

С. И. Вакула, мл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси;
Т. В. Никитинская, аспирант ИГиЦ НАН Беларуси;
В. В. Титок, зав. лабораторией ИГиЦ НАН Беларуси; В. Н. Леонтьев, доцент

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ЛЬНА КУЛЬТУРНОГО (*LINUM USITATISSIMUM* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЬЮТЕРНОЙ МОРФОМЕТРИИ

The article concerns the study on metric characteristics of elementary fibers in 22 common flax cultivars and on quantitative traits in 25 crown flax accessions. Computer analysis of images, obtained by electron microscopy of fiber specimens and by scanning of flax seeds, is effective for identification of quantitative morphologic differences as well as convenient for comparative analysis and screening of unique genotypes. Correlations were revealed between linear characteristics of seeds and elementary fibers of common flax and criteria of seed productivity and fiber content. Classification of accessions was performed for the studied traits. Promising donors of agronomic traits were revealed.

Введение. Лен культурный (*Linum usitatissimum* L.) – важная техническая культура, основными первичными продуктами переработки которой являются семена и волокно, используемые в производстве текстиля, композиционных материалов, целлюлозно-бумажных масс, промышленных и пищевых масел [1–3]. Физические параметры семян и волокна – это ключевые параметры организации технологических процессов, оборудования, складов, хранилищ, а также контролирующих процессов.

В последние годы быстрыми темпами модернизируется электронно-вычислительная техника и, соответственно, компьютерные программы, что способствует применению автоматизированного количественного анализа изображений, направленного на категоризацию и группировку сортов по незначительным количественным отличиям, которые могут быть неразличимы сенсорно.

Анализ изображений – выделение значимой информации из изображений, в основном цифровых, с использованием программных методов обработки изображений. Эта отрасль информатики появилась в 1950-х гг. как часть искусственного интеллекта и робототехники. Область применения анализа изображений велика – медицина, микроскопия, астрономия, охранные системы, обработка документов, материаловедение, технология производства, робототехника и др.; в биологии льна – для упорядочения генетических коллекций, описания сортов и генотипов, анализа качества семян и волокна.

Цель работы – проанализировать количественные признаки семян и элементарных волокон льна культурного с использованием методов компьютерной морфометрии и оценить возможности применения этого способа в систематике, классификации и оценке качества этих продуктов переработки льна.

Основная часть. Материалом исследования служили образцы элементарных волокон 22 сортов 5 подвидов [4–6] льна культурного из коллекции ИГиЦ НАН Беларуси: лен-долгунец (subsp. *elongatum* Vav. et Ell., сорта Блажит, А-29, Слав-

ный 82, Ariane), лен-межеумок (subsp. *usitatissimum* conv. *intermedium* Czernom., сорта Koto, Leona, Cree, Norlin, Culbert), лен-кудряш (subsp. *usitatissimum* conv. *humile* Czernom., сорта Ручеек, Lirina, Gold Flax, Flanders, Raluca), лен крупносемянный (subsp. *mediterraneum* Vav. et Ell., сорта Ocean, K-1210, Maracian, Endress Oljen), лен растрескивающийся (subsp. *crepitans* Boenn., сорта K-4821, Grandal, Dehiscent, Mourisco E730).

Для выделения льняного волокна использовали химический метод, основанный на применении хелатирующих агентов и автоклавирования [7]. Стебли льна (фрагменты по 4–5 см из средней части 20–25 стеблей растений) помещали в 0,05 М *трис*-буфер (рН 8,0) с добавлением 0,05 М ЭДТА и автоклавировали при 120°C на протяжении 30 мин, затем отмывали проточной и ополаскивали дистиллированной водой. Высушивание проводили при 23°C на протяжении 2 сут, затем вычесывали для лучшего разделения элементарных волокон.

Цифровые микроснимки элементарных волокон льна были сделаны при помощи сканирующего электронного микроскопа JSM-5610 LV, оснащенного системой химического анализа EDX JED-2201 JEOL (Япония). Изображения льняных волокон были получены в низковакуумном режиме работы электронного микроскопа с использованием детектора обратноотраженных электронов, что позволило изучить структуру образцов без нанесения проводящих покрытий.

Количественные признаки семян исследовались у 25 образцов семян льна-кудряша (subsp. *usitatissimum* conv. *humile* Czernom., сорта Deep Pink, Flanders, Gold Flax, McGregor, SU-1-10, Linota, K-5827, Somme, Omega, Воронежский, K-2398, Atalante, K-6570, Glenelg, K-5627, Л-6582, Sandra, Циан, ЛМ-1, ЛМ-2, Blue Chip, Antares, Raluca, Невесный, Mivast) из коллекции ИГиЦ НАН Беларуси. Цифровые изображения были получены методом сканирования (Epson Perfection 1270).

Обработку и анализ полученных изображений проводили с использованием программного комплекса AutoScan 3.0 (ЗАО «Спектроскопические системы», Минск), позволяющего коррек-

тировать изображения при помощи встроенных фильтров, проводить анализ в полуавтоматическом режиме, редактировать полученные данные и осуществлять их первичную статистическую обработку [8]. Многофакторный статистический анализ выполняли при помощи пакета Statistica 7.0 (StatSoft, США), для построения диаграммы корреляционных связей между признаками использовали программу PAST (PALaeontological STatistics, ver. 1.89).

Результаты и обсуждение. Анализ изображений [4, 9–11] используется для исследований анатомических показателей волокон хлопка, конопли и льна и является хорошей альтернативой традиционным методам оценки.

Сравнительный анализ анатомо-морфологических параметров волокна выявил достоверные различия по исследуемым признакам площади, периметра, длины, ширины, фактора формы и округлости (табл. 1). Средние значения количественных признаков волокон составляли: площадь 295,25 мкм², периметр 62,12 мкм, диаметр 15,50 мкм, фактор формы 0,089. Эти данные позволяют характеризовать форму волокон льна как близкую к округлости.

Анализ корреляционной зависимости анатомических признаков волокна и технологических параметров оценки (масса соломы, масса волокна и процент волокна) представлен на рис. 1.

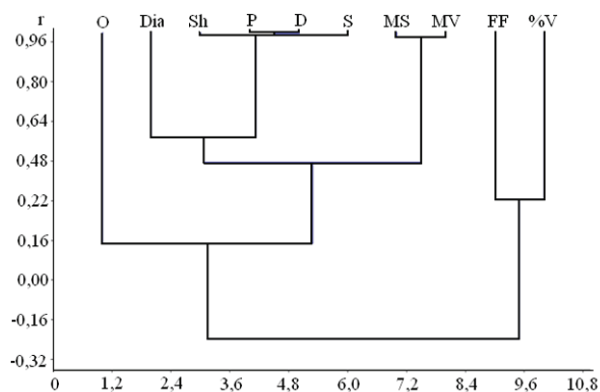


Рис. 1. Корреляционные связи признаков качества и содержания волокна:

г – коэффициент корреляции; О – окружность;
Dia – диаметр; Sh – ширина; P – периметр;
D – длина; S – площадь; MS – масса соломы;
MV – масса волокна; FF – фактор формы;
%V – процент волокна

Таблица 1

Количественные признаки поперечного среза индивидуального волокна и показатели продуктивности сортов *Linum usitatissimum* L.

Сорт	Морфологические признаки волокна							Продуктивность		
	Площадь, мкм ²	Периметр, мкм	Длина, мкм	Ширина, мкм	Фактор формы	Округлость	Диаметр, мкм	Масса соломы, г	Масса волокна, мг	Процент волокна, %
subsp. <i>elongatum</i> Vav. et Ell.										
Блакит	185,93	49,45	17,24	14,39	0,92	1,04	13,05	0,32	84,14	26,29
А-29	150,65	46,43	16,36	12,88	0,86	1,10	12,40	0,21	52,29	26,09
Слав-ный 82	103,60	37,48	13,48	10,42	0,87	1,07	12,15	0,18	28,43	16,83
Ariane	212,28	53,20	19,08	14,81	0,91	1,05	14,03	0,19	42,29	23,29
subsp. <i>usitatissimum</i> convar. <i>intermedium</i> Czernom.										
Koto	238,22	56,51	19,96	15,98	0,89	1,06	13,41	0,25	34,00	13,64
Leona	176,23	48,62	17,66	13,20	0,88	1,07	12,13	0,16	28,71	18,28
Cree	326,31	65,83	23,48	18,34	0,91	1,05	15,03	0,17	30,29	18,96
Norlin	205,44	52,63	19,28	14,19	0,89	1,06	12,21	0,18	22,29	12,51
Culbert	199,30	51,46	18,39	14,43	0,91	1,05	14,63	0,15	23,43	16,51
subsp. <i>usitatissimum</i> convar. <i>humile</i> Czernom.										
Ручеек	326,93	66,46	24,46	17,37	0,86	1,08	14,83	0,28	27,00	10,79
Lirina	301,63	62,39	22,45	17,07	0,89	1,06	12,58	0,28	43,86	15,76
Gold Flax	211,99	53,07	18,93	14,93	0,91	1,05	13,31	0,22	35,86	17,63
Flanders	334,66	67,81	24,54	18,33	0,88	1,07	15,50	0,25	41,43	16,80
Raluca	488,16	81,80	29,65	22,03	0,87	1,07	16,70	0,31	43,86	14,64
subsp. <i>mediterraneum</i> Vav. et Ell.										
Ocean	339,00	69,30	25,67	18,03	0,85	1,09	16,36	0,21	22,00	10,56
K-1210	365,81	69,72	24,95	19,32	0,90	1,06	22,33	0,25	26,28	10,37
Maracian	375,11	71,22	26,20	18,95	0,88	1,07	17,41	0,38	61,57	17,64
Endress Oljen	283,01	61,78	22,53	16,51	0,88	1,07	24,23	0,50	35,63	8,09
subsp. <i>crepitans</i> Boenn.										
Grandal	399,41	72,64	26,56	19,31	0,88	1,07	17,23	1,38	243,43	18,14
Dehiscent	398,35	73,30	26,65	19,93	0,88	1,07	15,66	2,77	615,50	22,53
Mourisco E730	415,25	75,54	27,44	20,53	0,88	1,07	22,43	2,41	445,23	19,43
K-4821	447,71	77,81	28,80	20,28	0,87	1,07	15,15	3,17	473,75	14,60
HCP _{0,05}	0,08	0,04	0,04	0,04	0,01	0,01	3,05	0,08	12,48	5,41

Тесно коррелировали между собой метрические признаки волокна: площадь, периметр, длину, ширину, диаметр. С данными параметрами достоверно ($r = 0,48$) связаны признаки масса соломки и волокна. Исходя из выявленных корреляций, можно предположить, что масса волокна и соломки льна зависят от метрических характеристик элементарного волокна.

Для разбиения исследуемых образцов на однородные группы по анатомическим признакам волокна был использован метод k-средних. На линейном графике (рис. 2) отмечены средние значения признаков в кластере.

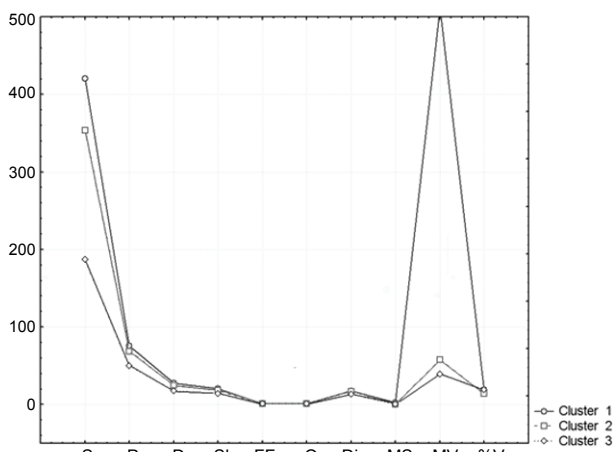


Рис. 2. Средние значения признаков k-кластеров:

S – площадь; P – периметр; D – длина;
Sh – ширина; FF – фактор формы; O – окружность;
Dia – диаметр; MS – масса соломки;
MV – масса волокна; %V – процент волокна

Так, «Кластер 1» с высокими значениями среднего по признакам площадь ($420,44 \text{ мкм}^2$), длина ($27,63 \text{ мкм}$), ширина ($20,25 \text{ мкм}$), периметр ($75,55 \text{ мкм}$) и диаметр волокна ($17,75 \text{ мкм}$) состоял из 3 сортов подвида лен растрескивающийся (Dehiscent, Mourisco E730, K-4821). «Кластер 2» объединил сорта подвидов: лен-межеумок (Cree), лен-кудряш (Ручеек, Lirina, Flanders, Raluca), лен крупносемянный (Ocean, K-1210, Maracian, Endress Ojlen) и лен растрескивающийся (Grandal). Значения среднего по признакам площадь, периметр, длина, ширина, диаметр волокна составили $354,01 \text{ мкм}^2$, $68,90 \text{ мкм}$, $25,05 \text{ мкм}$, $18,53 \text{ мкм}$, $17,22 \text{ мкм}$ соответственно. Волокно этих образцов можно использовать для производства композитных и звукоизоляционных материалов, утеплителей и в автомобилестроении.

Средние значения по признакам площадь ($187,07 \text{ мкм}^2$), периметр ($49,87 \text{ мкм}$), длина ($25,05 \text{ мкм}$), ширина ($18,53 \text{ мкм}$), диаметр ($13,04 \text{ мкм}$) характеризуют волокно образцов «Кластера 3» как наиболее тонкое и перспективное для применения в текстильной промышленности. Этот кластер объединил сорта подвидов: лен-долгунец (Блакит, А-29, Славный 82,

Ariane), лен-межеумок (Koto, Leona, Norlin, Culbert) и лен-кудряш (Gold Flax).

Таким образом, результаты электронно-микроскопического анализа позволили обнаружить взаимосвязь между структурно-функциональными параметрами элементарных волокон, качеством волокна и продуктивностью сортов льна культурного.

Исследование метрических характеристик семян важно не только для анализа качества семенного материала, но также для оптимизации процессов сушки, очистки, калибровки автоматических сеялок. Появились исследования [12] о преимуществах использования семян определенной формы для производства пищевых продуктов (так, мелкие семена сои применяют для производства натто – соевого творога, крупные – для получения мисо и тофу) [12]. Перспективы использования льняного семени в пищу очень высоки, так как его жирнокислотный состав характеризуется высоким содержанием необходимых нашему организму ω -3-жирных кислот.

Сравнительный анализ морфологических параметров льняных семян выявил достоверные различия по исследуемым признакам (табл. 2). В среднем площадь семени масличных сортов льна составляет $8,31 \text{ мм}^2$, периметр – $11,43 \text{ мм}$, длина – $4,74 \text{ мм}$, ширина – $2,52 \text{ мм}$, фактор формы – $0,79$ (рис. 3). Семена льна округлые, слегка вытянутые, с так называемым «носиком».

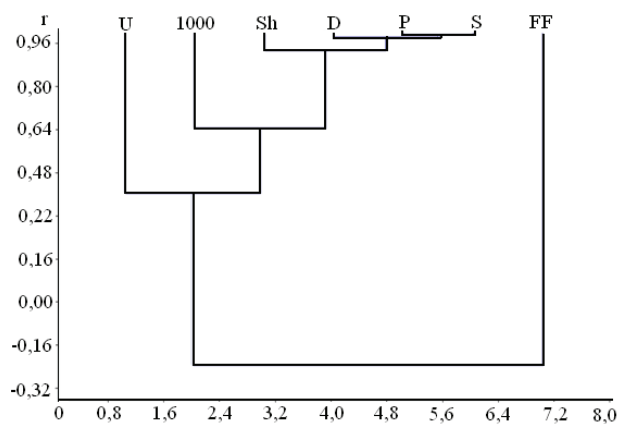


Рис. 3. Корреляционные связи метрических и весовых признаков семени льна:

r – коэффициент корреляции; U – удлинение;
1000 – масса 1000 семян; Sh – ширина;
D – длина; P – периметр; S – площадь;
FF – фактор формы семени

От качества семян в большей степени зависит продуктивность растений. Однако до сих пор не совсем ясно, каким показателем оценивать качество семян при послеуборочной обработке. Имеются три различных мнения относительно показателей качества семян. Качество семян предлагают оценивать толщиной, массой 1000 зерен либо их плотностью.

Количественные признаки семян и показатели продуктивности сортов льна масличного
***Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum* convar. *humile* Czernom.**

Сорт	Морфологические признаки семени						Продуктивность
	Площадь, мм ²	Периметр, мм	Длина, мм	Ширина, мм	Фактор формы	Удлинение	Масса 1000 семян, г
<i>subsp. usitatissimum</i> convar. <i>humile</i> Czernom.							
Deep Pink	6,50	10,06	4,05	2,20	0,81	1,84	5,11
Flanders	7,15	10,73	4,38	2,25	0,78	1,95	4,69
Gold Flax	7,16	10,69	4,39	2,22	0,79	1,98	6,09
McGregor	7,23	10,81	4,44	2,23	0,78	2,00	5,58
SU-1-10	7,28	10,65	4,32	2,31	0,80	1,87	5,52
Linota	7,34	10,70	4,35	2,29	0,80	1,91	5,06
K-5827	7,46	10,90	4,34	2,30	0,79	1,94	4,97
Somme	7,55	10,82	4,35	2,40	0,81	1,82	5,51
Omega	7,58	11,00	4,45	2,38	0,79	1,88	6,13
Воронежский	7,67	10,87	4,39	2,36	0,81	1,87	5,53
K-2398	8,08	11,34	4,65	2,37	0,79	1,96	4,20
Atalante	8,13	11,29	4,55	2,46	0,80	1,85	5,80
K-6570	8,29	11,46	4,68	2,42	0,79	1,94	5,04
Glenelg	8,40	11,60	4,77	2,41	0,78	1,99	6,86
K-5627	8,44	11,58	4,73	2,46	0,79	1,93	7,33
Л-6582	8,54	11,55	4,67	2,49	0,80	1,88	5,12
Sandra	8,64	11,80	4,88	2,45	0,78	1,99	7,02
Циан	8,78	11,72	4,74	2,55	0,80	1,87	5,39
ЛМ-1	9,15	12,06	4,96	2,50	0,79	1,99	7,27
ЛМ-2	9,33	12,24	5,07	2,50	0,78	2,03	6,68
Blue Chip	9,40	12,20	4,98	2,57	0,79	1,93	5,93
Antares	9,49	12,18	4,96	2,60	0,80	1,91	7,53
Raluca	9,53	12,34	5,08	2,56	0,79	1,99	6,62
Небесный	9,59	12,33	5,05	2,58	0,79	1,96	5,62
Mivast	10,13	12,62	5,12	2,70	0,80	1,90	7,15
НСР _{0,05}	0,09	0,02	0,08	0,02	0,01	0,02	0,09

Анализ корреляционной связи линейных признаков семян (площадь, периметр, длина, ширина) и массы 1000 семян представлен на рис. 3. Коэффициент корреляции метрических признаков семени составил 0,88, что позволяет предположить наличие их общей наследственной основы. С количественными признаками семени достоверно связана масса 1000 семян ($r = 0,64$), один из наиболее стабильных показателей в пределах сорта.

Для разбиения образцов на однородные группы был использован метод *k*-средних (рис. 4).

Известно, что между размером семени и концентрацией в нем масла существует прямая положительная корреляция. Таким образом, наиболее перспективной с точки зрения получения масла является «Кластер 3». Он объединил сорта Deep Pink, Flanders, Gold Flax, McGregor, SU-1-10, Linota, K-5827, Somme, Omega, Воронежский, K-2398, Atalante, K-6570, Л-6582. Этот кластер характеризовался наибольшими показателями

среднего по признакам площадь (9,46 мм²), периметр (12,24 мм), длина (5,01 мм), ширина (2,58 мм) (рис. 4). В «Кластер 2» вошли сорта Gleneld, K-5627, Sandra, ЛМ-1, Antares. Значения среднего по признакам площадь, периметр, длина, ширина, диаметр семян у этих сортов составляли 8,83 мм², 11,84 мм, 4,86 мм, 2,48 мм соответственно. «Кластер 1» объединил сорта Циан, ЛМ-2, Blue Chip, Raluca, Небесный, Mivast, характеризующиеся наименьшими показателями среднего по исследуемым признакам (площадь – 7,57 мм², периметр – 10,92 мм, длина – 4,43 мм, ширина – 2,33 мм), что характеризует эти семена как мелкие и, соответственно, содержащие малые количества масла.

Таким образом, исследованные метрические признаки семени (площадь, периметр, длина, ширина) не только являются показателями его качества, но и весьма удобным инструментом классификации и категоризации сортов льна масличного.

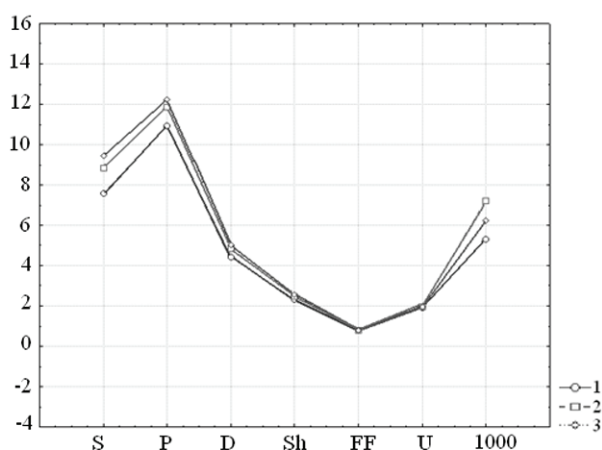


Рис. 4. Средние значения к-кластеров семян льна:
S – площадь; P – периметр; D – длина;
Sh – ширина; FF – фактор формы семени;
U – удлинение; 1000 – масса 1000 семян

Заключение. Результаты исследования позволили выявить зависимости между линейными характеристиками семян, элементарных волокон и критериями продуктивности льна культурного. Полученные данные свидетельствуют об эффективности использования компьютерной морфометрии для проведения сравнительного анализа и скрининга уникальных генотипов льна культурного.

Кластеризация по методу k-средних позволила выявить генотипы, наиболее перспективные для хозяйственного использования в текстильной промышленности (Блакит, А-29, Славный 82) и для производства масла (Deer Pink, Flanders, Gold Flax, McGregor, SU-1-10, Linota, K-5827, Somme, Omega, Воронежский, K-2398, Atalante, K-6570, Л-6582).

Литература

1. Hamilton, I. Linen / I. Hamilton // Textiles. – 1986. – Vol. 15, № 1. – P. 30–34.
2. Sharma, H. Enzyme treatment of flax / H. Sharma, C. Van Sumere // Genet Eng. Biotechnol. – 1992. – Vol. 12, № 1. – P. 19–23.

3. Sharma, H. The biology and processing of flax / H. Sharma, C. Van Sumere; in eds. C. Van Sumere. – Belfast, Northern Ireland: M Publ., 1992. – 216 p.

4. Improved method for fibre content and quality analysis and their application to flax genetic diversity investigations / M. J. A. van den Oever [et al.] // Industrial crop and products. – 2003. – Vol. 18, № 3. – P. 231–243.

5. Diederichsen, A. Phenotypic and molecular (RAPD) differentiation of four infraspecific groups of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum*) / A. Diederichsen, Yong-Bi Fu // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2006. – Vol. 53, № 1. – P. 77–90.

6. Diederichsen, A. Variation of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum*) and its wild progenitor pale flax (subsp. *angustifolium* (Huds.) Thell.) / A. Diederichsen, K. Hammer // Genetic Resources and Crop Evolution. – 1995. – Vol. 42, № 3. – P. 263–272.

7. Лемеш, В. А. RAPD-анализ межвидового полиморфизма льна / В. А. Лемеш, М. В. Шут, Л. В. Хотылева // Вестник ВОГиС. – 2005. – Т. 9, № 4. – С. 490–494.

8. AutoScan: методическое руководство к программному пакету [Электронный ресурс]. – PDF-документ (5,72 Мб). – ЗАО «Спектроскопические системы», 2002.

9. Himmelsbach, D. S. FT-IR microspectroscopic imaging of flax (*Linum usitatissimum* L.) stems / D. S. Himmelsbach, S. Khalili, D. E. Akin // Cell. Mol. Biol. – 1998. – Vol. 44, № 1. – P. 99–108.

10. Wang, H. M. Evaluation of the fineness of degummed bast fibers / H. M. Wang, X. Wang // Fibers and Polymers. – 2004. – Vol. 5, № 3. – P. 171–176.

11. Identification and measurement of convolutions in cotton fiber using image analysis / J. Han Young [et al.] // Artificial Intelligence Review. – 1998. – Vol. 12, № 1–3. – P. 201–211.

12. Shatadal, P. Identifying damaged soybeans by color image analysis / P. Shatadal, J. Tan // Appl. Eng. Agri. – 2003. – Vol. 19, № 1. – P. 65–69.