

## 基于光学相干层析技术的昆虫胚胎影像处理方法

买童童<sup>1,2</sup>, 魏丽亚<sup>4</sup>, 姚晓天<sup>1,2</sup>, 苏亚<sup>1,2,3\*</sup>, 王秀丽<sup>1,2</sup>, 杨丽君<sup>1</sup>

<sup>1</sup>河北大学物理科学与技术学院, 河北 保定 071002;

<sup>2</sup>河北省光学感知技术创新中心, 河北 保定 071002;

<sup>3</sup>河北大学生命科学与绿色发展研究院, 河北 保定 071002;

<sup>4</sup>河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002

**摘要** 胚胎在发育过程中会逐渐形成具有不同组织和器官的复杂生物体。对胚胎发育的无创实时监测有助于深入了解其形态演变过程和发育规律。光学相干层析(OCT)技术具有无损、高分辨、三维成像等特点,非常适合用于对生物体胚胎的发育情况进行监测。然而,当采用 OCT 技术检测昆虫胚胎时,虫卵外壳的存在会影响 OCT 三维重建图的可视化效果,使得卵内部胚胎的三维图无法清晰地呈现。基于此,本文结合 OCT 成像特点提出了一种消除卵壳影响的图像处理方法。该方法可以自动识别出卵壳区域并予以“擦除”,从而只呈现昆虫卵内部胚胎的清晰三维图像。该图像处理方法对于采用 OCT 技术研究昆虫胚胎发育具有重要的参考价值。

**关键词** 生物光学; 光学相干层析成像; 昆虫胚胎可视化; 图像处理

中图分类号 TN247

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202148.0907002

### 1 引言

胚胎发育是生物体研究中的重要组成部分之一,而监测胚胎内部的器官和组织对于胚胎发育研究至关重要。组织切片技术和体视显微镜观察是两种常用的生物胚胎观察手段,前者需要对胚胎进行切片才能观察,而后者则需要解剖样本后才能进行观察<sup>[1]</sup>。无论是组织切片技术还是体视显微镜观察,都会破坏样本,且不同发育阶段需要制作不同的样本,既耗时又需要大量的样本。此外,在观察时需要将样本固定,因此会人为地改变样本原有的形态和外观,间接影响实验结果。因此,迫切需要一种高效、无创的成像手段用于生物体胚胎发育的监测。

光学相干层析(OCT)技术是 21 世纪新发展起来的成像技术,不同于计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)、X 射线扫描等成像技术,OCT 技术

主要利用低相干干涉原理,使用近红外光对样本进行无损伤的扫描成像,在保证分辨率的前提下,可以提供样本表面以下 1~3 mm 深度范围内的内部结构信息。此外,OCT 技术还可以实现实时监测,可用于监测活体生物体在不同时间段的胚胎内部发育情况<sup>[2]</sup>。因此,OCT 技术的无创性、高效性、实时性和三维成像等特点可以很好地弥补组织切片技术和体视显微镜观察的不足,成为生物体胚胎发育监测的有力手段。

近年来,OCT 技术在生物体中的应用越来越多<sup>[3-5]</sup>,该技术除了可以实现对胚胎发育的实时监测外,还可以对胚胎内器官的形态和功能进行评估。斑马鱼在胚胎和刚孵化阶段是透明的,研究人员使用 OCT 技术对斑马鱼的胚胎发育情况进行了观察和记录,还清楚地观察到了胚胎的角膜、虹膜、晶状体视网膜等眼部特征<sup>[6]</sup>。非洲爪蟾中的白化爪蟾是

收稿日期: 2020-08-28; 修回日期: 2020-10-04; 录用日期: 2020-11-19

基金项目: 国家自然科学基金(31702064)、河北省重点研发计划(19212109D, 20542201D)、河北省自然科学基金(F2020201041, C2018201135)、河北省高等学校科学技术研究基金(QN2017022, QN2019035)、河北省教育厅青年基金(QN2019117)、河北大学自然科学多学科交叉研究计划资助项目(DXK201910)、河北大学创新训练项目(2020043)、河北大学“新医科”教学改革项目(2020XYKY08)

\*E-mail: suya@hbu.edu.cn

透明的,且爪蟾的胚胎易于处理,因此 OCT 技术也被用于观察非洲爪蟾的胚胎发育以及心脏功能监测<sup>[7]</sup>。除此之外,OCT 技术也常被用于小鼠和禽类的胚胎检测<sup>[8-9]</sup>。但是,目前关于应用 OCT 技术研究昆虫胚胎发育的文献却鲜有报道,其主要原因在于昆虫胚胎多被卵壳包裹(保障胚胎的正常发育)。在使用 OCT 技术对昆虫卵进行成像时,由于卵壳的存在,其三维图像中内部胚胎的形貌特征会被遮盖,从而影响了昆虫胚胎发育的实时监测。

本文结合 OCT 技术的成像特点,选择飞蝗卵作为样本<sup>[10]</sup>,提出了一种可以自动识别昆虫胚胎卵壳位置和厚度并能智能“擦除”卵壳的图像处理方法,消除了卵壳对胚胎三维形貌成像的影响,实现了对昆虫类生物胚胎发育过程的无损、清晰监测。

## 2 昆虫胚胎卵壳的处理流程

图 1 所示为昆虫胚胎卵壳图像处理方法的流程图。将采集的飞蝗卵的三维 OCT 图像进行滤波降噪、局部阈值分割和边界识别处理,然后将卵壳的位置及厚度信息提取出来,再在原图像中进行“擦除”,从而使胚胎的表型三维图像能够清晰地呈现。

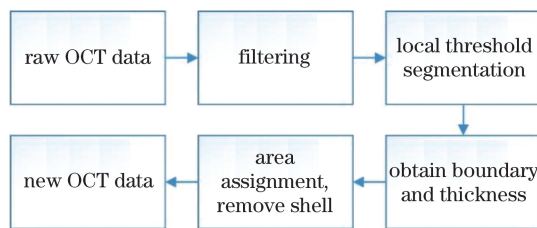


图 1 昆虫胚胎卵壳处理方法流程图

Fig. 1 Flow chart of insect eggshell processing method

### 1) 滤波降噪

在使用 OCT 实时采集图像时,会不可避免地引入噪声,噪声的存在会严重影响卵壳边缘的检测

效果。因此,对采集到的原始图像进行降噪处理是图像预处理中不可缺少的操作<sup>[11-12]</sup>。常用的图像滤波方法有中值滤波、均值滤波、高斯滤波和维纳滤波。图 2(a)是飞蝗卵三维图像中的某一帧 B-scan 图像,若用  $x$  和  $y$  表示该 B-scan 图像中某一像素点的坐标,则可用  $(x, y)$  表示该 B-scan 图像内的任一像素点。采用中值滤波处理后,该点的输出可以表示为

$$g(x, y) = \text{median}\{f(x - k, y - l), k, l \in W\}, \quad (1)$$

式中: $f(x, y)$ 、 $g(x, y)$  分别表示中值滤波处理前和处理后该像素点的灰度值; $W$  表示选取的邻域大小; $k, l$  为邻域范围内的位置坐标。从(1)式可以看出,各个像素点最终的灰度值由该点的灰度值及其邻域内所有像素点的灰度值共同决定。这种方法可以有效地去除随机噪声,同时可以很好地保留图像的边缘信息,这种滤波器被称为空间滤波器。除中值滤波器外,其余三种滤波器也均属于空间滤波器,不同的是:均值滤波器选择某一像素点邻域范围内的平均值作为该点的最终输出值;高斯滤波器对整幅图像进行加权平均,每一个像素点的值都由其本身和邻域内的其他像素值经过加权平均后得到;维纳滤波器则是基于最小均方误差准则,使输出像素值与期望值之间的均方误差最小。

图 2(b)~(d)是采用 4 种滤波方法对昆虫胚胎的原始 OCT 图像进行处理后的图像。从图 2 中可以看出:采用高斯滤波和维纳滤波处理后的图像与原始图像差异不大,没有达到很好的滤波效果;而采用均值滤波处理后卵壳边界与内部组织都变得模糊,不利于后期的进一步处理。综合比较后最终选择中值滤波对图像进行预处理。图 2(b)是采用中值滤波处理后的图像。

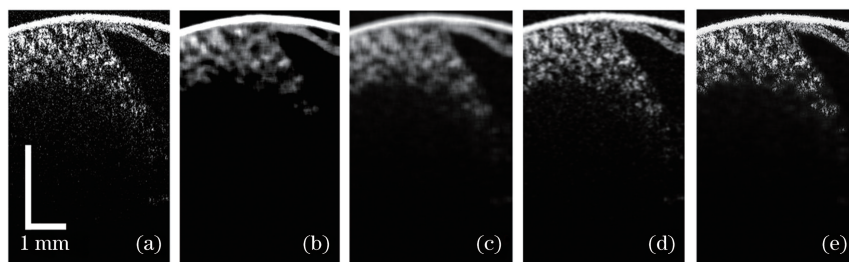


图 2 不同滤波方法的对比。(a)原始 OCT 图像;(b)中值滤波;(c)均值滤波;(d)高斯滤波;(e)维纳滤波

Fig. 2 Comparison of different filtering methods. (a) Original OCT image; (b) median filtering; (c) mean filtering; (d) Gaussian filtering; (e) Wiener filtering

无论选择哪种滤波器,邻域范围的选择都会对最终图像的处理结果产生很大影响:邻域范围选择

过小,降噪的效果可能不理想;范围选择过大则会造成过度滤波,使原有的信号信息变得模糊。图 3 为

选择不同邻域范围采用中值滤波处理后的结果比较图,其中:图 3(b)为选择  $3 \times 3$  邻域范围进行中值滤波处理后的效果,可以看出,经滤波处理后的图像与原始图像基本没有差异,没有达到很好的滤波效果;图 3(c)为选择  $11 \times 11$  邻域范围进行中值滤波处理后的效果图,可以看出,内部组织信息由于滤波

而变得模糊,但卵壳信息更易分辨;图 3(d)为选择  $19 \times 19$  邻域范围进行中值滤波处理后的效果,可以看出,位于顶端和尾端的卵壳由于过度滤波而相对模糊,对下一步的边界识别可能会产生影响。结合本实验的具体需求,最终选择的邻域范围为  $W = 11 \times 11$ 。

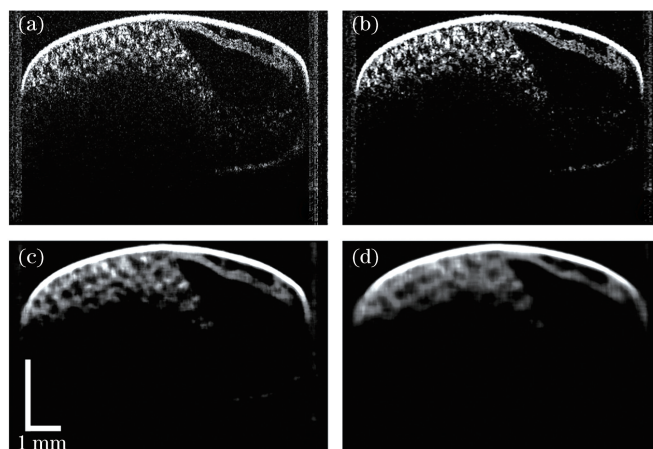


图 3 选择不同邻域范围进行中值滤波后的图像。(a)原始 OCT 图像;(b)邻域范围  $3 \times 3$ ;(c)邻域范围  $11 \times 11$ ;(d)邻域范围  $19 \times 19$

Fig. 3 Images processed by different neighborhood sizes of median filtering. (a) Original OCT image; (b) neighborhood size of  $3 \times 3$ ; (c) neighborhood size of  $11 \times 11$ ; (d) neighborhood size of  $19 \times 19$

### 2) 局部阈值分割

对原始 OCT 图像进行采用中值滤波处理后,卵壳边缘与内部结构形成了较高的对比度,但卵壳内边界与卵黄、胚胎依旧连接,这会导致提取卵壳厚度信息时产生误差,因此需要进一步进行处理。这里主要采用局部阈值分割方法对图像进行处理,如图 4 所示。

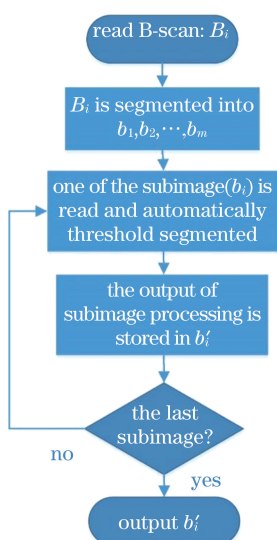


图 4 原始 OCT 图像的局部阈值分割方法流程

Fig. 4 Local threshold segmentation method of original OCT images

局部阈值分割方法的步骤如下:

A) 设 OCT 三维图 IMG1 由  $n$  幅 B-scan 图(二维图)组成,分别为  $B_1, B_2, \dots, B_n$ 。读取其中的某一幅  $B_i (0 < i < n)$  进行处理。

B) 将  $B_i$  分割为  $m$  幅子图像  $b_1, b_2, \dots, b_m$ 。

C) 读取子图像  $b_j (0 < j < m)$ , 对其进行自动灰度阈值分割: a) 选取一个初始估计值  $X$ ; b) 用  $X$  分割图像, 这样便会生成两组像素集合  $Y_1$  和  $Y_2$  ( $Y_1$  由所有灰度值大于  $X$  的像素组成, 而  $Y_2$  由所有灰度值小于或等于  $X$  的像素组成); c) 计算  $Y_1$  和  $Y_2$  中所有像素的平均灰度值  $W_1$  和  $W_2$ ; d) 计算新的阈值  $X, X = \frac{1}{2}(W_1 + W_2)$ 。重复步骤 b)~d), 直到得到的  $X$  值之差小于一个事先定义参数  $Z$ 。之后将该子图像结果并入结果图像  $B_i'$  中。返回步骤 B) 直至将  $B_i$  图中的所有子图像处理完毕, 得到的结果如图 5(c) 所示。

D) 返回步骤 A), 直至将 OCT 三维图的所有 B-scan 图处理完毕, 得到二值化的三维图 IMG2。

### 3) 卵壳边界识别及厚度检测

由于通过 OCT 系统样品臂的光首先进入卵壳, 因此代表卵壳的白色区域一般在图像的上端。依据此特点可以取局部阈值处理后得到的二值化三

维图 IMG2 中的每一个 A-scan 图,沿其深度方向逐点对各像素值进行判断。由于二值化后卵壳部分的像素值为“1”(灰度值 255),其余部分的像素值为“0”(灰度值 0),因此首先检测到的“1”和“0”的交界处即为卵壳的外边界,第二个“1”和“0”的交界处为卵壳内边界。通过统计每一个 A-scan 图中两个交界处的位置以及其中包含的“1”像素点的个数,即可得到卵壳上下边界的位置及其厚度。图 5(c)中字母 S(eggshell)所标识的部分为检测的目标卵壳区域。需要注意的是,在经过局部阈值分割处理后,卵壳的边缘也会变得不平滑。因此,在处理过程中还需要进行边缘平滑处理<sup>[13]</sup>。本文主要使用二次滤波来对图像进行边缘平滑,以便更准确地提取卵壳的边界和厚度信息。

图 5 为去除卵壳的处理过程。图 5(a)为采集到的原始 OCT 图像,图 5(b)为经中值滤波处理后的图像。可以看出,图 5(b)较图 5(a)明显变得模糊,但这仅是为了提取卵壳部分信息而做的处理,而且从图 5(d)中可以看出这一处理并不影响最后实际图像的显示。图 5(c)为经过局部阈值分割后的二值化图像,可以看到,卵壳左侧边界与卵内部组织仍有粘连区域,在读取厚度信息时可能会产生误差,此时需要将左侧的厚度信息赋予与右侧厚度相同的

值,以减小误差。当读出卵壳边界信息及厚度信息后,将 OCT 原始三维图 IMG1 中对应卵壳位置的像素值设为 0,即可“擦除”卵壳,得到清晰的卵内部胚胎的三维投影图,如图 5(d)所示。该图中的大部分卵壳信息已经被成功“擦除”,但在卵右端保留了少部分卵壳信息。这是由放置卵的载物台产生的强反射信号[见图 5(a)中卵左右两端的纵向“亮线”]导致的,在进行局部阈值分割处理时,这部分“亮线”信息会影响卵两端局部阈值的选择,导致将卵壳部分信息误判为内部信息,从而将其保留。因此,在实验中还需注意使用弱反射的载物台,以避免无关信号造成的干扰。此外,由图 5(d)可以观察到在卵的底部仍有部分卵壳图像信息存在,这主要是由于本文重点检测的是胚胎腹面(上部)的发育情况,所以对于二值化三维图中的每一个 A-scan 图,都是由上而下逐点判断像素值,即最终检测的是卵上部的卵壳层并予以“擦除”。若需要消除下部卵壳层的信号,可以在检测完上部卵壳层后,再采用由下而上逐点检测的方式,就可确定下部壳层位置及厚度并将壳层“擦除”。不过受限于 OCT 的采集深度,若要观察卵背面(下部)的发育情况,则需要将卵翻转 180°(即背面向上),再从图像中去除卵壳,就可以获得更好的观察效果。

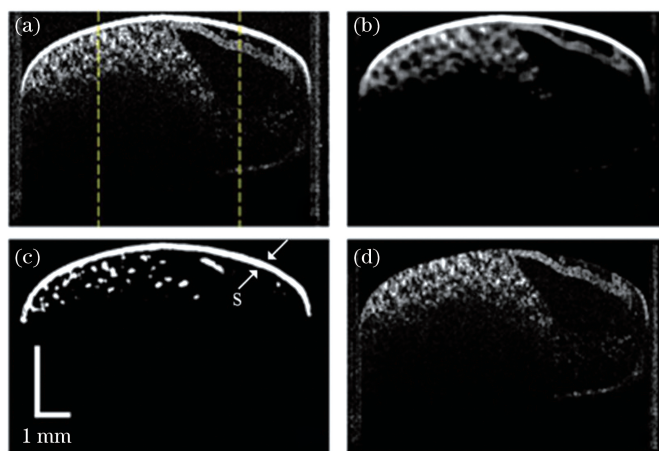


图 5 昆虫胚胎影像的处理过程。(a)原始 OCT 图像;(b)滤波;(c)局部阈值分割(S,卵壳);(d)卵壳图像消除

Fig. 5 Image processing of insect embryo. (a) Original OCT image; (b) filtering; (c) local threshold segmentation(S, eggshell); (d) removal of eggshell image

### 3 实验部分

#### 3.1 实验样本

本次实验选择的对象为飞蝗<sup>[14]</sup>。雌蝗产卵后,从产卵盆中筛选出卵块,用消过毒的软毛刷将虫卵从卵块中轻轻刷开,并置于蒸馏水中清洗其表面的泥土。将卵取出后再浸于酒精中进行表面杀菌处

理,最后使用无尘纸吸干表面的水分。待所有卵都从卵块中剥离后,将卵整齐地排列在含琼脂凝胶的培养皿中,然后将培养皿置于 30 °C 的恒温培养箱中进行饲养。在 30 °C 的环境下,飞蝗的孵化时间一般为 14 d<sup>[15]</sup>。从蝗卵发育的第 4 天开始,每日使用 OCT 对虫卵进行三维扫描成像,并使用上述提出的去除卵壳的方法对原始图像进行处理,观察蝗卵胚

胎的发育情况。

### 3.2 实验仪器及参数

监测蝗卵发育的仪器为扫频 OCT 系统<sup>[16]</sup>(型号为 OCM1300SS-ENG),光源中心波长为 1300 nm,扫描频率为 16 kHz。当一帧 B-scan 设置 512 个 A-scan 时,成像速度可达 25 frame/s。同时,该系统的横向分辨率为 25  $\mu\text{m}$ ,轴向分辨率为 12  $\mu\text{m}$ ,最大扫描范围( $X \times Y$ )为 10 mm  $\times$  10 mm,检测深度( $Z$  方向)为 3 mm,灵敏度为 102 dB。在对卵进行监测时,快轴方向( $x$  方向)设置的扫描范围是 9 mm,慢轴方向( $y$  方向)设置的扫描范围是 2.5 mm。

## 4 结果与讨论

图 6 为蝗卵发育至第 11 天时使用卵壳去除方法处理前后 OCT 图像的对比。图 6(a)、(b)表示 XY 面上的蝗卵三维图像,其中:(a)图为包含卵壳的 OCT 三维图像,因为图像包含有卵壳信息,所以内部胚胎形貌不可见;(b)图为采用去除卵壳方法进行处理后的三维图像,胚胎的头部、触角、腹部和前中后足等均清晰可见。对比图 6(a)、(b)可以明显看出,去除卵壳信息后,胚胎形态的三维图像可以

被清晰地观察到。图 6(c)、(d)分别为卵上表面以下深度为 0.67 mm 和 0.88 mm 处的 XY 截面图(B-scan 图),二维截面 B-scan 图有助于研究胚胎内部不同深度器官发育情况的细节信息。虽然图 6(c)、(d)是沿  $Z$ (深度)方向的 XY 面的 B-scan 图,且不受卵壳遮挡的影响,但是通过与图 6(b)对比可以明显看出二维 B-scan 图像[图 6(c)、(d)]更侧重于表现胚胎的局部细节特征,并不能像图 6(b)一样能够反映胚胎发育形态的整体变化情况。但是,胚胎发育研究一般更侧重于观察其表型整体形态的变化情况,因此,这也是应用卵壳去除方法得到图 6(b)三维图像的优势所在。图 6(e)、(f)分别为卵壳“擦除”前和“擦除”后蝗卵在 XZ 面上的二维截面图。从 XZ 截面图中可以看到,在外部卵壳信息被“擦除”的情况下,胚胎内部图像得以很好的保留。因此,在进行图像处理,主要依据去除卵壳前后的三维重建图和二维截面图来评判卵壳的去除效果以及是否有误操作。通过对比图 6(a)和图 6(b)(三维重建图)、图 6(e)和图 6(f)(二维截面图)能够明显地看出,卵壳已基本被完全消除,而且且内部组织器官图像完整无缺失。

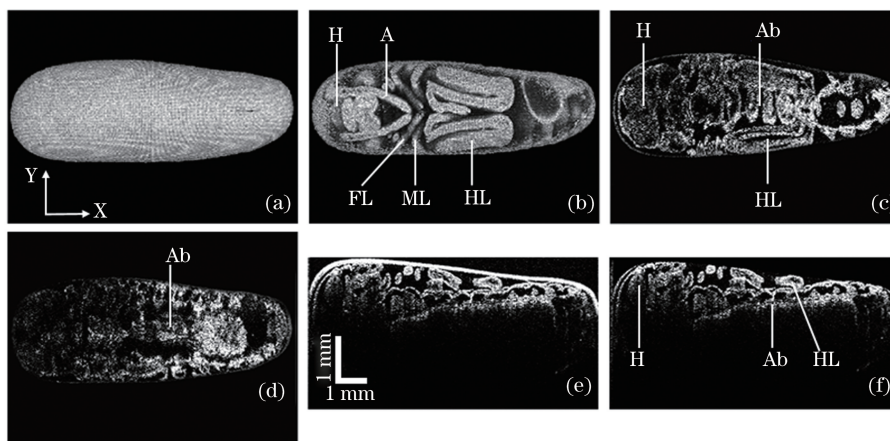


图 6 去除卵壳前后的 OCT 图像对比,其中 A 表示触角,Ab 表示腹部,FL 表示前足,H 表示头部,HL 表示后足,ML 表示中足。(a)XY 面上的蝗卵三维投影图(包含卵壳);(b)XY 面上的蝗卵三维投影图(去除卵壳);(c)XY 面上的蝗卵二维截面图(深度为 0.67 mm);(d)XY 面上的蝗卵二维截面图(深度为 0.88 mm);(e)XZ 面上的蝗卵二维截面图(包含卵壳);(f)XZ 面上的蝗卵二维截面图(去除卵壳)

Fig. 6 Comparison of OCT images before and after eggshell removing, where A represents antenna, Ab represents abdomen, FL represents fore legs, H represents head, HL represents hind legs, and ML represents mid legs. (a) Three-dimensional projection of locust egg on XY plane (include eggshell); (b) three-dimensional projection of locust egg on XY plane (erase eggshell); (c) two-dimensional cross-sectional image of locust egg on XY plane with depth of 0.67 mm; (d) two-dimensional cross-sectional image of locust egg on XY plane with depth of 0.88 mm; (e) two-dimensional cross-sectional image of locust egg on XZ plane (include eggshell); (f) two-dimensional cross-sectional image of locust egg on XZ plane (erase eggshell)

图 7 为结合卵壳去除方法,使用 OCT 系统无损监测活体蝗卵内部胚胎组织器官生长发育直至

孵化的全过程。在第 6 天,卵黄居于虫卵的前端,末端为胚胎,蝗虫胸部各节附肢已逐渐成形且可

以被观察到。第 7 天至第 9 天, 蝗卵体积较第 6 天变大, 同时卵黄逐渐消耗殆尽。在此期间胚胎还发生了胚转现象, 即胚胎的头部自卵的后端向前翻转了  $180^\circ$  (卵的左侧为前端, 右侧为后端)。翻转后, 胚胎的头部与卵的前端方向一致, 翻转过程一般持续 10 h 左右。第 10 天至第 12 天, 胚胎的肢体结构不断发育长大, 直至第 14 天胚胎各个组织器官逐渐发育完善, 胚胎填满整个卵并即将破壳而出。由图 7 可以看出, 采用卵壳去除方法进行

处理后可以实时清晰地观察到蝗虫各个组织器官的发育情况。上述结果与利用传统方法<sup>[17]</sup> (如: 解剖和组织切片观察) 观察到的蝗虫胚胎发育现象基本一致。相比于传统的有创检测方法不能对单一活体胚胎进行持续监测、操作复杂、耗费时间的缺点, OCT 技术以其无创、实时、高速的优势更为突出, 而且可以得到卵内部胚胎发育更为准确的监测结果, 这也是本文提出的昆虫胚胎影像处理方法的的目的和意义所在。

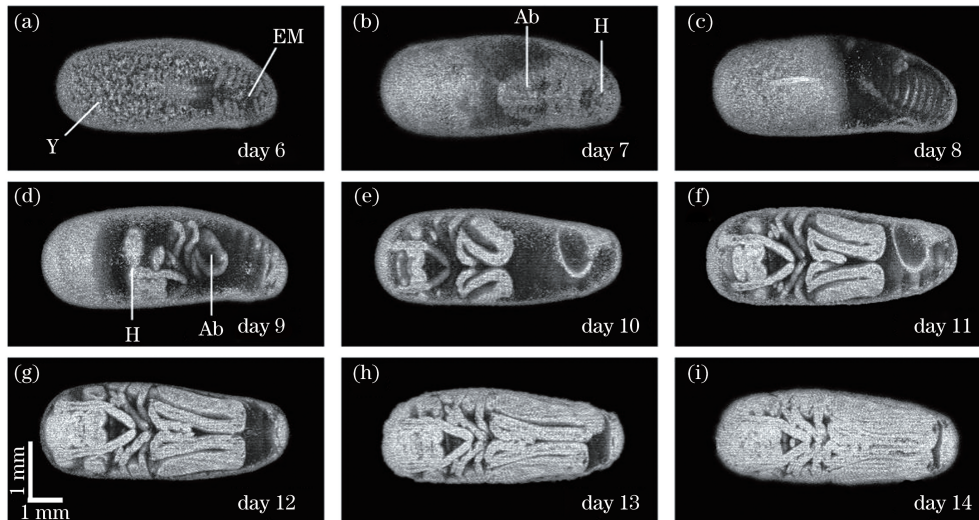


图 7 去除卵壳后观察到的胚胎第 6 至第 14 天的发育过程, 其中 Y 表示卵黄, EM 表示胚胎, Ab 表示腹部, H 表示头部  
Fig. 7 Embryonic development process observed on days 6 to 14 after removal of eggshell, where Y represents yolk, EM represents embryo, Ab represents abdomen, and H represents head

## 5 结 论

昆虫胚胎一般由不透明的卵壳包裹, 使得 OCT 扫描的三维图像无法直接呈现卵内部胚胎发育的具体情况。针对这一问题, 本文提出了一种结合 OCT 三维成像特点来去除胚胎外层卵壳的处理方法。该方法可以自动确定卵壳边界所在的图像位置及厚度信息, 在去除卵壳的同时不影响内部胚胎的成像。结果表明, 采用该方法对昆虫胚胎影像进行处理后, 能够准确且清晰地监测到昆虫胚胎发育的具体过程。该方法在应用 OCT 系统研究昆虫胚胎发育等方面具有重要的参考价值。

### 参 考 文 献

- [1] Ren J L, Zhao L, Ge J, et al. Embryonic development of diapausing eggs in *Calliptamus italicus* (L.) (Orthoptera: Catantopidae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 2015, 58(11): 1201-1212.  
任金龙, 赵莉, 葛婧, 等. 意大利蝗的胚胎发育及卵滞育发生的胚胎发育阶段 [J]. 昆虫学报, 2015, 58(11): 1201-1212.
- [2] Raghunathan R, Singh M, Dickinson M E, et al. Optical coherence tomography for embryonic imaging: a review [J]. Journal of Biomedical Optics, 2016, 21(5): 050902.
- [3] Wang C M, Huo T C, Zheng J G, et al. Automated assessment of epidermal thickness and vascular density of port wine stains OCT image [J]. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2014, 7(1): 1350052.
- [4] Si P J, Wang L, Xu M E, et al. Tumor cell invasion imaging based on optical coherence tomography [J]. Chinese Journal of Lasers, 2019, 46(9): 0907003.  
斯培剑, 王玲, 徐铭恩, 等. 基于光学相干层析成像技术的肿瘤细胞侵袭成像 [J]. 中国激光, 2019, 46(9): 0907003.
- [5] Wang Q, Peng H L, Wang P H, et al. Dither removing of three-dimensional optical coherence tomography retinal image [J]. Acta Optica Sinica, 2019, 39(3): 0317001.  
汪权, 朋汉林, 汪平河, 等. 光学相干层析成像眼底视网膜三维图像抖动方法 [J]. 光学学报, 2019,

- 39(3): 0317001.
- [6] Kagemann L, Ishikawa H, Zou J, et al. Repeated, noninvasive, high resolution spectral domain optical coherence tomography imaging of zebrafish embryos [J]. *Molecular Vision*, 2008, 14: 2157-2170.
- [7] Yang V X D, Gordon M L, Tang S J, et al. High speed, wide velocity dynamic range Doppler optical coherence tomography (Part III): *in vivo* endoscopic imaging of blood flow in the rat and human gastrointestinal tracts [J]. *Optics Express*, 2003, 11 (19): 2416-2424.
- [8] Huang Y L, Li M H, Huang D D, et al. Depth-resolved enhanced spectral-domain OCT imaging of live mammalian embryos using gold nanoparticles as contrast agent [J]. *Small*, 2019, 15(35): 1902346.
- [9] Ma Z H, Dou S D, Ma Y S, et al. Measurement of wall strain in embryonic chick heart by spectral domain optical coherence tomography [J]. *Acta Physica Sinica*, 2016, 65(23): 235202.  
马振鹤, 窦世丹, 马毓妹, 等. 基于光学相干层析成像的早期鸡胚心脏径向应变测量 [J]. *物理学报*, 2016, 65(23): 235202.
- [10] Ma C, Kang L. Population genetics and the subspecific taxonomy of the migratory locust [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2013, 50 (1): 1-8.  
马川, 康乐. 飞蝗的种群遗传学与亚种地位 [J]. *应用昆虫学报*, 2013, 50(1): 1-8.
- [11] He Y J, Gao Y J, Li K, et al. Optical coherence tomography images processing [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2009, 38(6): 1464-1468.  
何永健, 高应俊, 李逵, 等. 光学相干层析图像的处理研究 [J]. *光子学报*, 2009, 38(6): 1464-1468.
- [12] Gao Y, Li Z L, Zhang J H, et al. Automatic measurement method for corneal thickness of optical coherence tomography images [J]. *Acta Optica Sinica*, 2019, 39(3): 0311003.  
高阳, 李中梁, 张建华, 等. 光学相干层析成像图像中角膜厚度的自动测量方法 [J]. *光学学报*, 2019, 39(3): 0311003.
- [13] He Q Y, Li Z L, Wang X Z, et al. Automated retinal layer segmentation based on optical coherence tomographic images [J]. *Acta Optica Sinica*, 2016, 36(10): 1011003.  
贺琪欲, 李中梁, 王向朝, 等. 基于光学相干层析成像的视网膜图像自动分层方法 [J]. *光学学报*, 2016, 36(10): 1011003.
- [14] Jing X H, Kang L. Seasonal changes in the supercooling point of overwintering eggs of *Locusta migratoria* [J]. *Entomological Knowledge*, 2003, 40 (4): 326-328.  
景晓红, 康乐. 飞蝗越冬卵过冷却点的季节性变化及生态学意义 [J]. *昆虫知识*, 2003, 40(4): 326-328.
- [15] Guo F. The biology of the migratory locusts in China [M]. Jinan: Shandong Science & Technology Press, 1991.  
郭鄂. 中国飞蝗生物学 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1991.
- [16] Zhu Y, He Y H, Li P, et al. Enhancement and quantitative measurement of layer structures in optical coherence tomographic images [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, 27(3): 515-520.  
朱毅, 何永红, 李鹏, 等. 光学相干层析图像层状结构的增强与定量测量 [J]. *光学学报*, 2007, 27(3): 515-520.
- [17] Hart A G, Bowtell R W, Köckenberger W K, et al. Magnetic resonance imaging in entomology: a critical review [J]. *Journal of Insect Science*, 2003, 3(1): 5.

## Image Processing Method of an Insect Embryo Based on Optical Coherence Tomography

Mai Tongtong<sup>1,2</sup>, Wei Liya<sup>4</sup>, X. Steve Yao<sup>1,2</sup>, Su Ya<sup>1,2,3\*</sup>, Wang Xiuli<sup>1,2</sup>, Yang Lijun<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Physics Science & Technology, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China;

<sup>2</sup> Hebei Provincial Center for Optical Sensing Innovations, Baoding, Hebei 071002, China;

<sup>3</sup> Institute of Life Science and Green Development, Baoding, Hebei 071002, China;

<sup>4</sup> College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China

### Abstract

**Objective** Embryonic development has attracted increasing attention in biological research. Monitoring the internal organs and tissues of an embryo is relevant to the study of embryonic development. Generally, two methods are employed to monitor tissues in the embryo: tissue section technology and stereomicroscope observation. Both methods need to kill the embryo and cannot monitor a single living embryo continuously. Therefore, noninvasive

real-time monitoring of embryonic development is expected to understand the morphological evolution process. Optical coherence tomography (OCT) is a relatively novel imaging method in the 21st century and is based on the principle of low coherence interference. It uses near-infrared light to scan the sample noninvasively, and then a three-dimensional image reconstruction is performed. OCT can provide internal structure information with a depth of 1–12 mm below the sample surface. Several research groups have reported studies on the embryonic development of different animals, such as *Xenopus*, mice, and birds, using OCT. However, there are few reports on the application of OCT to insect embryonic development. The main reason is that insect embryos are usually wrapped with eggshells that protect the embryo from external damage. This morphology of the insect embryo significantly affects the real-time monitoring of its development. Therefore, a method that can automatically identify the edge and thickness of the eggshell and intelligently erase it is required.

**Methods** An image processing method is proposed in this paper to eliminate the effect of eggshells on OCT imaging. This method can automatically identify and erase the area of the eggshells so that the clear three-dimensional image of the embryo inside the eggshell is presented. As shown in Fig. 1, first, the three-dimensional image is filtered to reduce noise; second, local threshold segmentation and boundary recognition are performed; and then the position and thickness of eggshells can be extracted and erased in the original image. Afterward, the three-dimensional image of the embryo phenotype can be presented. Noise is often introduced during the real-time OCT image acquisition process, which can severely influence the effect of eggshell edge detection. Therefore, the original three-dimensional image denoising is an indispensable operation in image preprocessing. After comparing various image-denoising methods (Fig. 2), the median filtering is selected. Figure 5(b) shows that the contrast is higher between the eggshell edge and the internal structure after noise reduction. However, the inner boundary of the eggshell is still connected with the yolk and embryo, which can cause measurement error when extracting the thickness of the eggshell. Therefore, local threshold segmentation is employed to solve the problem, and detailed procedures are shown in Fig. 4. Figure 5(c) shows the binary image in which the grey value of the eggshell is 255, whereas, other regions are 0 after local threshold segmentation. Hence, the first junction between 255 and 0 is the outer boundary of the eggshell, and the second is the inner boundary. Thus, the location and thickness of the outer and inner boundary of the eggshell can be obtained by counting the number of pixel points with a grey value of 255 between the two junctions in each A-scan image. Notably, the eggshell edge is non-smooth after local threshold segmentation. Consequently, the second filtering is used to smoothen the edge, which ensures accurate measurements.

**Results and Discussions** Figure 6 shows the comparison of OCT imaging results before and after eggshell removal on the 11th day of locust egg development. As shown in Fig. 6 (a), the internal morphology of the embryo is covered by eggshell and is not visible. After using the eggshell removal method to process the image, the head, antennae, abdomen, and feet of the embryo are clearly seen in the three-dimensional projection of XY [Fig. 6(b)]. Figures 6 (c) and (d) are two-dimensional cross-sectional images of XY with depths of 0.67 and 0.88 mm, respectively. Although these cross-sectional images are not affected by the eggshell, they cannot reflect the overall changes of the embryonic development morphology and are significantly different from the three-dimensional image of Fig. 6(b). By contrast, Fig. 6(b) is a suitable three-dimensional image to study embryonic development. Therefore, this is the purpose and significance of the eggshell removal method proposed in this paper. Equipped with the eggshell removal method, Fig. 7 shows the embryonic development process observed on days 6 to 14 clearly.

**Conclusions** Because the insect embryo is wrapped by an eggshell, the three-dimensional OCT image cannot directly show the whole morphology of the embryo inside the egg. Therefore, in this study, we propose an image processing method to eliminate the effect of eggshell on OCT imaging. This method can automatically determine the boundary and thickness of eggshell and erase it. Compared with traditional invasive detection methods that are complicated in operation, time-consuming, and cannot continuously monitor a single living embryo, OCT has the advantages of noninvasive, real-time, and high-speed nature to obtain more accurate monitoring results of embryonic development. This image processing method is helpful to the application of OCT in the study of insect embryonic development.

**Key words** biotechnology; optical coherence tomography; insect embryo visualization; image processing

**OCIS codes** 110.4500; 100.3020; 170.26