

РАСТЕНИЕВОДСТВО

УДК 631.527:631.526.32:633.14

Опыт имидж-анализа зерна ржи

Зыкин Павел Александрович¹, кандидат биол. наук, доцент,

Уткина Елена Игоревна², кандидат биол. наук, зав. отделом,

Войлоков Анатолий Васильевич³, доктор биол. наук, доцент, зав. лабораторией

¹ФГБОУ «Санкт-Петербургский государственный университет»,

г. Санкт-Петербург, Россия,

²ФГБНУ «Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства

Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого», г. Киров, Россия,

³Санкт-Петербургский филиал ФГБУН Институт общей генетики имени

академика Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия

E-mail: pavel.zykin@gmail.com, E-mail: utkina.e.i@mail.ru

*В статье приводятся результаты имидж-анализа размеров и цвета зерновок ржи разной окраски, контролируемой известными генами. Изучено 23 образца ржи с окраской зерна, визуальное описание как желтая, зеленая, коричневая и фиолетовая. Для компьютерного анализа цифровых изображений зерновок, полученных с помощью сканера, адаптировали программу GrainScan, используемую для работы с пшеницей. Программа помимо размеров позволяет установить три координаты цвета, рассчитанные в цветовом трехмерном пространстве CIEL*a*b*. На основании значений координат a* и b* произведен расчет двух дополнительных параметров – C* и h*, характеризующих насыщенность (чистоту) и тон (собственно цвет) зерновок соответственно. Показано, что индивидуальный анализ размеров и цветовых характеристик зерновок дает малые значения стандартных ошибок. Это позволяет установить пары форм, различающиеся по любому из параметров. Цвет зерна ржи нельзя описать как насыщенный цвет одного из тонов. Значения h* позволили разбить четыре группы образцов с разной окраской зерна на три в соответствии с отсутствием антоцианов в зерновке (безантоциановые, желтозерные и коричневозерные образцы), наличием антоцианов в алейроновом слое (зеленозерные образцы) и наличием антоцианов в перикарпе (фиолетовозерные образцы). Полученные данные обсуждаются в связи с литературными данными по визуальному описанию цвета зерна ржи, типу пигментов и окраске отдельных слоев зерновки у ржи.*

Ключевые слова: озимая рожь, имидж-анализ, размер и цвет зерна

Размер зерновок является важным компонентом урожайности зерновых культур, влияет на всхожесть и энергию прорастания семян, а также прямо или косвенно определяет технологические характеристики зерна. Для ряда видов установлена положительная корреляция между окраской и прорастанием семян в стрессовых условиях. Цвет зерна злаков определяется флавоноидами (антоцианами) и каротиноидами, имеющими несомненную пищевую значимость. До недавнего времени размеры и цвет зерна определяли только массово с помощью соответствующих устройств и приборов. Размеры зерна находили своё косвенное отражение в массе 1000 зерен, объемном весе (натуре) и фракционном составе, оцениваемом с помощью калибровочных сит. Цвет зерна определяют с помощью дорогостоящих колориметров. Развитие цифровых технологий позволило создать технику и компьютерные программы, ориентированные на оценку индивидуальных характеристик биологических объектов, в частности зерновок, разработать на этой основе принципы имидж-анализа, понимаемого как цифровое описание

размеров, формы и цвета отдельных особей и их органов. Имидж-анализ зерновок позволяет изучать изменчивость по изучаемым параметрам в пределах сортов и гибридов, проводить отбор на уровне отдельных зерновок, исходя из объективной оценки их формы, размеров и цвета. В настоящее время ведется активная разработка оборудования и компьютерных программ имидж-анализа, ориентированных на их использование в селекции и семеноводстве основных зерновых культур [1]. Доказана эффективность использования цифрового анализа семян многих культур для сортовой идентификации, анализа засоренности, преждевременного прорастания, поражения болезнями, влажности и качества семян [2]. Исследования на ржи в этом отношении отсутствуют.

Цель исследований – изучить возможность применения одного из вариантов имидж-анализа, разработанного на зерне пшеницы GrainScan [1], к анализу зерновок ржи, различающихся по окраске зерна.

Материал и методы. В работе использовали компьютерную программу GrainScan

[1], которая анализирует цифровые изображения зерновок, полученные с помощью сканера, и выдает три параметра размеров (длина, ширина, площадь) и три координаты цвета, рассчитанные в цветовом трехмерном пространстве CIEL*a*b*, служащим одним из стандартов при измерении цветовых характеристик. Координаты цвета (L^* , a^* и b^*), рассчитанные в этом пространстве, являются аппаратно независимыми и соответствуют зрительному восприятию человека. Координата L^* (яркость или светлота) измеряет изменение цвета от черного (0) к белому (100). Координатные оси на плоскости, перпендикулярной оси L^* , обозначают a^* и b^* . Значения a^* и b^* в любой точке оси L^* отражают изменения цвета от зеленого через серый к красному (a^*) и от синего через серый к желтому (b^*). Близкие к нулю значения a^* и b^* описывают оттенки серого. На основании значений трех координат рассчитываются обобщающие параметры S и h^* , позволяющие описывать цвет объектов численно [3]. Насыщенность S (chroma) рассчитывается как $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$. Тон (собственно цвет) h^* (hue angle) рассчитывается в градусах как $\arctangent b^*/a^*$ [2]. Для проведения имидж-анализа использовали сканер марки Epson Perfection V19, его предварительно калибровали с помощью цветовой шкалы Munsell Color Checker Mini согласно инструкции разработчиков программы [1]. При сканировании устанавливали разрешение 300 dpi.

Анализировали длину, ширину и цвет семян 23 образцов ржи, с акцентом на анализ цветовых характеристик. Каждый образец включал от 68 до 223 зерновок разных лет урожая. Материал был разбит на четыре группы с разной окраской семян. Первая группа включала 11 образцов с желтой окраской семян. Семь из них (№1-№7 в таблице) являются безантоциановыми мутантами. Безантоциановость – отсутствие антоциана на всем растении, включая зерновки, является следствием гомозиготности по соответствующим рецессивным мутациям *vil* (№1 и №2) и *vi2-vi6* (№3-№7 соответственно). Четыре образца с желтыми семенами (№8-№11) характеризуются отсутствием антоциана только в зерновках. Отсутствие антоциана определяется гомозиготностью (*cc*) по рецессивной аллели гена *C*. Пять зеленозерных образцов (№12-№16) несут доминантные аллели в этом гене, благодаря их действию антоцианы синтезируются в алейроновом слое зерновки. Две формы (№17-№18) имеют зерно коричневой окраски. Образец под номером 17 является инбредной линией, полученной на основе скрещивания двух форм с установленными

генами *Vs* (violet seed) и *vil*. Путём самоопыления отдельных растений в последующих поколениях выделена форма гомозиготная по этим генам. Предполагаемый генотип этой формы *Vs/Vs, vil/vil* подтвержден в контрольных скрещиваниях. Возможно, что и коричневая окраска зерновок у формы №18 также объясняется взаимодействием генов *Vs* и *vil*. Пять изученных образцов гомозиготны по гену фиолетовой окраски зерна. Образцы под номерами 19 и 20 представляют урожай разных лет формы генетической коллекции ГК-14, поддерживаемой путем групповой изоляции растений. Образец №23 является высокоинбредной линией, выделенной путем инбридинга из ГК-14. Образцы 21 и 22 представляют урожай зерна разных лет яровой фиолетовозёрной формы, полученной в свое время на основе озимой формы с фиолетовым зерном.

Результаты и их обсуждение. Оценка размеров и цвета отдельных зерновок в больших выборках дает малые значения стандартных ошибок, поэтому в пределах каждой выделенной группы, как и во всем материале в целом, можно выделить образцы, различающиеся по значениям отдельных параметров. Наиболее крупным зерном среди изученных форм характеризуются открытоопыляемые сорта. Это белозерный сорт Esto (№2) и сорт Вятка 2 (№16), который был представлен специально отобранной фракцией зеленых семян. Из данных таблицы 1 следует, что семена Вятки 2 длиннее ($10,3 \pm 0,11$ мм против $9,5 \pm 0,1$ мм), чем семена Esto ($P < 0,01$) и не отличаются по ширине – $2,9 \pm 0,03$ мм против $3,0 \pm 0,03$ мм.

Измерение семян на основании обработки цифровых изображений имеет ряд достоинств по сравнению с ручными измерениями. Это несравненно более высокая производительность, их большая точность и объективность. Измерение сотен семян занимает несколько минут.

Точность и объективность измерения достигаются аппроксимацией проекции зерновки эллипсом и расчетом его меньшего (ширина) и большего (длина) диаметров, вне зависимости от ориентации бороздки зерна относительно стекла сканера. Эти же достоинства проявляются при анализе цвета зерна. В этом случае на первый план выходит возможность представления цвета отдельных зерновок в виде чисел. Это позволяет использовать численные характеристики цвета для математической обработки данных, в частности, для разработки методов неразрушающего анализа качества зерна. Анализ цвета проводили по группам образцов с разным цветом семян (табл.).

Таблица 1

Результаты имидж-анализа размеров и окраски зерновок ржи

№ формы, линии	Длина, мм	Ширина, мм	Координата цвета				
			L*	a*	b*	C*	h*
1	8,3±0,07	2,8±0,03	46,1±0,21	3,7±0,05	14,6±0,07	15,06	75,78
2	9,5±0,1	3,0±0,03	49,0±0,18	3,5±0,05	16,2±0,11	16,57	77,81
3	7,0±0,05	2,3±0,02	44,9±0,17	3,4±0,08	15,3±0,07	15,67	77,47
4	7,5±0,04	2,4±0,02	50,2±0,22	3,1±0,06	17,4±0,07	17,67	79,90
5	7,2±0,06	2,4±0,03	47,5±0,19	3,8±0,07	15,8±0,14	16,25	76,48
6	8,0±0,06	2,4±0,02	48,7±0,24	4,1±0,08	15,8±0,11	16,32	75,45
7	7,7±0,04	2,6±0,03	51,4±0,20	4,0±0,09	17,9±0,13	18,34	77,40
8	8,5±0,08	2,8±0,02	47,8±0,23	3,9±0,07	15,7±0,10	16,18	76,05
9	9,1±0,07	2,6±0,02	50,0±0,19	4,4±0,07	17,8±0,11	18,34	76,12
10	8,0±0,07	2,7±0,02	48,2±0,22	4,0±0,09	16,2±0,12	16,69	76,13
11	7,9±0,06	2,7±0,02	49,2±0,21	4,4±0,05	16,8±0,08	17,34	75,32
12	8,1±0,05	2,7±0,03	45±0,24	2,4±0,05	14,5±0,08	14,70	80,60
13	8,4±0,06	2,8±0,02	46,3±0,23	2,8±0,07	13,9±0,08	14,18	78,61
14	7,7±0,07	2,9±0,03	51,1±0,21	2,4±0,07	15,9±0,11	14,11	81,42
15	8,4±0,07	2,8±0,03	49,1±0,2	2,3±0,05	14,2±0,06	14,40	80,80
16	10,3±0,11	2,9±0,03	47,8±0,19	2,7±0,06	15,2±0,09	15,43	79,93
17	8,5±0,06	2,7±0,02	38,8±0,35	4,8±0,07	14,4±0,09	15,18	71,56
18	8,9±0,09	2,2±0,04	42,7±0,34	3,6±0,10	14,9±0,09	15,33	76,42
19	8,8±0,08	2,5±0,02	30,2±0,25	6,6±0,06	11,9±0,11	13,61	60,99
20	9,1±0,06	2,6±0,02	34,8±0,36	4,9±0,07	12,4±0,11	13,33	68,44
21	7,5±0,07	2,2±0,03	28,4±0,3	5,2±0,09	9,4±0,13	10,60	61,05
22	7,9±0,05	2,3±0,02	30,3±0,29	4,4±0,07	9,6±0,1	10,56	65,38
23	7,6±0,06	2,8±0,03	60,0±0,56	7,3±0,15	17,0±0,12	17,70	66,76

Примечания: 1-7 – безантоциановые линии ржи; 8-11 – жёлтозёрные линии; 12-16 – зелёнозёрные формы и линии; 17-18 линии с коричневой окраской зерна; 19-23 – фиолетовозёрные формы и линии. Координаты цвета L*, a*, b* указаны со стандартной ошибкой, насыщенность C* и тон h* цвета рассчитаны на основе средних значений координат a и b.

Использовали как координаты, выдаваемые программой непосредственно (L*, a* и b*), так и самостоятельно рассчитанные координаты – насыщенность – C* и тон – h*. Значения C* и h* для каждого образца вычисляли на основании средних значений координат a* и b*. Распределения всех пяти показателей для безантоциановых (№1-№7) и желтозерных (№8-№11) форм перекрываются, что хорошо соответствует отсутствию антоциана в алейроновом слое их зерновок, визуально описанных как жёлтые. Согласно сравнению значений параметра a* группа зеленозерных образцов «зеленее» остальных, фиолетовозерные образцы «краснее» согласно a*, «синее» согласно b* и являются самыми темными согласно L*. Исключение составляет образец №23, который по значению всех параметров выделяется не только среди фиолетовозёрных, но и среди образцов с другой окраской зерна. Такой результат можно объяснить, принимая во внимание неоднородную окраску зерновок этой линии, выражающуюся

в чередовании белесых и бледно-фиолетовых пятен, а также плохую выполненность семян. Возможно, что эти причины влияют на цветовые характеристики зерновок и дают смещенные значения цветовых координат. Анализ дополнительных параметров C* и h* подтверждает различия между группами, но не позволяет описать окраску зерновок в терминах чистых цветов. Чистым, насыщенным цветам должно отвечать значение координаты C*, равное 100, расчетные значения, полученные нами, колеблются в диапазоне 10,56 (№ 22)-18,34 (№7). Взаимное расположение образцов в цветовом круге согласно значениям h* соответствует ранее сделанному выводу. Зеленозерные образцы зеленее, желтозерные и коричневозерные желтые, а фиолетовозерные краснее. Согласно критерию знаков, распределения значений h* у этих образцов различаются, что позволило рассчитать средние арифметические значения h* для трех выделенных групп. Они равняются соответственно 80,27; 76,3 и 64,52. Интересно

отметить, что этот вывод соответствует отсутствию антоцианов в зерне у желтозерных форм, преобладанию дельфинидин-3-рутинозида у зеленозерной ржи и цианидин-3-глюкозида у фиолетовозерной ржи [4]. В монографии «Рожь» [5] приводится визуальное описание окраски зерновок посевной ржи, составленное на основании описания огромного количества сортов, входящих в коллекцию ВИР. Согласно этому описанию «у ржи посевной зерновка окрашена в следующие цвета: зеленый, желтый, белый, фиолетовый, голубой, коричневый, черный и переходные – желто-зеленый, светло-зеленый, серо-зеленый, темно-зеленый, желто-коричневый, светло-коричневый». Таким образом, разнообразие в словесном описании цвета зерновок ржи соответствует установленным нами межгрупповым и внутригрупповым различиям цветовых координат. Главные отличия визуального и цифрового описаний заключаются в объективности и воспроизводимости цифровых характеристик и, следовательно, в возможности их использования для косвенной оценки качественного и количественного состава пигментов, отвечающих за окраску. Работы по составу и распределению антоцианов по тканям зерновки у ржи единичны [4]. Одной из работ, не получивших должного развития, являются исследования, опубликованные в монографии Л.Н. Любарского [6]. Автор установил, что у большинства районированных сортов ржи встречаются зерновки трех цветов: зеленые (серо-зеленые), желтые и редко – коричневые. В монографии отсутствует описание пигментов в тканях зерновок с разной окраской, однако приводится визуальное описание окраски отдельных оболочек зерновок трех цветов при их анатомическом препарировании. Показано, что сочетание окраски алейрона с окраской разных слоев семенной (теста) и плодовой (перикарп) оболочек определяет окраску зерновки как желтая, коричневая или зеленая. В.Д. Кобылянский приводит в монографии «Рожь» [5] таблицу, в которой все разнообразие зерна ржи по окраске, включая фиолетовое зерно, представлено как следствие комбинирования градаций окраски алейрона (не окрашен – голубой), тесты (не окрашена – красно-коричневая – темно-коричневая) и перикарпа (не окрашен – желтый – фиолетовый). Такое описание окраски зерновок ржи задает направление исследований с помощью современных методов и адекватного генетического материала. Первым шагом в этом направлении явилось проведенное нами объективное описание цвета с помощью анализа цифровых изображений зерновок. Очевидно,

что данный метод позволяет эффективно дифференцировать селекционный материал и по размерам зерна с учётом его длины и ширины, в отличие от сортировки на ситах, на которых разделение происходит только по ширине. Известно, что соотношение длины и ширины определяет мукомольные качества зерна, выход муки и отрубей. Однородность зерна по размерам также является важной характеристикой сортов. Изменчивость по этим показателям можно эффективно учитывать при анализе урожая с отдельных растений ржи в ходе оценки селекционного материала с помощью высокопроизводительного имидж-анализа.

Выводы. Установлено, что компьютерная программа GrainScan может быть использована для имидж-анализа зерновок ржи по их размеру и цвету. Это позволяет использовать данный метод для анализа внутри- и межсемейной изменчивости по этим параметрам в ходе селекционного процесса. При индивидуальном анализе зерновок 23 образцов ржи, различающихся по генетически контролируемой окраске зерна, установлены различия по длине, ширине и координатам цвета (L^* , a^* , b^* , C^* , h^*), рассчитанным в трехмерном цветовом пространстве CIE $L^*a^*b^*$.

Значения параметра h^* позволяют разбить образцы на четыре группы, визуально выделенные по цвету, и на три группы в соответствии с наличием и локализацией антоциана: 1) отсутствие антоциана в зерновке (безантоциановые, желтозерные и коричневозерные); 2) наличие антоцианов в алейроновом слое (зеленозерные); 3) наличие антоцианов в перикарпе (фиолетовозерные). Установленное разделение образцов на три группы соответствует отсутствию антоцианов в зерне у безантоциановых, желтозерных и коричневозерных форм, преобладанию дельфинидин-3-рутинозида у зеленозерной ржи и цианидин-3-глюкозида у фиолетовозерной ржи.

Исследования проводились при финансовой поддержке РФФИ (проект №16-04-00411) и программы Президиума РАН «Биоразнообразие природных систем» (проект №0112-2015-0012).

Список литературы

1. Whan A.P., Smith A.B., Cavanagh C.R., Rai J.-P.F., Shaw L.M., Howitt C.A., Bischof L. GrainScan: a low cost, fast method for grain size and colour measurements // Plant Methods, 2014. V.10. P. 23-32.
2. SandeepVarma V., Kanaka Durga K., Kes-havulu K. Seed image analysis: its applications in seed science research // International Research Journal of Agricultural Sciences, 2013. V.1 (2). P. 30-36.
3. McGuire R.G. Reporting of objective color measurements // Hort. Science, 1992. V. 27. P. 1254-1255.

4. Dedio W., Kaltsikes P.J., Larter E.N. The anthocyanins of *Secale cereale* // *Phytochemistry*. 1969. V.8. P. 2351-2352.

5. Культурная флора СССР. Рожь. Т. 2 . ч. 1

/ Отв. ред. В.Д. Кобылянский. Л.: Агропромиздат, 1989. 368 с.

6. Любарский Л.Н. Рожь. М.: Хлебоиздат, 1956. 259 с.

Experience of image-analysis of rye grain

Zykin P.A.¹, PhD in biology, associated professor, **Utkina E.I.**², PhD in biology, head of department, **Voylovkov A.V.**³, DSc in biology, associated professor, head of laboratory,

¹*Saint Petersburg State University, Saint Petersburg,*

²*North-East Agricultural Research Institute, Kirov, Russia,*

³*Saint Petersburg branch of N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia*

The article presents the results of image analysis of size and color of rye grains of different color that is controlled by known genes. It was studied 23 samples of rye with the color of the grain visually described as yellow, green, brown and violet. Software GrainScan developed for wheat was adapted for computer analysis of digital images of rye kernels obtained with flatbed scanner. Software along with size allows calculating three-coordinates of color in three-dimensional color space CIEL*a*b*. Based on coordinate values a* and b* calculation of two additional parameters - C* and h* describing the saturation (purity) and tone (the color itself) of the grains, respectively, was made. It is shown that the individual analysis of size and color characteristics of the kernels give low values of standard errors. This allows revealing pairs of forms, which differ from each other for any of the studied parameters. The color of the rye grain cannot be described as the saturated color of one of the tones. In accordance to values of h*, it was possible to divide four visually selected groups into three ones. A composition of groups correspond to lack of anthocyanins in caryopsis (anthocyaninless, yellow-seeded, brown-seeded samples), the presence of anthocyanins in the aleurone layer (green-seeded samples) and the presence of anthocyanins in the pericarp (violet-seeded samples). The data obtained are discussed in connection with literature data on visual description of colors of rye grain, type of pigments, and the coloring of the individual layers of rye kernel.

Key words: *winter rye, image-analysis, kernel size and color*

References

1. Whan A.P. et al. GrainScan: a low cost, fast method for grain size and colour measurements. *Plant Methods*, 2014. Vol. 10. pp. 23-32.

2. SandeepVarma V., Kanaka Durga K., Kes-havulu K. Seed image analysis: its applications in seed science research. *International Research Journal of Agricultural Sciences*, 2013. Vol. 1 (2). pp. 30-36.

3. McGuire R.G. Reporting of objective color mea-

surements. *Hort. Science*, 1992. Vol. 27. pp. 1254-1255.

4. Dedio W., Kaltsikes P.J., Larter E.N. The anthocyanins of *Secale cereal*. *Phytochemistry*. 1969. Vol. 8. pp. 2351-2352.

5. *Kul'turnaya flora SSSR. Rozh'*. [Cultural flora of the USSR. A rye]. Vol. 2. Part. 1. *Otv. red. V.D. Kobylanskiy*. Leningrad: *Agropromizdat*, 1989. 368 p.

6. Lyubarskiy L.N. *Rozh'*. [A rye]. Moscow: *Khleboizdat*, 1956. 259 p.

УДК 631.524.02: 633.11: 57.055

Работа генетических систем пшеницы в зависимости от пути поступления алюминия в растение

Лисицын Евгений Михайлович, доктор биол. наук, зав. отделом,

Амунова Оксана Сергеевна, мл. научный сотрудник

ФГБНУ «Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого», г. Киров, Россия

E-mail: edaphic@mail.ru

В полевых условиях Кировской области в 2014...2016 гг. проведена оценка влияния корневого и фолиарного поступления алюминия в растения яровой мягкой пшеницы на активность генетических систем адаптивности, аттракции и микрораспределения продуктов фотосинтеза. Оценка проведена с использованием графиков ортогональной регрессии в системах координат «масса колоса – масса соломы» и «масса зерна – масса мякоти». Изменения активности генетических систем качественно и количественно отличаются при разных путях воздействия ионов алюминия. У сортов Вятчанка, Магистральная 1, Свеча, Тюменская 80 и Эстивум V313 внекорневая обработка 1,5 мМ сульфатом алюминия снизила активность генетической системы микрораспределения. У сортов Баженка, Легенда, Сибирская 14 и Эстивум 155 обработка способствовала перераспределению пластических веществ в хозяйственно полезную часть колоса. Активность генетических систем адаптивности и аттракции усилилась у сортов Магистральная 1, Свеча, Сибирская 14 и Эстивум V313. Почвенный алюминий (211 мг/кг) повысил эффективность работы генетической системы микрораспределения у сортов Алтайская 80, Карабалыкская 98, Легенда, Линия 3691h,