان كما ان لون الخلفية يجب ان لا يتداخل مع ألوان الصورة لتلافي التشويش على عملية التحديد حيث تلاحظ أننا اخترنا اللون الأسود لعدم تداخله مع باقي الألوان. ويتم ذلك من خلال الذهاب إلى قائمة Edit ثم اختيار Options ثم Colors فتظهر نافذة حوار نذهب إلى خانة Background ونختار Black ثم OK.

4. إجراء عملية التحديد اللوني Color thresholding من خلال الذهاب إلى قائمة Image ثم Adjust ثم اختيار Color threshold فتظهر نافذة تحتوي على ثلاثة مناطق تحكم الأولى تتحكم بالتدرج اللوني Hue والثانية تتحكم بالتشبع اللوني Saturation والثالثة تتحكم بدرجة السطوع Brightness وكل منطقة تحتوي على شريطي تحكم لتحديد النطاق اللوني المناسب بواسطة منزلقات يتم تحريكها باستخدام الماوس ويتم التحديد عادة ابتداءا من ضبط درجة السطوع ثم التشبع اللوني ثم تدرج الألوان بحيث يتم تظليل المنطقة التي نريد قياس مساحتها بشكل كامل بلون التحديد Threshold color الذي يمكن تغييره حسب الرغبة من خانة Threshold color في نفس النافذة. والشكل التالي يمثل الخطوات التي تم شرحها أعلاه:

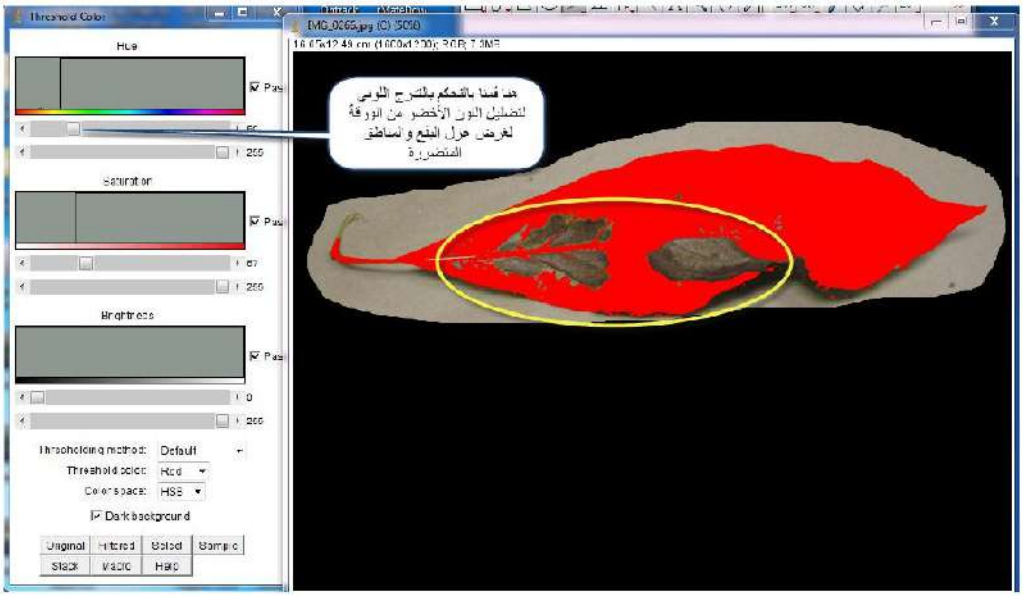


5. لتحديد المنطقة المظللة لغرض حساب المساحة الكلية لها ننقر على الزر Select كما في الصورة أعلاه فيتم تحديد المنطقة المظللة كما في الصورة ادناه ويمكن تنظيف المناطق الغير مرغوب بها والتي تحددت بسبب التشويش الناتج من تداخل الألوان بواسطة أداة Selection Brush Toll والتي يمكن تفعيها من خلال النقر بزر الماوس الأيسر على ايكونة Oval selection الموجودة في شريط الأدوات والتي شرحت سابقا بحيث يصبح الشكل النهائي للصور كما في الشكل التالي:

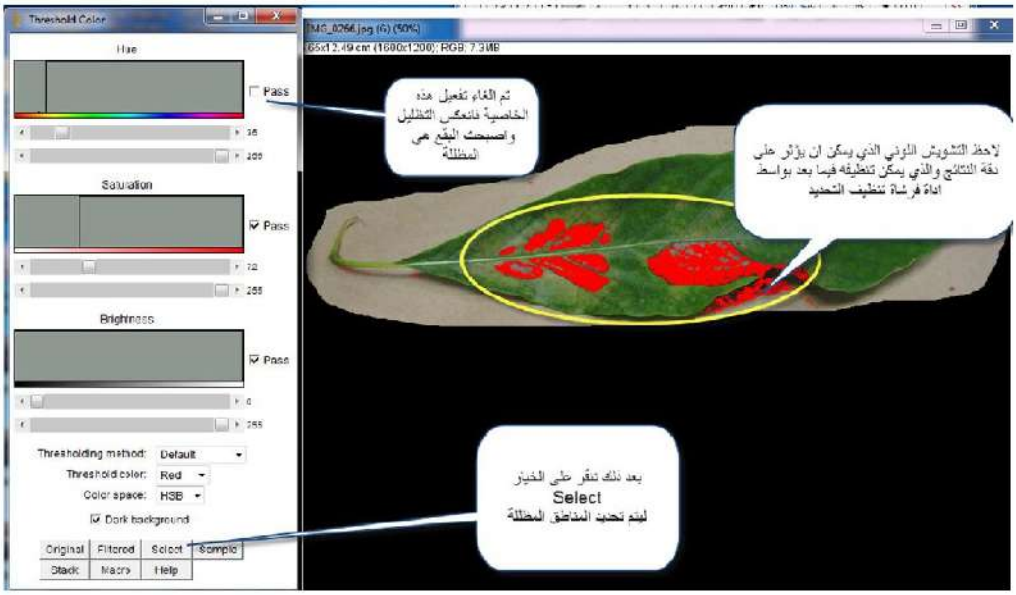


6. ولحساب المساحة الكلية بالسنتمتر المربع نذهب إلى قائمة Analyze ونختار Measure أو نضغط على Ctrl+M فتظهر النتائج في نافذة النتائج كما في الشك التالي:

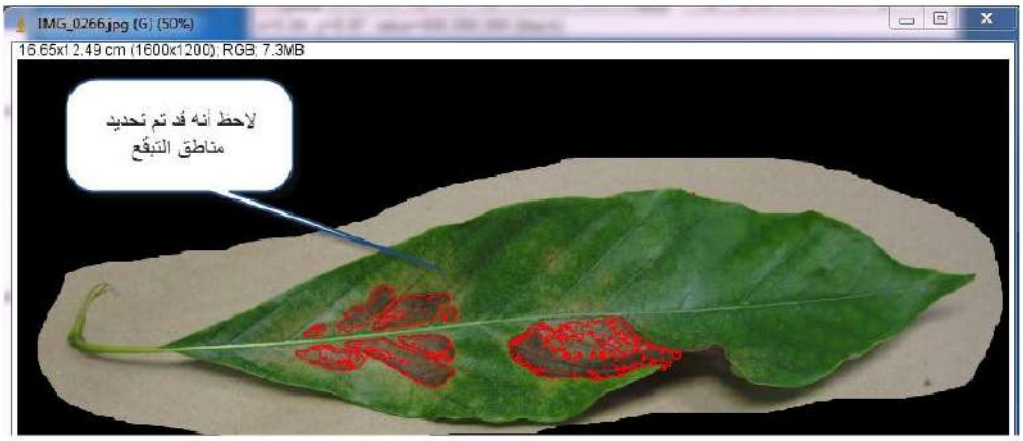
7. بنفس الطريقة نظلل مساحة الورقة الكلية ثم نبدأ بالتحديد على أساس التدرج اللوني حيث نحرك المنزلقة كما في الشكل التالي باتجاه اللون الأخضر لحين تفريغ مساحات البقع قدر الإمكان.



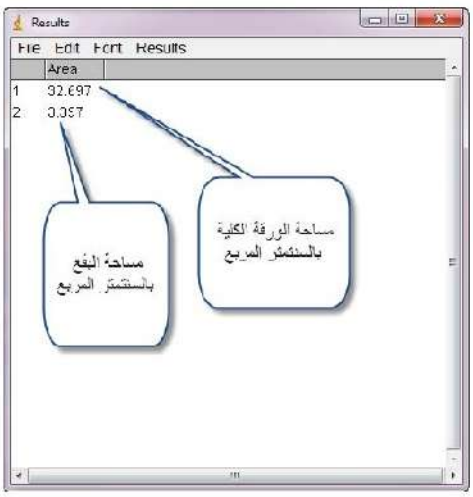
8. لغرض تحديد مناطق البقع يجب أن يتم تظليلها ويمكن عمل ذلك بسهولة عن طريق عكس التظليل من خلال الغاء تفعيل الخاصية Pass المجاورة لمنطقة التحكم باللون بواسطة النقر على مربع الاختيار الخاص بها مرة واحدة الزر الأيسر للماوس وكما في الشكل التالي:



9. ننقر على الخيار Select كما في الشكل السابق فيتم تحديد المناطق المظلل وبعد تنظيف المناطق الغير مرغوب بتحديدها بواسطة أداة فرشاة التحديد Selection Brush tool نحصل على التحديد التالي:



10. الخطوة الأخيرة تشمل قياس مساحة البقع الكلية ويتم ذلك من خلال الذهاب إلى قائمة Analyze واختيار Measure أو Ctrl+M فنحصل على قياس المساحة في نافذة النتائج وكما يلي:



نسبة الضرر %= (مساحة البقع / المساحة الكلية) × 100
= (3.397 / 32.697) × 100
= %10.39

تحليل صور الهلام Gel analysis

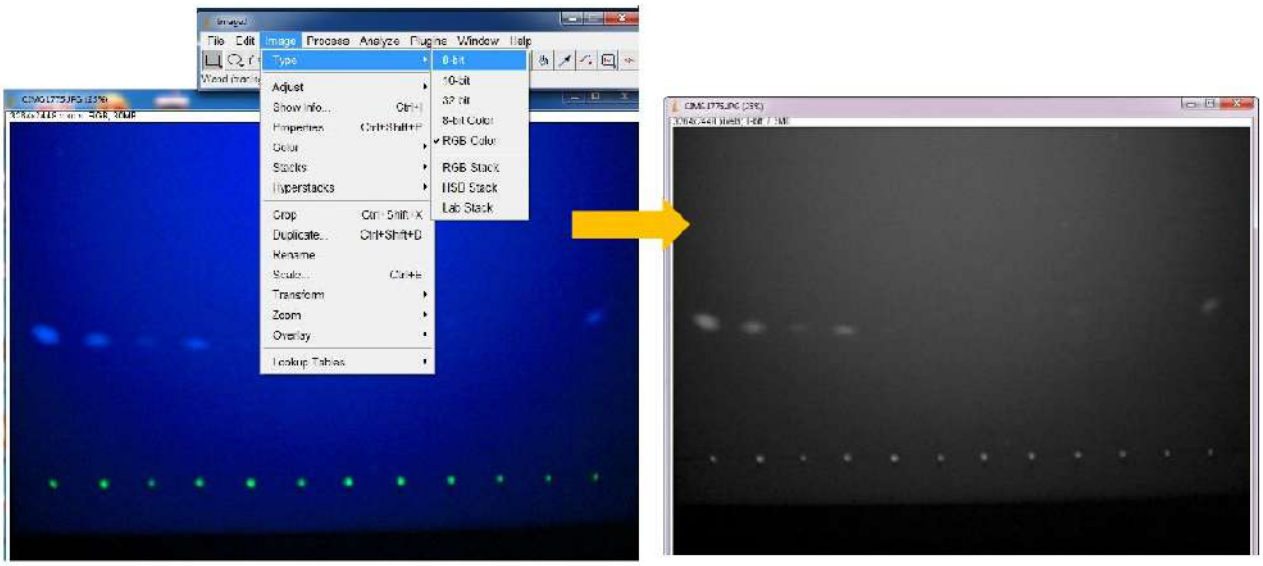
وتشمل تحليل صور هلام السيليكا أو هلام الأكاروز وكل ما يتعلق بصور الترحيل الكهربائي أو الكروموتوكرافي والتي يمكن من خلالها حساب المسافات التي قطعتها البقع بدقة عالية وكذلك التقدير الكمي للمواد المرحلة على الهلام (السيليكا أو الأكاروز) بشرط وجود بقع قياسية معروفة التركيز للمادة نفسها في حالة التقدير الكمي والذي سنركز عليه في مثالنا التالي حيث أن قياس المسافات التي قطعتها البقع مشابه تماما لقياس الأطوال بواسطة أداة الخط المستقيم Line Tool الذي تم شرحه سابقا ولا داعي لأعادته.

التقدير الكمي للمواد على صفائح السيليكا الرقيقة High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

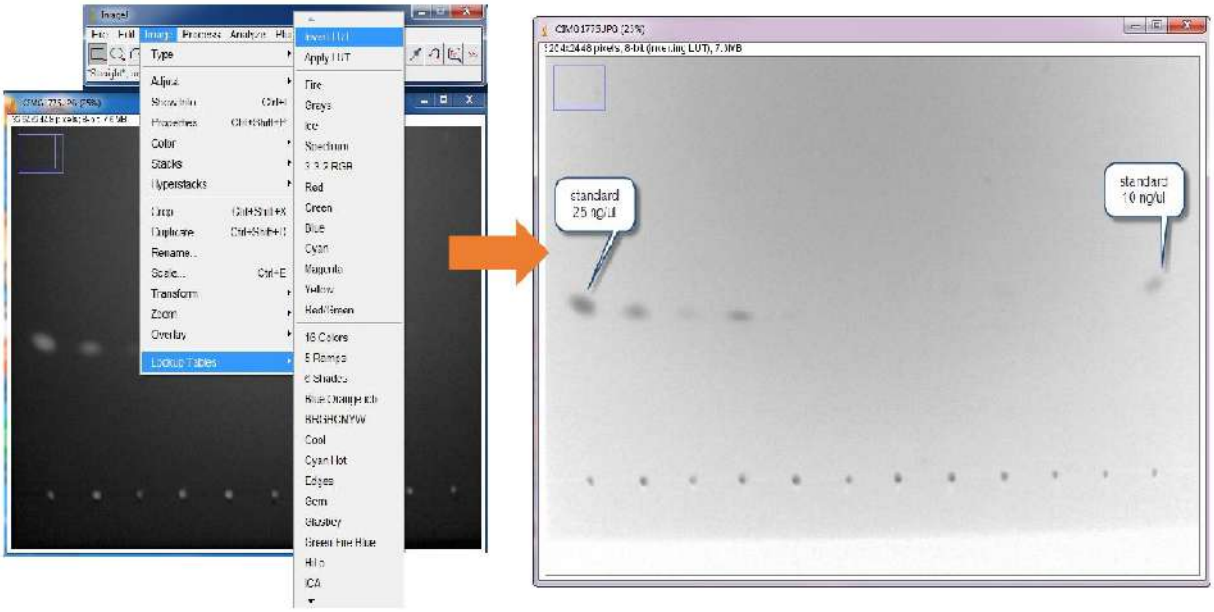
هناك أكثر من أسلوب أو طريقة للتقدير الكمي تتفاوت فيما بينها من حيث الدقة في التقدير وسنتعرض في مثالنا التالي إلى اثنين منها لمعرفة مدى كفاءة طرق التقدير واختيار الأفضل منها لاعتمادها في العمل من قبل الباحثين علما أن هذه الطرق معتمدة في البحث العلمي وهناك عدد كبير من البحوث العلمية المنشورة اعتمدت عليها في حساب نتائج التقدير الكمي التي تعتبر مقاربة إلى دقة التحليل الآلي باستخدام HPLC وقد تفوقه أحيانا. وهناك ملاحظة مهمة في طريقة من طرق التقدير الكمي علينا ان نتذكر دائما أن الصورة الملتقطة للصفيحة يجب أن تلتقط باستخدام كاميرا رقمية عالية الوضوح قدر الإمكان أن تكرر خمس مرات على الأقل مرة من كل زاوية والخامسة من الأعلى تماما لضمان اخذ كل الاحتمالات الممكنة لشدة التألق وإجراء الحسابات لكل لقطة ثم أخذ معدل الحساب واعتماده كتقدير كمي للمادة وهذه هي المنهجية العلمية المتبعة في البحوث المنشورة عالميا.

الطريقة الأولى

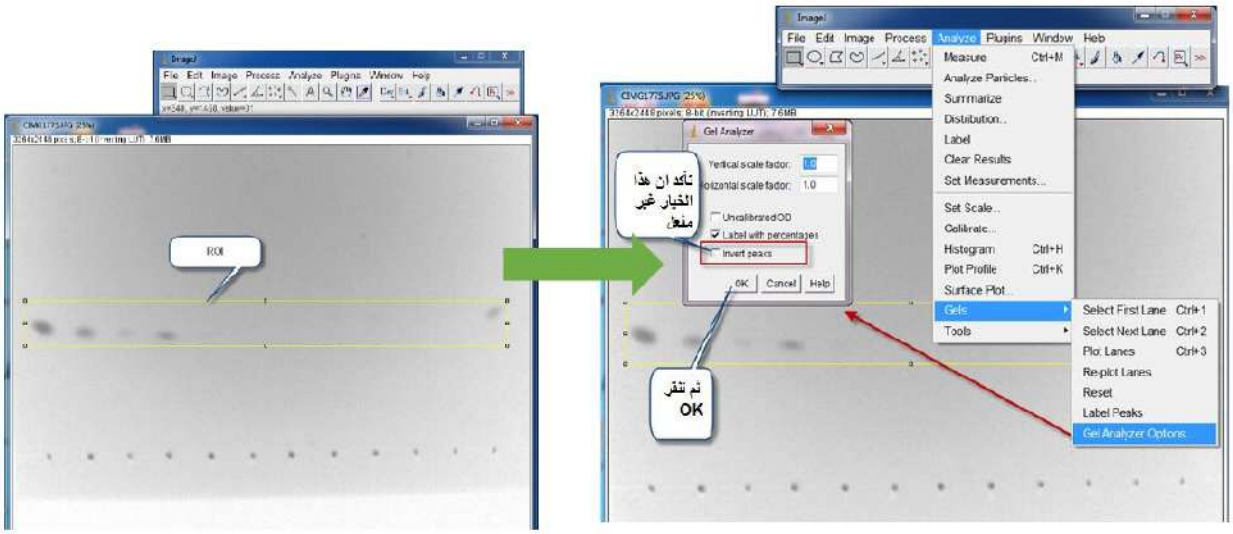
1. نقوم بفتح الصورة.
2. نحولها إلى تدرج الرمادي من خلال Image >> Type >> 8-bit.



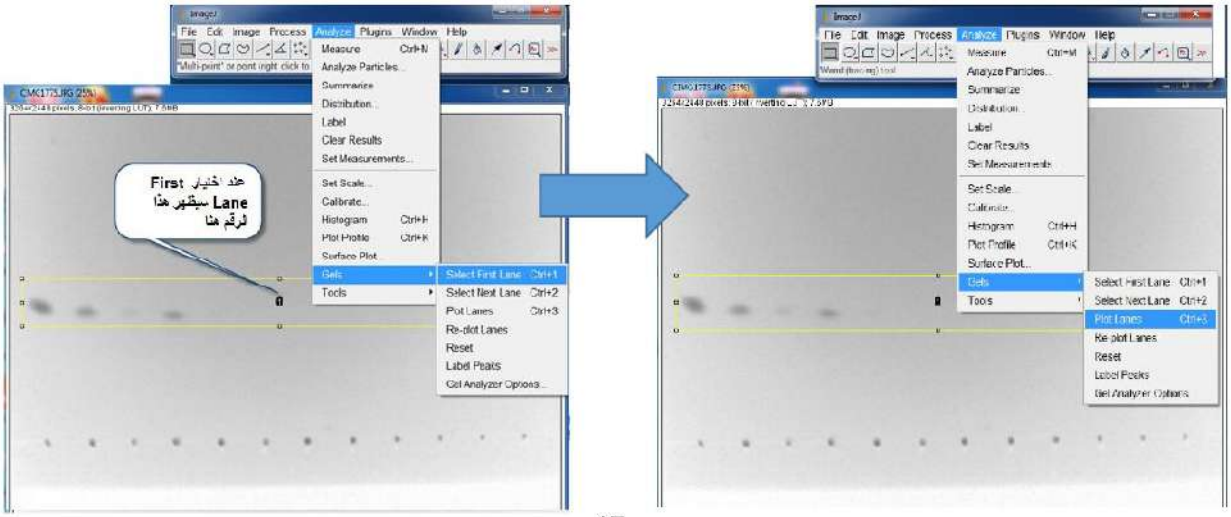
3. تحويل الصورة إلى صورة سالبة Negative image من خلال الذهاب إلى قائمة Image ثم Lookup tables >> Invert LUT.



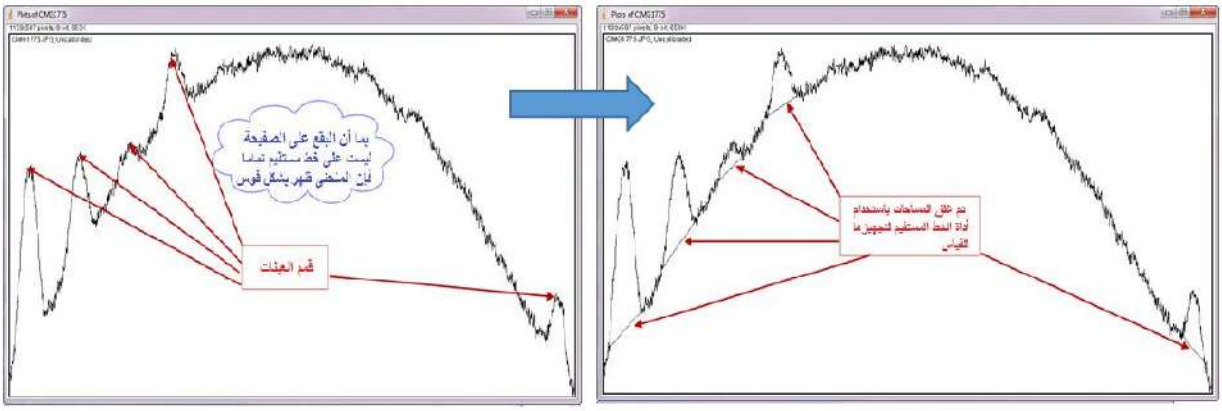
4. نستخدم أداة التحديد المستطيل Rectangular Tool لرسم مستطيل يضم كل البقع المرحلة أي تحديد منطقة العمل ROI.
5. الذهاب إلى Analyze >> Gels >> Gel Analyzer Options ستظهر نافذة حوار وهنا تأكد أن خيار Invert Peaks غير مفعل لأنه أن تم تفعيله ستظهر المنحنيات للأسف على شكل حفر وليس قمم. بعد ذلك انقر على OK.



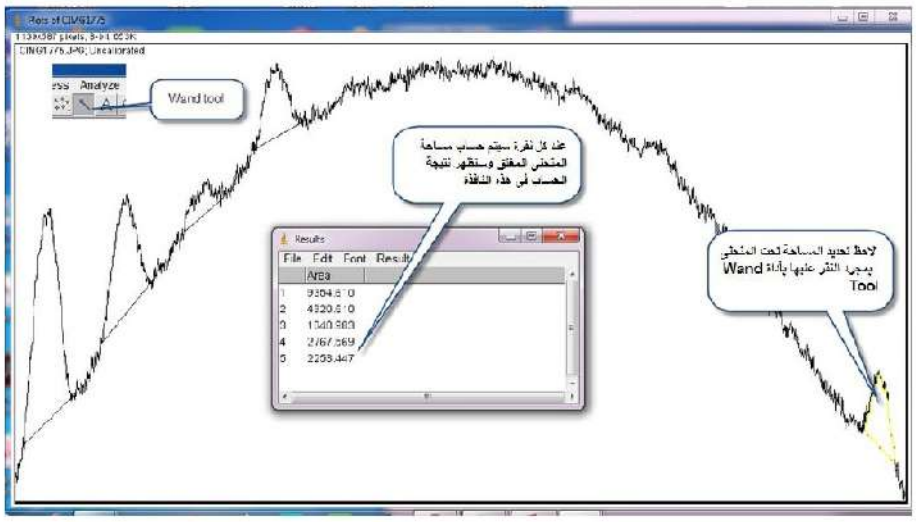
6. إذهب إلى Analyze >> Gels >> Select First Lan.
7. إذهب إلى Go to Analyze >> Gels >> Plot lanes.



8. ستظهر لك نافذة النتائج تحتوي على منحنيات تمثل المساحة التي تحتها تركيز المواد في البقعة والتي تم قياسها على أساس شدة تألق اللون والذي يعكس مدى تركيز دقائق المادة في هذه البقعة كما أن مكان المنحنى أو القمة ضمن الشكل يمثل مكانها على الصفيحة.
9. نستخدم أداة الخط المستقيم لغلق المساحة تحت المنحني ويجب ان نكون دقيقين هنا لأن أي زيادة أو نقصان سيؤدي إلى تغير في المساحة المحسوبة وبالتالي دقة التقدير.



10. لقياس المساحة تحت المنحنى (والتي تمثل التركيز) نستخدم الـ Wand Tool وننقر داخل المساحة المغلقة للمنحنى فنلاحظ أنها قد علمت بلون مختلف وستظهر نافذة النتائج وفيها



رقم المنحنى والمساحة التي تحته. وعند كل نقرة داخل كل منحنى ستظهر نتيجة تقدير مساحته ذاتيا في نافذة النتائج.

11. الآن اصبح لدينا قياس للمساحة تحت المنحنى لكل عينة ولحساب التركيز بالنانوغرام فيمكننا تقدير ذلك نسبيا اعتمادا على تركيز البقعة القياسية المعروفة لدينا مسبقا (عينة رقم 1) وباستخدام طريقة النسبة والتناسب يمكننا تقدير تركيز المادة لكل عينة وكما يلي:.

No.	area	Conc.(ng/µl)
1	9354.610	25
2	4920.610	?
3	1040.983	?
4	2767.569	?
5	2253.447	?

$$\text{The conc. of sample 2} = \frac{4920.610 \times 25}{9354.610} = 13.150 \text{ ng/µl}$$

$$\text{The conc. of sample 3} = \frac{1040.983 \times 25}{9354.610} = 0.566 \text{ ng/µl}$$

$$\text{The conc. of sample 4} = \frac{2767.569 \times 25}{9354.610} = 7.396 \text{ ng/µl}$$

$$\text{The conc. of sample 5} = \frac{2253.447 \times 25}{9354.610} = 6.022 \text{ ng/µl}$$

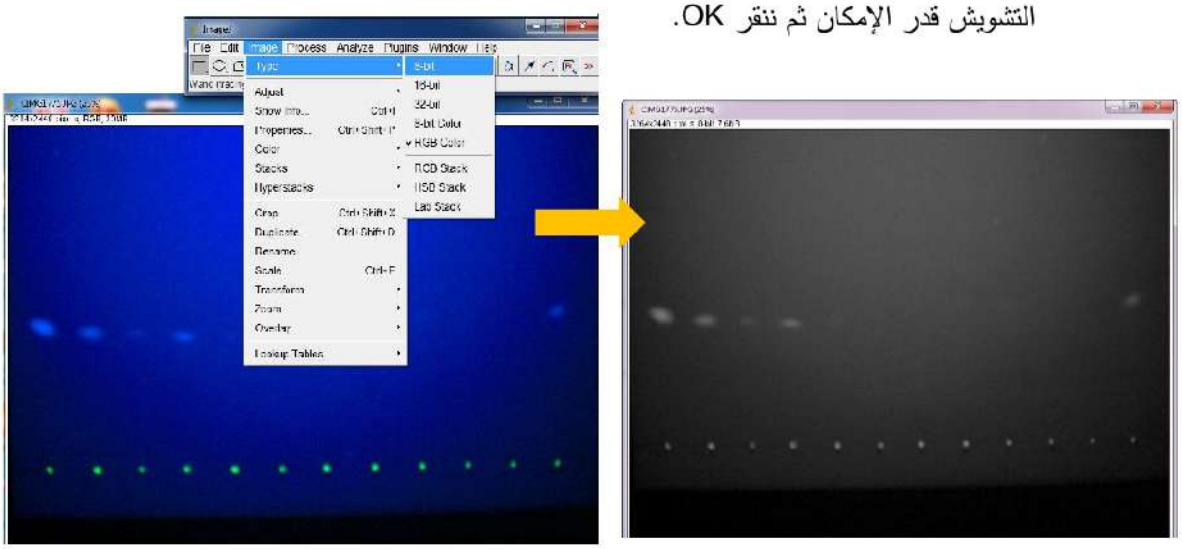
وإذا كان لدينا أكثر من عينة للمادة القياسية (أكثر من تركيز في الصورة) يمكننا عمل منحنى قياسي Standard curve باستخدام برنامج أكسل مثلا واستخراج معادلة الميل Slop formula لحساب التراكيز المجهولة بدقة عالية.

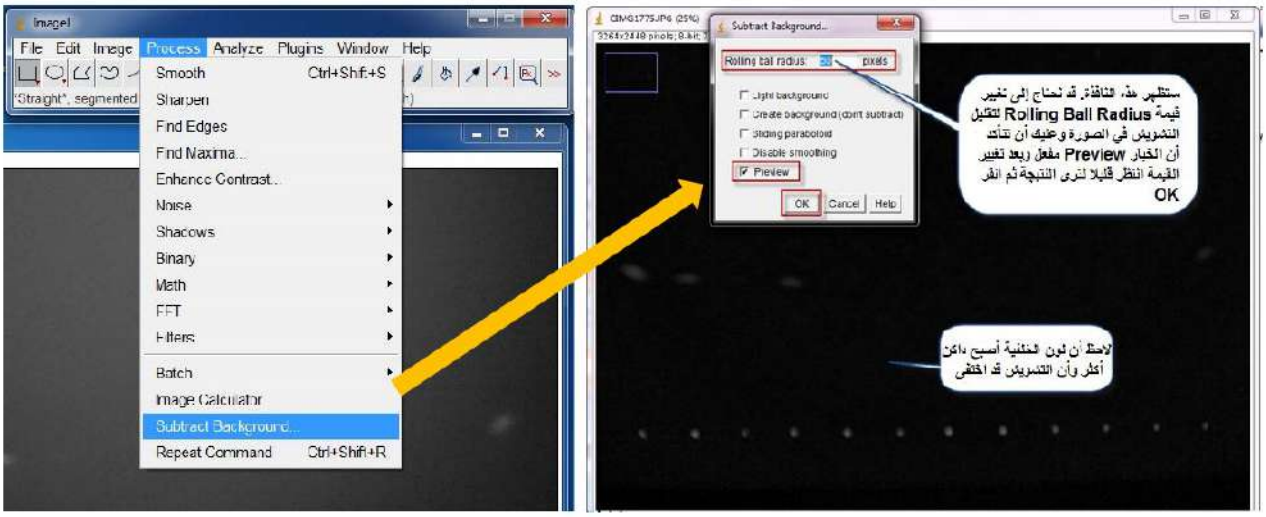
والملاحظ على الطريقة أعلاه أنها تلائم تحليل النتائج التي تكون فيها بقع العينات مصطفة بشكل مستقيم تقريبا حيث تعطي نتائج أكثر دقة وهي ملائمة لتحليل صور ترحيل الـDNA أو البروتينات على هلام الأكاروز أو الأكريليمايد. أما الطريقة التالية فهي تلائم العينات التي تكون بقعها غير مستقيمة التراصف وهو ما يحدث دائما في صفائح الـ TLC عند انزالها في الحوض بشكل خاطئ او بسبب رداءة نوعية الصفيحة حيث يؤدي ذلك إلى انحراف اتجاه الترحيل.

الطريقة الثانية

1. نفتح الصورة ونحولها إلى تدرج الرمادي 8-bit.
2. نذهب إلى قائمة Process >> Subtract Background لتقليل التشويش الموجود في الصورة قدر الإمكان نتيجة انعكاس الضوء على طبقة السيليكا في مثالنا الحالي من خلال

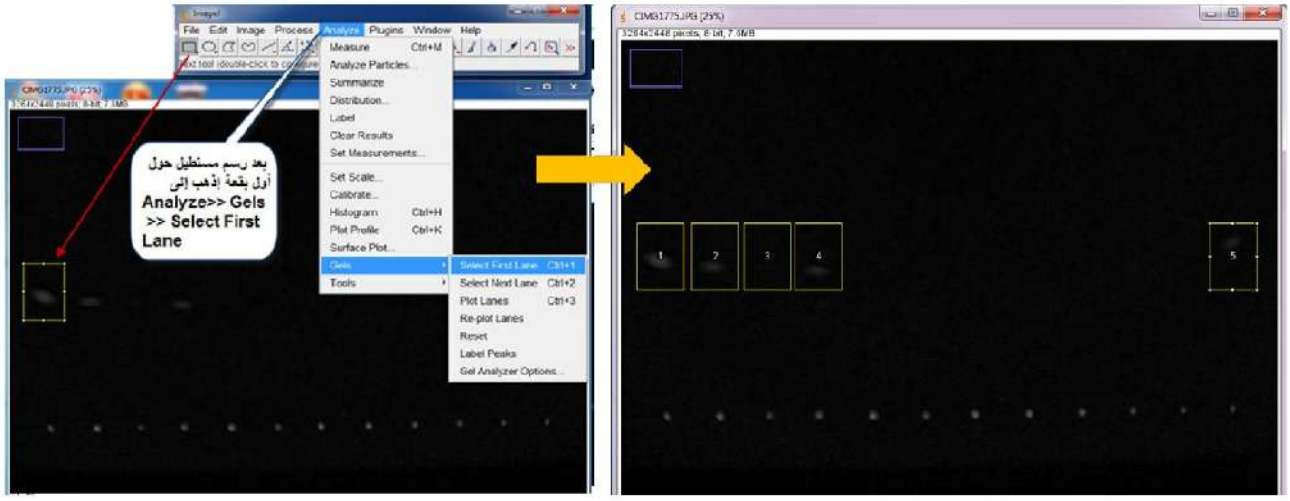
تنشيط خيار Preview ثم نغير قيمة Rolling Ball radius لتعديل لون الخلفية لحين اختفاء التشويش قدر الإمكان ثم ننقر OK.



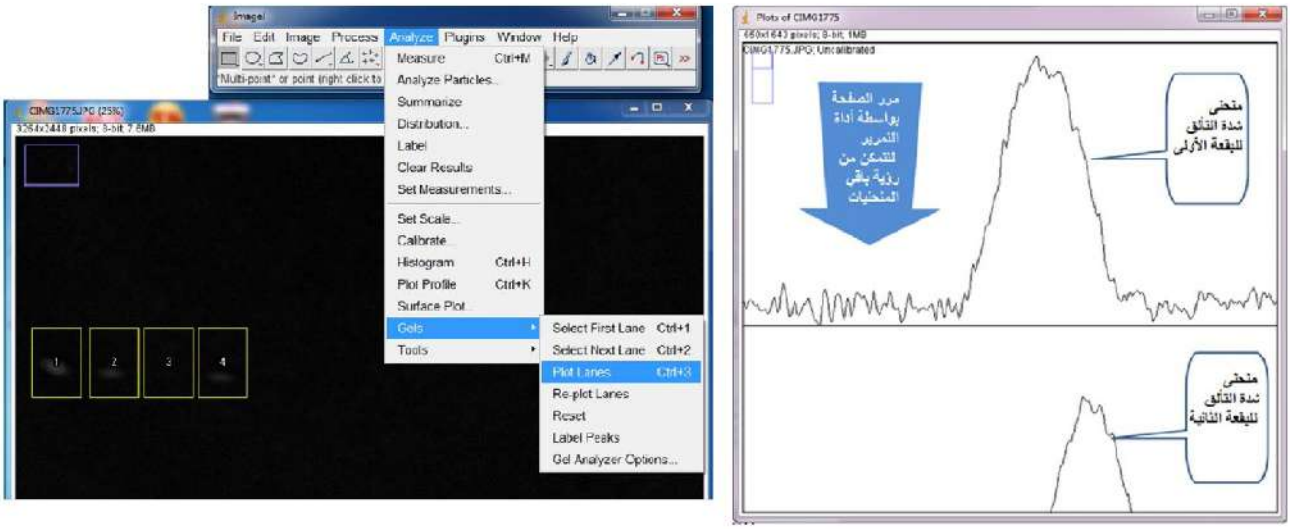


3. ارسم مستطيل حول أول بقعة وتذكر ان يكون ارتفاعه يلائم احتواء كل البقع في الصورة ثم إذهب إلى Analyze >> Gels >> Select First Lan (or Ctrl+1).

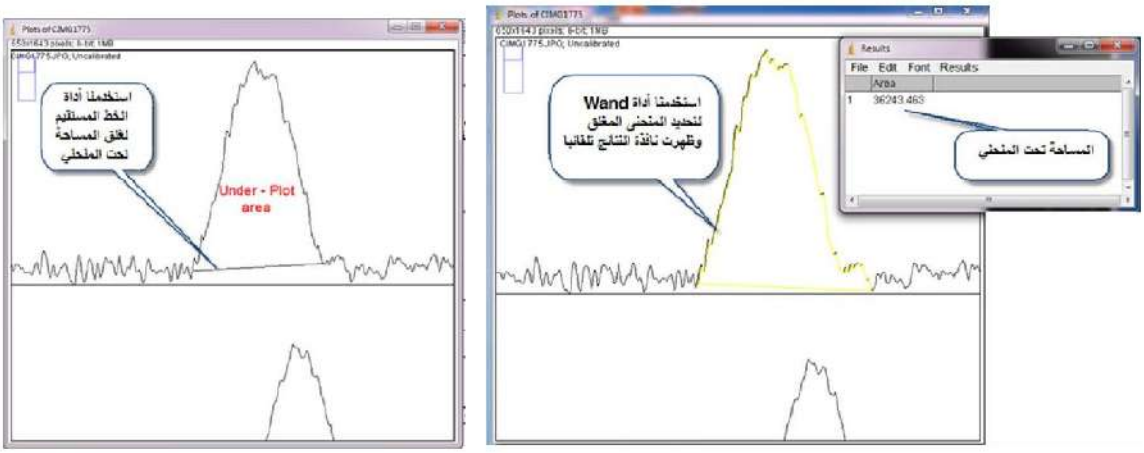
4. انقل المستطيل بواسطة الماوس إلى البقعة الثانية واذهب إلى Analyze >> Gels >> Select Next Lan (or Ctrl+2). كرر هذه الخطوة لباقي البقع وستظهر مستطيلات متراصفة افقيا حول البقع ومرقم حسب التسلسل.



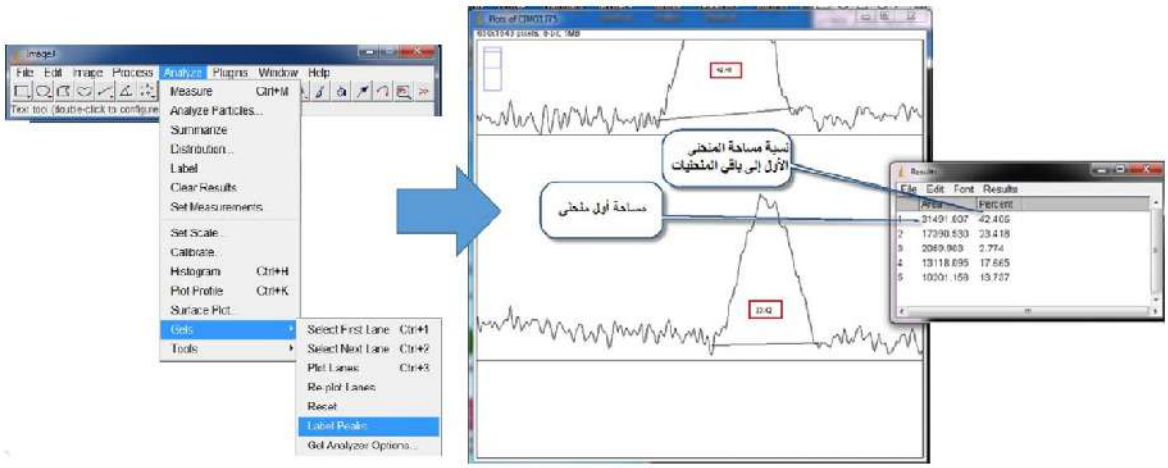
5. إذهب إلى قائمة Analyze >> Gels >> Plot Lanes وستظهر نافذة المنحنيات بحيث يرسم كل منحنى بشكل منفصل وتترتب المنحنيات عموديا ويمكن تصفحها باستخدام أداة التمرير Scrolling Tool.



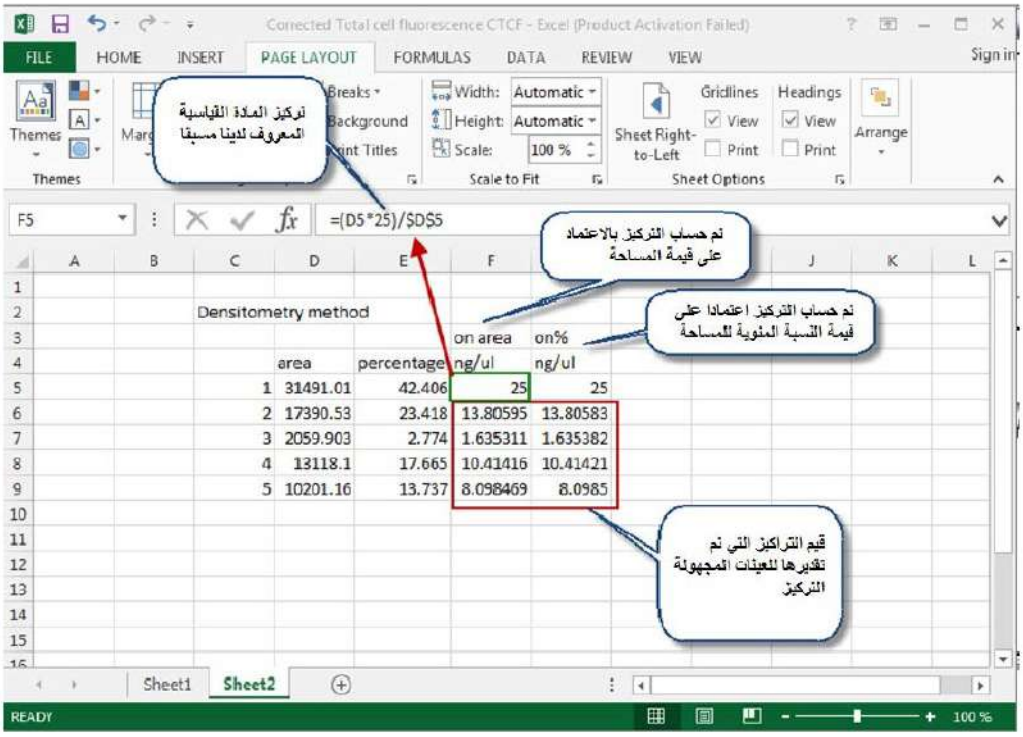
6. استخدم أداة الخط المستقيم لغلق المساحة تحت المنحنى ثم استخدم أداة Wand Tool لتحديد المساحة المغلقة وستظهر النتائج أوتوماتيكيا في نافذة النتائج.



7. عند الانتهاء من حساب جميع المساحات نذهب إلى Analyze >> Gels >> Label Peaks وسيتم تعليم كل منحنى بالنسبة المئوية للمساحة الخاصة به



8. يمكن استخدام المساحة أو النسبة المئوية للمساحة مع قيمة التركيز للمادة القياسية Standard لتقدير التراكيز باستخدام معادلة النسبة والتناسب والتي يمكن تطبيقها في برنامج اكسل MS Excel. وفي حالة وجود عدة تراكيز من المادة القياسية فيمكن عمل Standard curve ومن معادلة الميل يمكن تقدير التراكيز بدقة أكبر.



استخدام الأكداس Stacks

قبل الخوض في هذا الموضوع نريد من القارئ أن يفهم ان الأكداس ببساطة عبارة عن صورتين ثنائيتي الأبعاد أو أكثر يتم استعراضهم في نافذة واحدة بحيث تسمى كدس حيث ترتب الصور فيه الواحدة فوق الأخرى بشكل طبقات تسمى كل طبقة شريحة Slice وتحتوي النافذة على منزلقة في الأسفل يمكن من خلالها التنقل بين شرائح الكدس كما يمكن تحريك الصور اوتوماتيكا (بشكل فديو)

بسرع تتراوح بين 10 – 1000 صورة بالثانية. ومن فوائد عملية التكديس هو إمكانية إجراء عمليات القياس والتحليل كالتحديد Selecting و Thresholding و الفلترة وتعديل التباين اللوني بصورة متوازية لجميع الشرائح مما يوفر الجهد والوقت.

استخدامات ألكداس The usage of Stacks

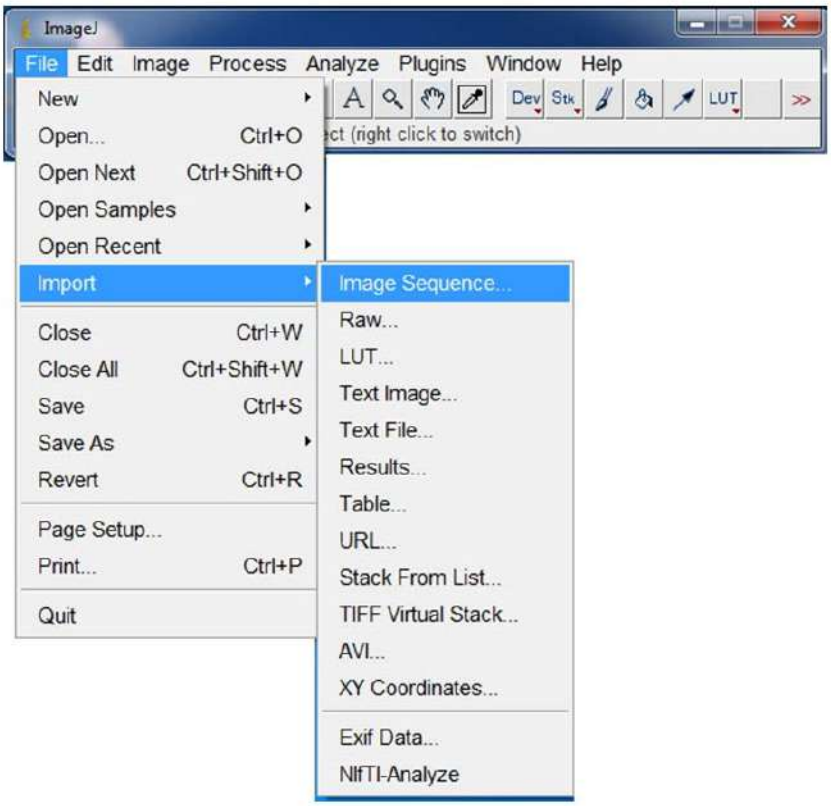
تستخدم الأكداس بشكل عام في عرض وتحليل الصور الرقمية التي ترتبط بعلاقة ما كأن تكون **علاقة زمنية Temporal أو علاقة مكانية Spatial أو طيفية Spectral**. ففي حالة العلاقة الزمنية فإن الأكداس تمكننا من استعراض صور الشيء قيد الدراسة ضمن تسلسل زمني معين لتحديد التغيرات التي طرأت عليه خلال تلك الفترة مثل زيادة قطر النمو لفطر معين على الوسط الغذائي أو التغيرات الجيولوجية والطوبوغرافية لمنطقة معينة خلال فترة زمنية اعتمادا على الصور الجوية أو صور الأقمار الصناعية حيث تمكننا هذه الآلية من قياس الأبعاد والمساحات خلال تلك الفترة وحساب معدلات التغير. بالنسبة للأكداس ذات العلاقة المكانية (ثلاثية الأبعاد عموما) فإنها تمكننا من استعراض وتحليل الصور بشكل ثلاثي الأبعاد وإجراء قياسات دقيقة لم تكن ممكنة في حالة الصور الثنائية الأبعاد فلو أخذنا مقاطع متوازية طولية أو عرضية لنسيج معين فإن برنامج ImageJ سيمكننا من بناء نموذج ثلاثي الأبعاد يمكن من خلال دراسة الخلايا المكونة للنسيج وعدها بشكل دقيق ولهذه الطريقة تطبيقات كثيرة في دراسة العضيات الخلوية وعد الخلايا والأنوية ودراسة التأثيرات المرضية ...الخ ضمن طبقات الأنسجة كما أنها مستخدمة بكثرة في دراسة الصور الفلكية ومتابعة حركة الكواكب والنجوم..ألخ. أما في حالة صور التحليل الطيفي أو اللوني للصور فإن ImageJ يتيح لنا عمل صور بألوان حقيقة أو فصلها إلى عدة صور اعتمادا على أطياف لونية معينة وهذه الخاصية مهمة جدا في تحليل صور مجهر الفلورسنت Fluorescent microscope images حيث يمكن فصل الصور على اساس ألوان التصبيغ المستخدمة في النموذج ودراسة كل صورة على حدة أو مجتمعة ضمن الكدس.

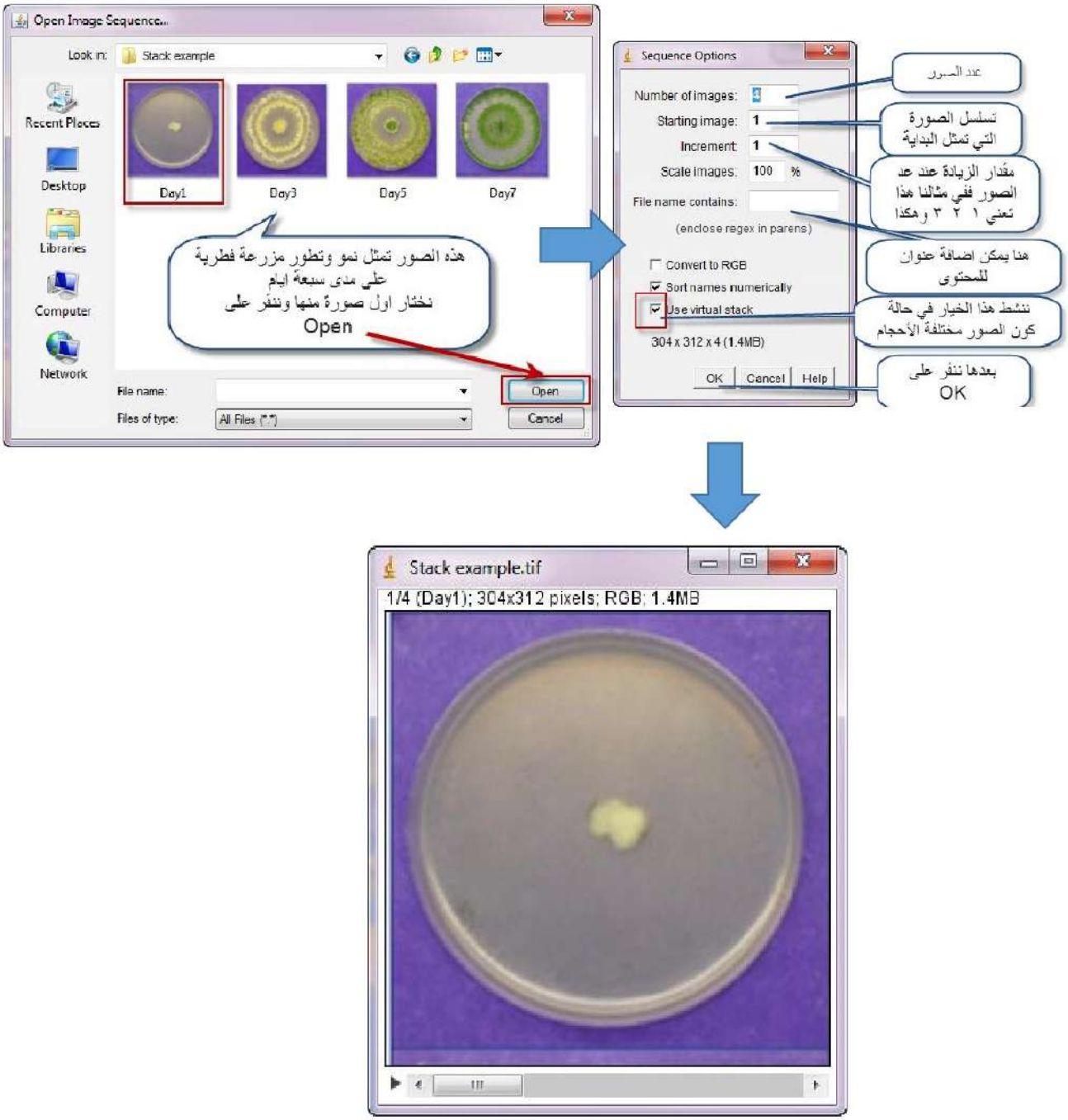
كيفية انشاء الكدس Create stack

لإنشاء أي كدس يجب الأخذ بنظر الاعتبار أن تكون الصور المستخدمة في انشائه بنفس الحجم والعمق اللوني Bit–Depth لتكون نتائج التحليل والقياس دقيقة إلى أبعد ما يمكن. وسنتعلم انشاء نوعين من الأكداس الأول لسلسلة صور ضمن تدرج زمني (سلسلة زمنية) والثاني لمجموعة صور تمثل نفس الصورة ولكن بعد فصل الألوان (الطيف الأحمر و الطيف الأخضر و الطيف الأزرق).

لإنشاء الكدس من النوع الأول (التدرج الزمني) نتبع الخطوات التالية:

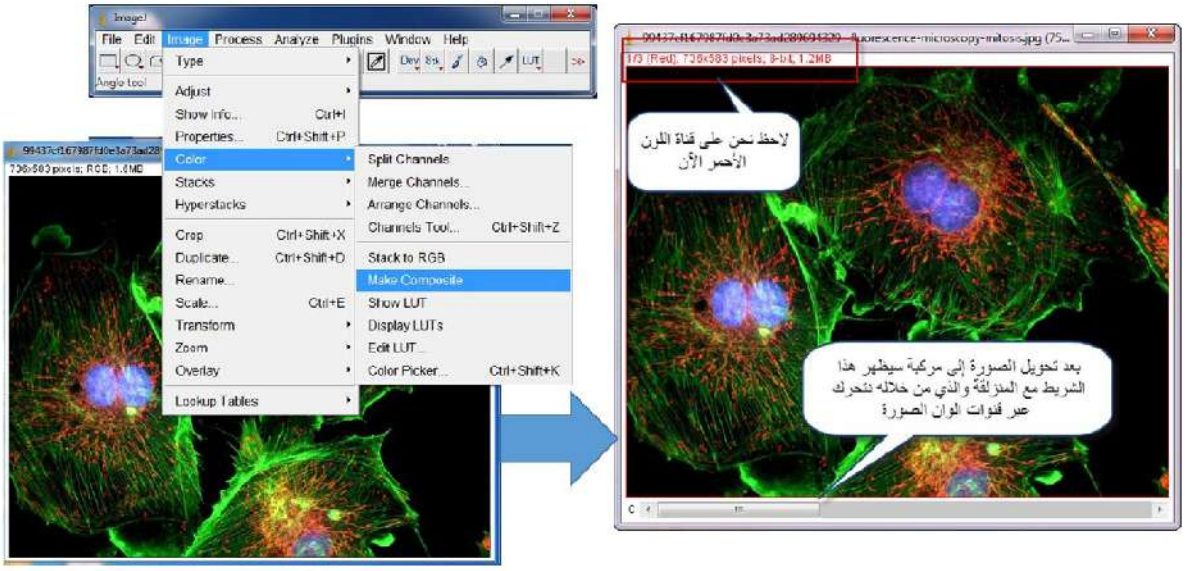
1. نذهب إلى قائمة File ونختار Import ومن القائمة الفرعية نختار Image Sequence.
2. ستظهر نافذة المتصفح فنقوم بالتصفح للوصول إلى المجلد الحاوي على الصور ونختار الصورة الأولى ثم ننقر على Open.
3. ستفتح نافذة فيها معلومات عن الصور المكونة للكدس وعلينا التأكد منها حيث يمكن تعديلها حسب الرغبة وبعد ذلك ننقر على OK فيتم انشاء الكدس كما في الأشكال التالية:




Open Image Sequence...
Look in:
Stack example
Recent Places
Desktop
Libraries
Computer
Network
Day1
Day3
Day5
Day7
هذه الصور تمثل نمو وتطور مزرعة فطرية
على مدى سبعة ايام
نختار اول صورة منها وننقر على
Open
File name:
Files of type:
All Files (*.*)
Open
Cancel
Sequence Options
Number of images: 4
Starting image: 1
Increment: 1
Scale images: 100 %
File name contains:
(enclose regex in parens)
Convert to RGB
Sort names numerically
Use virtual stack
304 x 312 x 4 (1.4MB)
OK
Cancel
Help
عدد الصور
تسلسل الصورة
التي تمثل البداية
مقدار الزيادة عند عد
الصور ففي مثالنا هذا
تعني ١ ٢ ٣ وهكذا
هنا يمكن اضافة عنوان
للمحتوى
ننشط هذا الخيار في حالة
كون الصور مختلفة الأحجام
بعدها ننقر على
OK
Stack example.tif
1/4 (Day1); 304x312 pixels; RGB; 1.4MB

لعمل الكدس من النوع الثاني (التدرج الطيفي Spectral) فإننا نحتاج إلى عدد من الصور مساوي لعدد الأطياف أو القنوات اللونية التي نريد تحليلها (عزل الألوان مثلا: صورة للون الأحمر و صورة للأخضر وصورة للأزرق) ويستخدم هذا التكنيك بكثرة في تحليل صور مجهر الفلورسنت حيث نحتاج إلى عزل الألوان لعزل الأشياء في الصورة حسب اللون الذي اعطته Emission بعد تحفيز الصبغة Exaitation الضوء أما إذا كانت الصور أصلا منفصلة (أي صورة لكل قناة لونية حيث أن المجهر لديه إمكانية اخذ صور منفصلة لكل قناة لونية على حدة) فما علينا إلا أن نعمل كدس منها مباشرة. وفي مثالنا التالي سنعمل على صورة فلورسينية مركبة (أي ان القنوات اللونية فيها مجمعة معا) لذا سنتبع الخطوات التالية لإنشاء هذا الكدس:

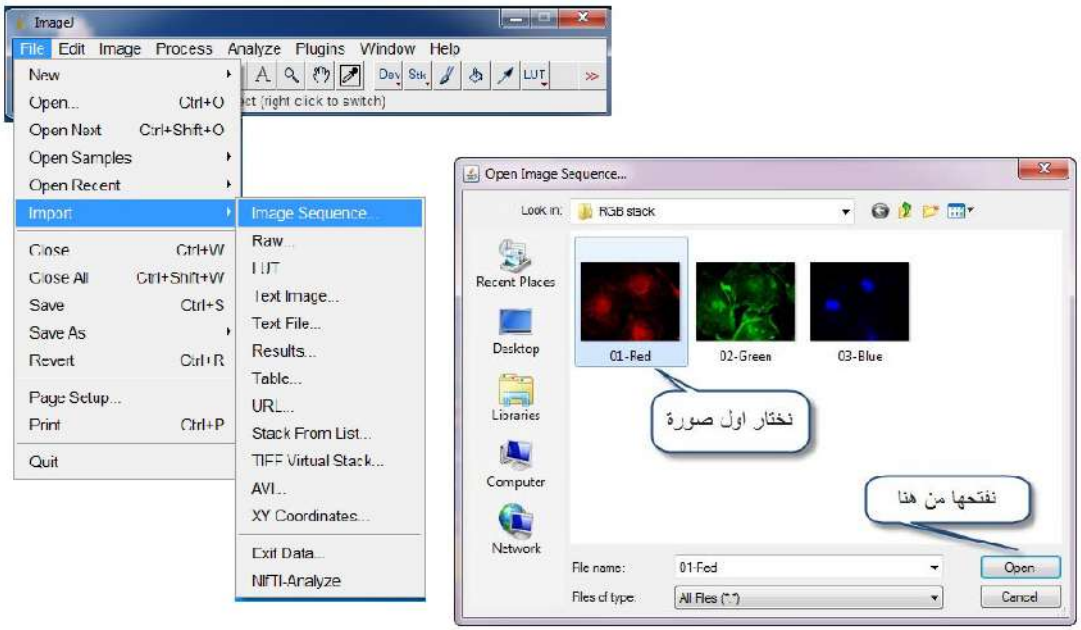
1. نفتح الصورة ثم نذهب إلى قائمة Image ونحولها إلى صورة مركبة بواسطة الخيار Make Composite حيث سيظهر شريط مع منزلقة أسفل إطار الصورة عند تحريك المنزلقة نلاحظ في أعلى الإطار تغير المعلومات حسب القناة اللونية الحالية.

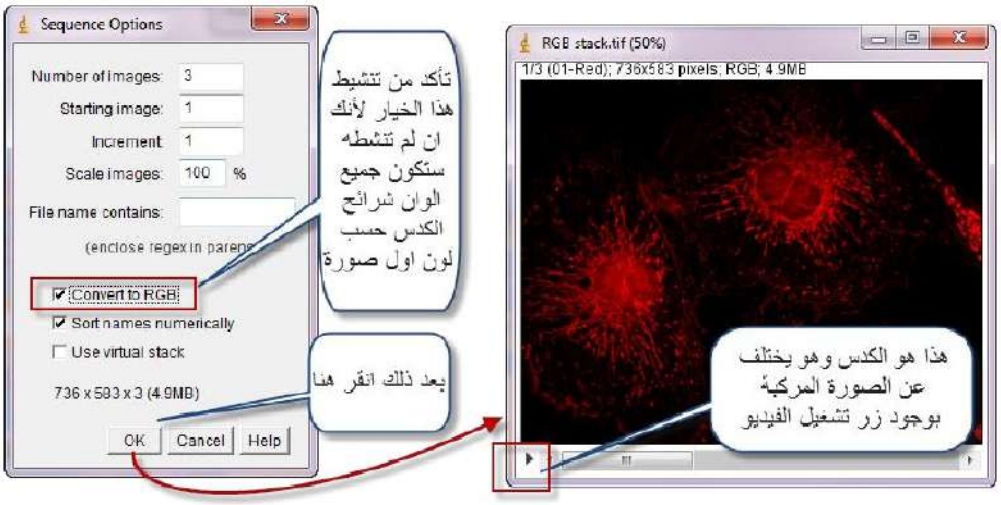


2. بعد الخطوة أعلاه سنتمكن من عزل الألوان (الأحمر على حدة والأخضر على حدة والأزرق على حدة) وذلك من خلال الذهاب إلى قائمة Image واختيار Split Channels وسنحصل

على ثلاثة صور (واحدة لكل قناة لونية) بعد ذلك نقوم بخزن هذه الصور من خلال تنشيط الصورة والذهاب إلى قائمة File واختيار الأمر Save ثم نخزنهم في مجلد منفصل (هذه العملية تجرى لكل واحدة على حدة).

3. الآن يمكننا أن ننشئ الكدس من الصور التي تم معالجتها وخزنها في الخطوة السابقة عن طريق الذهاب إلى قائمة File واختيار Import ستفتح قائمة فرعية نختار منها Image Sequence فتظهر نافذة المتصفح فنقوم بالتصفح لحين الوصول إلى مجلد الصور ونفتحه ونختار أول صورة وننقر على Open فستفتح نافذة جديدة فيها معلومات الكدس (تأكد من تنشيط الخيار Convert to RGB بالنقر مرة واحدة بزر الماوس الأيسر على مربع الاختيار المجاور له، لأنك إن لم تفعل ذلك ستظهر جميع الشرائح بنفس لون اول شريحة داخل الكدس ويضيع الهدف من العملية) بعد ذلك أنقر على OK فتحص على الكدس.

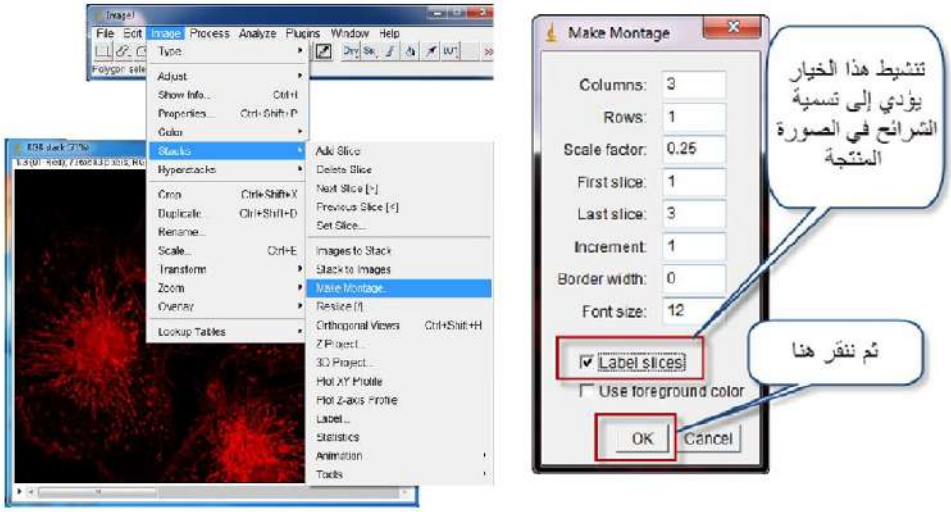


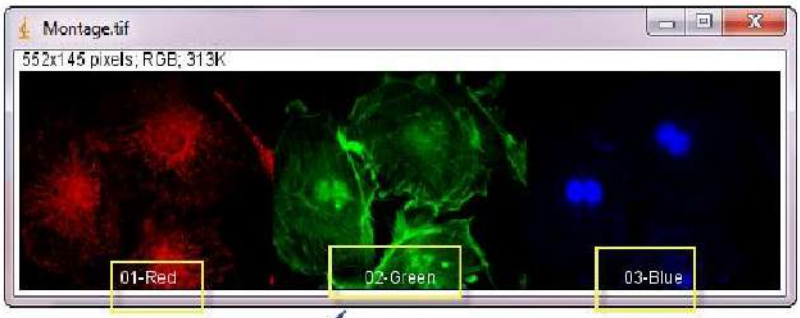


4. الآن بعد إنشاء الكدس يمكننا التنقل بين شرائحه عن طريق الشريط المنزلق أسفل إطار الصورة لتصفح قنوات الألوان (لاحظ كل لون قد أظهر تفاصيل معينة من الصورة الأصلية فالأزرق مثلا أظهر الأنوية بشكل واضح) كما في الشكل التالي:

5. بقي أن نعرف أن الشرائح المكونة للكدس يمكن أن تخرج طباعيا لأغراض العرض أو النشر في البحوث العلمية على شكل صور متسلسلة بأحد تنسيقات الصور المعروفة. ويمكن إجراء ذلك من خلال عمل مونتاج عن طريق الذهاب إلى قائمة Image ومن ثم الدخول إلى القائمة الفرعية Stack واختيار Make Montage والتي عند النقر عليها ستنفتح نافذة فيها معلومات

عن الشرائح المستخدمة وكيفية ترتيبها في الصورة النهائية (يمكن التعديل على هذه الخصائص) بعد ذلك ننشط خيار Label Slices ليتم تعليم الصور حسب أسماء ملفاتها الأصلية (هذا الخيار حسب الرغبة) وأخيرا ننقر على OK لتظهر لنا الصور مرتبة بشكل شريط أو مصفوفة أشرطة مرتبة وفق التسلسل و الخصائص التي تم ضبطها في النافذة السابقة وكما في الأشكال التالية:





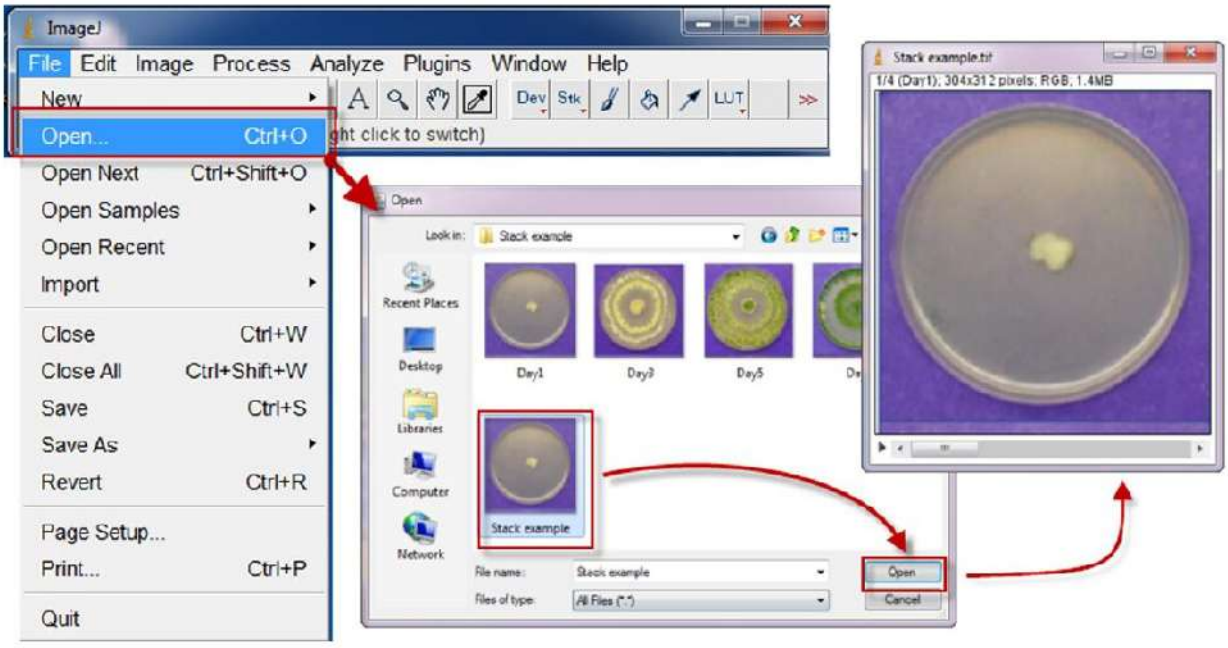
الناتج النهائي هو صورة لثلاث شرائح وقد سميت كل شريحة باسمها الذي هو في الواقع اسم ملف الصورة الأصلية

6. نقوم بعد ذلك بخزن هذه الصور من خلال الذهاب إلى قائمة File >> Save.

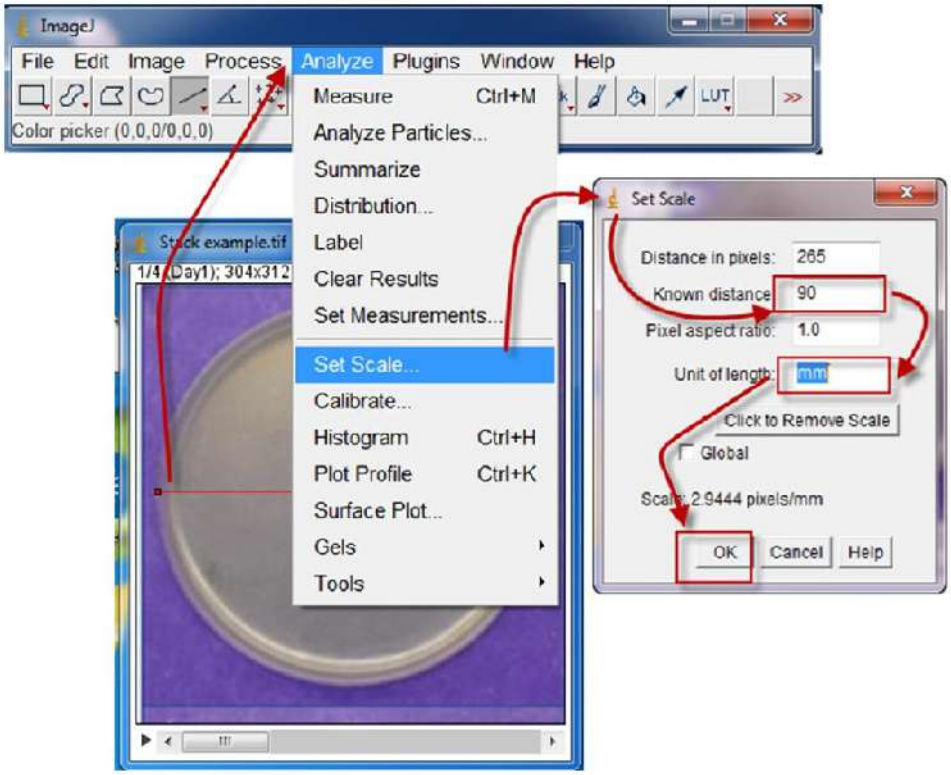
استخدام الأكداس الزمنية Time series stack في دراسة نمو وتطور مزرعة فطرية

تستخدم الأكداس الزمنية عادة في دراسة التغيرات التي تحدث لشيء معين خلال فترة زمنية محددة حيث يتم تصوير هذا الشيء بنفس جهاز التصوير وبنفس دقة التصوير وبنفس مواصفات الصورة من حيث مقدار التعرض للضوء وفتحة العدسة ...ألخ ولكن في فترات زمنية متباعدة تعتمد على الغرض من إجراء الدراسة. ففي مثالنا التالي سنتابع نمو وتطور المزرعة الفطرية لفطر معين على الوسط الغذائي الصلب خلال فترة سبعة أيام وهذه الدراسة تعتبر من الدراسات الروتينية في مجال الفطريات وأمراض النبات حيث يتم من خلالها قياس تأثير ظروف تجريبية معينة على معدل سرعة النمو اليومي للمزرعة الفطرية Growth rate. سنستخدم في هذا المثال الكدس الذي تم انشائه سابقا وكما في الخطوات التالية:

1. بعد تشغيل برنامج ImageJ نذهب إلى قائمة File ثم إلى Open فتظهر نافذة المتصفح حيث نقوم بعدها بالتصفح لحين الوصول إلى الملف المقصود ونقوم بفتحه من خلال النقر على الزر Open اسفل يمين النافذة أو النقر نقرتين متتاليتين بالزر الأيسر للماوس.

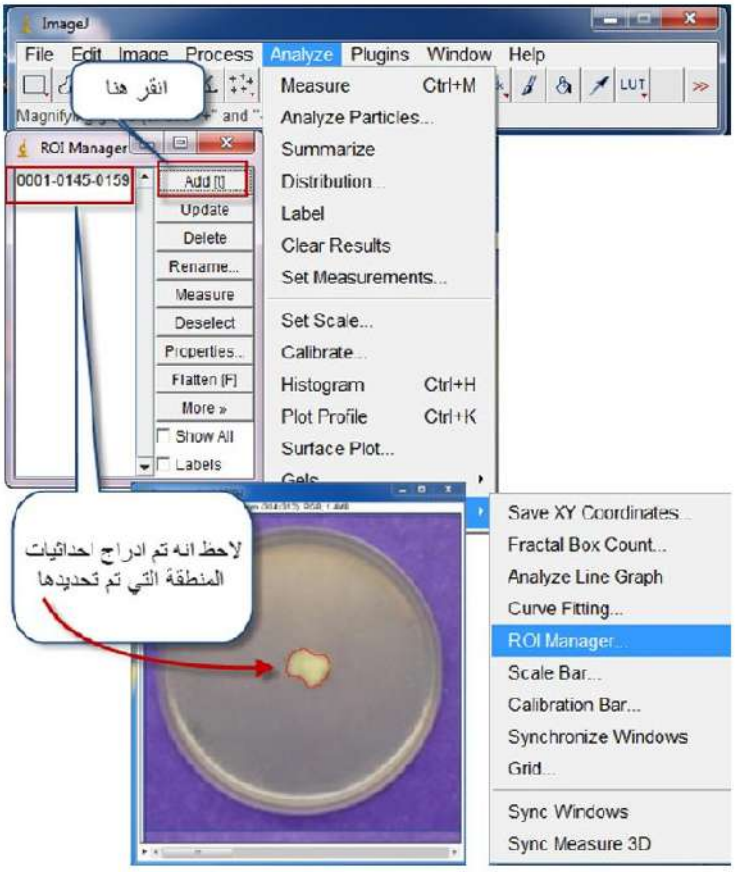


2. الخطوة التالية تتضمن تعيير البرنامج لإجراء القياسات حسب وحدات القياس الحقيقية وحيث أن الصورة التي لدينا لا تحتوي على شريط قياس فإننا سوف نعتمد على قطر طبق البتري كأساس للقياس وذلك من خلال استخدام أداة الخط المستقيم مع الضغط على مفتاح Shift ورسم خط مستقيم على طول قطر الطبق في الصورة (لاحظ عند تحريك المنزلقة أسفل الكدس ستجد أن الخط المستقيم قد رسم على جميع الشرائح وبنفس المكان وهذه أحد خواص الكدس وهي أن العملية التي تجرى على أي شريحة ستطبق على باقي الشراح بنفس الوقت) بعد ذلك نذهب إلى قائمة Analyze4 ونختار منها Set Scale فتظهر نافذة المعايرة فنقوم بكتابة الرقم 90 في خانة Known distance ونكتب mm في خانة Unit of length ثم ننقر على OK فيتم معايرة البرنامج.



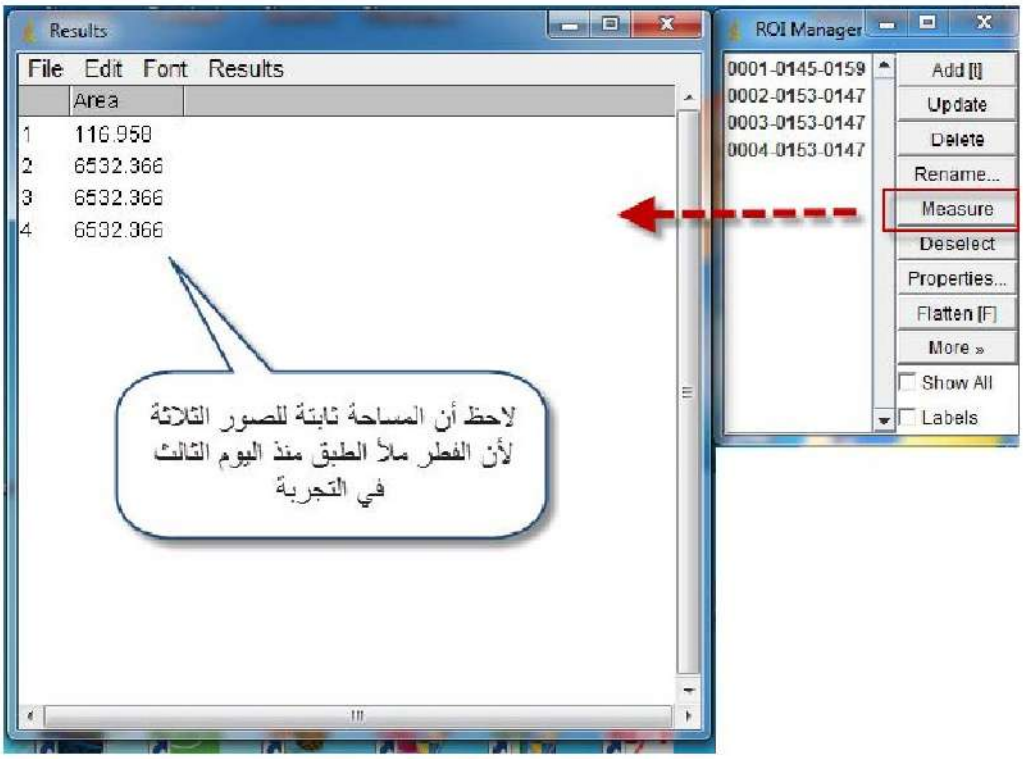
3. في هذه الخطوة سنقوم بقياس مساحات النمو خلال فترة الدراسة وحيث أن المساحات غير متشابهة خلال أيام الدراسة فيجب علينا ان نقيس كل مساحة على حدة للتغلب على خاصية تطبيق العمليات على كل الشرائح مرة واحدة في الكدس والتي أشرنا إليها في الفقرة السابقة وعليه سننتقل بين الشرائح ونحدد مساحة النمو لكل شريحة على حدة بواسطة أدوات التحديد التي تعلمنا استخدامها سابقا ثم نحسب المساحات مرة واحدة وكما يلي:

- نذهب إلى الشريحة الأولى ونقوم بتحديد مساحة النمو الابتدائية بواسطة أداة التحديد الحر Free hand selection tool أو أي طريقة أخرة تتناسب مع خبرة المستخدم.
- نذهب إلى قائمة Analyze ثم إلى القائمة الفرعية Tools ومنها إلى خيار ROI Manager (وهي نفس الأداة التي استخدمناها سابقا في عد المستعمرات البكتيرية) ومنها ننقر على Add (t) حيث سيتم إدراج إحداثيات المنطقة التي تم تحديدها إلى خانة المناطق المهمة حيث ستقوم هذه الأداة بخزن كل ما يتعلق بهذا التحديد لحين مسحه من قبل المستخدم (وهذه من الأدوات المهمة التي تسهل كثيرا اجراء مثل هذه الحسابات خصوصا إذا كانت البيانات كبيرة).



- نكرر الخطوتين أعلاه لجميع الشرائح.

4. من نافذة ROI Manager ننقر على Measure فتظهر لنا النتائج في شاشة النتائج كما في الشكل التالي:



5. يمكننا استخدام النتائج أعلاه لحساب معدل النمو اليومي بمساعدة بعض البرامج الأخرى مثل MS Excel أو حتى يدويا.

المصادر

Al-saad,L. A., A. I. Al-badran, and S. A. Al-jumaily. 2014. Image analysis method to evaluate biological control of Aspergillus flavus growth by Bacillus subtilis and Pseudomonas fluorescens. *Basrah Journal of Science*, *32*(3), 290–303.

Bankhead,P. 2014. Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ. *ImageJ*, (May), 1–195. https://doi.org/10.1109/NER.2015.7146654

Barry,D. 2010. *Development of novel image analysis methods for the morphological quantification of filamentous fungi. School of Biological Sciences, School of Electrical ....* https://doi.org/10.21427/D7730D

Burger,W., and M. J. Burge. 2009. *Principles of Digital Image Processing*. springer. https://doi.org/10.1007/978-1-84800-195-4

Burger,W., M. J. Burge, B. Heidelberg, N. London, P. Tokyo, H. Kong, and B. Budapest. 2013. *Principles of Digital Image Processing Springer-Verlag. Core Algorithms*. Washington DC. Retrieved from https://imagingbook.files.wordpress.com/2013/06/burgerburgeuticsvolc_extras.pdf

Chaowuttikul,C., W. Thitikornpong, and C. Palanuvej. 2014. Quantitative Determination of Usnic Acid Content in Usnea siamensis by TLC-Densitometry and TLC Image Analysis. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, *5*(118), 118–125.

Collins,T. 2011a. ImageJ for Medical Microscopy Image Processing: An Introduction to Macro Development for Batch Processing. *Optical*

and Digital Image Processing: Fundamentals and Applications, 859–877. https://doi.org/10.1002/9783527635245.ch38

Collins,T. 2011b. ImageJ for Medical Microscopy Image Processing: An Introduction to Macro Development for Batch Processing. In *Optical and Digital Image Processing* (pp. 859–877). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. https://doi.org/10.1002/9783527635245.ch38

Collins,T. J. 2007. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*, *43*(1 Suppl), 25–30. https://doi.org/10.2144/000112505

Cornell University Library/Research Department. 2003. Digital Imaging Tutorial - Basic Terminology. Retrieved from: http://preservationtutorial.library.cornell.edu/intro/intro-01.html

De Vylder,J., F. Vandenbussche, Y. Hu, W. Philips, and D. Van Der Straeten. 2012. Rosette tracker: an open source image analysis tool for automatic quantification of genotype effects. *Plant Physiology*, *160*(3), 1149–59. https://doi.org/10.1104/pp.112.202762

Du,H., P. Lv, M. Ayouz, A. Besserer, and P. Perré. 2016. Morphological characterization and quantification of the mycelial growth of the brown-rot fungus postia placenta for modeling purposes. *PLoS ONE*, *11*(9), e0162469. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162469

Gavet,O., and J. Pines. 2010. Activation of cyclin B1–Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *The Journal of Cell Biology*, *189*(2), 247–259. https://doi.org/10.1083/jcb.200909144

Gilles,J. F., M. Dos Santos, T. Boudier, S. Bolte, and N. Heck. 2017. DiAna, an ImageJ tool for object-based 3D co-localization and distance analysis. *Methods*, *115*, 55–64. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.11.016

Harland,L., and M. Forster. 2012. *Open source software in life science research : practical solutions to common challenges in the pharmaceutical industry and beyond*. Woodhead Pub.

Hiscox,J., G. Clarkson, M. Savoury, G. Powell, I. Savva, M. Lloyd, … L. Boddy. 2016. Effects of pre-colonisation and temperature on interspecific fungal interactions in wood. *Fungal Ecology*, *21*, 32–42. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.01.011

Horio,T. 2004. The Role of Microtubules in Rapid Hyphal Tip Growth of Aspergillus nidulans. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(2), 918–926. https://doi.org/10.1091/mbc.E04-09-0798

Jaffe,M. J., A. H. Wakefield, F. Telewski, E. Gulley, and R. Biro. 1985. Computer-assisted image analysis of plant growth, thigmomorphogenesis and gravitropism. *Plant Physiology*, *77*(3), 722–730. https://doi.org/10.1104/pp.77.3.722

Jain,R., R. Singh, S. Sudhaker, A. Kumar Barik, and S. Kumar. 2017. TOXICOLOGY AND FORENSIC MEDICINE Citation Coupling Microextraction With Thin Layer Chromatography-Image Processing Analysis: A New Analytical Platform for Drug Analysis. *Toxicol Forensic Med Open J*, *2*(1), 17–252. https://doi.org/10.17140/TF-MOJ-2-113

Jurjen Broeke; Jose Maria Mateos Perez; Javier Pascau. 2015. *Image Processing with ImageJ - Second Edition*. Packt Publishing. Retrieved from: https://www.kobo.com/us/en/ebook/image-processing-with-imagej-second-edition.

Kenneth R. S., J. C. Russ, M. J. Parry, L. D. Zuckerman, and M. W. Davidson. Molecular Expressions Microscopy Primer: Digital Image Processing - Digital Image Sampling Frequency - Interactive Tutorial. Retrieved February 16, 2018, from: https://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/digitalimaging/processing/samplefrequency/index.html.

Kenneth R. S., J. C. Russ, M. J. Parry, L. D. Zuckerman, and M. W. Davidson. Molecular Expressions Microscopy Primer: Digital Image Processing - Digital Image Sampling Frequency - Interactive Tutorial. Retrieved February 16, 2018, from: http://hamamatsu.magnet.fsu.edu/articles/digitalimagebasics.html.

Lysetska,M., A. Knoll, D. Boehringer, T. Hey, G. Krauss, and G. Krausch. 2002. UV light-damaged DNA and its interaction with human replication protein A: an atomic force microscopy study. *Nucleic Acids Research*, *30*(12), 2686–91. Retrieved from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060686.

Lysetska M, Knoll A, Boehringer D, Hey T, Krauss G,K. G. 2002. Measuring DNA Contour Lengths with ImageJ. *Nucleic Acids Research*, *30*(12), 12–14.

McCloy,R. A., S. Rogers, C. E. Caldon, T. Lorca, A. Castro, and A. Burgess. 2014. Partial inhibition of Cdk1 in G_2 phase overrides the SAC and

decouples mitotic events. *Cell Cycle*, *13*(9), 1400–1412. https://doi.org/10.4161/cc.28401.

Pérez, . M. M., and J. Pascau. (n.d.). *Image processing with ImageJ : discover the incredible possibilities of ImageJ, from basic image procesing to macro and plugin development*. Retrieved from https://www.kobo.com/us/en/ebook/image-processing-with-imagej

Popovic,N., and J. Sherma. 2014. Comparative study of the quantification of thin-layer chromatograms of a model dye using three types of commercial densitometers and image analysis with ImageJ. *Trends in Chromatography*, *9*, 21–28.

Rocha,D. F. de L., M. dos S. Oliveira, E. B. Furlong, A. Junges, N. Paroul, E. Valduga, R. L. Cansian. 2017. Evaluation of the TLC quantification method and occurrence of deoxynivalenol in wheat flour of southern Brazil. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, *34*(12), 2220–2229. https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1364872.

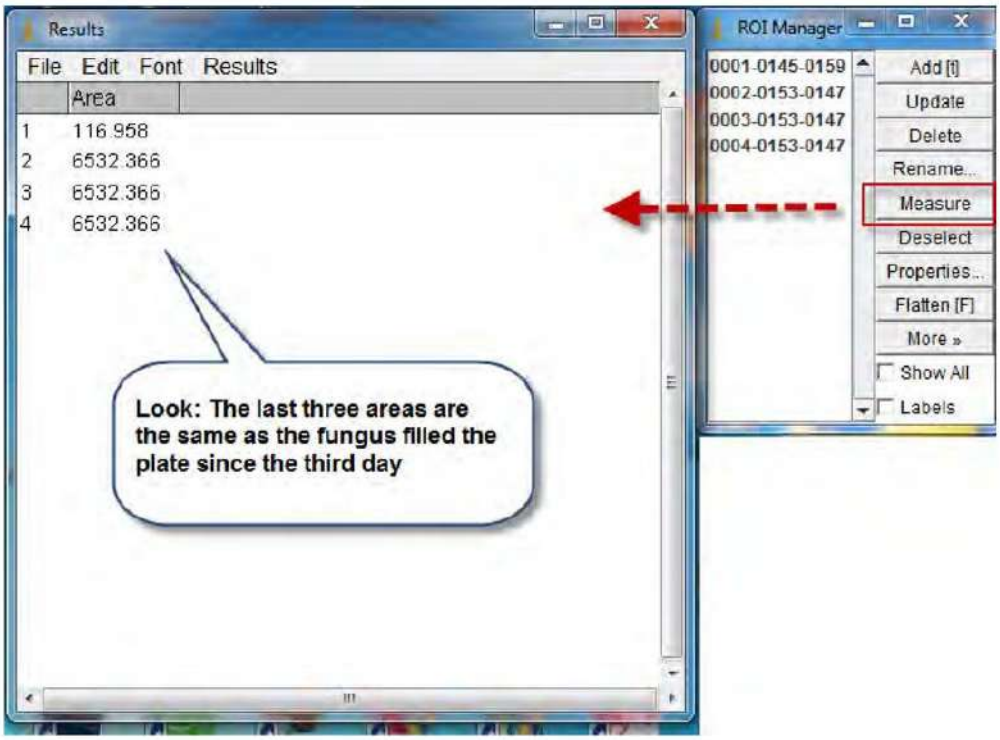
Sakunpak,A., J. Suksaeree, P. Pathompak, T. Charoonratana, N. Chankana, and N. Sermkaew. 2015. Thin-Layer Chromatography—Densitometry and Thin-Layer Chromatography—Image Analysis for Screening Bile Acid-Binding Activities of Thai Edible Plants. *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, *28*(5), 380–385. https://doi.org/10.1556/1006.2015.28.5.6.

Schindelin,J., C. T. Rueden, M. C. Hiner, and K. W. Eliceiri. 2015. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image

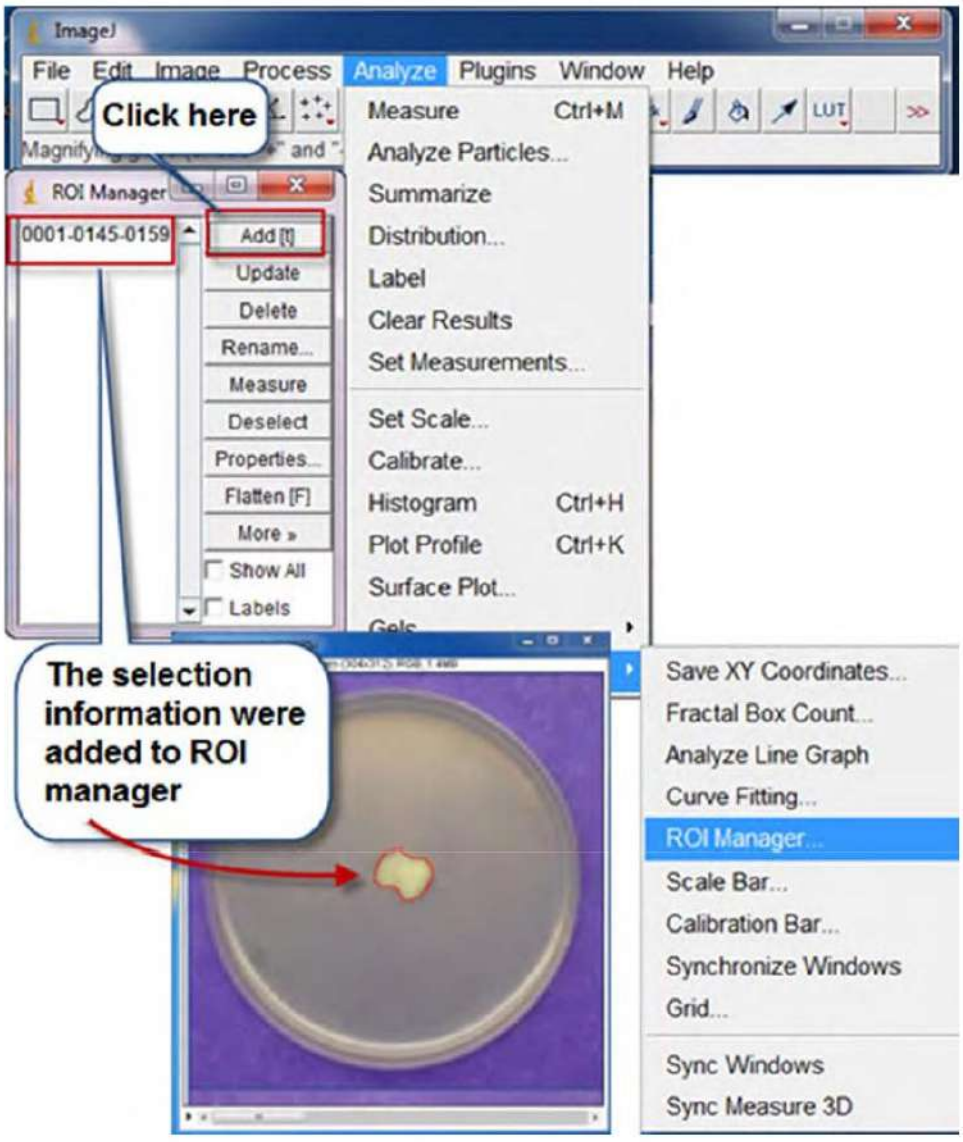
analysis; The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction & Development Mol. Reprod. Dev*, *82*(82), 518–529. https://doi.org/10.1002/mrd.22489.

Stawarczyk,M., and K. Stawarczyk. 2015. Use of the ImageJ Program to Assess the Damage of Plants By Snails. *Chemistry-Didactics-Ecology-Metrology*, *20*(1–2), 67–73. https://doi.org/10.1515/cdem-2015-0007

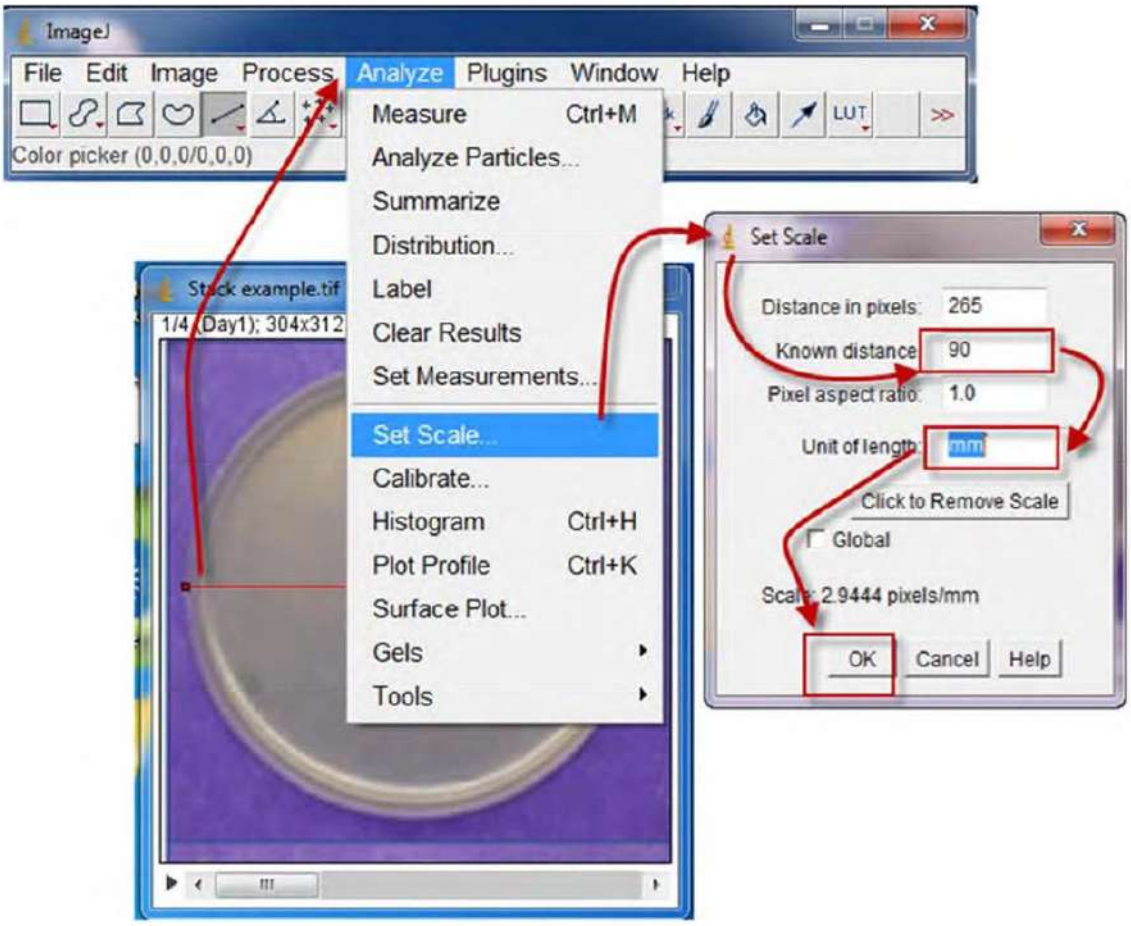
❖ From ROI Manager window >> **Click Measure or (Ctrl+M)** >> the result window will appear including the four areas measurement.



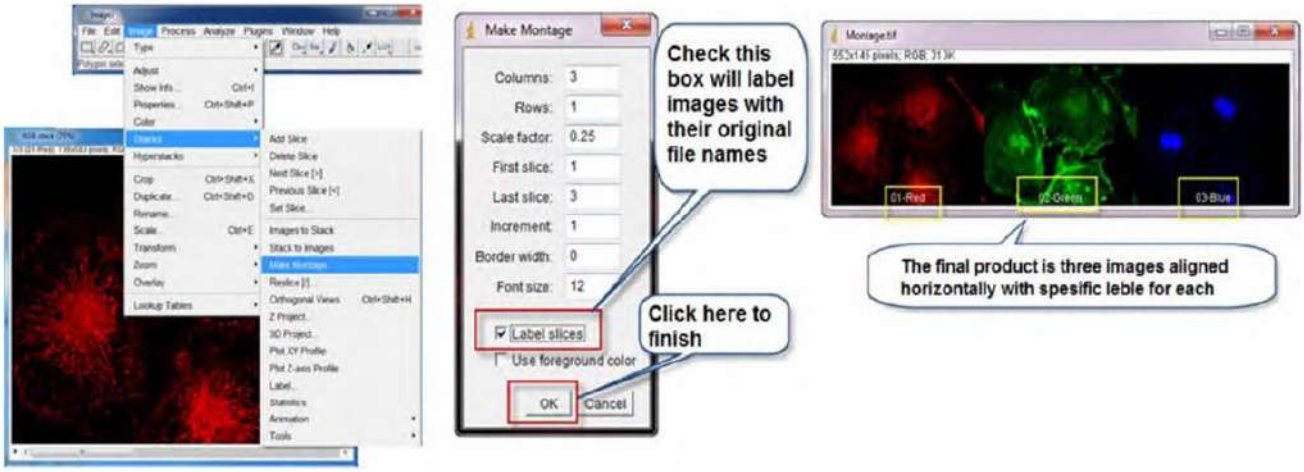
- Select the radial growth area free hand selection tool or any selection method satisfy your experience.
- Go to **Analyze menu >> Tools >> ROI Manger >> Add (t)** >> the selection ROI information will be recorded. Repeat that for each slice.



❖ The first step is to scale measurements considering the petri plate radius as a known length as we learned before. Move the slider across slices to see that the line you'd draw was drown in each slice in the same place. Go to **Analyze menu** >> **Set Scale** >> the distance will be 90 mm >> **Ok**.



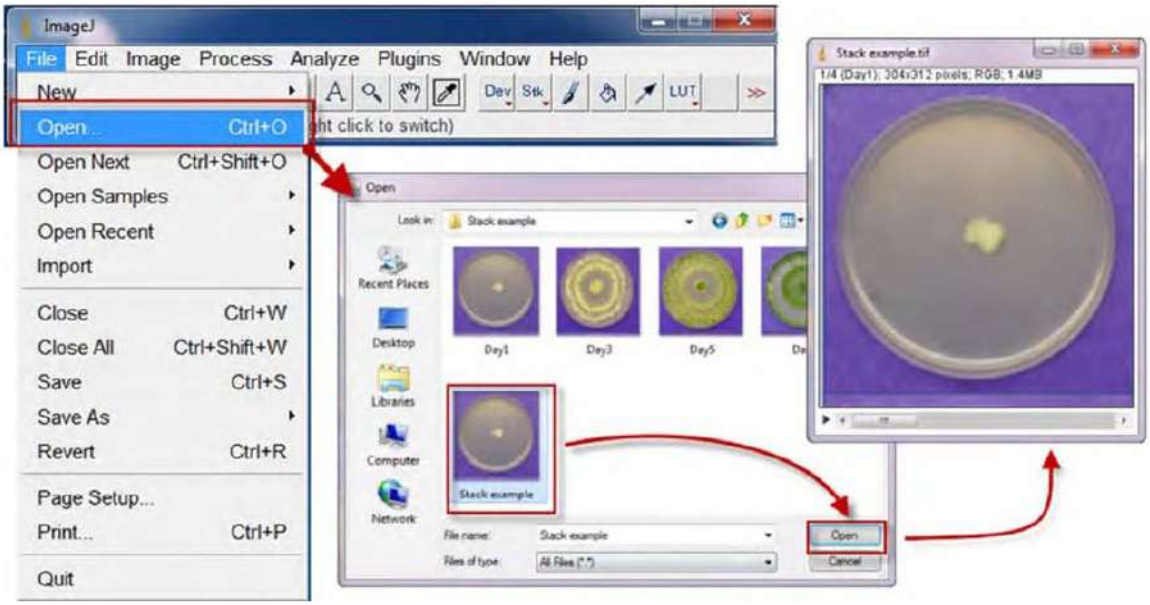
❖ As we need to calculate the area in each slice separately, so we have to select each area manually:

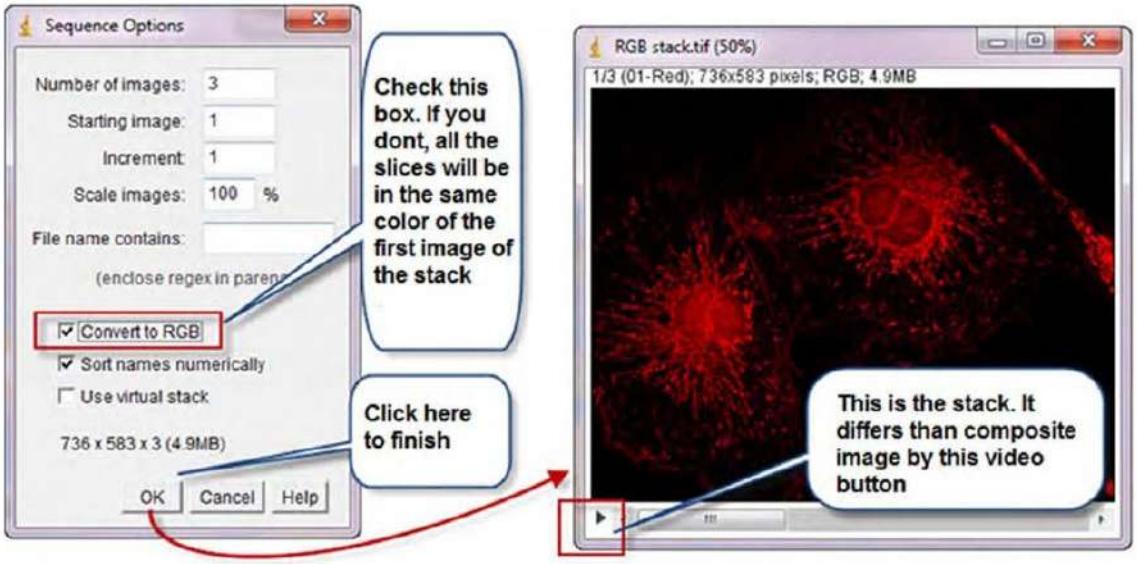


Example for time series measurements

In this example we'll calculate the area of the fungal radial growth to study the growth development by the time and estimating the growth rate.

- ❖ Open stack that we created before: Go to file menu >> Open >> Brows and open stack file.

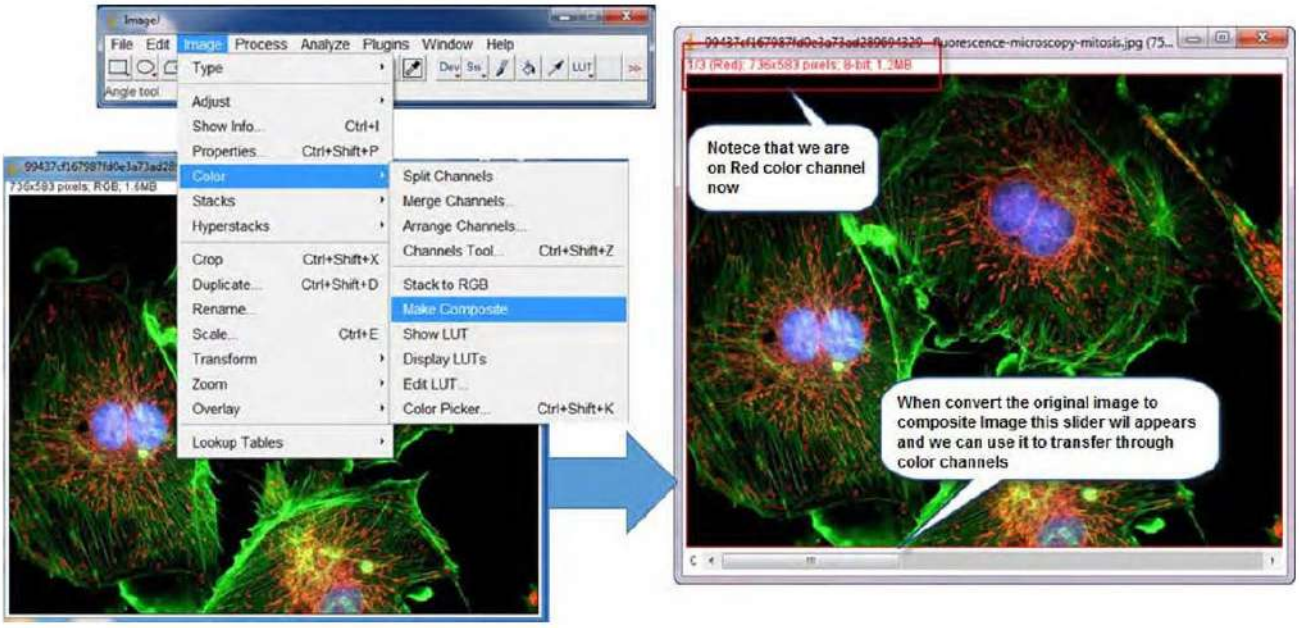




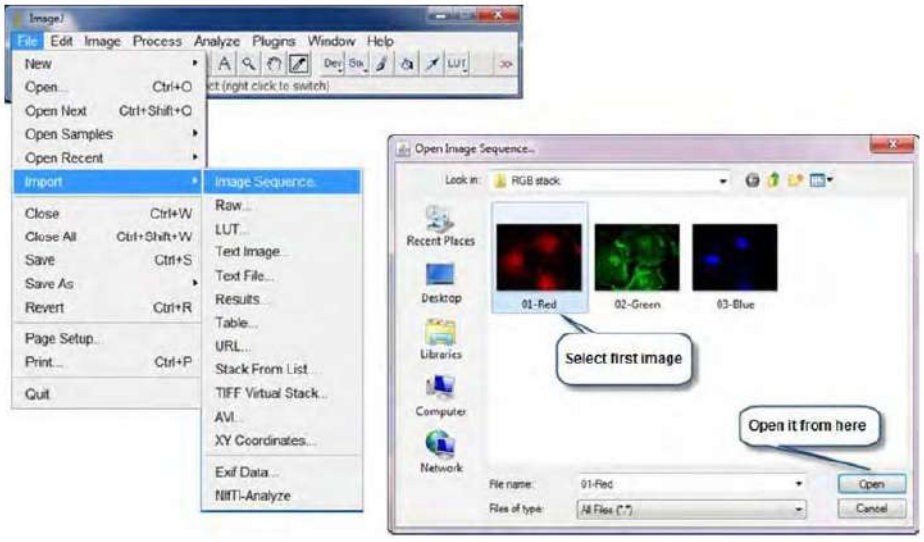
❖ The stack will be creating and when we move the slide, we can explore the channel slides.

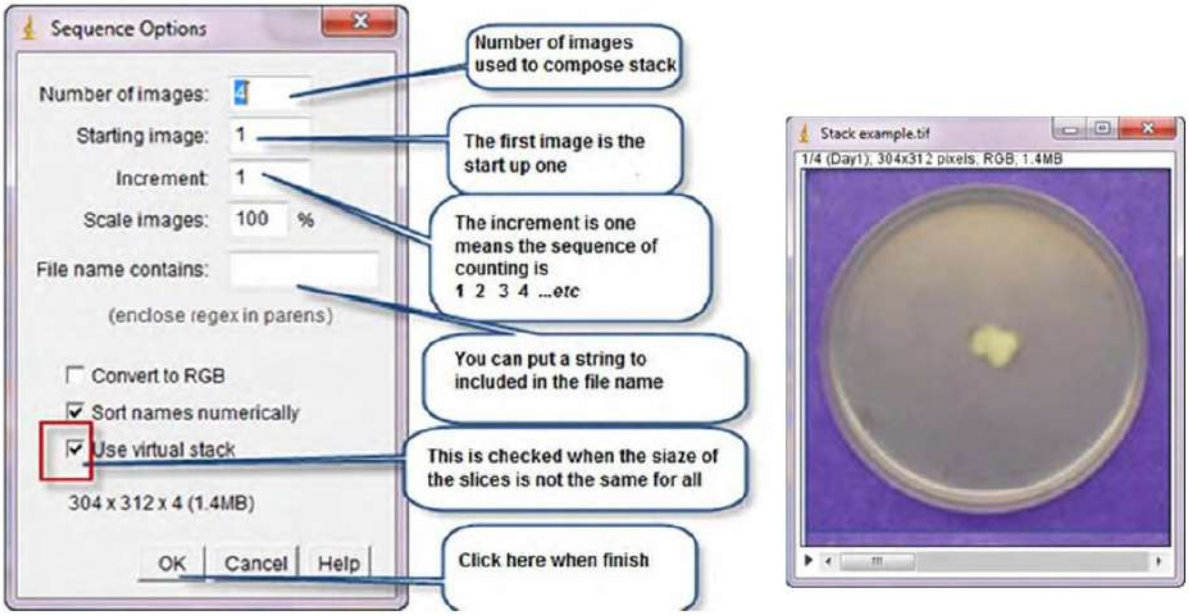
❖ The stack slices can be prepared for printing or publishing in scientific papers using "Make montage" option as below:

- Go to **Image menu >> stacks >> Make montage** >> New window will appear >> **Check "Label slices" check box >> OK**.



- If the images were separated previously (Red, Green and blue), so just we need to stack
- Now we have to stack them: Go to **file menu >> Import >> Image sequence >>** brows >> open the first image >> in the appeared window be sure to check **"Convert to RGB" box >> OK.**





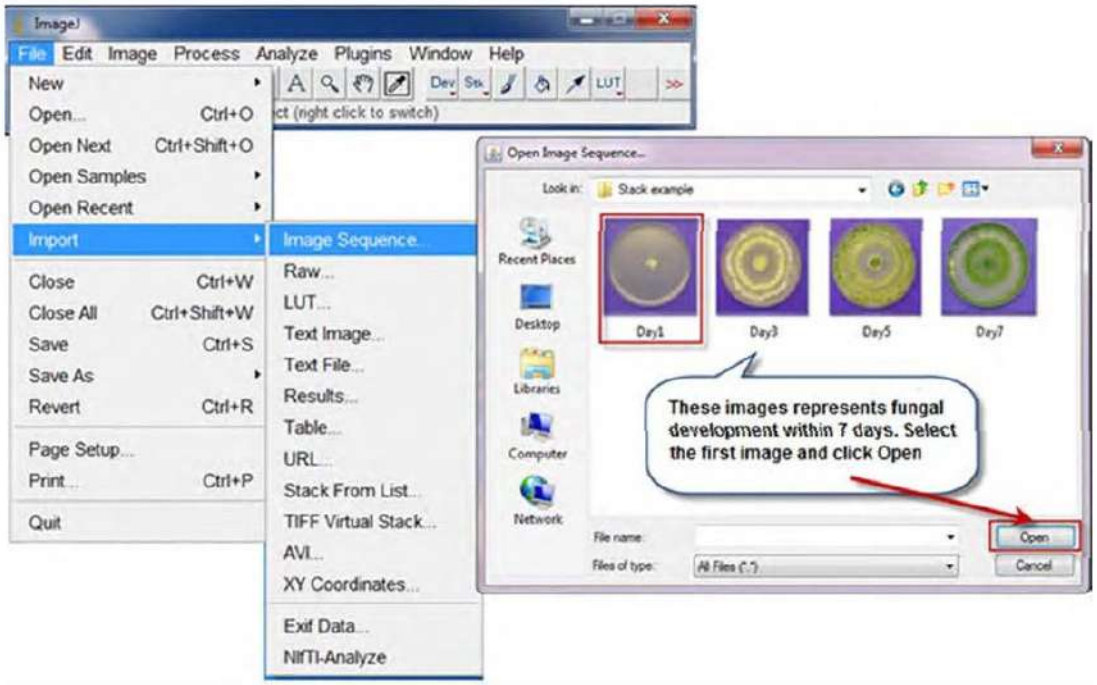
- To create spectral stack we need a number of images equal to the number of spectra that we want to analyze (Red, Green, Blue for example). This technique used mostly for fluorescent microscope image analysis as we need to separate channels to isolate objects for analyze according to the dye that they stained with.
- If the images were separated previously (Red, Green and blue), so just we need to stack them as we learned before; if not, we have to separate channels as below:

- Open fluorescent image >> go to **Image menu >> Make Composite >>** a slide bar will appear in the bottom of image frame.
- **Image menu >> Split Channels** >> we will got three images (one for each channel) >> Save them in a folder.

Note: The model image that used in this example was retrieved from: https://assets.about.me/background/users/c/h/r/christineleonswisher_142034 1687_62.jpg in 14/2/2018.

How to create stack in ImageJ?

- To create stack we need two or more images in the same size and bit-depth. Now let us create time series stack depending on sequence of images stored in folder.
- The first step is going to the **file menu >> import >> Image Sequence**.
- The browsing widow will appear >> brows to the folder and open it >> select the first image **>> open**
- A new widow will appear >> Specify if the information in the boxes are correct (edit if needed) >> Give a name to the file **>> ok**.
- The stack will be created >> go to **File >> save**.



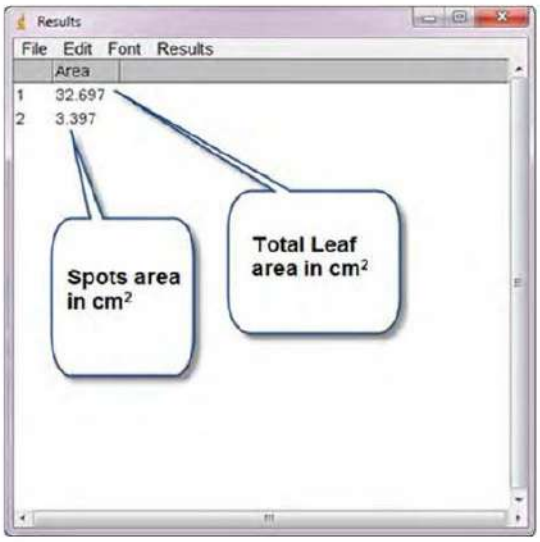
Stacks

Stack is an image processing technique at which two or more 2 dimensional images are companied together in the same frame as a parallel layers called slices with availability of viewing them separately using slide bar at the bottom of the frame in addition to parallel processing and analysis of all contained images (slices) at the same time or individually. The images (slices) that composes stack could related temporally (time series stacks), spectrally (color or spectral channels isolation stacks) or spatially (space related stacks).

What are stacks using for?

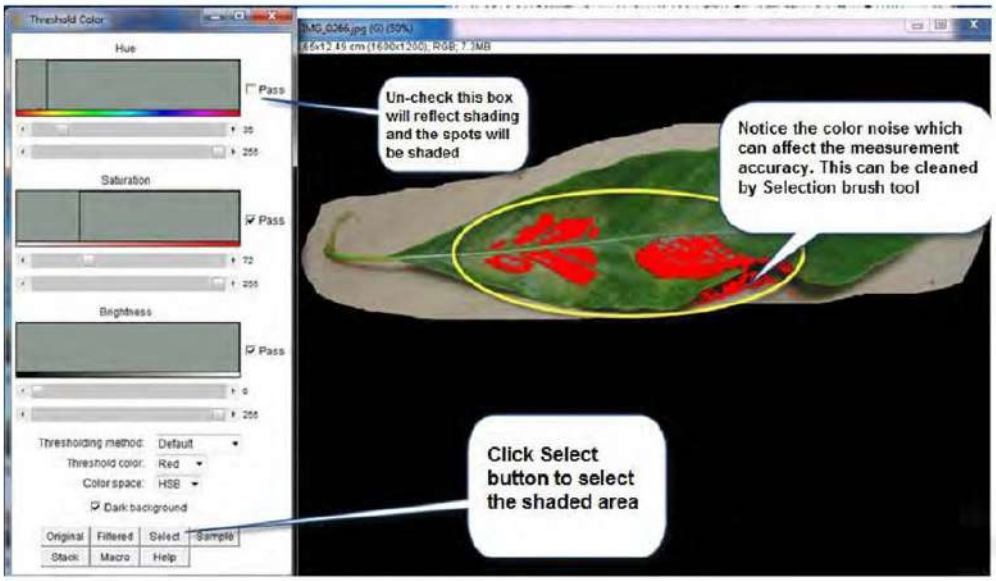
As we mentioned above, the stacks mostly used for parallel analysis of scientific images. The temporal stacks used when we need to study the changes occur to a particular object over a certain period of time like growth development of fungal colony on Petri plate by the time or geological changes of the certain location in a certain period. Spatial stacks generally used in 3D image analysis of 2D slices, the technique that provides availability of building 3D description of particular object through composition of several spatial slices of 2D image like building of 3D object from multiple longitudinal or cross sections of tissues in biological studies. The spectral stacks used to analyze images depending on spectral isolation of colors, the technique that employed widely in fluorescent microscope image analysis as we can separate the fluorescent images to several color channels to easily studying each stained organelles individually.

❖ Go to **Analyze >> measure or (Ctrl+M) >>** the results will appears in the result window.

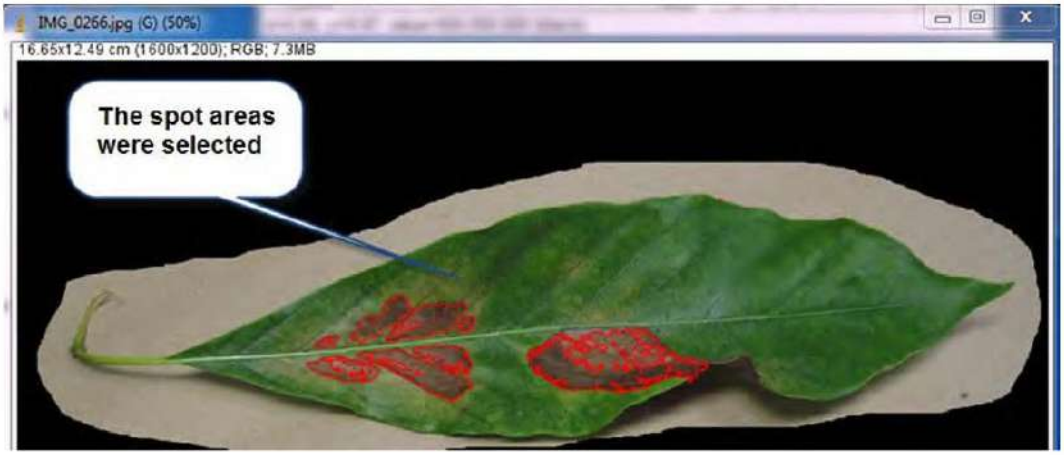


Damage % = (Spots area / Total leaf area) × 100
= (3.397 / 32.697) × 100 = 10.39 %

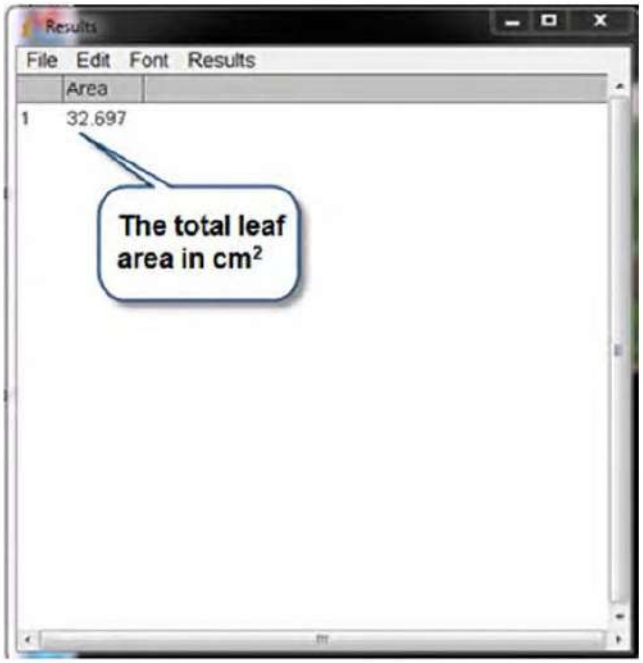
❖ To threshold the spots we have to invert selection by un-check **Pass** option of the **Hue control box**.



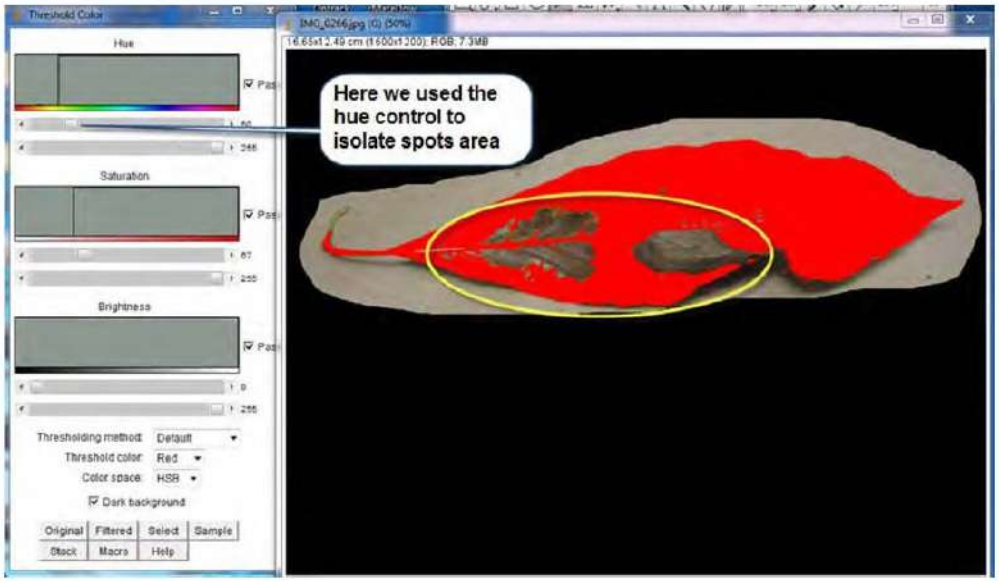
❖ After pressing **select button,** the selected area may includes some noise (unwanted selections). We can clean that by Selection brush tool (right click on Oval tool). The selected area should be as below:



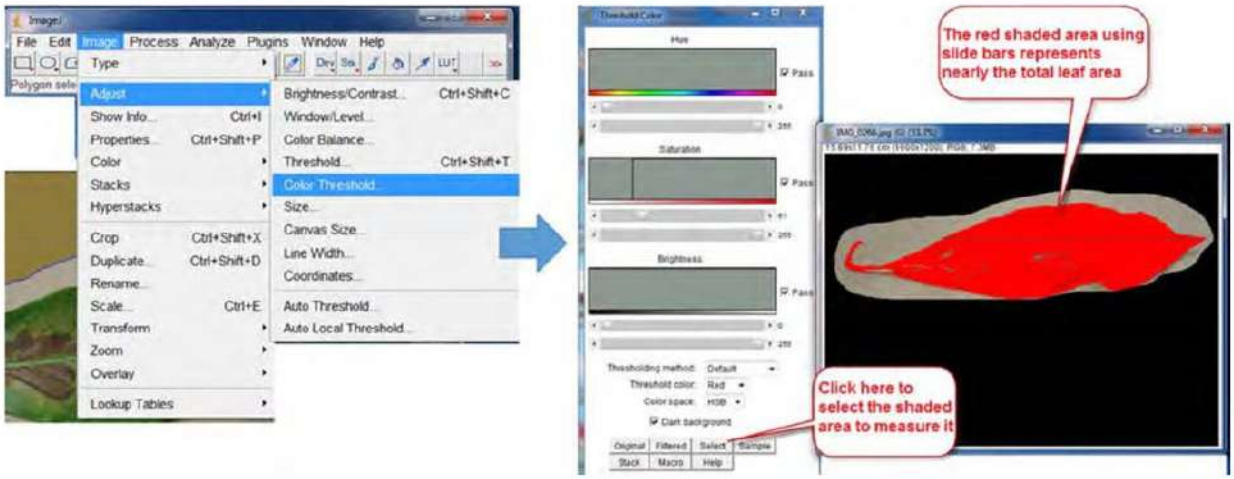
❖ Go to **Analyze >> Measure or Ctrl + M** to calculate the total leaf area.



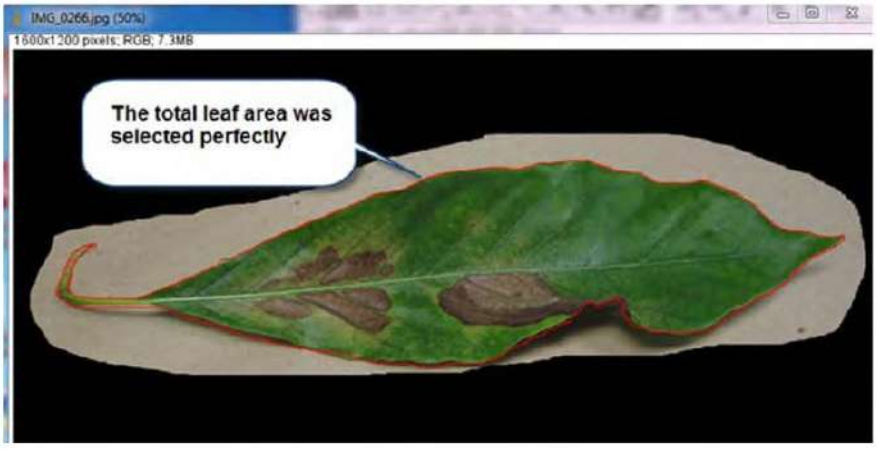
❖ In the same way (by color thresholding) we have to select the damaged areas.



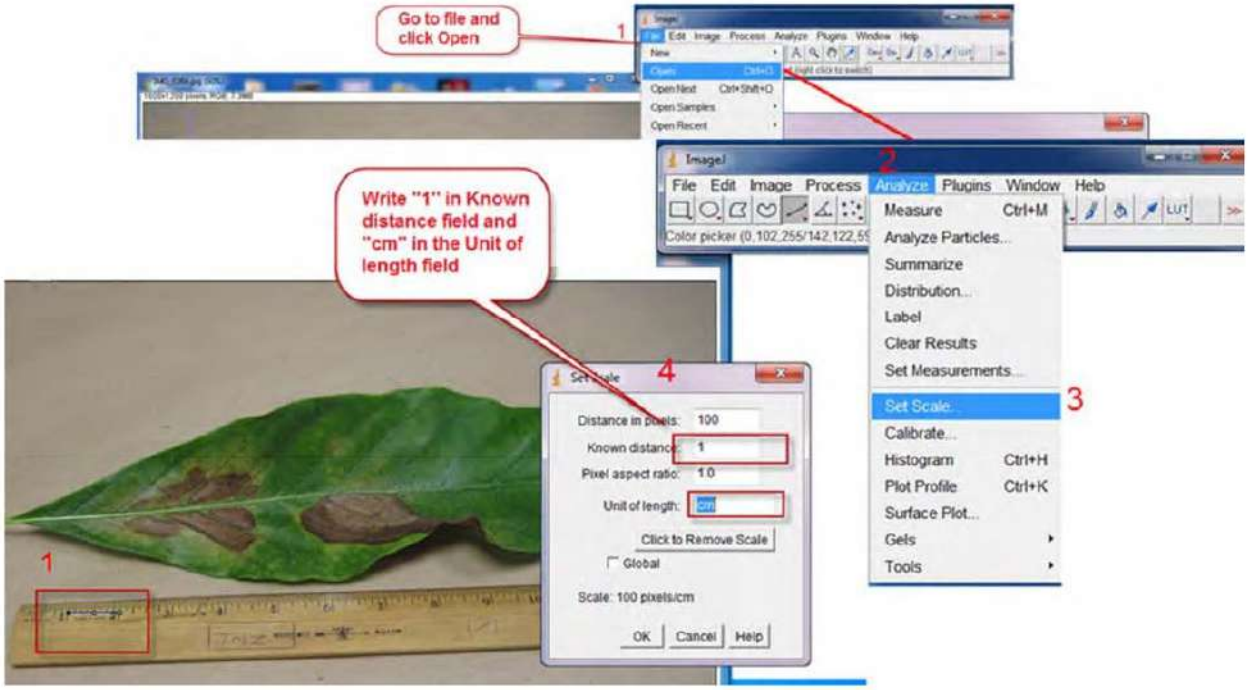
❖ Thresholding image: Go to **Image menu >> Adjust >> Color threshold.**



❖ After pressing the select button, the selected area may includes some noise (unwanted selections). We can clean that by **Selection brush tool** (right click on Oval tool). The selected area should be as below:

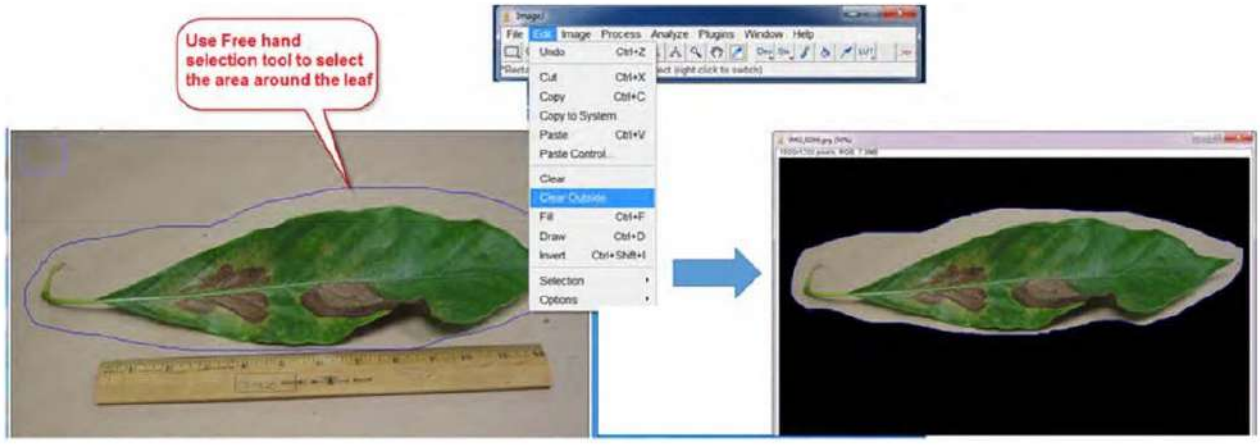


❖ The first step is opening the image: Go to **File >> Open** >> Brows then double click to open image.



❖ Scale the measurements: Draw a line between 1-2 cm >> go to **Analyze >> Set scale**.

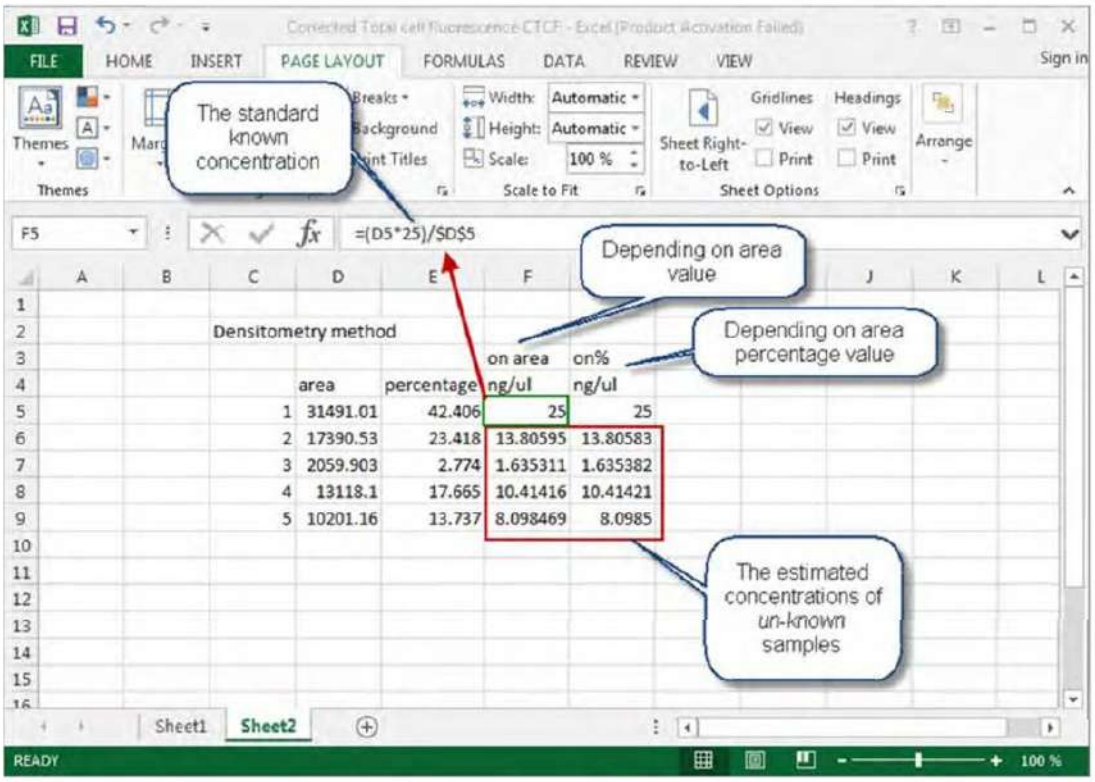
❖ Select the leaf area by **free selection tool** >> go to **Edit menu >> Clear out side.**



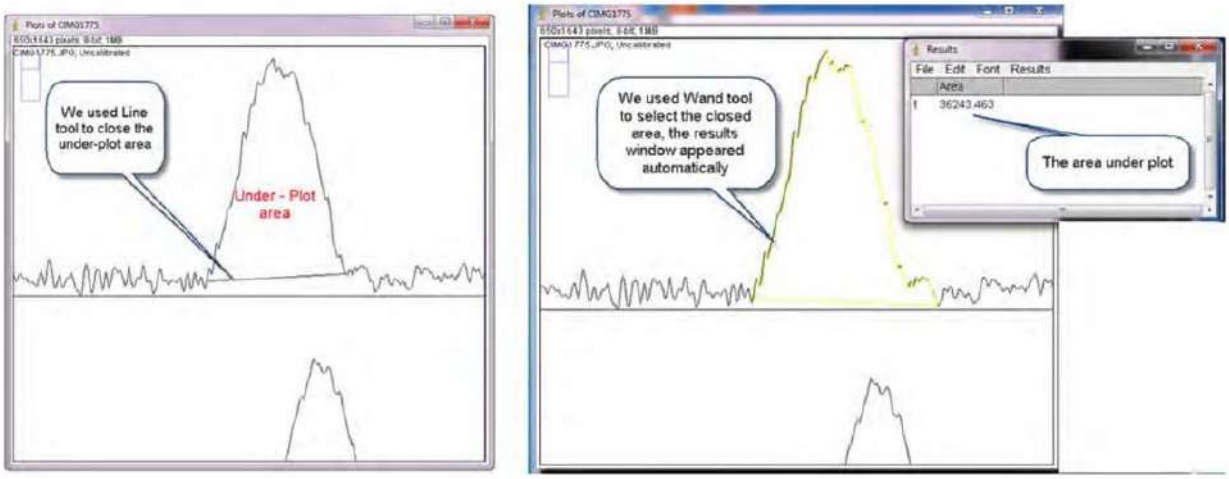
Estimating leaf spot percentage

Leaf spotting is one of the most important plant diseases that affect the foliage of a large number of plant species. The disease mostly caused by pathogenic fungi in addition to the bacteria and viruses, furthermore, insects can be causes damages like leaf spot diseases. Anyway, the disease severity of spotting mostly determine by estimating of the damaged area of the infected leaves that measured by several classical methods that may lack accuracy and/or efficiency. ImageJ provides several tools to establish accurate estimation of damaged areas of leaf surface depending on the color thresholding detection, (which is the best) and/or manual measurement tools. The following example focusing on the color thresholding method that can be performed by following the steps below:

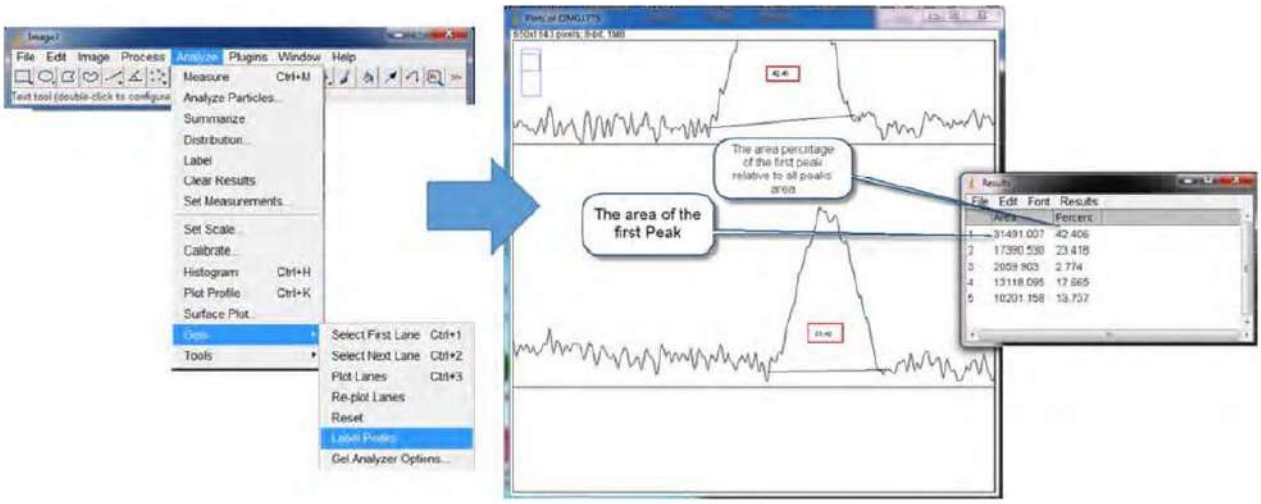
Note: the leaf image used in the following example was retrieved from: https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTkVQdb5cXd5RafVrHhhx5ksUhHvfFx0lAcPE3pwMkILWV-SjMd6w in 14/2/2018.


The standard known concentration
=(D5*25)/D5
Depending on area value
Depending on area percentage value
The estimated concentrations of un-known samples
Densitometry method
area
percentage
on area ng/ul
on% ng/ul
1 31491.01 42.406 25 25
2 17390.53 23.418 13.80595 13.80583
3 2059.903 2.774 1.635311 1.635382
4 13118.1 17.665 10.41416 10.41421
5 10201.16 13.737 8.098469 8.0985
Sheet1
Sheet2
READY

❖ Use Line Tool to close the curve area >> Wand Tool to select that area >> and the results will appears in the results window automatically.

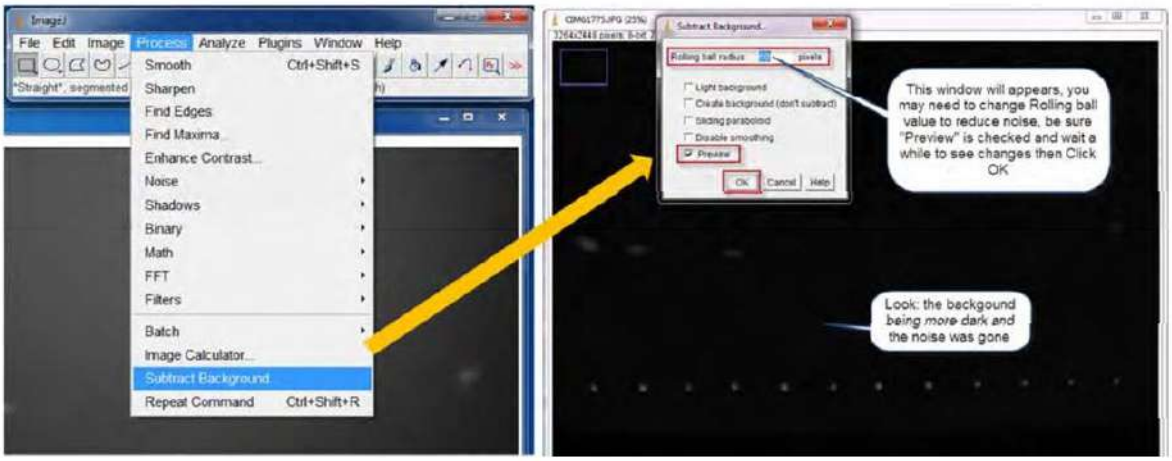


❖ When finish, Go to Analyze >> Gels >> Label Peaks >> each peak will be labeled with area percentage.



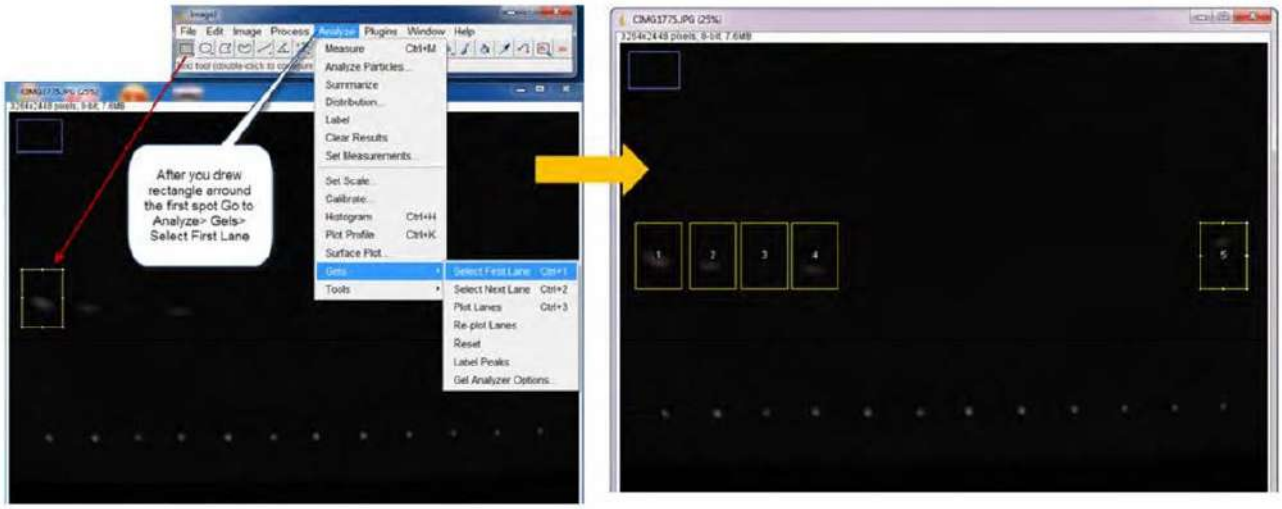
❖ Utilize area or area percentage values and known standard peak concentration to quantify concentration by Pro rata method. Use MS excel to perform that.

❖ Go to **Process >> Subtract Background** to reduce noise as could as possible by **check Preview >> change the Rolling ball** radius value until adjusting background >> **OK.**



❖ Draw rectangle around the first spot >> go to **Analyze >> Gels >>** Select First Lan **(or ctrl+1).**

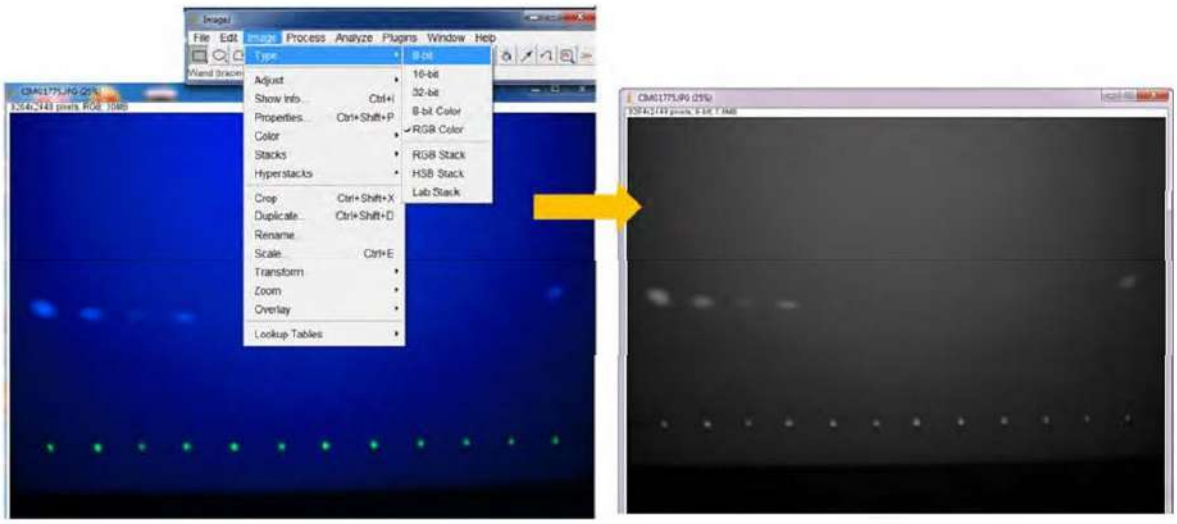
❖ Transfer rectangle to the second spot by mouse >> go to **Analyze >> Gels>>** Select next Lan **(or ctrl+2).** Repeat this to all spots.

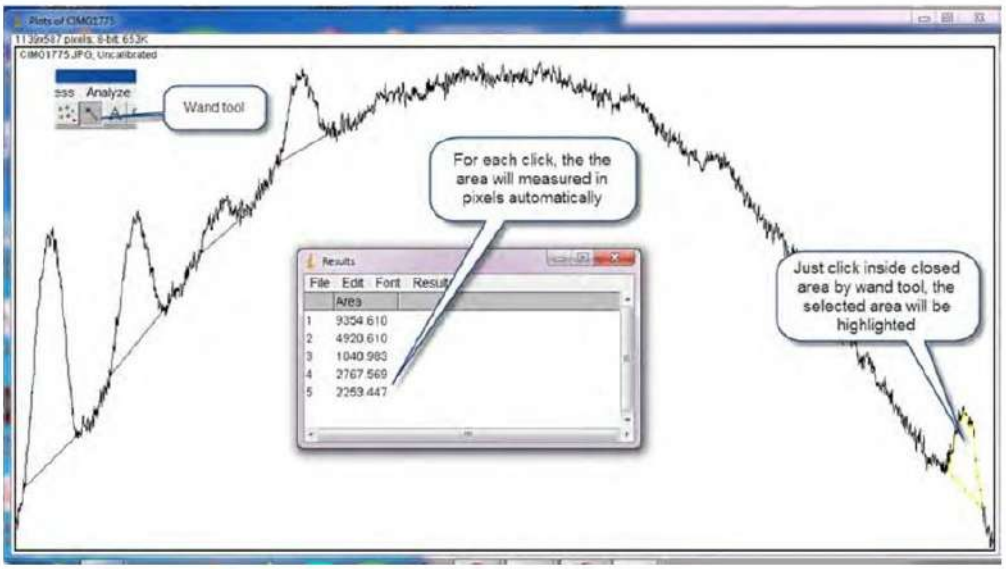


- If we have 2 or 3 known standard in the plate we can make a standard curve using MS Excel then use the slop formula to calculate the un-known concentrations accurately.

Other method to quantify TLC spots. This method is better and more accurate especially when spots are not in straight order.

- **Open Image >> convert to gray scale.**
- Go to **Process >> Subtract Background** to reduce noise as could as possible by **check Preview >> change the Rolling ball** radius value until adjusting background >> OK.
- Draw rectangle around the first spot >> go to **Analyze >> Gels >> Select First Lan (or Ctrl+1).**
- Transfer rectangle to the second spot by mouse >> go to **Analyze >> Gels>> Select next Lan (or Ctrl+2).** Repeat this to all spots.
- **Open Image >> convert to 8-bit gray scale.**





❖ Now we have the area of each peak. To calculate the concentration in Nano grams relatively depending on the known concentration of standard (sample 1) by Pro Rata calculation method as below:-

The results of our example will be:

No.	area	Conc.(ng/µl)
1	9354.610	25
2	4920.610	?
3	1040.983	?
4	2767.569	?
5	2253.447	?

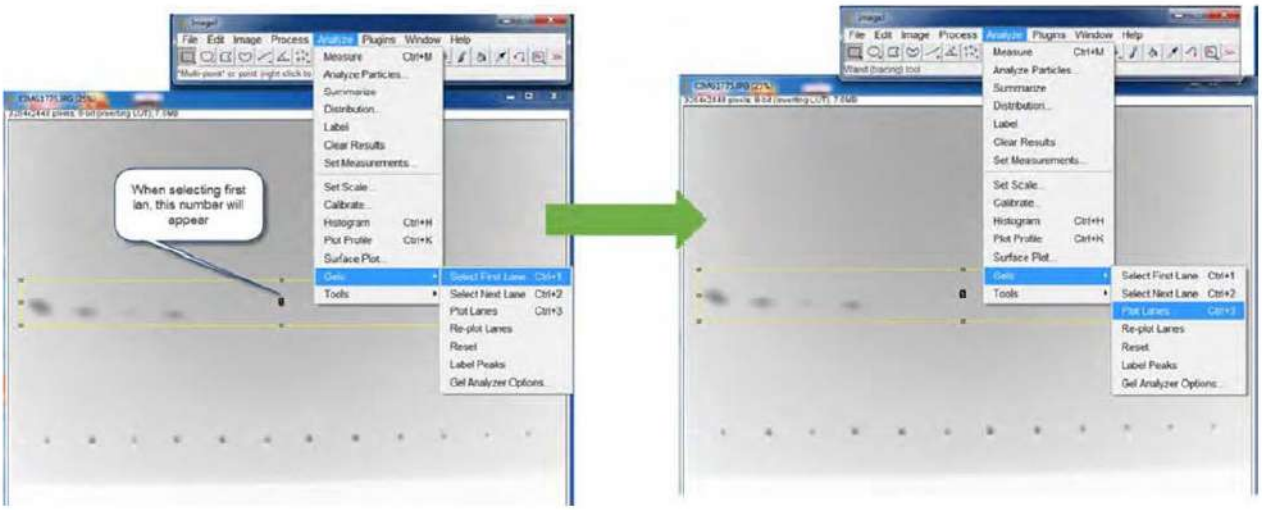
$$\text{The conc. of sample 2} = \frac{4920.610 \times 25}{9354.610} = 13.150 \text{ ng/µl}$$

$$\text{The conc. of sample 3} = \frac{1040.983 \times 25}{9354.610} = 0.566 \text{ ng/µl}$$

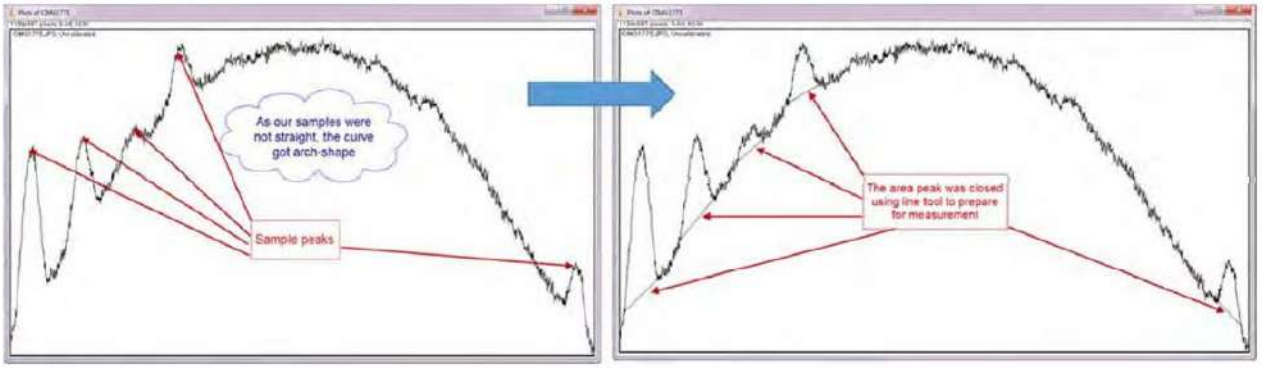
$$\text{The conc. of sample 4} = \frac{2767.569 \times 25}{9354.610} = 7.396 \text{ ng/µl}$$

$$\text{The conc. of sample 5} = \frac{2253.447 \times 25}{9354.610} = 6.022 \text{ ng/µl}$$

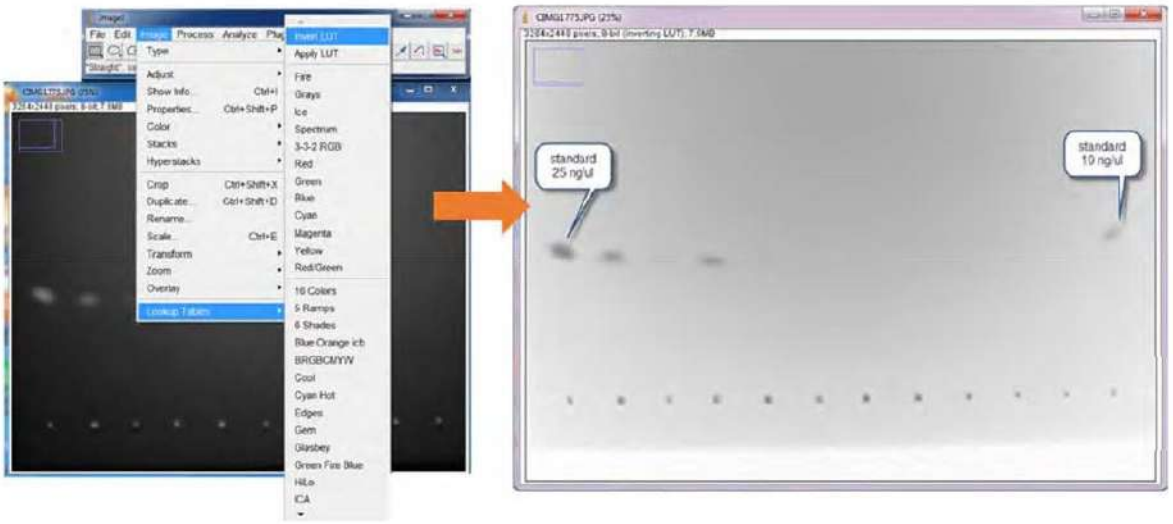
❖ Go to **Analyze >> Gels >> Plot lanes.**



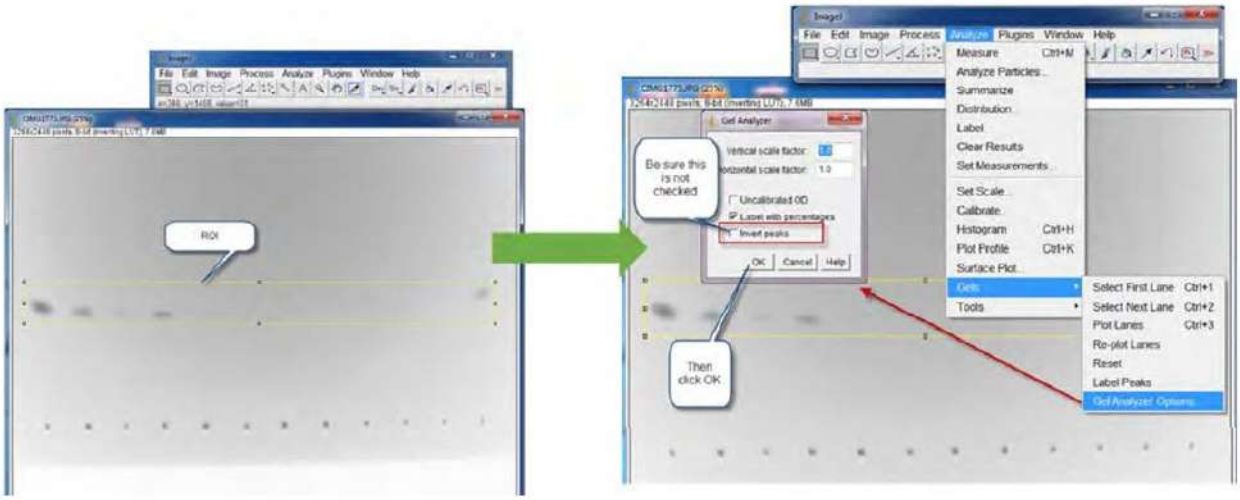
❖ Use line tool to close the peaks area



❖ To measure the area under peak use wand tool to select it and the area will appears in the results window.



- Use rectangular tool to highlight ROI (Region of interest).
- Go to **Analyze >> Gels >> Gel Analyzer options** >> new window ill appears (be sure Invert peaks is not checked) then OK.



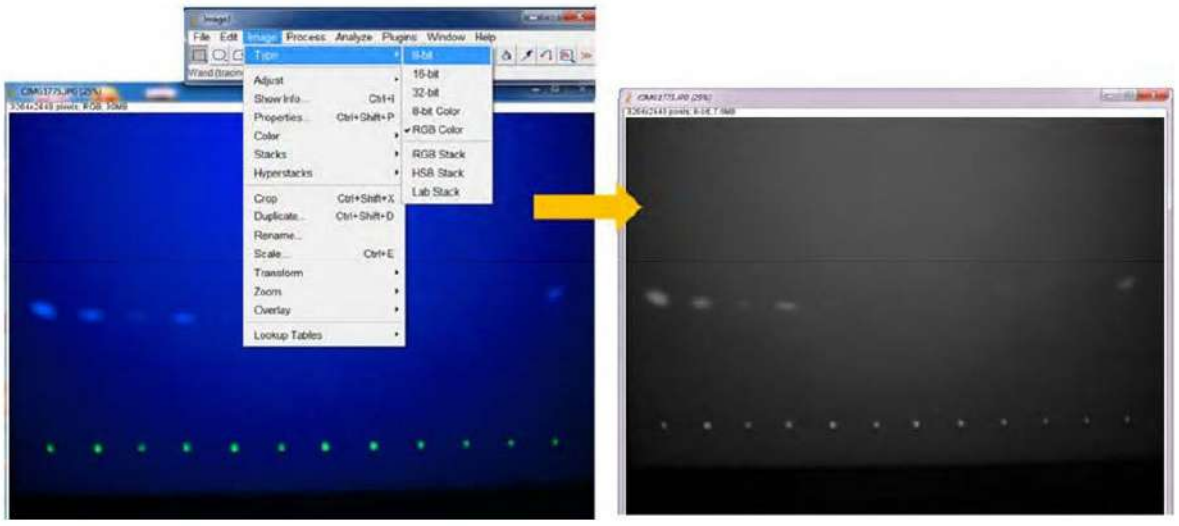
- Go to **Analyze >> Gels >>** select first lane.

Gel analysis

Gel analysis refer to all gel images processing (that includes agarose, polyacrylamide or silica gel) to estimate the distances of the bands or spots in addition to the quantification processes to estimate the concentration of the studied objects.

To perform gel analysis in ImageJ flow up these steps:

- open Image >> convert to 8-bit gray scale



- Go to Image >> Lookup tables >> Invert LUT (This will convert image to a negative image)

Counting

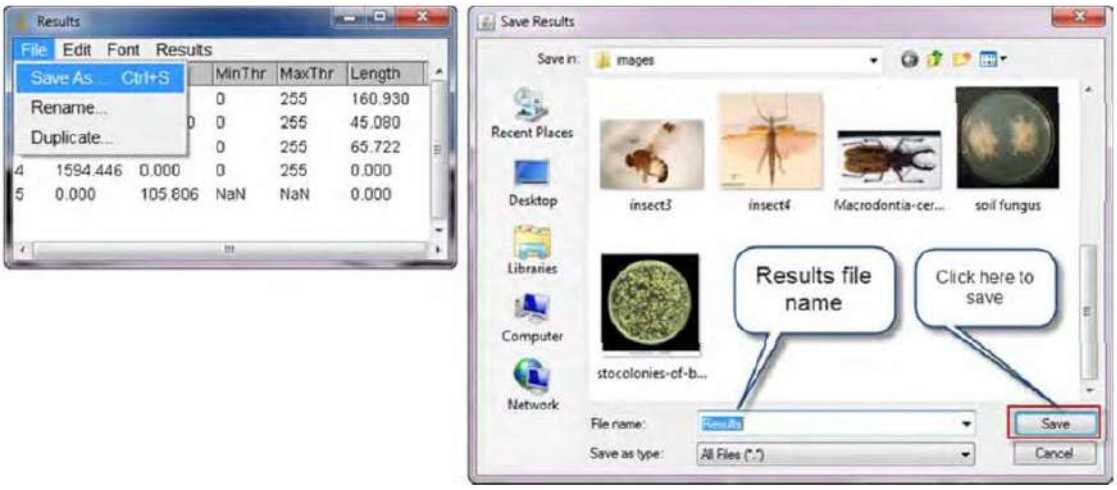
To count objects in the work field manually, you must do what below:

- Open Image.
- Use Multi-Point tool.
- Point the objects you want to count.
- When finish go to **Analyze >> measure >>** the results window will appear containing the pointed objects count with X and Y coordinates of each point position.

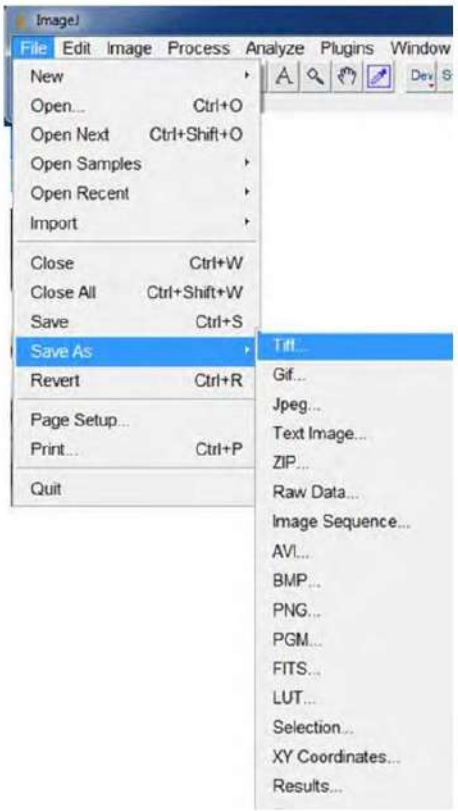
To count objects in the work field automatically, you must do what below:

- Open Image.
- Convert Image to gray scale 8 bit.
- Threshold the Image (make it black and white).
- **Process >> Binary >> Watershed** (to separate merged objects).
- Go to **Analyze >> Analyze particles** and type the upper and lower limits for particle size >> **OK** >> each particle size will be outlined and numbered in new window. The data window will contains measurement for each particle.

❖ The results can be saved as Excel sheet: **File >> Save as >> Brows then save**.

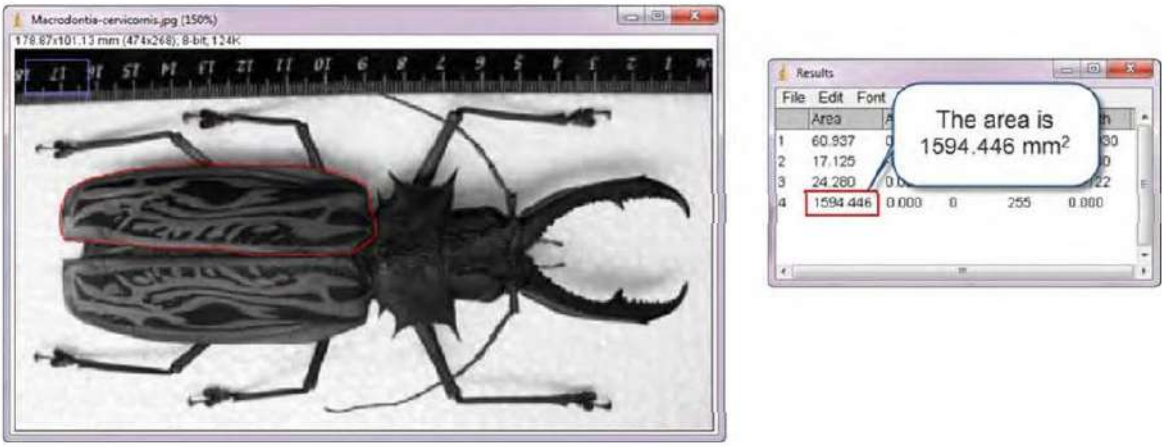


Save image

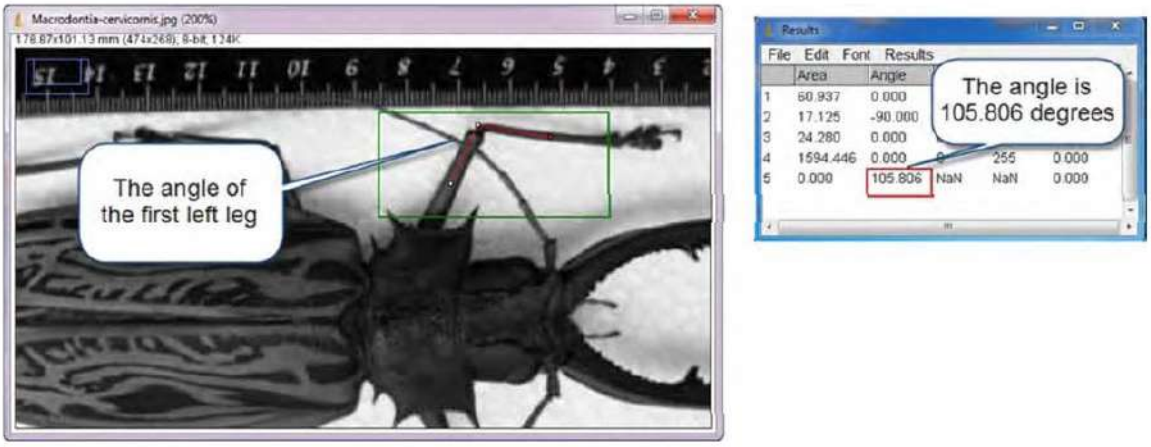


Images from digital cameras are usually saved as JPEG files. JPEG is a type of memory compression that results in the loss of some data. A JPEG image degrades each time it is opened, edited and resaved. It is best to save a file in a 'lossless' format such as a TIFF during the editing process: **File >> Save As >> Tiff.**

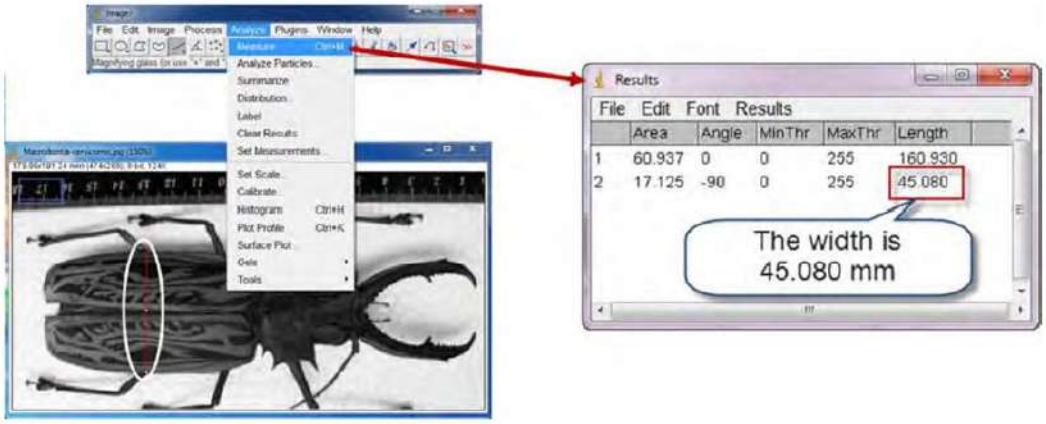
❖ Measuring the left wing area: **Select the left wing area by Free hand selection >> Analyze >> measure OR Ctrl+M >> The results will appears in results window.**



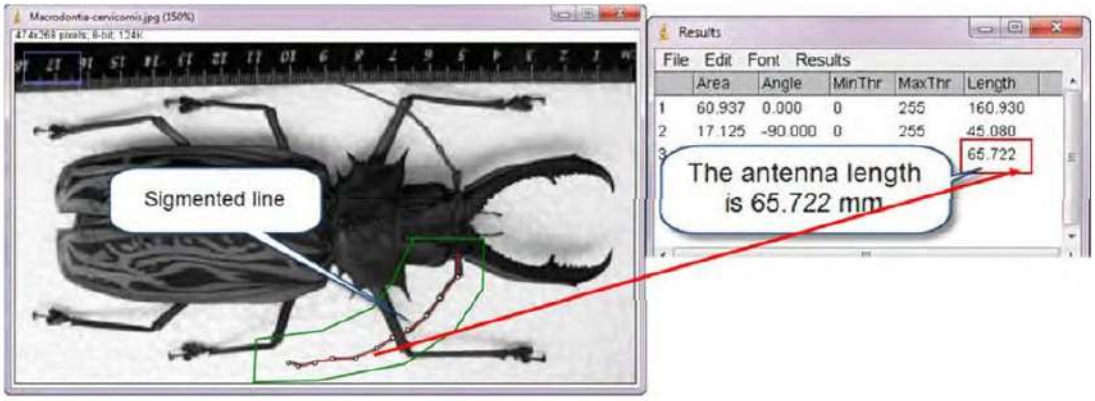
❖ Measuring the leg angle: **Draw angle on the leg using Angle Tool** **>> Analyze >> measure OR Ctrl+M >> The results will appears in results window.**



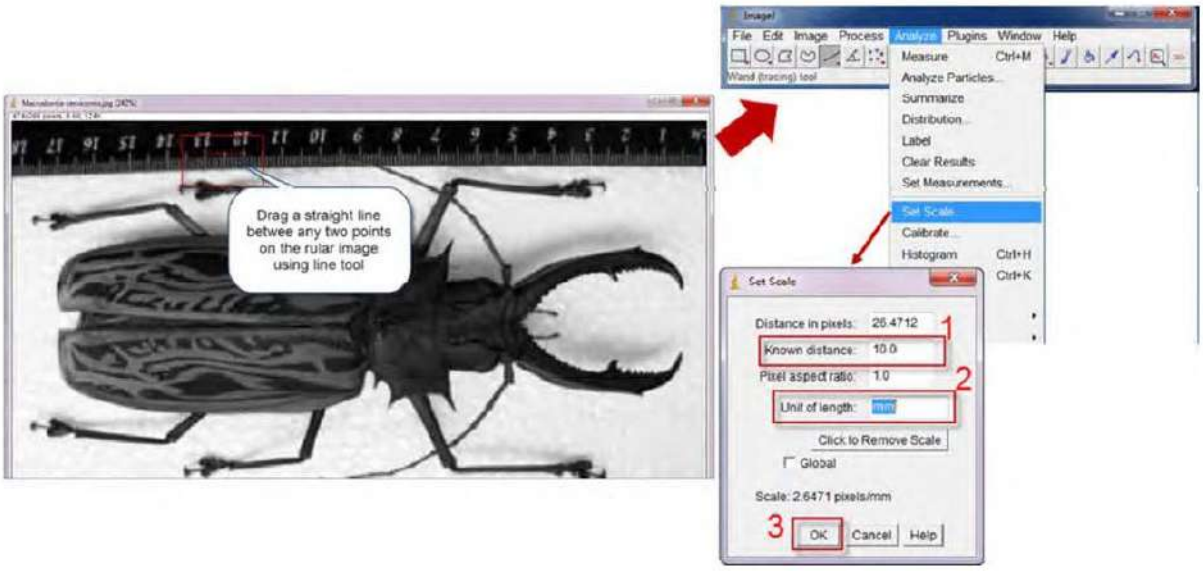
❖ Measuring the width: **Drag a straight line along widest area of the insect >> Analyze >> measure OR Ctrl+M >> The results will appears in results window.**



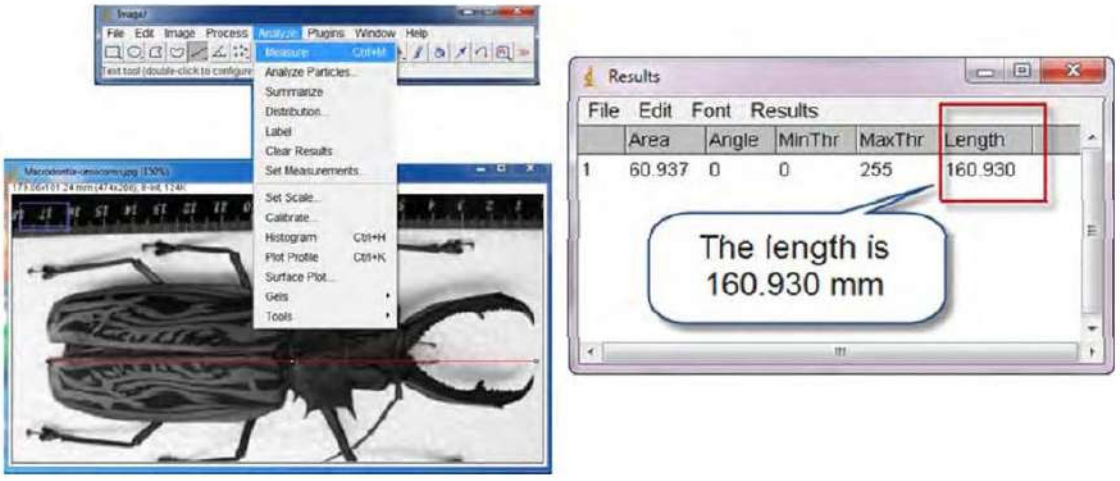
❖ Measuring the antenna length: **Drag a segmented line (right click on line tool and change to segmented) along the antenna >> Analyze >> measure OR Ctrl+M >> The results will appears in results window.**

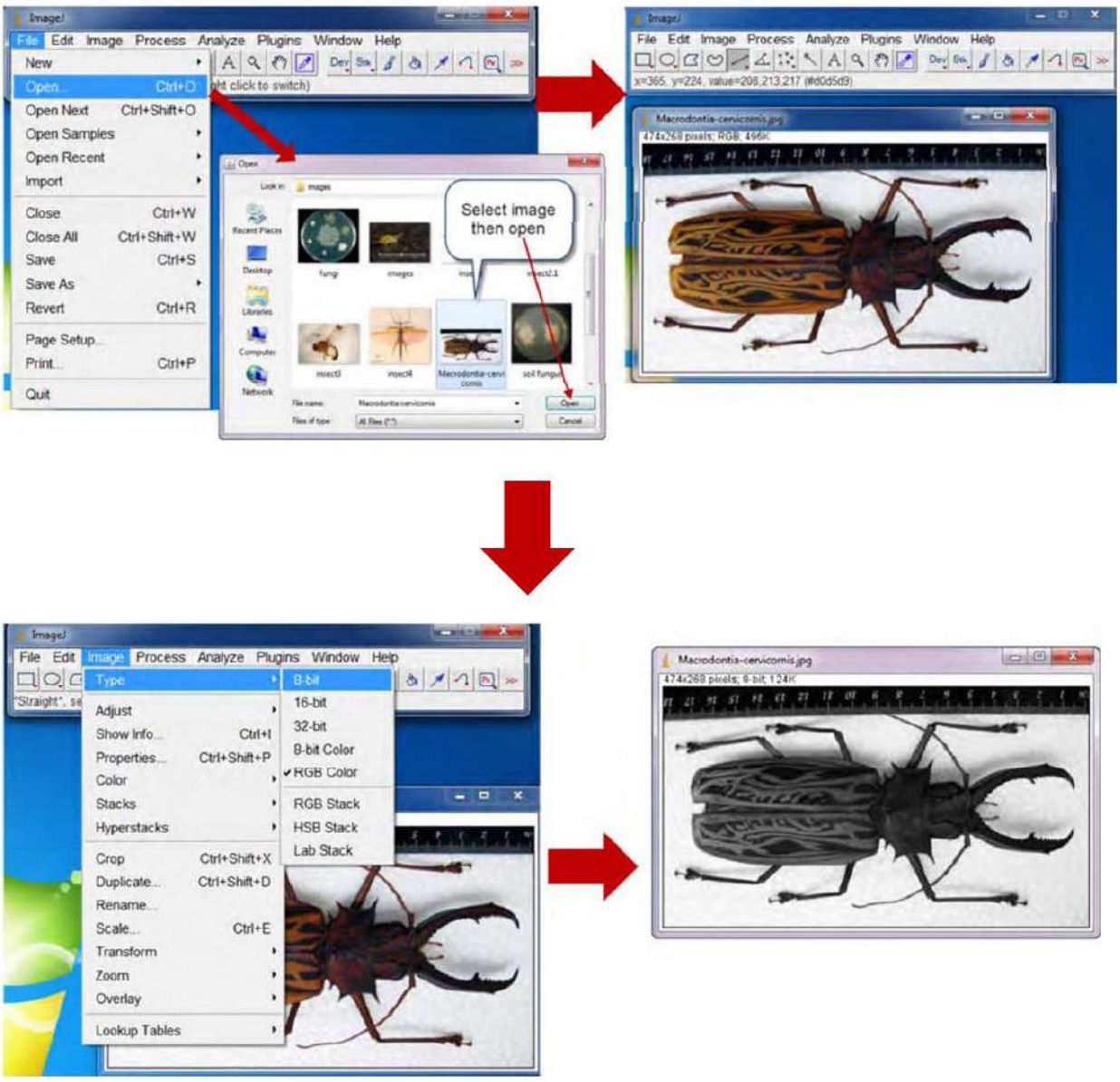


the known length in "known distance" box >>write the measurements units in "Unit of length" box >> OK



- Now the object is ready for measurements.
- To estimate the length: **Drag a straight line along the insect >> Analyze >> measure OR Ctrl+M >> The results will appears in results window.**





❖ Scale measurements: **Draw straight line between two points of known measurements object >> go to Analyze >> Set Scale >> write**

Measuring and counting objects – preparation

Image processing dependent measurements (distance, length, width, size, area, angle,.. *etc*..) in the scientific image, required the following preparations:

- ❖ The Image should include a well-known dimensions object (such as a ruler, known dimensions square object, known radius circular object... *etc*..) to set the measurement scale according to it.

http://labmed.ucsf.edu/education/residency/fung_morph/fungal_site/thumbnails/aflavussdd4.2ofw4.jpg

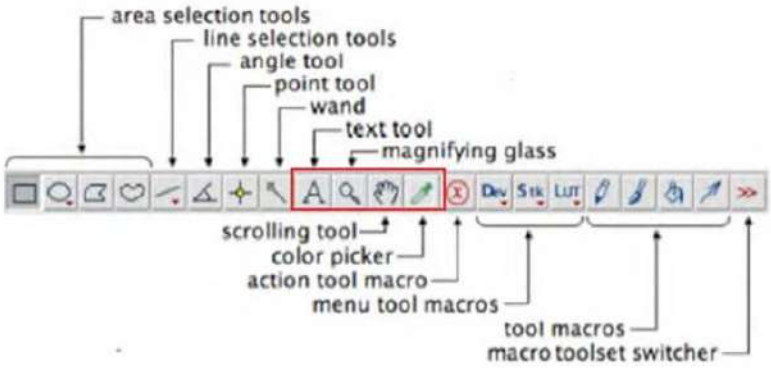
http://3.bp.blogspot.com/-g23eyxvT5pM/VIEQiayGPCI/AAAAAAAAEk8/I_Nvh9UTjKw/s1600/Macrodontia_cervicornis__M.jpg

https://s.blogcdn.com/www.dailyfinance.com/media/2012/09/bedroom-bedbugs-240cs091112.jpg

- ❖ The starting image should be as high resolution as possible. The high quality image the high accuracy measurements.
- ❖ Open the image in the imageJ: **File >> Open >> brows then open OR Drag your image and drop it on ImageJ tools ribbon.**
- ❖ Convert the color image to grayscale 8-bit image: **Image >> Type >> 8-bit.**

❖ Other Tools: The remaining tool buttons are similar to those found in drawing programs (spray can, flood fill, etc.) and can be easily used after a bit of experimentation.

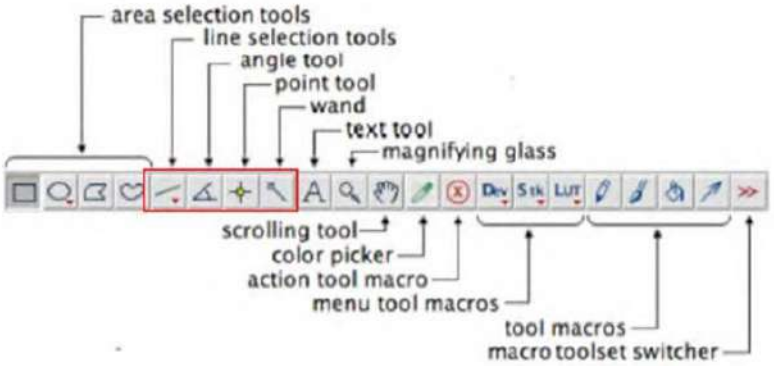
to the left of an edge; click and the algorithm will search to the right for an edge. It will then trace along the edge of the object until it returns to the starting point.



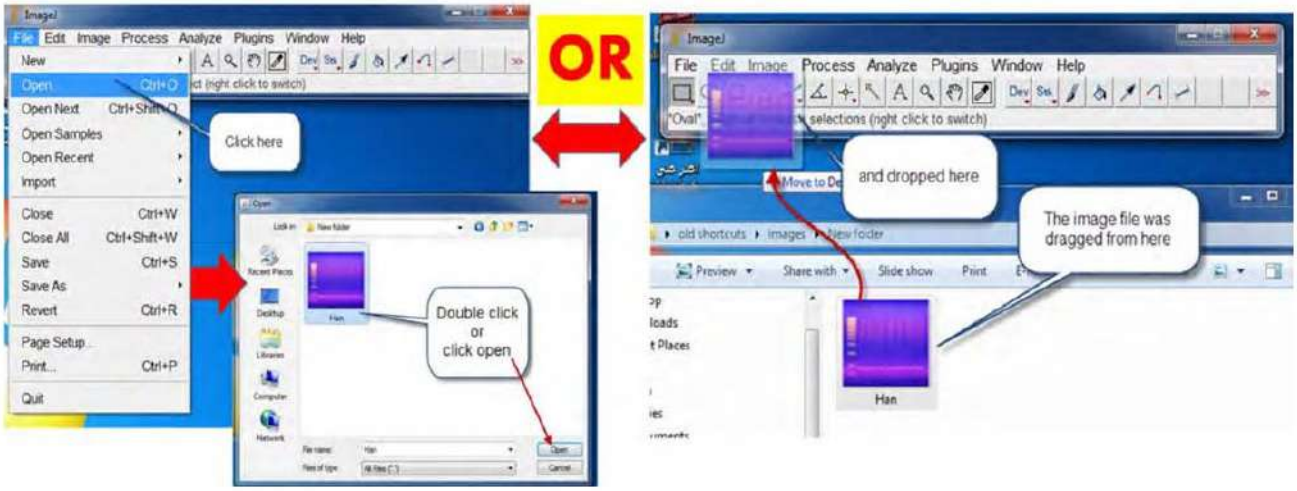
- Text Tool: Double click on this button to select a font and size. A large font size will probably be required for an image from a high resolution digital camera. Single click the button, click- drag a text box and type the label. Move the box to the desired location and permanently set the text in place with Edit → Draw (or Ctrl+D). Use the color picker tool to select font color.
- Magnifying Glass: Left-click on the image to magnify; right-click to reduce the image size.

- Text Tool: Double click on this button to select a font and size. A large font size will probably be required for an image from a high resolution digital camera. Single click the button, click- drag a text box and type the label. Move the box to the desired location and permanently set the text in place with Edit → Draw (or Ctrl+D). Use the color picker tool to select font color.
- Magnifying Glass: Left-click on the image to magnify; right-click to reduce the image size.

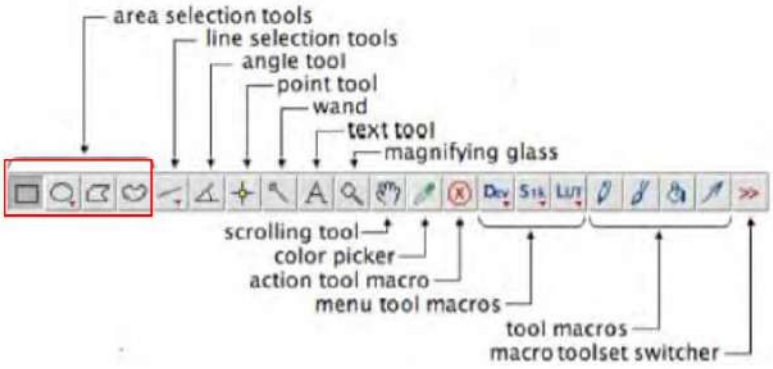
copied, etc. using the menu commands. Note that the status bar, below the tool bar, gives information such as the coordinates (xx, yy) of the selection on the frame.



- Line Selection Tool: This button allows you to create straight, segmented or freehand lines (right-click to select line type). Information about the line is displayed on the status bar. Double-click on the button to alter the line width, select **Analyse → Measure** (or Ctrl+M) to record a line length and **Edit → Draw** (or Ctrl+D) to make a line permanent.
- Angle Tool: Draws two intersecting lines and measures the formed angle.
- Point Tool: When 'Auto-Measure' is selected, this tool allows you to mark locations on an image; with each click the coordinates of the mark (xx, yy) and brightness values (0-255) are recorded in a data window. Color images will have three brightness readings displayed on the status bar, one each for the red, green and blue channels, however only a single grayscale brightness value will appear in the data window.
- Wand Tool: This tool automatically finds the edge of an object and traces its shape. It works best with high contrast images. Place the wand



Tools Bar

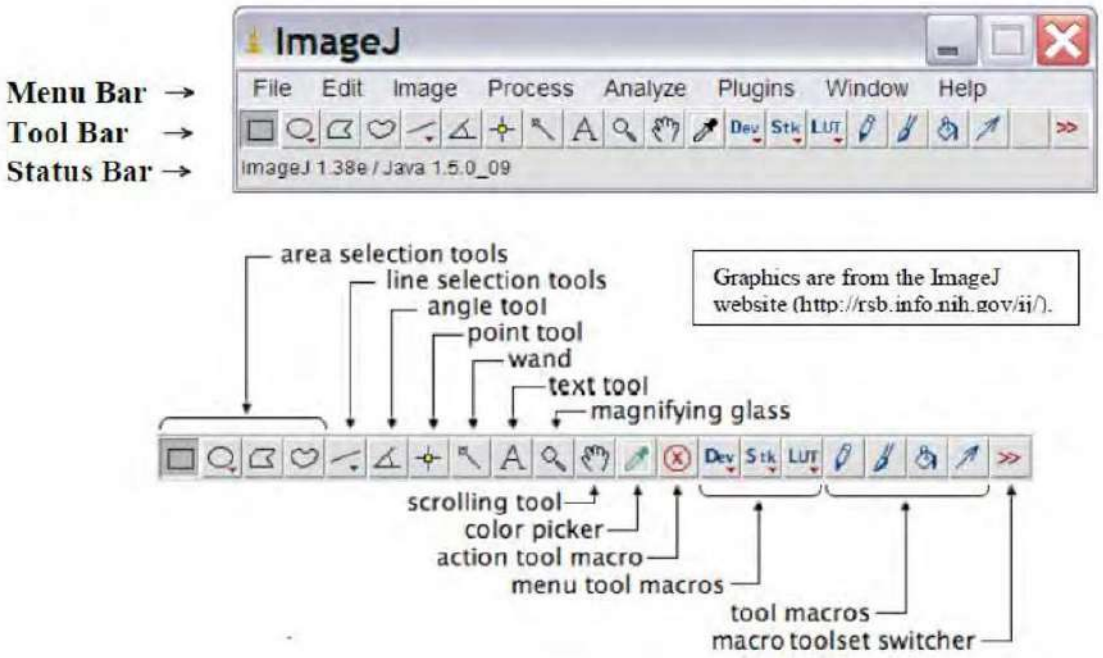


The various buttons on the tool bar allow you measure, draw, label, fill, etc. A right click or a double left-click may expand your options with some of the tool buttons.

- ❖ Area Selection Tools: The first four buttons on the tool bar allow you to surround an area on the image with a rectangle, oval, polygon or freehand shape. After selection, these areas may be altered, analyzed,

❖ Restart ImageJ and the launcher (ImageJ.exe) will generate a new ImageJ.cfg that uses the Java you just installed.

ImageJ user interface



Opening file

❖ Select ***File → Open*** from the menu bar to open a stored image file.

❖ Or drag the image and drop it in image J bar.

Contents of ImageJ Folder

ij.jar

This JAR (Java Archive) file is the platform-independent core of ImageJ. It is the only file changed when you upgrade using the Help>Update ImageJ command.

ImageJ.exe

This is the ImageJ launcher.

jre (optional): This folder contains the Java runtime.

Macros

This folder contains example macros. The StartupMacros.txt file in this folder contains macros and macro tools that are automatically installed when ImageJ launches. To run a macro, drag and drop it on the ImageJ window and run it by pressing ctrl-r (Macros>Run Macro).

Plugins

This folder contains a small sample of the hundreds of plugins available for ImageJ. Plugins, macros and scripts in this folder, and immediate sub-folders, are installed in the Plugins menu when ImageJ launches.

LUTs

This folder contains LUTs (LookUp Tables) that are installed at startup in the Image>Lookup Tables menu. Use the Image>Color>Display LUTs command to view all the LUTs in this menu.

Upgrading to a Newer Version of Java

This is what you need to do to upgrade to a newer version of Java:

- Download and install the latest JDK from:

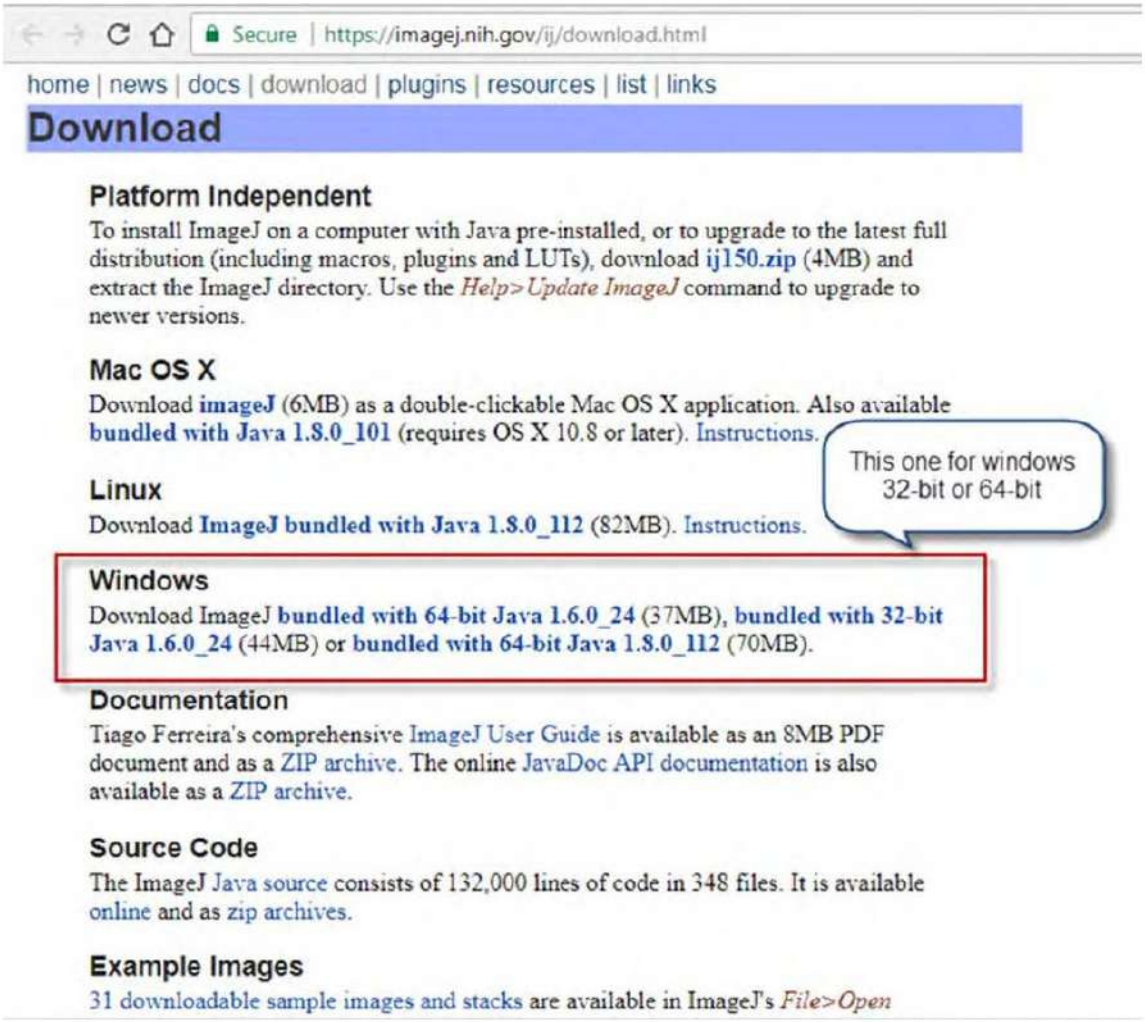
  www.oracle.com/technetwork/java/javase/downloads/

- Go to the ImageJ folder and delete or rename the jre folder Delete the ImageJ.cfg file then

ImageJ installation

To install ImageJ to your PC you have to follow what below:

- Download from: http://imagej.nih.gov/ij/download.html .
- Decompress the file and start working.
- Details on how to install ImageJ on Linux, Mac OS 9, Mac OS X and Windows are available at: http://imagej.nih.gov/ij/docs/install



Conclusion

To nalyze image with any image processing program we have to:

- ❖ Work on digital image.
- ❖ Specify the suitable Bit-depth which plays a significant role in image processing.
- ❖ Specify the suitable resolution as it affects the analysis accuracy.
- ❖ Using greyscale mode making processing easiest to perform.

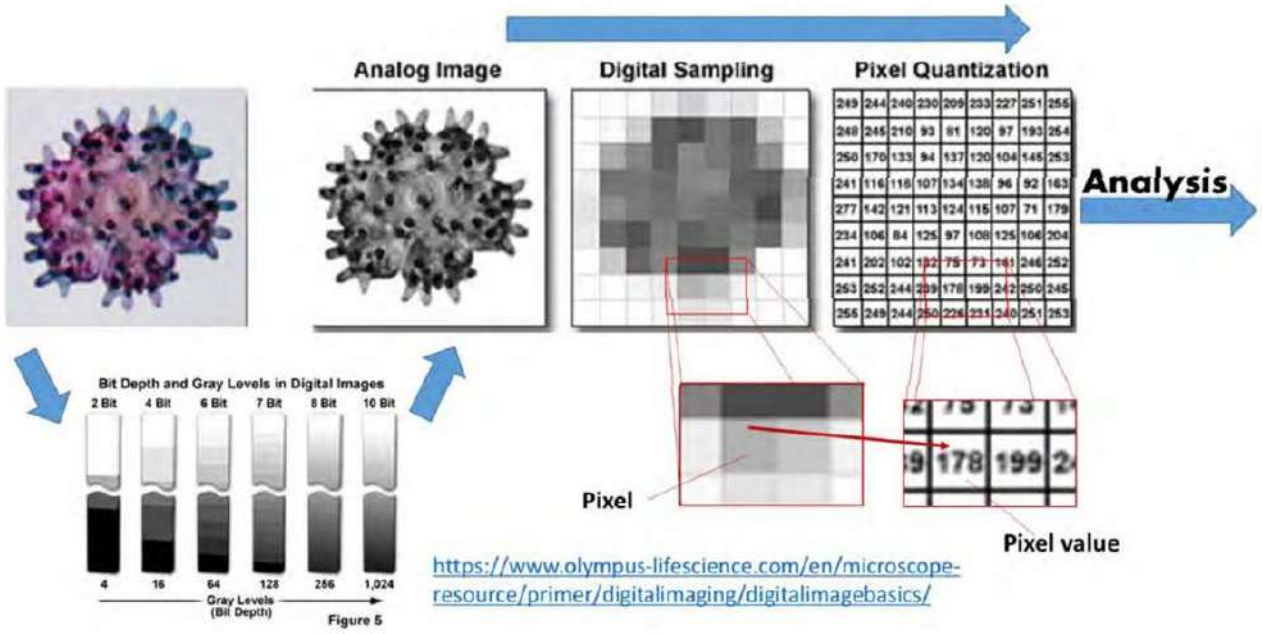
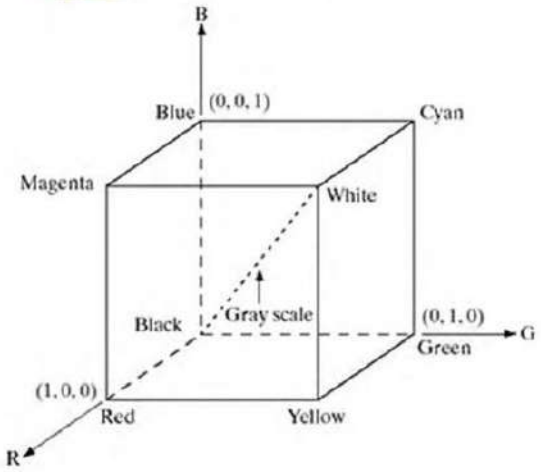


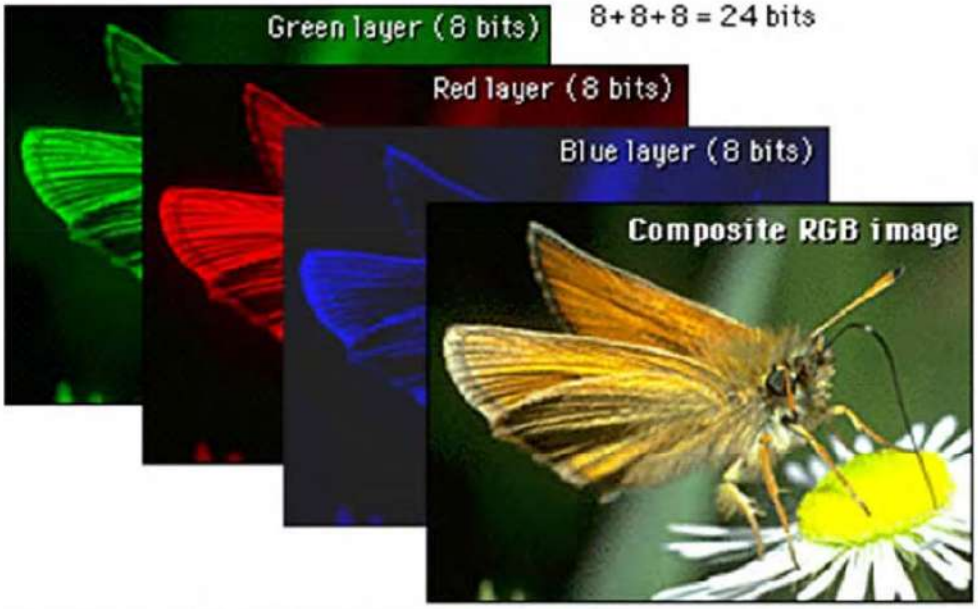
Figure 5

RGB color cube



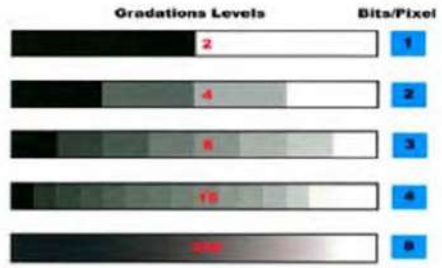
RGB 24-bit color cube

http://images.slideplayer.com/24/7019748/slides/slide_9.jpg

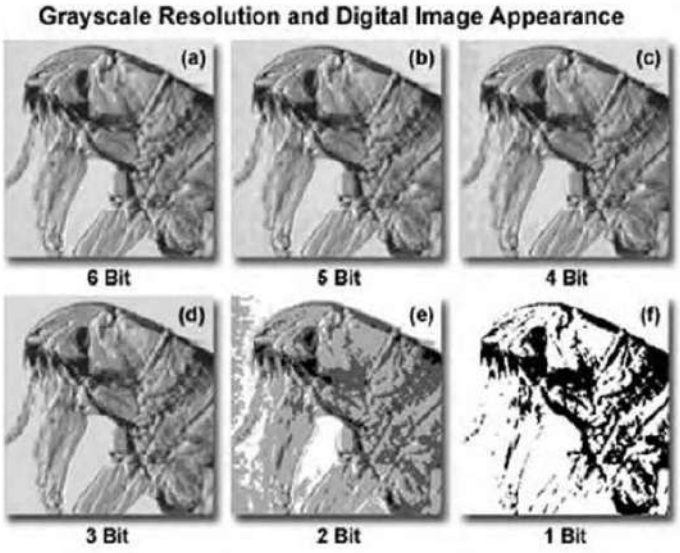


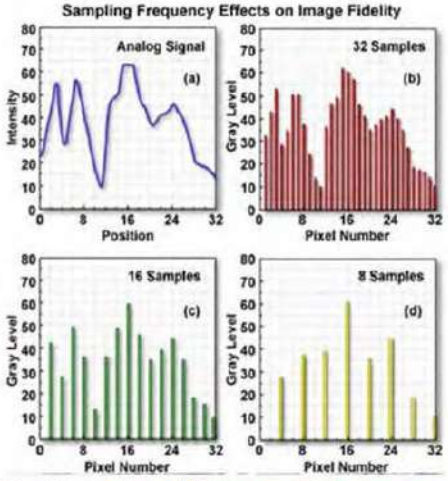
https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQpL5pceKre0JY4KfuftqtTd-ybKnU9FXrmcLFDcPH74eAW0NL9

1 bit (2^1) = 2 tones
2 bits (2^2) = 4 tones
3 bits (2^3) = 8 tones
4 bits (2^4) = 16 tones
8 bits (2^8) = 256 tones
16 bits (2^{16}) = 65,536 tones
24 bits (2^{24}) = 16.7 million tones



http://copierwise.com/17rules/bitdepth.html

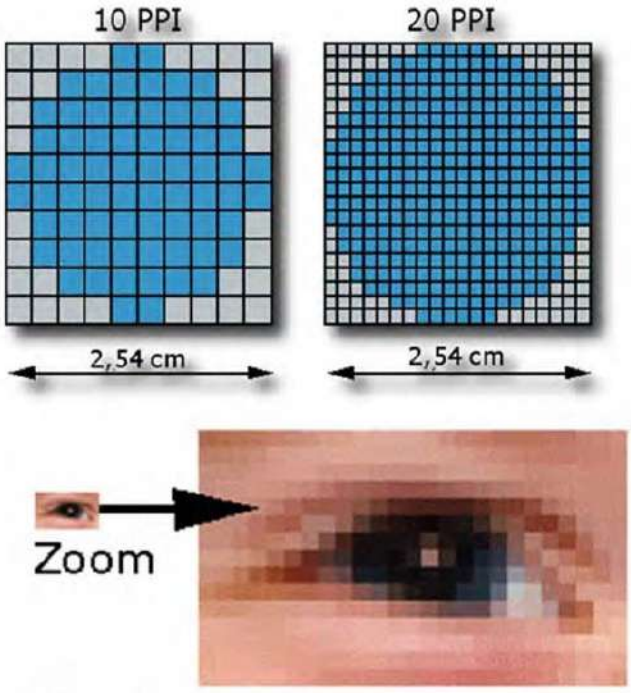




https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/digitalimaging/digitalimagebasics/

❖ A color image is typically represented by a bit depth ranging from 8 to 24 or higher. With a 24-bit image, the bits are often divided into three groupings: 8 for red, 8 for green, and 8 for blue. Combinations of those bits are used to represent other colors. A 24-bit image offers 16.7 million (2^{24}) color values

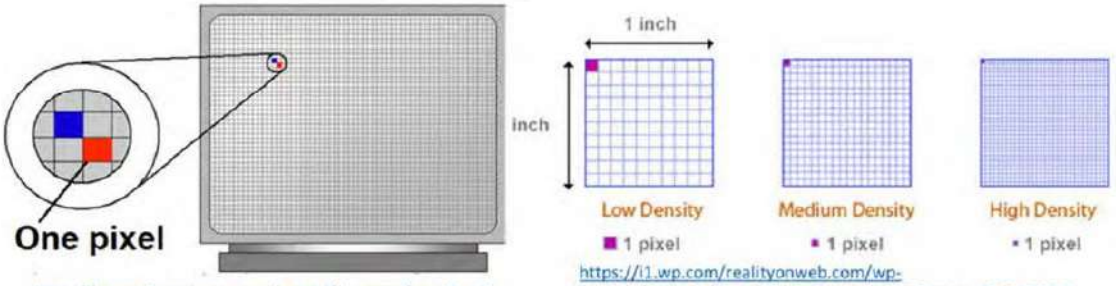
limits, increasing the sampling frequency also helps to increase resolution.



Pixels: Individual pixels can be seen by zooming in an image.
http://preservationtutorial.library.cornell.edu/intro/intro-02.html

Basic concepts - Bit - depth

- BIT DEPTH is determined by the number of bits used to define each pixel. The greater the bit depth, the greater the number of tones (grayscale or color) that can be represented resolution.
- In a 2-bit image, there are four possible combinations: 00, 01, 10, and 11. If "00" represents black, and "11" represents white, then "01" equals dark gray and "10" equals light gray. The bit depth is two, but the number of tones that can be represented is 2^2 or 4. At 8 bits, 256 (2^8) different tones can be assigned to each pixel.

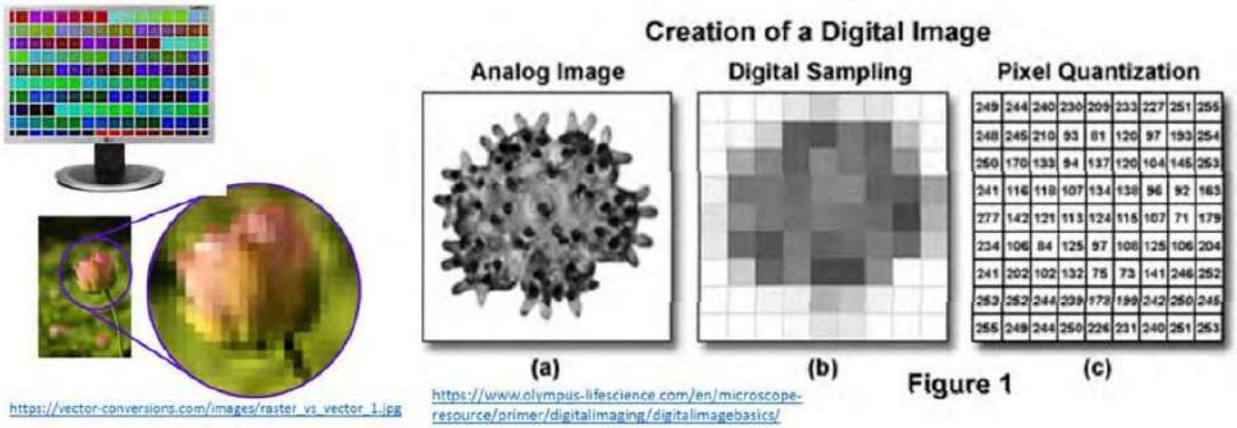


http://www.functionx.com/win32/images/pixel1.gif

https://i1.wp.com/realityonweb.com/wp-content/uploads/2014/02/pixel-density-.jpg?resize=474%2C201

Raster Image

- Raster Image or bitmap image is a rectangular grid of pixels *i.e.* dot matrix structure.
- Image formats like BMP, GIF, JPEG and PNG are an examples of raster images



https://vector-conversions.com/images/raster_vs_vector_1.jpg

https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/digitalimaging/digitalimagebasics/

Figure 1

Basic concepts - Resolution

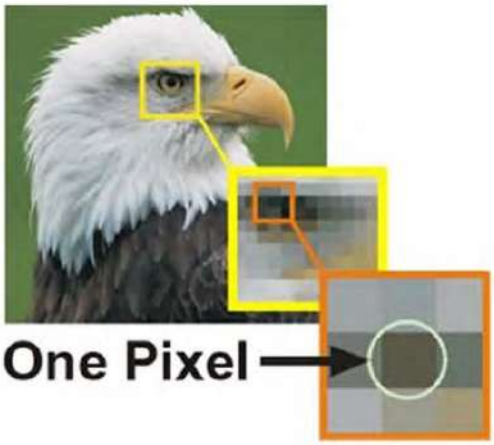
- RESOLUTION is the ability to distinguish fine spatial detail. The spatial frequency at which a digital image is sampled (the sampling frequency) is often a good indicator of resolution. This is why dots-per-inch (dpi) or pixels-per-inch (ppi) are common and synonymous terms used to express resolution for digital images. Generally, but within

1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	1	1	0	0	0	1
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
1	0	0	0	1	1	0	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

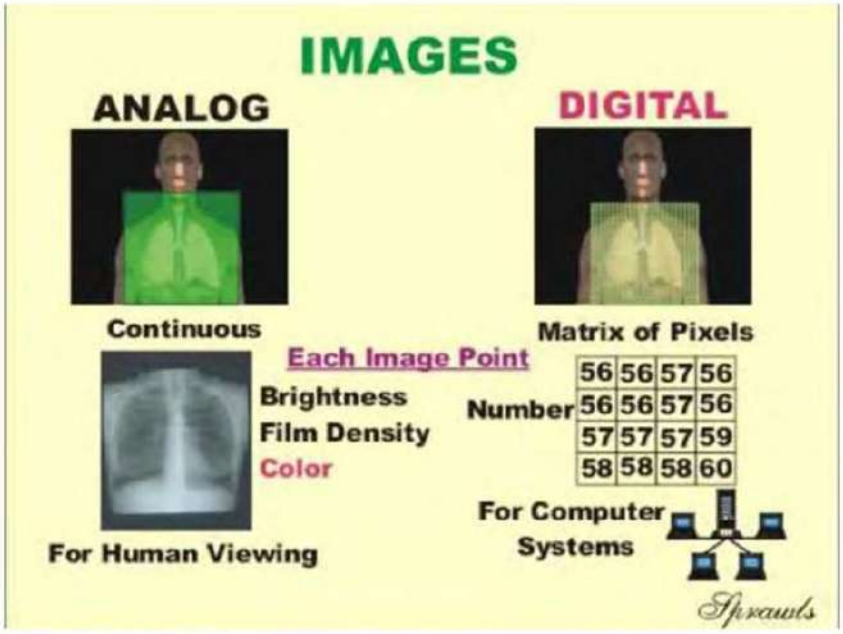
Pixel Values: As shown in this bi-tonal image, each pixel is assigned a tonal value, in this example 0 for black and 1 for white.
http://preservationtutorial.library.cornell.edu/intro/intro-01.html

What is Pixel ?

- Pixel is the smallest visual element (component) of image .
- Each pixel is a sample of an image where more samples provide more accurate representation of the original image.



https://www.troyhunt.com/content/images/2016/02/544543image20.png



https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQENSTiVj961mOt8quOn8Yk5GMoGd9Ef0FrLnvpALl0bPeUFxp7

Basic concepts - Digital images

- DIGITAL IMAGES are electronic snapshots taken of a scene or scanned from documents, such as photographs, manuscripts, printed texts, and artwork. The digital image is sampled and mapped as a grid of dots or picture elements (pixels).
- Each pixel is assigned a tonal value (black, white, shades of gray or color), which is represented in binary code (zeros and ones). The binary digits ("bits") for each pixel are stored in a sequence by a computer and often reduced to a mathematical representation (compressed). The bits are then interpreted and read by the computer to produce an analog version for display or printing.

- Create rectangular, elliptical or irregular area selections. Create line and point selections. Edit selections and automatically create them using the wand tool. Draw, fill, clear, filter or measure selections. Save selections and transfer them to other images.
- Cut, copy or paste images or selections. Paste using AND, OR, XOR or "Blend" modes. Add text, arrows, rectangles, ellipses or polygons to images.
- Display a "stack" of related images in a single window. Process an entire stack using a single command. Open a folder of images as a stack. Save stacks as multi-image TIFF files.

Other features

- Extend ImageJ by developing plugins using ImageJ's built in text editor and Java compiler. More than 500 plugins are available.
- ImageJ and its Java source code are freely available and in the public domain. No license is required.

Basic concepts – Analog images and Digital images

- Analog images are the type of images that we, as humans, look at. What we see in an analog image is various levels of brightness (or film density) and colors. It is generally continuous and not broken into many small individual pieces. (Required for human viewing)
- Digital images are recorded as many numbers. The image is divided into a matrix or array of small picture elements, or pixels. Each pixel is represented by a numerical value. The advantage of digital images is that they can be processed, in many ways, by computer systems. (Required for computer viewing)

Introduction to ImageJ software and image processing

What is ImageJ?

- One of the most important image processing software that employed in scientific researchs.
- Developed by Wayne Rasband for National Institute of Health (Washington, USA).
- It is completely free, open source Java program.
- It can be installed on Windows, Mac OS X and Linux in both 32-bit and 64-bit modes.

What can ImageJ do?

- Open and save most Image formats like GIF, JPEG, BMP, PNG, PGM, FITS , ASCII, DICOM, and many other formats using plugins.
- Considered as fastest image processing Java program in the world which can filter 2048 x 2048 image (40 million pixels) in 0.1 second.
- Provide zooming ranges (1:32 to 32:1) with scrolling and guaranteed functioning pf all analysis processes at any magnification factor.
- Analyze images of 8-bit, 16-bit, 32-bit and RGB color.
- Split a 32-bit color image into RGB or HSV components. Merge 8-bit components into a color image. Convert an RGB image to 8-bit indexed color. Apply pseudo-color palettes to grayscale images.
- Measure area, mean, standard deviation, min and max of selection or entire image. Measure lengths and angles. Use real world measurement units such as millimeters. Calibrate using density standards. Generate histograms and profile plots.
- Supports smoothing, sharpening, edge detection, median filtering and thresholding on both 8-bit grayscale and RGB color images. Interactively adjust brightness and contrast of 8, 16 and 32-bit images.

Contents

Introduction to ImageJ software and image processing 2
What is ImageJ? 2
What can ImageJ do? 2
Other features 3
Basic concepts – Analog images and Digital images 3
Basic concepts - Digital images 4
What is Pixel ? 5
Raster Image 6
Basic concepts - Resolution 6
Basic concepts - Bit - depth 7
Conclusion 10
ImageJ installation 11
Contents of ImageJ Folder 12
Upgrading to a Newer Version of Java 12
ImageJ user interfac 13
Opening file 13
Tools Bar 14
Measuring and counting objects – preparation 18
Save image 23
Counting 24
Gel analysis 25
Estimating leaf spot percentage 33
Stacks 39
What are stacks using for? 39
How to create stack in ImageJ? 40

The Basics of Image Processing with ImageJ

Dr. Labeed Abdullah Al-Saad
Dr. Halima Zugher Hussain