

ZMIANY STRUKTURY TKANKI BULWY ZIEMNIAKA W WYNIKU DEFORMACJI*

K. Pawlak, A. Król

Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego, Polska Akademia Nauk, ul. Doświadczalna 4,
P.O. Box 201, Lublin 27

Streszczenie. W pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące zmiany parametrów struktury tkanki bulwy ziemniaka powstałych w wyniku odkształcania. Opracowano metodę utrwalania struktury próbki, umożliwiającą jej obróbkę mechaniczną i długotrwałe przechowywanie oraz metodę uzyskiwania cienkich przekrojów tkanki do badań mikroskopowych. Przedstawiono metodykę uzyskiwania obrazów struktury tkanki bulwy ziemniaka oraz transformacji tych obrazów pozwalającą na identyfikację i parametryzację pojedynczych komórek. Automatycznej ilościowej analizie komputerowej dokonano przy pomocy opracowanego algorytmu do specjalistycznego programu analizy obrazu Aphelion.

Słowa kluczowe: tkanka bulwy ziemniaka, analiza obrazu, utrwalanie struktury

WSTĘP

Od wielu lat prowadzone są badania nad ograniczeniem strat i poprawą jakości produktów roślinnych. Badania wykazały, że jedną z głównych przyczyn strat i spadku jakości tych materiałów są oddziaływania mechaniczne jakim są poddawane podczas całego cyklu produkcyjnego. Dlatego szczególną rolę odgrywają badania nad właściwościami mechanicznymi materiałów roślinnych i ich podatnością na mechaniczne uszkodzenia [3,5]. W ostatnich latach zwrócono uwagę na wpływ mikrostruktury tkanek roślinnych na ich mechaniczną odporność [7,8]. Budowa anatomiczna tkanki roślinnej w istotny sposób determinuje jej właściwości mechaniczne oraz cechy jakościowe finalnego produktu. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga udoskonalenia i rozwoju metod badawczych pozwalających na ilościowe opisywanie struktury tkanek roślinnych. W celu uzyskania obrazów struktury tkanki roślinnej stosuje się różne metody mikroskopowe, natomiast analiza ilościowa tych obrazów może być obecnie wykonywana przy pomocy nowoczesnych metod komputerowych. Istotną trudnością przy tego typu analizach jest brak uniwersalnych metod i procedur komputerowych, które można by było zastosować do różnych typów materiałów. Dobór

*Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych, Nr. 5P 06F 003 10.

metody analizy obrazu zależy od rodzaju materiału oraz od sposobu uzyskiwania jej struktury, tzn. od typu wykorzystanego mikroskopu. Zastosowanie odpowiednich procedur przekształceń cyfrowych pozwala na dokonanie analizy ilościowej i otrzymania parametrów opisujących strukturę komórkową tkanki roślinnej.

Celem badań było określenie wpływu parametrów geometrycznych komórek tkanki bulwy ziemniaka na zmiany struktury wewnętrznej, powstawanie i propagację w niej pęknięć.

Metodyka uzyskiwania obrazu tkanki bulwy ziemniaka

Obiektem badań były próbki tkanki bulwy trzech odmian ziemniaka pobrane z rdzenia zewnętrznego. Próbki o kształcie walca o średnicy i wysokości równej 5 mm wycinane były przy pomocy zaprojektowanego i wykonanego na potrzeby projektu badawczego urządzenia mechanicznego.

W celu uzyskania obrazów tkanki i ich dalszej analizy ilościowej próbki tkanki bulwy ziemniaka poddawano procedurze składającej się z następujących etapów:

1. utrwalanie struktury próbki do stanu umożliwiającego jej obróbkę mechaniczną i długotrwałe przechowywanie,

2. uzyskiwanie cienkich przekrojów tkanki do badań mikroskopowych,

3. akwizycja obrazu mikroskopowego.

Ilościowe określenie parametrów struktury tkanki bulwy ziemniaka i ich zmian powstałych w wyniku naprężeń osiowych wymagało opracowania metodyki pozwalającej na:

1. uzyskiwanie obrazu tkanki bulwy ziemniaka,

2. transformację obrazu struktury tkanki bulwy ziemniaka pozwalającej na identyfikację pojedynczych komórek,

3. parametryzację komórek.

Przeprowadzenie ilościowych badań i opisanie uszkodzeń tkanki bulwy ziemniaka wymagało zastosowania specjalnych procedur utrwalania próbek. W tym celu wybrano metodę parafinową [4]. Pozwala ona na utrwalenie struktury (również uszkodzonej) i następnie uzyskanie skrawków próbki o dowolnej grubości.

Przygotowano dwa rodzaje próbek ziemniaka o kształcie cylindrycznym i następujących wymiarach: średnica - 5 mm, wysokość 5 mm:

– nieuszkodzone (kontrolne),

– odkształcone w maszynie wytrzymałościowej.

Wszystkie próbki odpowiednio w podciśnieniu, utrwalano przez 24 h w utrwalaczu chromowym CrAF. Został on tak dobrany, aby jego działanie było powolne i nie powodowało drastycznego kurczenia ścian komórkowych.

Utrwalone próbki odwadniano w roztworze alkoholu etylowego (od 10% do ~100% alkoholu, co 10% do alkoholu absolutnego). Na tym etapie, oprócz usunięcia wody z próbek, następuje także rozpuszczanie i wymywanie z tkanek lipidów, związków

drobno-cząsteczkowych oraz jonów. W celu przygotowania próbek do etapu przesycania ich parafiną, odwodnione próbki płukano w mieszaninie alkoholu etylowego i rozpuszczalnika parafiny – benzenie, a następnie w czystym benzenie. Przesycanie parafiną przeprowadzono rozpoczynając od parafiny rozpuszczonej w benzenie (~5% w/w). Próbki umieszczano w suszarce i wysycano tym roztworem przez dobę w temperaturze 37°C. Następnie dodawano parafinę w ilości równowagowej z benzenem i całość ogrzewano w temperaturze 60°C (do całkowitego odparowania benzenu). Tak przygotowane próbki zatapiano w parafinie formując bloczki zawierające próbki.

Kolejny etap preparatyki próbek polegał na pocięciu bloczków przy pomocy mikrotomu. W efekcie cięcia uzyskiwano cienkie skrawki o grubości 25 μm . Dużą grubość skrawków zastosowano ze względu na duże wymiary komórek tkanki ziemniaka. Wybrany sposób cięcia pozwolił na uzyskanie sekwencji kolejnych przekrojów komórek.

Pocięte skrawki przyklejono do szkiełek mikroskopowych przy pomocy lepiku Houpta, następnie odparafinowano i poddano barwieniu w hematoksylinie ałunowej i safraninie w celu uwidocznienia ścian komórkowych, a następnie oglądano je pod mikroskopem konfokalnym. Uzyskane wyniki obserwacji okazały się nie zadowalające (duże zaciemnienie preparatów spowodowane absorpcją barwnika, niejednoznacznie odcinające się ściany komórkowe). W związku z tym podjęto działania w celu uzyskania obrazu mikroskopowego lepszej jakości, z wyraźnie określonymi granicami komórek pozwalającego na przeprowadzenie dalszej analizy ilościowych parametrów tkanki i prawidłową identyfikację uszkodzeń tkanki powstałych w trakcie zgniatania próbek. Ostatecznie zastosowano z dobrym wynikiem nie barwione próbki oglądane w mikroskopie optycznym BIOLAR EPI BE-2403 ze światłem przechodzącym. Zdjęcia zarejestrowano za pomocą dwóch kamer, kolorowej kamery CCD ELEMIS KK-35 oraz kamery CCD-HDD ARCO KAMA-2000 i komputerowego programu Matrox Intellicam. Tak uzyskane zdjęcia poddano dalszym transformacjom.

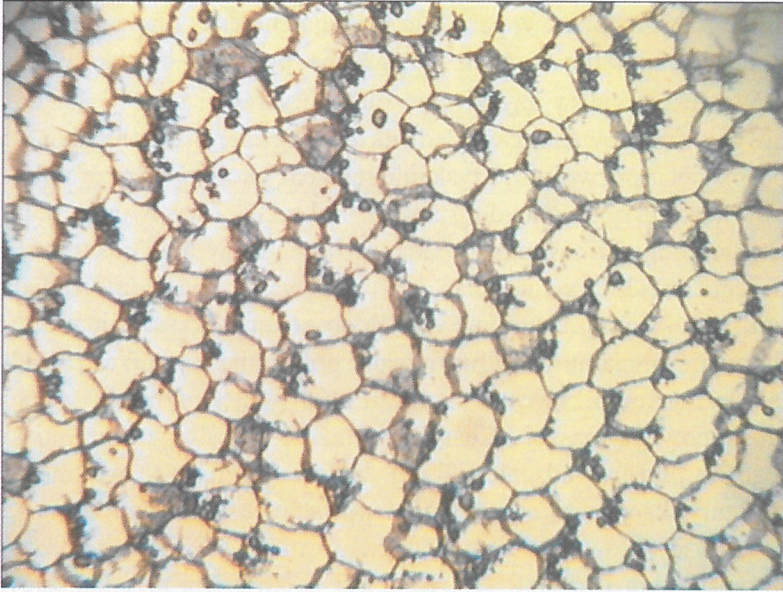
Przetwarzanie obrazu struktury tkanki miękkiszowej bulwy ziemniaka

Celem prac związanych z realizacją tego zadania było uzyskanie obrazu komórek, który umożliwiłby automatyczną ich identyfikację i parametryzację przez program analizujący.

Główny problem związany z identyfikacją komórek wynikał ze złożoności uzyskiwanego obrazu pochodzącego z mikroskopu. Oprócz przeciętych ścian komórkowych (Rys. 1) zawsze widoczne były na nim liczne, często stykające się ze sobą ziarna skrobi zasłaniające krawędzie ścian. Ponadto część ścian dawała obraz nie ostry ponieważ ich płaszczyzny nie były prostopadłe do płaszczyzny przekroju. Oba te czynniki, w powiązaniu z wtrąceniami i pewnymi wadami układu optycznego mikroskopu, utrudniały automatyczną identyfikację struktur komórkowych. Mimo tych trudności uzyskano nowe, interesujące wyniki co należy w dużej mierze zawdzięczać programowi analizy obrazu.

Prace nad opracowaniem automatycznych procedur komputerowych analizy obrazów można podzielić na trzy związane ze sobą kolejne etapy:

- opracowanie algorytmu (tzw. makro) do specjalistycznego programu analizy obrazu Aphelion v.2.3,
- testowanie poprawności wyników uzyskanych z program Aphelion na obrazie wzorcowym i optymalizacja parametrów algorytmu,
- automatyczna analiza wybranych obrazów struktur komórkowych i zapis wybranych parametrów wszystkich komórek widocznych na obrazie do arkusza Excel.



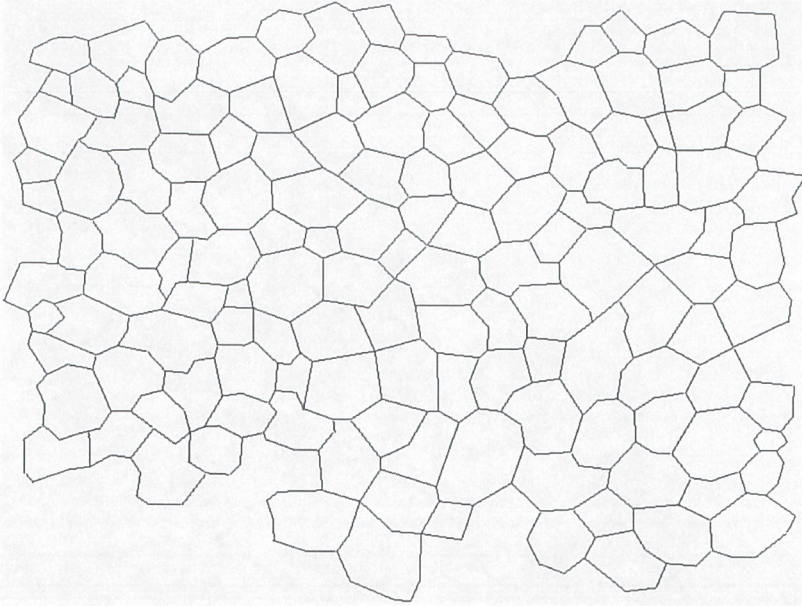
Rys. 1. Przykładowy obraz mikroskopowy tkanki bulwy ziemniaka.

Fig. 1. Example image of the potato tuber tissue.

Obraz wzorcowy powstał na podstawie jednego z obrazów mikroskopowych tkanki ziemniaka (obraz pierwotny), na którym zaznaczono “ręcznie” ściany komórkowe (Rys. 2). Obraz ten (w formacie BMP) został przeanalizowany przy pomocy programu do analizy obrazu - Aphelion. Na podstawie uzyskanych w ten sposób wyników wybrano z biblioteki programu do analizy obrazu taką sekwencję procedur, aby po ich zastosowaniu do obrazu pierwotnego, automatycznie uzyskać obraz ścian komórkowych, który byłby jak najbardziej zbliżony do obrazu uzyskanego “ręcznie”. Podstawą oceny jakości wyników było zarówno porównanie wizualne dopasowania przebiegu ścian uzyskanych z programu z obrazem pierwotnym jak i porównanie ze sobą odpowiadających sobie histogramów. Trzeba nadmienić, że większość funkcji programu Aphelion jest wieloparametrowa. Należało więc dobrać nie tylko sekwencję odpowiednich funkcji, ale również ustalić wartość ich parametrów.

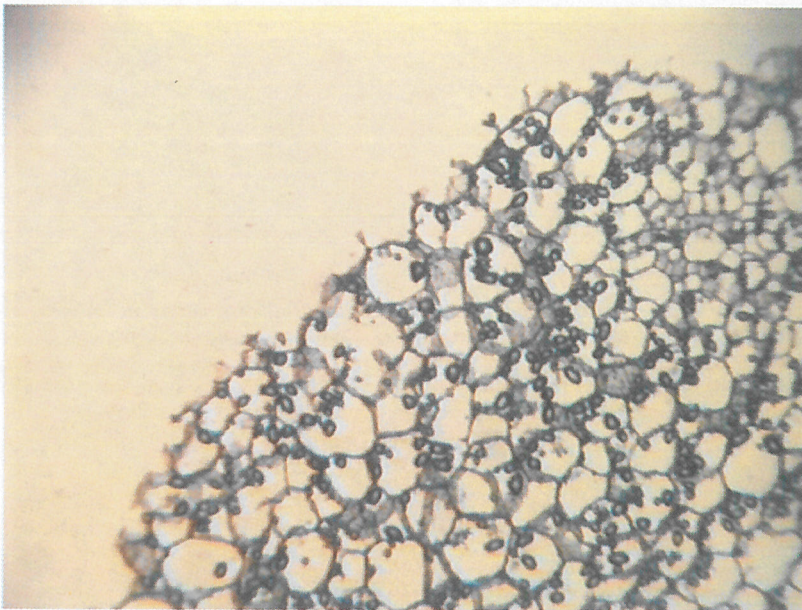
Poniżej przedstawiono optymalną naszym zdaniem sekwencję funkcji (tzw. makro) przetwarzających obraz z kamery CCD wraz z wynikami ich działania (Rys. 3-12).

Przy opracowywaniu tego algorytmu, czyli wyborze odpowiednich procedur, ustaleniu ich kolejności oraz doborze optymalnych parametrów, korzystano z doświadczeń innych naukowców zajmujących się tego typu badaniami [1,2,6,9].



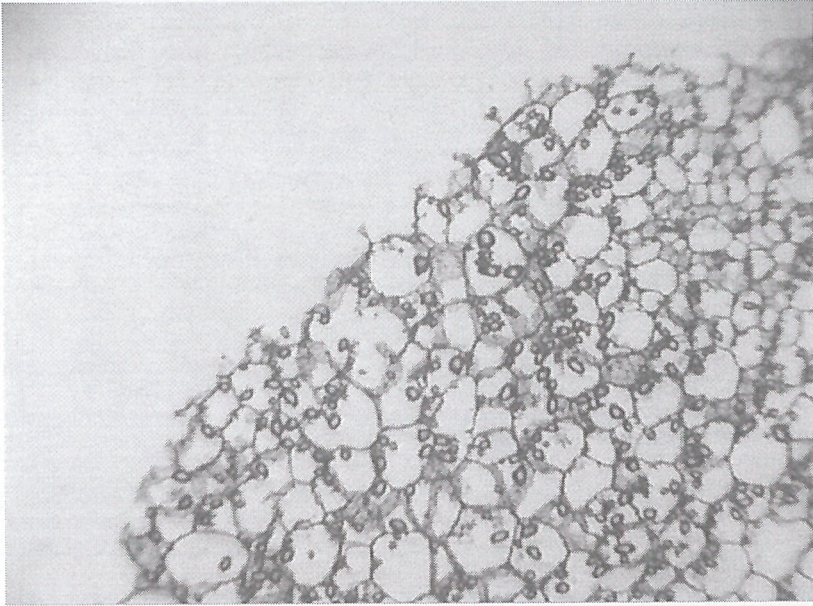
Rys. 2. Obraz z mikroskopu z zaznaczonymi ręcznie ścianami.

Fig. 2. Microscope image of potato tuber tissue cells with hand-made cell walls.



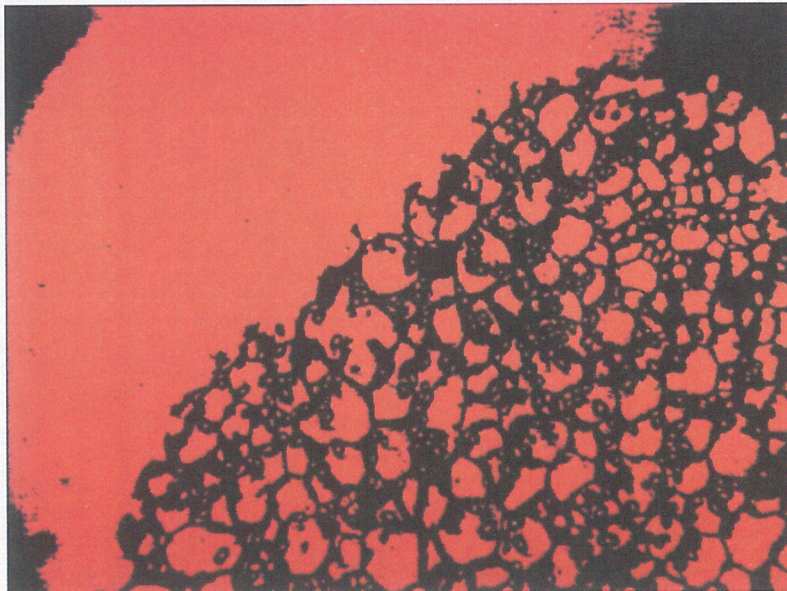
Rys. 3. Oryginalny obraz w formacie RGB (R-czerwony, G-zielony, B-niebieski).

Fig. 3. Original image in RGB mode (R-red, G-green, B-blue).



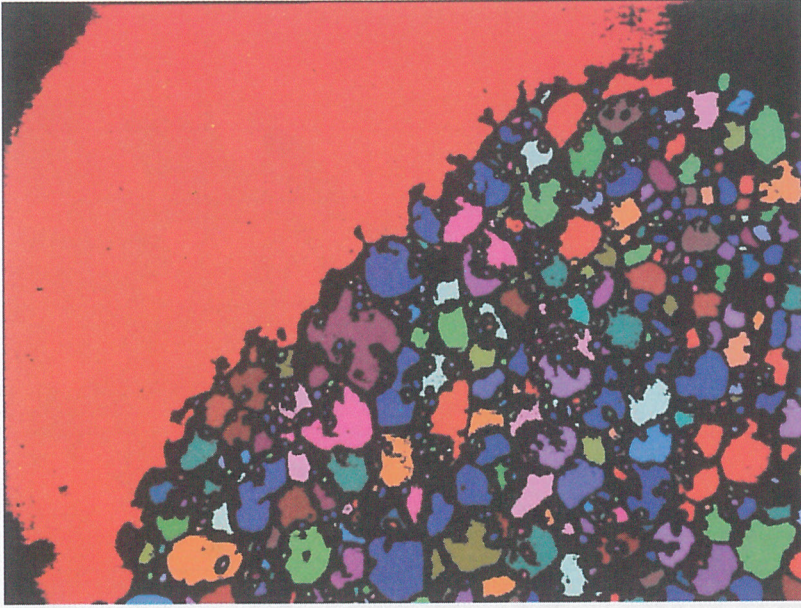
Rys. 4. Obraz w odcieniach szarości uzyskany w wyniku konwersji z formatu RGB na format HSI (H-barwa, S-nasycenie, I-jasność, procedura `AphImgRGBToHSI`) i wydzieleniu składowej jasności (procedura `AphImgSplitBand`).

Fig. 4. Grey image obtained after RGB to HSI conversion (H-hue, S-saturation, I-intensity, procedure `AphImgRGBToHSI`) and intensity channel splitting.

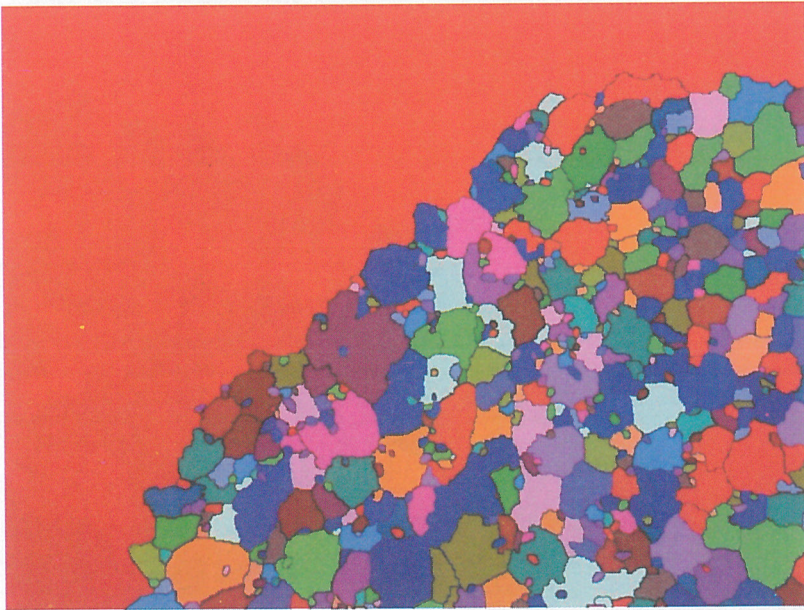


Rys. 5. Wyznaczanie obszarów lokalnych maksimów (identyfikatorów komórek) (procedura `AphImgExtendedRegionalMaxima`).

Fig. 5. Determination of local maximum regions (cell identifiers) (procedure `AphImgExtendedRegionalMaxima`).



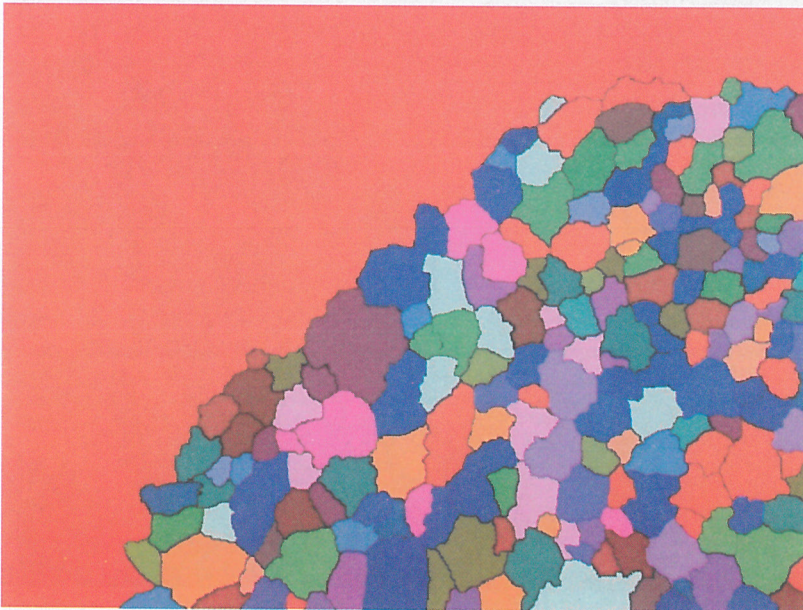
Rys. 6. Obraz po klasyfikacji identyfikatorów komórek (procedura `AphImgClustersToLabels`).
Fig. 6. Image after classification of cell identifiers (procedure `AphImgClustersToLables`).



Rys. 7. Procedura Działu Cieków Wodnych (`AphImgConstrainedWatershed`) wyznacza obiekty na podstawie sklasyfikowanych identyfikatorów komórek (Rys. 6).
Fig. 7. Constrained watershed procedure (`AphImgConstrainedWatershed`) derives the objects via the classified cell identifiers (Fig. 6).



Rys. 8. Obraz po usunięciu małych obiektów nie będących komórkami (procedura `AphImgAreaOpen`).
Fig. 8. Image after deleting of small (not cells) objects (procedure `AphImgAreaOpen`).

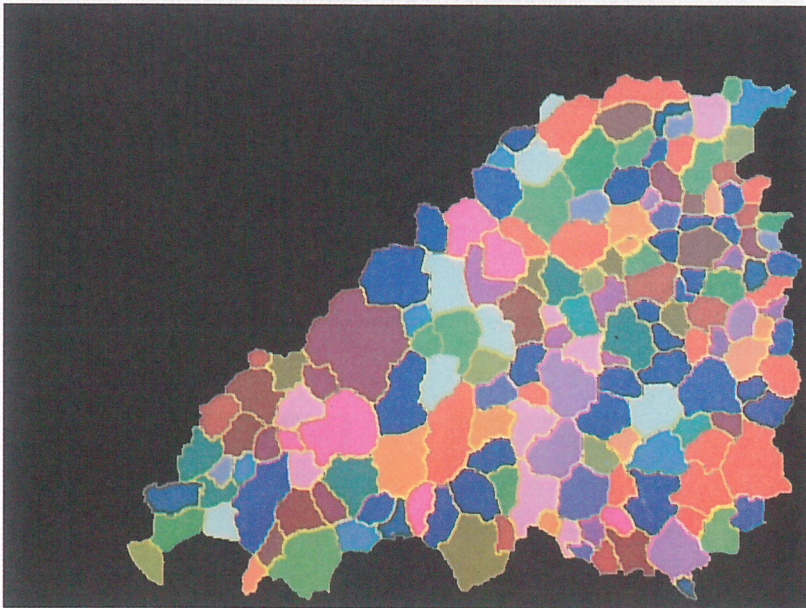


Rys. 9. Powtórzenie procedury Działu Cieków Wodnych. Zapelnienie pustych miejsc powstałych po usunięciu małych obiektów (procedura `AphImgConstrainedWatershed`).
Fig. 9. Free space filling arising after deleting of small objects (procedure `AphImgConstrainedWatershed`).



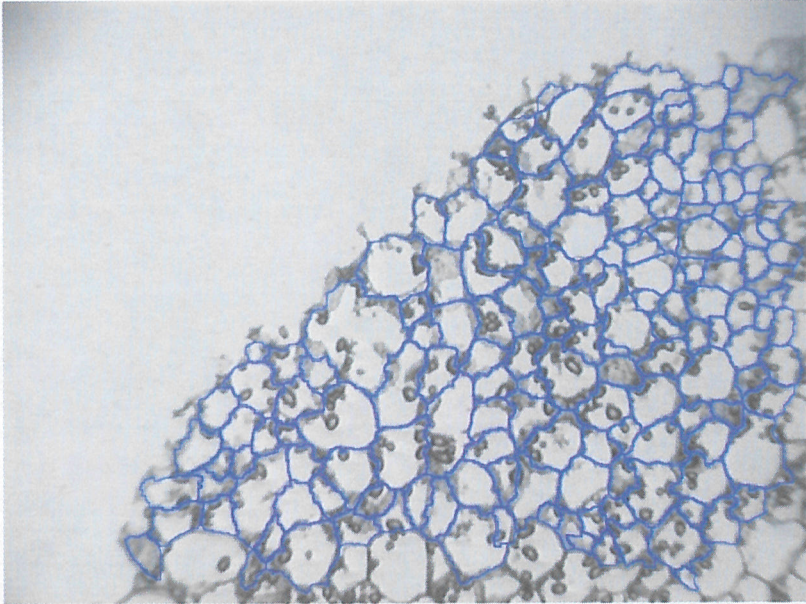
Rys. 10. Usunięcie obiektów brzegowych (procedura `AphImgBorderKill`).

Fig. 10. Image after border objects deleting (procedure `AphImgBorderKill`).



Rys. 11. Kontrastowanie obiektów (procedura `AphImgLabelsObj`).

Fig. 11. Objects labelling (procedure `AphImgLabelsObj`).

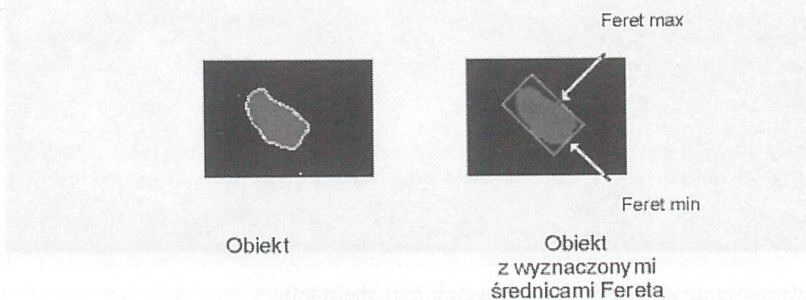


Rys. 12. Porównanie wyników uzyskanych przy pomocy programu Aphelion z oryginałem.
Fig. 12. The comparison of original image and Aphelion-processed one.

Rozkłady parametrów struktury tkanki mięsистой bulwy ziemniaka

Opracowana procedura pozwoliła wykonać analizę kilkuset obrazów tkanki mięsистой bulwy ziemniaka. Do ilościowego opisu struktur komórkowych wybrano następujące parametry geometryczne:

- powierzchnia komórki,
- obwód komórki,
- maksymalna średnica Fereta,
- minimalna średnica Fereta,
- stosunek średnic Fereta minimalnej i maksymalnej.



Rys. 13. Sposób wyznaczania średnic Fereta.
Fig. 13. The determination of Feret's diameters.

Wyniki przedstawiono w postaci rozkładów częstości wyżej wymienionych parametrów. Należy podkreślić, że prezentowane wyniki nie odnoszą się do komórek, będących obiektami trójwymiarowymi o bliżej nieokreślonym kształcie, lecz do ich przekrojów. Tak więc przez pojęcie powierzchni komórki należy rozumieć powierzchnię przekroju komórki. Należy również nadmienić, że uzyskane rozkłady nie są rozkładami normalnymi, z czym wiąże się trudność ich parametryzacji.

Struktura tkanki niezdeformowanej

Rozkłady wybranych parametrów dla tkanek niezdeformowanych wykazują wiele cech wspólnych. I tak, częstość występowania komórek jest największa dla komórek małych i szybko maleje ze wzrostem powierzchni. W zakresie początkowym od $2680 \mu\text{m}^2$ do $5360 \mu\text{m}^2$ znajduje się 47,5% komórek odmiany Bila, a dla Pandy i Triady wielkości te wynoszą odpowiednio 40,0% i 24,2%, co daje wyobrażenie o stopniu zróżnicowania wielkości powierzchni komórek tych odmian. Średnie powierzchnie komórek są następujące: Bila - $8118 \mu\text{m}^2$, Panda - $8667 \mu\text{m}^2$, Triada - $13214 \mu\text{m}^2$ (Rys. 14, 16 i 18).

Maksimum rozkładu obwodu komórek dla odmian Bila i Panda występuje przy 389 μm , a dla Triady - przy wartości blisko 2 razy większej, tzn. przy 648 μm . Z powyższych danych wynika, że komórki tkanki bulwy Triady są średnio większe od komórek pozostałych odmian (Rys. 15, 17 i 19).

Chcąc scharakteryzować również kształt komórek określono dwie średnice Fereta: F_{max} maksymalną i F_{min} minimalną. Średnice te są wymiarami boków prostokąta opisanego na dowolnej figurze, w sposób zapewniający minimalizację powierzchni prostokąta (Rys. 13). Oprócz tego wyznaczano stosunek średnicy minimalnej do maksymalnej. Współczynnik ten można uważać za miarę wydłużenia (ang. elongation) komórki. Jego wartość dla figur zbliżonych kształtem do kwadratu, koła bliska jest 1 i maleje dla figur jest wydłużonych.

Z Rys. 21, 23 i 25 wynika, że rozkłady obu średnic są podobne do siebie dla wszystkich odmian i pokrywają się w znacznym zakresie wartości. Jeśli za miarę wydłużenia komórek przyjąć ich stosunek wówczas, jak wynika z Rys. 20, 22 i 24 najwięcej komórek wydłużonych posiada odmiana Panda, a najmniej - Triada.

Struktura tkanki pękniętej

Charakterystyki dotyczące struktury komórek po zgnieceniu próbki w maszynie wytrzymałościowej otrzymywano w podobny sposób. Ponieważ jednak wynikiem naprężeń były pęknięcia struktur komórkowych, powstała konieczność ich rozróżniania i eliminacji. W programie do analizy obrazu warunek ten uwzględniono pomijając elementy struktury o powierzchni większej od największej z zaobserwowanych w próbce kontrolnej. Uzyskane wyniki dotyczące powierzchni, obwodów, średnic Fereta komórek tkanki bulwy odmian: Triada, Bila, Panda przedstawiono na Rys. 27-37.

Przed rozpoczęciem badań postawiono hipotezę dotyczącą związku między odpornością mechaniczną i parametrami geometrycznymi komórek, którą można sformułować następująco: Jeśli odporność mechaniczna tkanki ziemniaka na pęknięcia zależy od parametrów jej struktury, to należy się spodziewać, że częstość występowania komórek należących do pewnych klas zmieni się w stosunku do stanu kontrolnego.

W Tabeli 1 zestawiono wartości średnich i median 5-ciu rozkładów parametrów geometrycznych dla bulw trzech odmian ziemniaka w stanie kontrolnym i pękniętym. Wynika z niej, że na ogół dla tkanek pękniętych wartości średnich i median wszystkich rozkładów badanych parametrów w stosunku do stanu kontrolnego zmniejszyły się, przy czym różnice rosły w kolejności Bila - Panda - Triada.

Tabela 1. Wartości średnich i median rozkładów parametrów komórek trzech odmian ziemniaka
Table 1. Average and median values of cell parameter distributions for three potato varieties

		Bila		Panda		Triada	
		bez pęknięć	pęknięte	bez pęknięć	pęknięte	bez pęknięć	pęknięte
Powierzchnia (x 10 ⁻¹² m ²)	średnia	8118	8114	8667	6189	13214	6099
	mediana	5782	5185	6991	4133	11566	4147
Obwód (x 10 ⁻⁶ m)	średnia	481	483	476	427	579	425
	mediana	424	404	455	360	580	362
Średnica Fereta Max (x 10 ⁻⁶ m)	średnia	90	91	94	78	115	78
	mediana	82	77	89	67	115	67
Średnica Fereta Min (x 10 ⁻⁶ m)	średnia	127	127	124	115	152	113
	mediana	112	108	120	99	150	99
Iloraz średnic Fereta (Fmin/Fmax)	średnia	0.73152	0.73539	0.76034	0.70543	0.76553	0.71311
	mediana	0.73779	0.74065	0.77079	0.70038	0.78033	0.71698

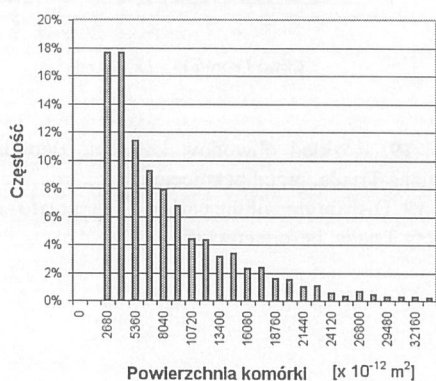
Różnice między strukturą tkanki pękniętej i niezdeformowanej

Ponieważ porównanie wartości średnich i median nie pozwala oszacować podatności na zniszczenia poszczególnych klas komórek sporządzono histogramy dotyczące różnic rozkładów wszystkich parametrów geometrycznych komórek tkanki miękkiszowej bulw trzech odmian ziemniaka.

Ogólna prawidłowość dotycząca zmian rozkładów powierzchni komórek (Rys. 38, 40 i 42) polega na tym, że w materiale z pęknięciami zmalała liczba komórek dużych i wzrosła liczba małych (których i tak było najwięcej). Komórki których ilość nie uległa zmianie miały powierzchnię 8000 μm^2 dla Triady i Pandy oraz 5400 μm^2 dla Bili. Największe zmiany zauważono dla Triady, gdzie udział jednego z przedziałów komórek wzrósł aż o 20%, najmniejsze zaś - dla Bili (>4%).

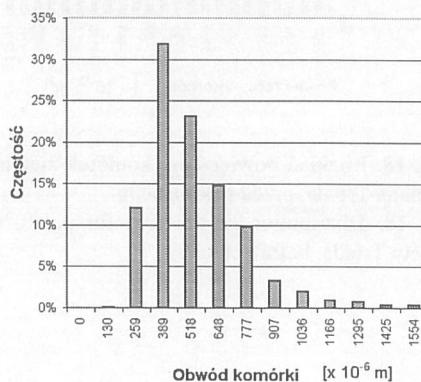
Podobne prawidłowości zauważono analizując rozkłady obwodów komórek (Rys. 39, 41 i 43). Z wyjątkiem jednej klasy komórek Bili, obserwowano wzrost liczby komórek o małych obwodach przy jednoczesnym zmniejszaniu się liczby komórek dużych.

Wynikłe z naprężeń zmiany rozkładów średnic Fereta komórek (Rys. 44, 46 i 48) objawiały się wzrostem ilości komórek najmniejszych (dodatnie przyrosty udziałów zarówno F_{min} jak i F_{max} w zakresie 40 μ m - 90 μ m). Jednocześnie następuje zmniejszenie się ilości komórek średnich i dużych. Spostrzeżenie to dotyczy wszystkich odmian (pewna różnica daje się zaobserwować w przypadku Bili, jednak jest ona stosunkowo mała < 1%).



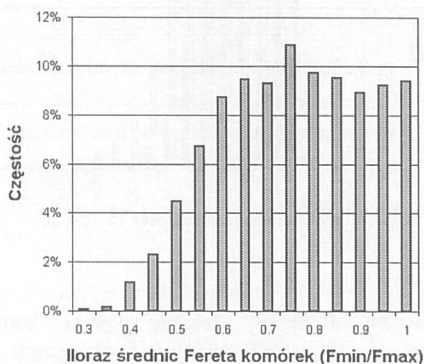
Rys. 14. Rozkład powierzchni komórek ziemniaka, odmiana Bili, przed pęknięciem.

Fig. 14. Distribution of the area for potato cells, variety Bili, before cracking.



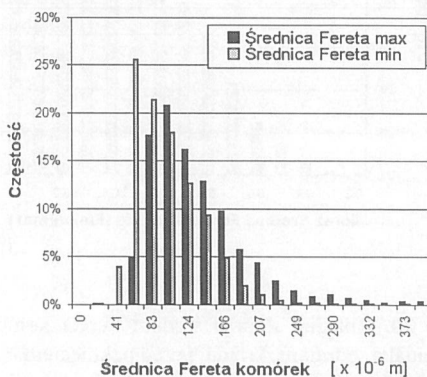
Rys. 15. Rozkład obwodów komórek ziemniaka, odmiana Bili, przed pęknięciem.

Fig. 15. Distribution of the perimeter for potato cells, variety Bili, before cracking.



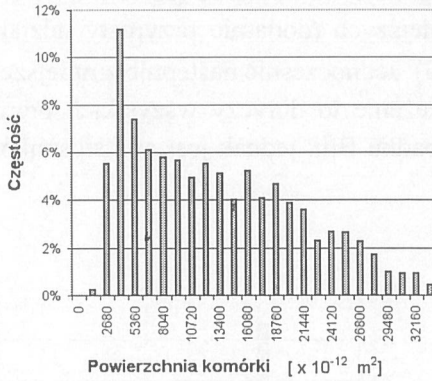
Rys. 16. Rozkład ilorazu średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Bili, przed pęknięciem.

Fig. 16. Distribution of the Feret's diameters ratio for potato cells, variety Bili, before cracking.



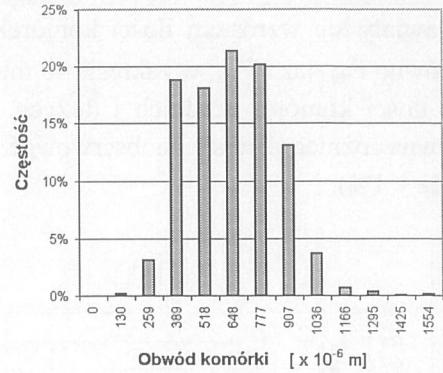
Rys. 17. Rozkłady średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Bili, przed pęknięciem.

Fig. 17. Distribution of the Feret's diameters for potato cells, variety Bili, before cracking.



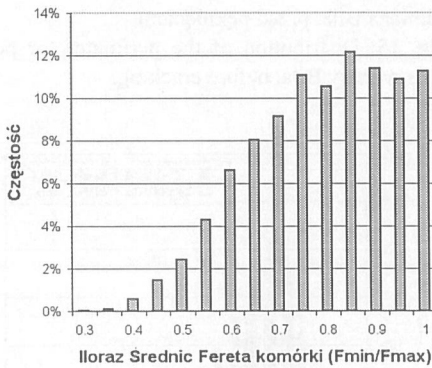
Rys. 18. Rozkład powierzchni komórek ziemniaka, odmiana Triada, przed pęknięciem.

Fig. 18. Distribution of the area for potato cells, variety Triada, before cracking.



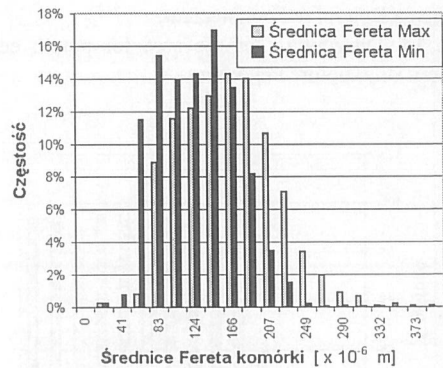
Rys. 19. Rozkład obwodów komórek ziemniaka, odmiana Triada, przed pęknięciem.

Fig. 19. Distribution of the perimeter for potato cells, variety Triada, before cracking.



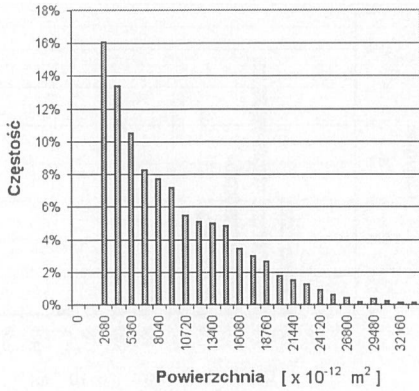
Rys. 20. Rozkład ilorazu średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Triada, przed pęknięciem.

Fig. 20. Distribution of the Feret's diameters ratio for potato cells, variety Triada, before cracking.

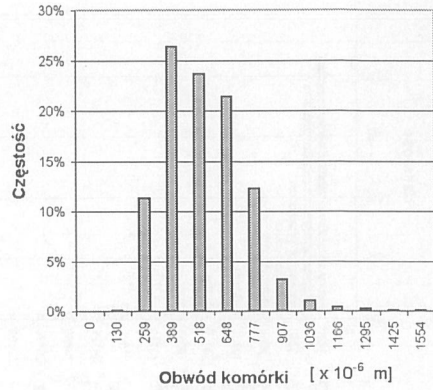


Rys. 21. Rozkłady średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Triada, przed pęknięciem.

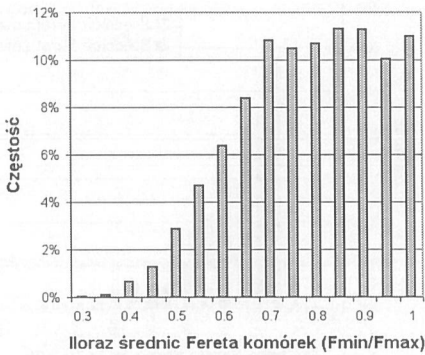
Fig. 21. Distribution of the Feret's diameters for potato cells, variety Triada, before cracking.



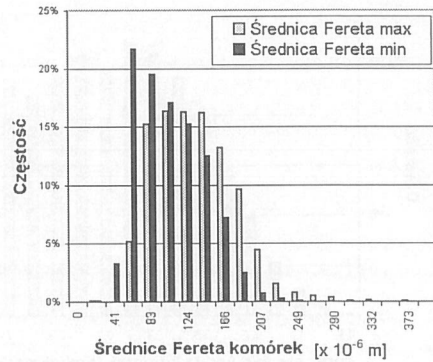
Rys. 22. Rozkład powierzchni komórek ziemniaka, odmiana Panda, przed pęknięciem.
Fig. 22. Distribution of the area for potato cells, variety Panda, before cracking.



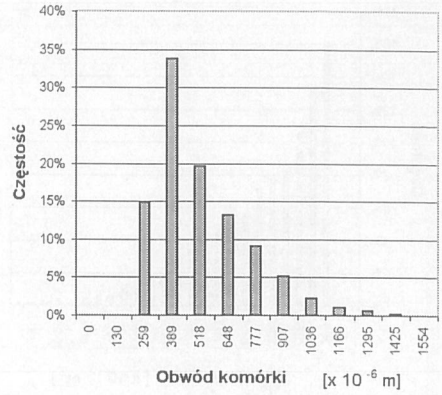
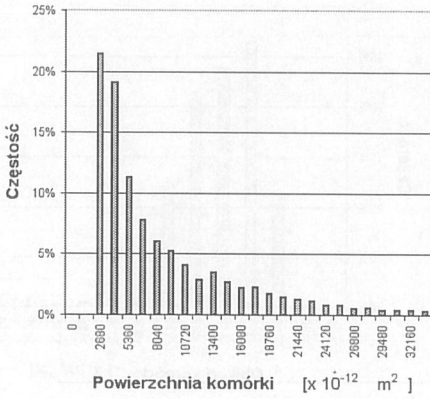
Rys. 23. Rozkład obwodów komórek ziemniaka, odmiana Panda, przed pęknięciem.
Fig. 23. Distribution of the perimeter for potato cells, variety Panda, before cracking.



Rys. 24. Rozkład ilorazu średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Panda, przed pęknięciem.
Fig. 24. Distribution of the Feret's diameters ratio for potato cells, variety Panda, before cracking.



Rys. 25. Rozkłady średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Panda, przed pęknięciem.
Fig. 25. Distribution of the Feret's diameters for potato cells, variety Panda, before cracking.

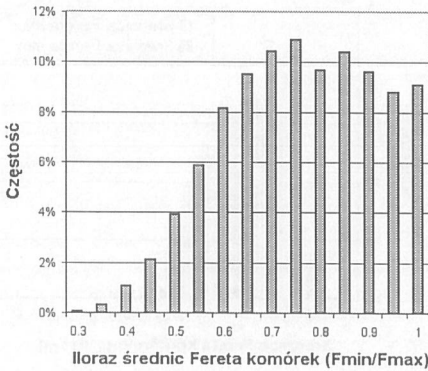


Rys. 26. Rozkład powierzchni komórek ziemniaka, odmiana Bila, po pęknięciu.

Fig. 26. Distribution of the area for potato cells, variety Bila, after cracking.

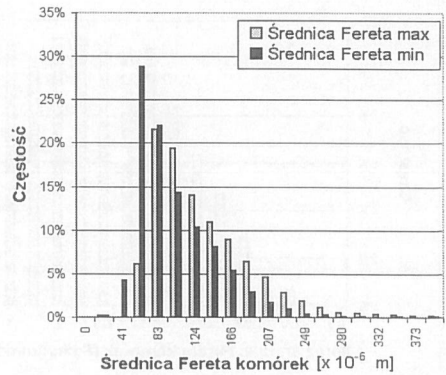
Rys. 27. Rozkład obwodów komórek ziemniaka, odmiana Bila, po pęknięciu.

Fig. 27. Distribution of the perimeter for potato cells, variety Bila, after cracking.



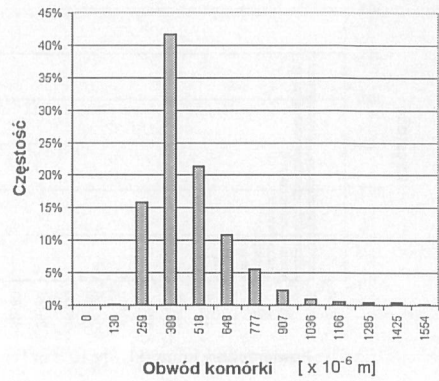
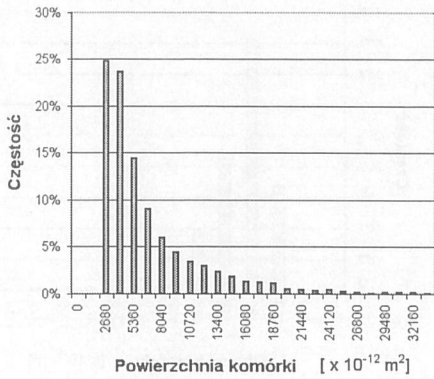
Rys. 28. Rozkład ilorazu średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Bila, po pęknięciu.

Fig. 28. Distribution of the Feret's diameters ratio for potato cells, variety Bila, after cracking.



Rys. 29. Rozkłady średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Bila, po pęknięciu.

Fig. 29. Distribution of the Feret's diameters for potato cells, variety Bila, after cracking.

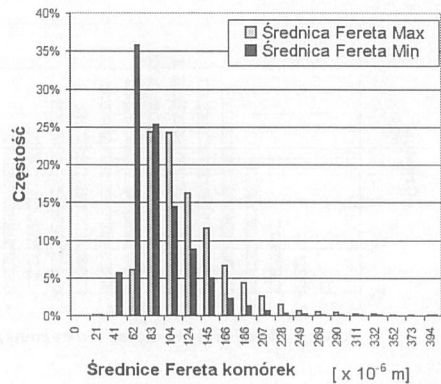
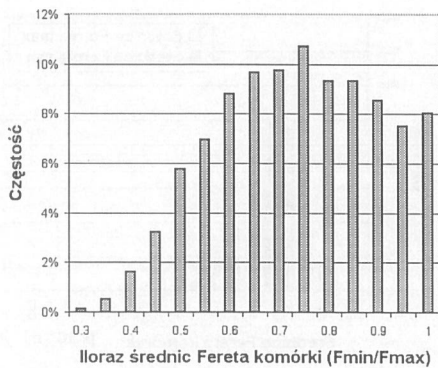


Rys. 30. Rozkład powierzchni komórek ziemniaka, odmiana Triada, po pęknięciu.

Fig. 30. Distribution of the area for potato cells, variety Triada, after cracking.

Rys. 31. Rozkład obwodów komórek ziemniaka, odmiana Triada, po pęknięciu.

Fig. 31. Distribution of the perimeter for potato cells, variety Triada, after cracking.

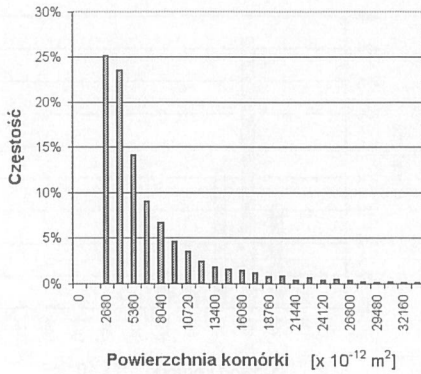


Rys. 32. Rozkład ilorazu średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Triada, po pęknięciu.

Fig. 32. Distribution of the Feret's diameters ratio for potato cells, variety Triada, after cracking.

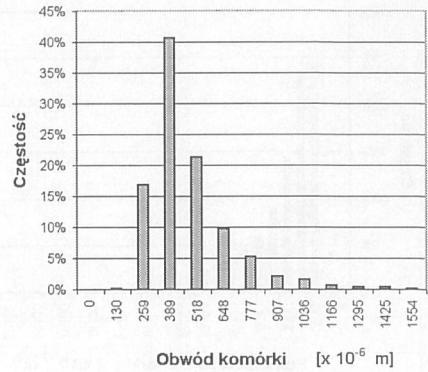
Rys. 33. Rozkłady średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Triada, po pęknięciu.

Fig. 33. Distribution of the Feret's diameters for potato cells, variety Triada, after cracking.



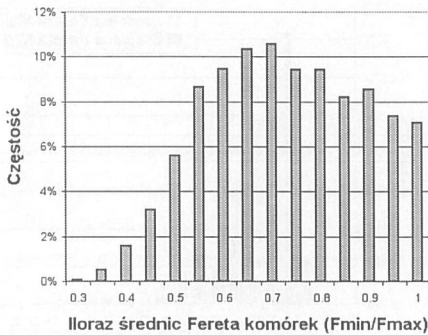
Rys. 34. Rozkład powierzchni komórek ziemniaka, odmiana Panda, po pęknięciu.

Fig. 34. Distribution of the area for potato cells, variety Panda, after cracking.



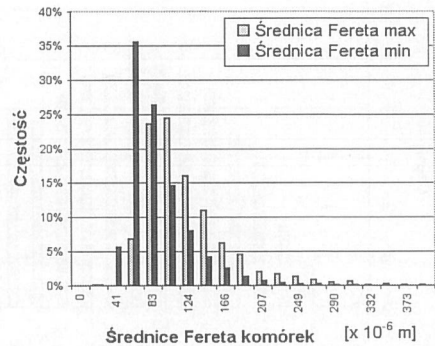
Rys. 35. Rozkład obwodów komórek ziemniaka, odmiana Panda, po pęknięciu.

Fig. 35. Distribution of the perimeter for potato cells, variety Panda, after cracking.



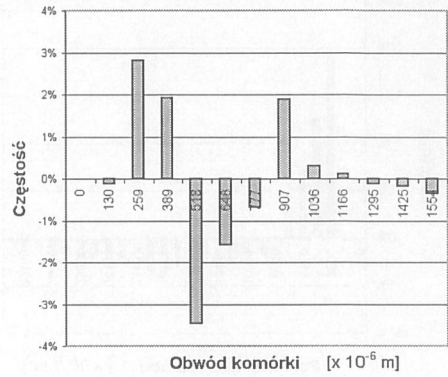
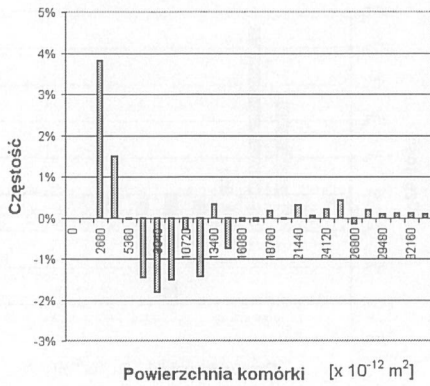
Rys. 36. Rozkład ilorazu średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Panda, po pęknięciu.

Fig. 36. Distribution of the Feret's diameters ratio for potato cells, variety Panda, after cracking.



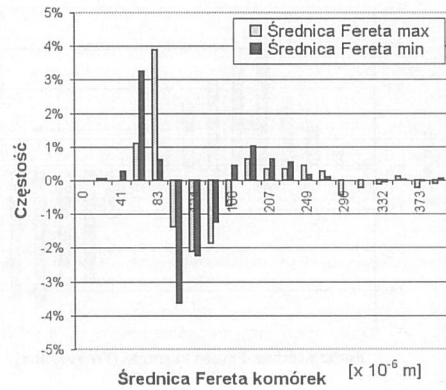
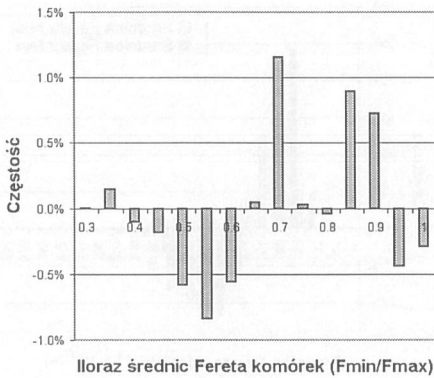
Rys. 37. Rozkłady średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Panda, po pęknięciu.

Fig. 37. Distribution of the Feret's diameters for potato cells, variety Panda, after cracking.



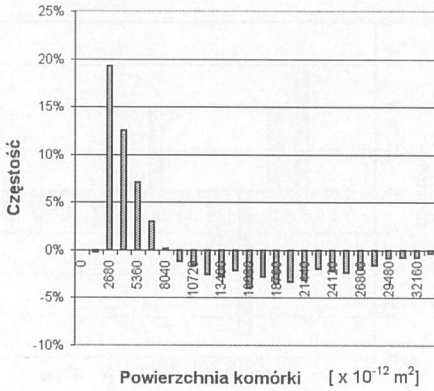
Rys. 38. Różnica rozkładów powierzchni komórek ziemniaka, odmiana Bila, pęknięte - bez pęknięć.
Fig. 38. Difference of the area distributions for potato cells, variety Bila, after – before cracking.

Rys. 39. Różnica rozkładów obwodu komórek ziemniaka, odmiana Bila, pęknięte - bez pęknięć.
Fig. 39. Difference of the perimeter distributions for potato cells, variety Bila, after – before cracking.

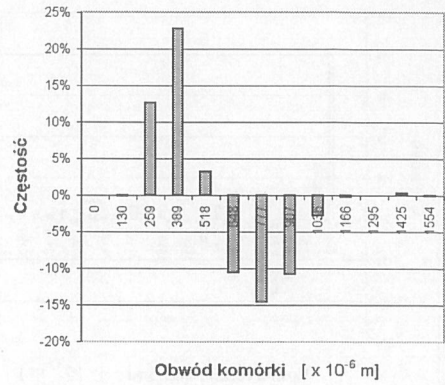


Rys. 40. Różnica rozkładów ilorazu średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Bila, pęknięte – bez pęknięć.
Fig. 40. Difference of the Feret's diameters ratio distributions for potato cells, variety Bila, after –

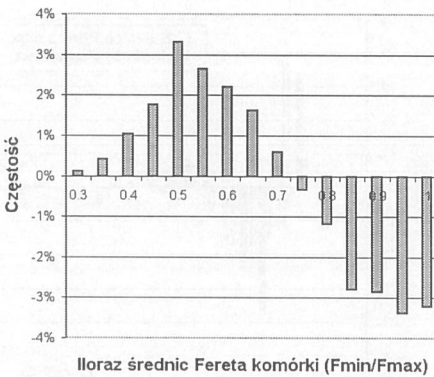
Rys. 41. Różnice rozkładów średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Bila, pęknięte - bez pęknięć.
Fig. 41. Differences of the Feret's diameters distributions for potato cells, variety Bila, after – before cracking.



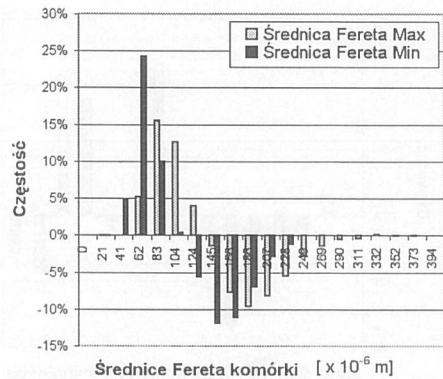
Rys. 42. Różnica rozkładów powierzchni komórek ziemniaka, odmiana Triada, pęknięte - bez pęknięć.
 Fig. 42. Difference of the area distributions for potato cells, variety Triada, after – before cracking.



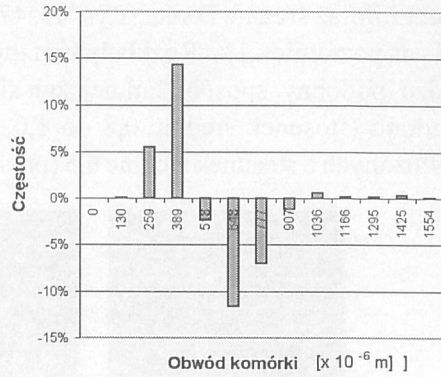
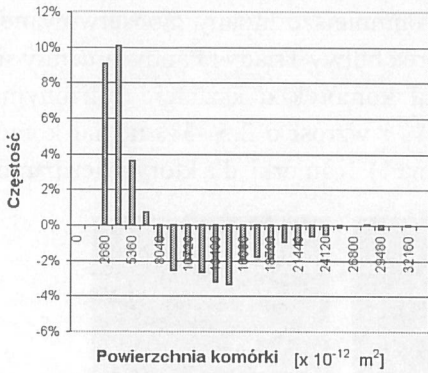
Rys. 43. Różnica rozkładów obwodu komórek ziemniaka, odmiana Triada, pęknięte - bez pęknięć.
 Fig. 43. Difference of the perimeter distributions for potato cells, variety Triada, after – before cracking.



Rys. 44. Różnica rozkładów ilorazu średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Triada, pęknięte – bez pęknięć.
 Fig. 44. Difference of the Feret's diameters ratio distributions for potato cells, variety Triada, after – before cracking.

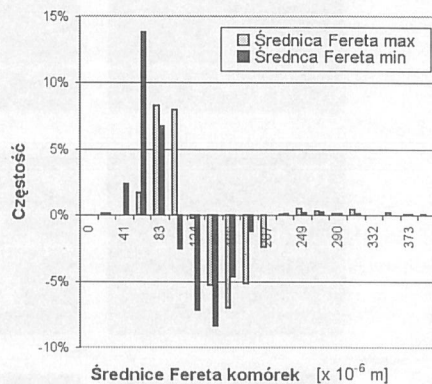
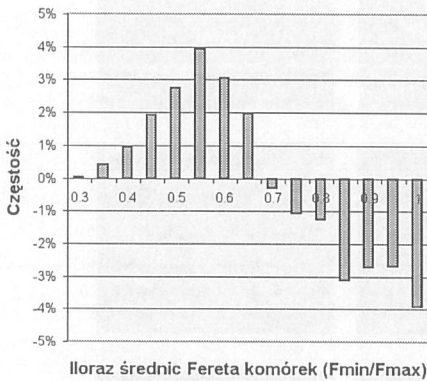


Rys. 45. Różnice rozkładów średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Triada, pęknięte – bez pęknięć.
 Fig. 45. Differences of the Feret's diameters distributions for potato cells, variety Triada, after – before cracking.



Rys. 46. Różnica rozkładów powierzchni komórek ziemniaka, odmiana Panda, pęknięte - bez pęknięć.
Fig. 46. Difference of the area distributions for potato cells, variety Panda, after – before cracking.

Rys. 47. Różnica rozkładów obwodu komórek ziemniaka, odmiana Panda, pęknięte - bez pęknięć.
Fig. 47. Difference of the perimeter distributions for potato cells, variety Panda, after – before cracking.

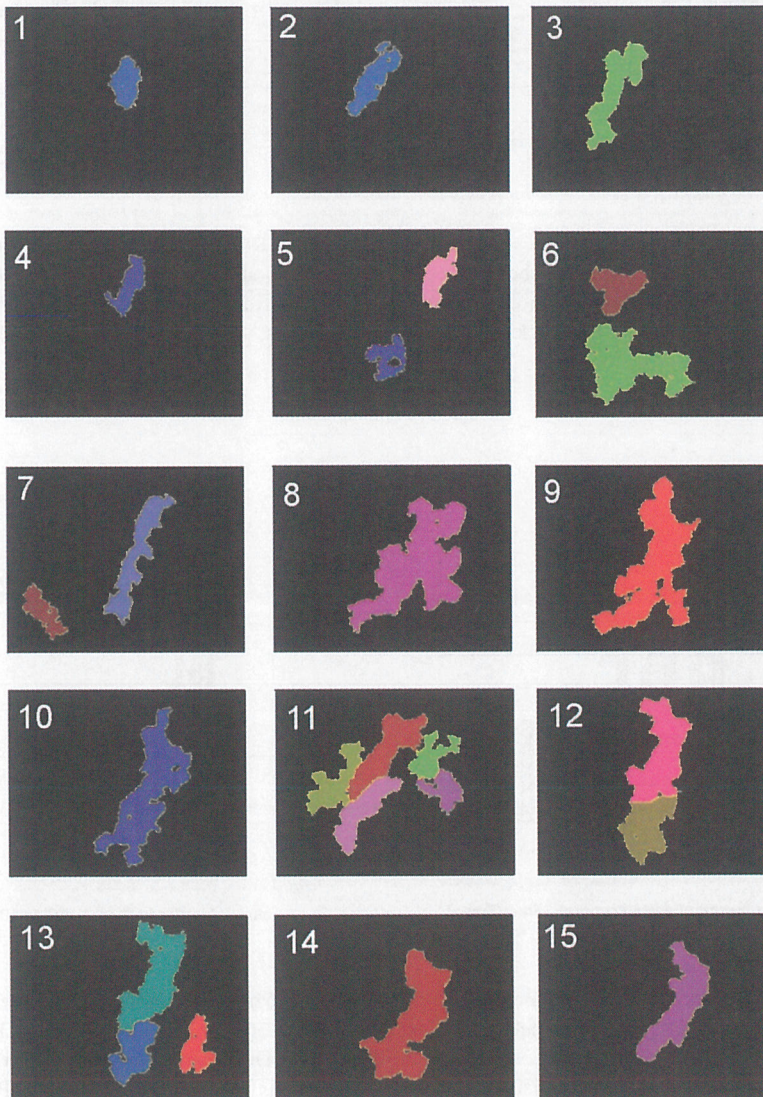


Rys. 48. Różnica rozkładów ilorazu średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Panda, pęknięte – bez pęknięć.
Fig. 48. Difference of the Feret's diameters ratio distributions for potato cells, variety Panda, after –

Rys. 49. Różnice rozkładów średnic Fereta komórek ziemniaka, odmiana Panda, pęknięte - bez pęknięć.
Fig. 49. Differences of the Feret's diameters distributions for potato cells, variety Panda, after – before cracking.

Podobnie jak w poprzednich przypadkach zmiany dla odmiany Triada były największe do 24%, mniejsze dla Pandy - 13%, najmniejsze dla Bili 3-4%.

Wynikiem naprężenia były również zmiany rozkładu kształtu komórek wyrażanego poprzez iloraz średnic Fereta (Rys. 45, 47 i 49). Najmniejsze zmiany zaobserwowano dla Bili - na poziomie <1%. Rozkłady kształtu komórek bulwy Triady i Pandy zmieniły się w bardzo podobny sposób: zmniejszył się udział komórek o kształcie zbliżonym do kwadratu (stosunek średnic 0,8 do 1,0) o 3-4% i wzrósł o 2,5 -3% udział komórek wydłużonych o stosunek średnic 0,5 (prostokąt 2 na 1). Komórki, dla których ten parametr



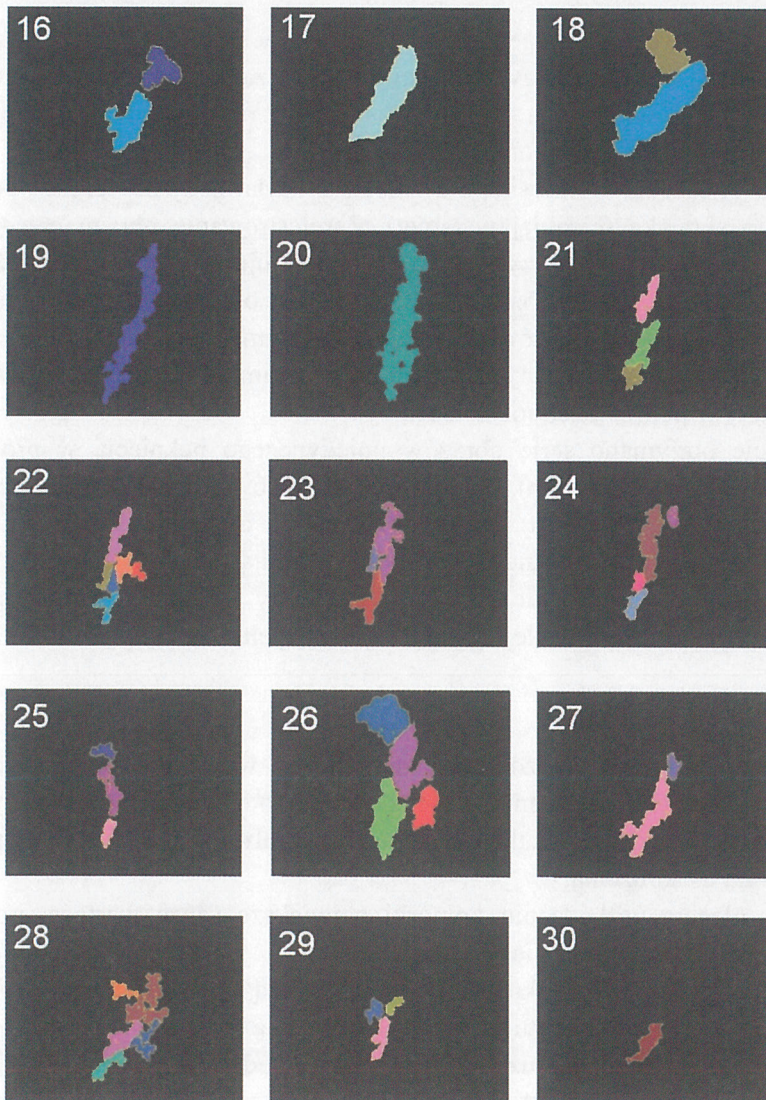
Rys. 50a. Obrazy szczeliny na kolejnych przekrojach próbki tkanki ziemniaka, powstałej w skutek odkształcenia próbki.

Fig. 50a. Sequence of the potato tuber crack pictures resulting the deformation of potato sample.

równy był $0,75 \pm 0,05$ okazały się stosunkowo nie wrażliwe na naprężenia - ich udział prawie nie uległ zmianie.

Należy wspomnieć, że histogramy dotyczące różnic częstości parametrów zostały pomyślane tak aby suma zmian równała się zero.

Ich interpretacja wymaga pewnego wyjaśnienia. Częstość występowania określonego przedziału badanego parametru może, w wyniku naprężenia niszczącego, wzrosnąć lub zmaleć. Interpretując zmiany ujemne przyjmujemy, że komórki z pewnego przedziału uległy częściowemu zniszczeniu przez co odpowiadająca im częstość zmalała. Jednocześnie zakładając, że komórki z innych przedziałów nie zostały zniszczone, w



Rys. 50 b. Obrazy szczeliny na kolejnych przekrojach próbki tkanki ziemniaka, powstałej w skutek odkształcenia próbki.

Fig. 50 b. Sequence of the potato tuber crack pictures resulting the deformation of potato sample.

zbiorze komórek po działaniu naprężenia, odpowiadające im częstości muszą wzrosnąć w porównaniu do próbki kontrolnej.

Wizualizacja pojedynczego pęknięcia tkanki

Uzyskanie sekwencji kilkudziesięciu cienkich przekrojów wzdłuż osi próbki poddanej naprężeniom niszczącym umożliwiło nam stworzenie serii obrazów wizualizujących kształt szczeliny. Szczelina jest rezultatem przyłożonego naprężenia, w wyniku którego powstaje pęknięcie struktur komórkowych w tkance miękkiszowej bulwy ziemniaka.

Metodyka wyszukiwania pęknięć przy pomocy analizy obrazu pozwoliła na identyfikację obszarów z nimi związanych. Przyjęto za pęknięcie uważać te elementy obrazu, których powierzchnia była większa 1,5 razy od największej komórki zidentyfikowanej w próbkach kontrolnych.

W polu widzenia mikroskopu widoczna była jedynie część powierzchni pojedynczego skrawka (cienkiej warstwy). Zarejestrowanie obrazu całego skrawka wymagało wykonania 11-12 przystających do siebie ujęć obiektu. Ponieważ pęknięcia były w niektórych przekrojach bardzo duże konieczne było precyzyjne łączenie dwóch, trzech, a niekiedy więcej, obrazów zawierających fragmenty pęknięć, ze sobą.

Obraz całości był analizowany przy pomocy programu do analizy obrazu Aphelion w sposób opisany w poprzednich rozdziałach.

W efekcie otrzymano serię obrazów pojedynczego pęknięcia w próbce bulwy ziemniaka (Rys. 50 a i Rys. 50 b). Starano się zarejestrować zarówno początek (obraz 1) jak koniec szczeliny (obraz 30). Na poszczególnych obrazach widoczna jest zmiana rozmiarów i kształtu analizowanej szczeliny. Zaskakująca jest obecność na większości obrazów wielu (nawet 5-ciu) a nie tylko jednej szczeliny. Świadczy to o złożonej budowie szczeliny, która może mieć wiele rozgałęzień, będących efektem procesu bifurkacji.

WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski szczegółowe dotyczące niszczenia komórek wskutek oddziaływań mechanicznych:

- cechy geometryczne komórek tkanki miękkiszowej bulwy ziemniaka mają wpływ na ich podatność na uszkodzenia,
- najłatwiej ulegają uszkodzeniu komórki największe (duże wartości powierzchni, obwodu i maksymalnej średnicy Fereta),
- komórki wydłużone o stosunku średnic Fereta 1:2 są najbardziej, a komórki zbliżone kształtem do okręgu (kwadratu) najmniej odporne na zniszczenie,
- podatność na uszkodzenia uzależniona jest od odmiany ziemniaka i maleje w następującej kolejności Triada - Panda - Bila,

– mechanizm niszczenia tkanki bulwy ziemniaka związany jest z powstawaniem mikropęknięć w całej objętości próbki, których część łączy się ze sobą tworząc szczelinę o wymiarach porównywalnych ze średnicą badanej próbki.

Metoda analizy obrazu okazała się bardzo uniwersalnym i wydajnym narzędziem pozwalającym na wykonanie bardzo dużej liczby skomplikowanych pomiarów w krótkim czasie. Z tego względu można uważać, że stwarza ona jakościowo nowe możliwości w badaniach mikroskopowych.

PIŚMIENNICTWO

1. **Boudry C., Herlin P., Coster M., Chermant J.L.:** Cell classification and sieving in biology. *Acta Stereologica*, 16/3, 215-222, 1997.
2. **Chazallon L., Pinoli J.C.:** An automatic morphological method for aluminium grain segmentation in complex grey level images. *Acta Stereologica*, 16/2, 119-130, 1997.
3. **Haman J., Konstankiewicz K., Zdunek A.:** Badania procesów pęknięcia tkanki rdzenia wewnętrznego i zewnętrznego bulwy ziemniaka. *Acta Agrophysica*, 24, 97-108.
4. **Gerlach D.:** Zarys Mikrotechniki Botanicznej. PWRiL, Warszawa, 1972.
5. **Konstankiewicz K., Zdunek A.:** Do mechanical properties of potato tuber depend on the place of sampling? *Proc. Int. Conf. Flow and deformation in Biology and environment*, Prague, 139-144, 1998.
6. **Meyer F.:** Morphological segmentation on a neighbourhood graph. *Acta Stereologica*, 16/3, 175-182, 1997.
7. **Pitt R.E., Chen H.L.:** Time-dependent aspects of the strength and rheology of vegetative tissue. *Trans. ASAE*, 26(4), 1275-1280, 1983.
8. **Pitt R.E.:** Models for the rheology and statistical strength of uniform stressed vegetative tissue. *Trans. ASAE*, 25(6), 1776-1784, 1982.
9. **Wojnar L., Majorek M.:** Komputerowa analiza obrazu. FOTOBIT-DESIGN S.C., Kraków, 1994.

THE CHANGES OF THE POTATO TUBER TISSUE STRUCTURE RESULTING A DEFORMATION

K. Pawlak, A. Król

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences
Doświadczalna 4, P.O. Box 201, 20-290 Lublin

SUMMARY

The relationship between the structure parameters of potato tuber tissue and the deformation has been investigated. The method applied allowed to stabilise structure and to obtain thin slices for microscopic investigation. Then the special procedure for image obtaining and transformation to identify and quantify each individual cell has been done. Automatic quantitative computer analysis of the images has been executed by means of image analysis (IA) program Aphelion v3.2.

K e y w o r d s: potato tuber tissue, image analysis, stabilisation of structure