

WYZNACZANIE MINIMALNEJ LICZBY KOMÓREK DO ANALIZY
GEOMETRYCZNYCH PARAMETRÓW STRUKTURY TKANKI BULWY
ZIEMNIAKA*

Krystyna Konstankiewicz, Marek Garncarz, Andrzej Król, Kamil Pawlak

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin
e-mail: konst@demeter.ipan.lublin.pl

Streszczenie. W pracy przedstawiono wyniki określenia minimalnej liczby komórek niezbędnej do ilościowego wyznaczenia geometrycznych parametrów struktury tkanki miękiszowej bulwy ziemniaka. Materiał badawczy stanowiły 4 odmiany ziemniaka w trzyletnim cyklu uprawowym. Mikroskopowe obrazy tkanki w stanie naturalnym uzyskano przy użyciu optycznego mikroskopu konfokalnego. Do analizy parametrów struktury wykorzystano kilkadziesiąt tysięcy komórek. Rozkłady powierzchni płaskiego przekroju komórek uzyskano przy pomocy specjalistycznego programu Aphelion. Minimalną liczbę komórek wyznaczono poprzez porównanie rozkładów empirycznych powierzchni płaskiego przekroju komórek, dla dużej bazy danych zapewniającej statystyczną przypadkowość wybranych prób, wg następującego schematu: 200 (2×100), 400 (2×200), 600 (2×300), 800 (2×400) komórek, przy użyciu testu zgodności λ Kołmogorowa-Smirnowa.

Słowa kluczowe: tkanka miękiszowa bulwy ziemniaka, geometryczne parametry struktury komórkowej, optyczny mikroskop konfokalny, analiza obrazu

WSTĘP

Obecny etap rozwoju nauki o materiałach charakteryzuje się poszukiwaniem ilościowych zależności pomiędzy składem chemicznym, parametrami technologicznymi, strukturą i właściwościami materiałów. W badaniach mających na celu wyznaczenie tych zależności podstawowe znaczenie ma obiektywność i dokładność oceny struktury [5,8,12].

Do uzyskania obrazów struktury używane są metody mikroskopowe, a ich analiza ilościowa może być wykonana przy użyciu nowoczesnych metod komputerowych. Dużą trudnością w tego typu analizach jest brak uniwersalnych metod i procedur

* Praca dofinansowana przez KBN: PB P06F01317

komputerowych, które można byłoby zastosować do różnych typów materiałów. Dlatego też ciągle trwają prace nad udoskonalaniem metod badawczych pozwalających na ilościowe opisywanie struktury badanego materiału [2,4, 9,15,17,18].

Badania struktury wykonywane są także dla materiałów pochodzenia roślinnego. Wynika z nich, że mikrostruktura ma istotny wpływ na inne właściwości materiału, m.in. na mechaniczną odporność tkanek roślinnych [16,19]. Zmiany struktury w wyniku różnych oddziaływań mogą wywoływać procesy – chemiczne, biologiczne – prowadzące do obniżenia jakości produktu. Ograniczenie strat oraz poprawa jakości surowców i produktów roślinnych są od wielu lat przedmiotem prowadzonych prac badawczych [1,3,5,7,19].

Znalezienie związku struktury tkanki roślinnej z innymi właściwościami wymaga jej opisu ilościowego, zarówno w stanie początkowym, jako surowca, a także zarejestrowania zmian w trakcie całego procesu produkcyjnego. Dotychczasowe badania wykazały, że struktura jest cechą charakterystyczną ośrodka, ale bardzo labilną. Prawidłowe wykorzystanie struktury w programach badawczych wymaga więc każdorazowo jej scharakteryzowania. Wiąże się z tym potrzeba opracowania metodyki wyznaczania parametrów struktury dla różnej klasy materiałów.

Do przeprowadzenia analizy ilościowej parametrów struktury wymagany jest mikroskopowy obraz dobrej jakości oraz wystarczająca liczba elementów strukturalnych, w przypadku tkanki roślinnej – komórek. Dotyczy to zarówno pojedynczego obrazu jak Ważnym etapem badań staje się więc wyznaczenie liczby elementów niezbędnych do charakterystyki parametrów struktury danego materiału [13].

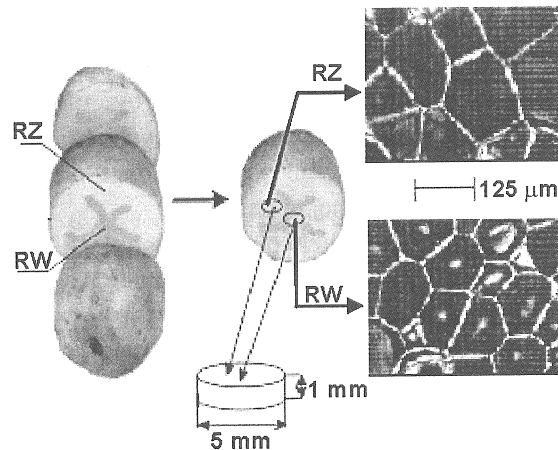
Celem pracy jest określenie minimalnej liczby komórek do wyznaczenia geometrycznych parametrów struktury tkanki miękkiszowej bulwy ziemniaka. W badaniach wykorzystano obszerny materiał doświadczalny – trzyletni cykl uprawowy, cztery odmiany – który pozwolił na porównanie wyników rozkładów parametrów struktury komórkowej tkanki miękkiszowej bulwy ziemniaka dla dużej liczby komórek z zachowaniem statystycznej przypadkowości wybranych prób do badań i obiektu traktowanego jako rodzaj materiału, np. tkanki ziemniaka.

MATERIAŁ I METODY

Do analizy wykorzystano materiał doświadczalny wieloletniego programu badawczego czterech odmian ziemniaka o różnym przeznaczeniu użytkowym: Danusia, Kuba, Miła i Triada pochodzących ze zbiorów 1999, 2000 i 2001 Oddziału Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Jadwisinie*.

* Materiał badawczy uzyskano dzięki współpracy z Instytutem Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział Jadwisin.

W bulwie ziemniaka wyodrębniono 2 obszary: rdzeń wewnętrzny i zewnętrzny, z których pobierano po 10 próbek dla każdej odmiany. Próbki miały kształt walca o wysokości 1 mm i średnicy 5 mm, co umożliwiło pobieranie materiału z tych dwóch obszarów (rys. 1).



Rys. 1. Schemat pobierania próbek do obserwacji mikroskopowych i wyznaczenia parametrów struktury komórkowej tkanki mięsistej bulwy ziemniaka, gdzie: RW – rdzeń wewnętrzny, RZ – rdzeń zewnętrzny.

Fig. 1. Sample collection scheme of potato tuber tissue for microscopic observations and determination of parameters of cellular structure, where RW – inner core, RZ – outer core.

wstępnej preparacji próbki. W całym eksperymencie wykonano kilkaset obrazów dla każdej odmiany i każdego typu rdzenia, przy czym każdy obraz zawierał od kilku do kilkunastu całych komórek.

Podczas eksperymentu w roku 2001 użyto metody składania obrazów, która pozwalała uzyskać o 40% więcej całych komórek niż z obrazów pojedynczych, [6].

Dla uzyskanych mikroskopowych obrazów przeprowadzono analizę ilościową parametrów struktury komórkowej zgodnie z wcześniej opracowaną metodyką, przy wykorzystaniu programu do analizy obrazu – Aphelion, [11]. Na podstawie płaskich przekrojów struktury uzyskano parametry, oraz ich rozkłady, związane z wielkością komórek: powierzchnia – A , obwód – P , średnica Fereta, maksymalna – F_{max} i minimalna – F_{min} , oraz z kształtem komórki: stosunek średnic Fereta – F_{min}/F_{max} , wydłużenie – E (stosunek różnicy maksymalnej i minimalnej średnicy elipsy wpisanej w komórkę do sumy tych średnic), zwartość – C ($16 A/P^2$). Przeliczenie

Do wykonania obrazu mikroskopowego struktury tkanki bulwy ziemniaka wykorzystano optyczny mikroskop konfokalny „Confocal 2002” TSRLM, wyposażony w obiektyw 20/0.4 i precyzyjny, ciągły przesuw obiektu w płaszczyźnie X-Y, z dokładnością 1 μm . Możliwe było przeprowadzenie całej obserwacji (~20 obrazów) jednej próbki w ciągu kilku minut, co w warunkach stałej temperatury pokojowej (~20°C) i wilgotności względnej powietrza (50-60%) nie powodowało jej wysychania.

Mikroskop konfokalny pozwalała na badanie tkanki roślinnej w stanie naturalnym, bez

wyników – powierzchni, obwodów i średnic – uzyskanych w pikselach na jednostki długości jest natychmiastowe na podstawie skali, uzyskanej poprzez przeprowadzenie analogicznej analizy dla obiektu o znanych płaskich wymiarach. Do analizy statystycznej oraz uzyskania rozkładów mierzonych wielkości wykorzystano program Excel.

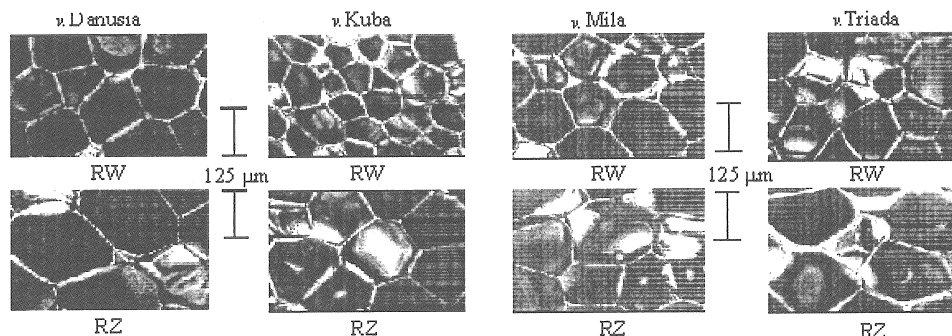
W celu wyznaczenia minimalnej liczby komórek do analizy parametrów struktury użyto testu zgodności λ Kołmogorowa-Smirnowa, który umożliwia porównanie dwóch populacji o ciągłych rozkładach. Z każdej populacji pobiera się losowo próby o liczebnościach n_1 i n_2 , przy czym obydwie powinny być możliwie duże, przekraczające 100 elementów. Następnie na podstawie uzyskanych rozkładów przeprowadza się weryfikację hipotezy zerowej czy obie populacje mają taki sam rozkład – co oznacza, że obie próby pochodzą z tej samej populacji.

Hipoteza alternatywna zakłada różnice w cechach obydwu populacji. Przy założeniu prawdziwości hipotezy zerowej, statystyka λ ma rozkład asymptotyczny λ Kołmogorowa. Z tablic tego rozkładu można odczytać dla przyjętego poziomu istotności α wartość krytyczną λ_α i porównać z obliczoną wartością λ . Jeżeli zachodzi relacja $\lambda \geq \lambda_\alpha$ to należy odrzucić hipotezę zerową, natomiast gdy $\lambda < \lambda_\alpha$ wówczas nie ma podstaw do jej odrzucenia. Odrzucenie hipotezy zerowej dowodzi istotnej różnicy pomiędzy rozkładami badanej cechy w obydwu populacjach, z kolei brak podstaw do jej odrzucenia wskazuje, że nie można wykluczyć, iż obie próby pochodzą z tej samej populacji lub, że badane populacje mają nieistotnie różne rozkłady analizowanej zmiennej losowej, [13].

Analizie poddano 8200 komórek przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$, dla którego statystyka $\lambda_{0,05} = 1,358$. Przeprowadzono porównanie rozkładów powierzchni płaskiego przekroju komórek dla wybranego terminu zbioru, odmiany i miejsca pobrania w bulwie, wg następującego schematu: 200 (2×100), 400 (2×200), 600 (2×300), 800 (2×400) komórek. W celu zachowania statystycznej przypadkowości wybranych prób do analizy wykorzystano tylko te odmiany, typy rdzenia i terminy zbioru, dla których liczba komórek była nie mniejsza niż 600. Wyjątkowo w badaniach uwzględniono mniejszą liczbę komórek tylko dla odmiany Danusia rdzeń zewnętrzny, która cechuje się na tyle dużymi komórkami, że z posiadanej bazy danych nie można było uzyskać wymaganej liczby komórek.

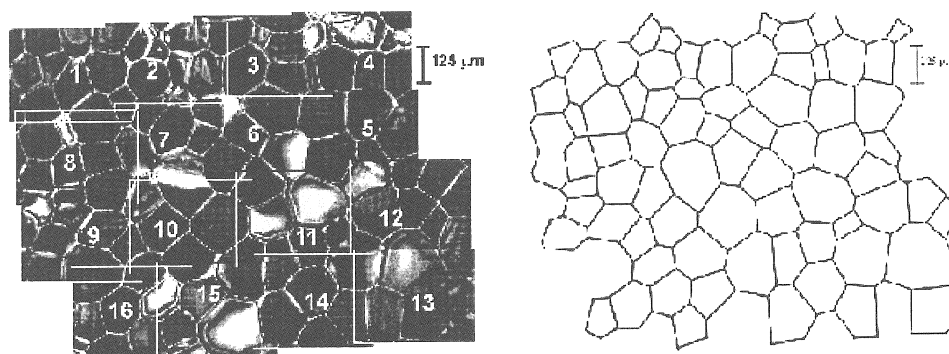
WYNIKI I DYSKUSJA

Uzyskane obrazy struktury tkanki miękkiszowej bulw badanych odmian ziemniaka różnią się w zależności od miejsca pobrania próbek w obrębie bulwy. We wszystkich przypadkach komórki rdzenia zewnętrznego są większe od komórek rdzenia wewnętrznego (rys. 2).



Rys. 2. Przykładowe obrazy struktury tkanki mięsistej bulwy ziemniaka, dla rdzenia wewnętrznego i zewnętrznego, czterech badanych odmian, uzyskane z optycznego mikroskopu konfokalnego
 Fig. 2. Samples of images of potato tuber tissue structures for the inner and outer core as obtained from an optical confocal microscope for the four varieties studied

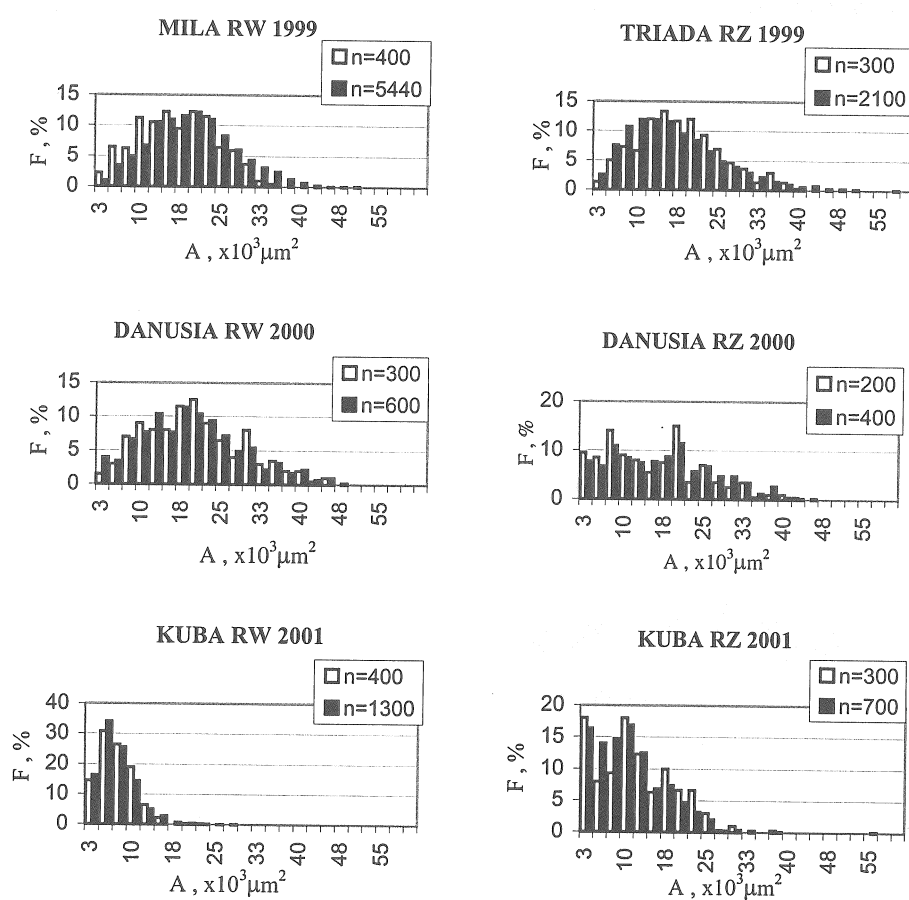
Na niektórych obrazach, np. RZ *v. Danusia*, nie uzyskano ani jednej pełnej komórki dla której można przeprowadzić analizę parametrów struktury. Dlatego też w badaniach wykorzystano opracowaną wcześniej metodę składania obrazów w celu uzyskania większej powierzchni obserwowanej tkanki i większej liczby komórek do analizy. Uzyskane obrazy nie preparowanej struktury tkanki bulwy ziemniaka są bardzo dobrej jakości, z wyraźnie widocznymi ścianami komórkowymi. Wykorzystując precyzyjny przesuw stolika mikroskopu w płaszczyźnie X-Y można było przeprowadzić procedurę połączenia ścian komórek z sąsiednich obrazów i uzyskać większą liczbę obiektów do analizy parametrów struktury (rys. 3).



Rys. 3. Obraz uzyskany po złożeniu 16 obrazów pojedynczych oraz przygotowany do analizy parametrów struktury

Fig. 3. A compilation of 16 single images and an image prepared for the structural parameter analysis

Z dotychczasowych naszych badań nad strukturą tkanki miękkiszowej bulwy ziemniaka wynika, że wielkość komórek zależy od odmiany, rodzaju tkanki, terminu zbioru, natomiast kształt komórek jest zbliżony i stały dla wszystkich odmian, rodzajów tkanki i terminów zbioru, [10]. Dlatego też do dalszych analiz wybraliśmy parametr wielkości komórki, jakim jest powierzchnia jej płaskiego przekroju. Przykładowe rozkłady powierzchni dla testowanej liczby komórek oraz wszystkich uzyskanych komórek przedstawiają kolejne wykresy (rys. 4).



Rys. 4. Rozkłady powierzchni komórek dla czterech badanych odmian z uwzględnieniem liczby analizowanych komórek, F – częstotliwość, A – powierzchnia, n – liczba komórek

Fig. 4. Distributions of the cell surface areas for the four potato varieties studied taking into consideration the number of cells analyzed, F – frequency, A – surface area, n – number of cells

W kolejnym etapie badań przeprowadzono testy λ Kołmogorowa-Smirnowa porównując rozkłady powierzchni dla różnej liczby komórek w próbie. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wyniki testu λ w zależności od liczby analizowanych komórek
Table 1. Results of λ tests in relation to the number of cells analysed

| Odmiana Variety | Typ rdzenia Type of core | Termin zbioru Harvest | 2*100 λ | 2*200 λ | 2*300 λ | 2*400 λ | |
|---|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Mila | wewnętrzny inner | 1999 | 1,132 | 0,95 | 0,735 | 1,060 | |
| Triada | zewnątrzny outer | 1999 | 0,989 | 0,90 | 0,939 | | |
| Danusia | wewnętrzny inner | 2000 | 0,494 | 0,65 | 0,510 | | |
| Danusia | zewnątrzny outer | 2000 | 1,272 | 1,06 | | | |
| Kuba | wewnętrzny inner | 2001 | 1,697 | 0,45 | 1,147 | 1,188 | |
| Kuba | zewnątrzny outer | 2001 | 2,333 | 1,85 | 1,102 | | |
| Liczba komórek Number of cells | | | 1200 | 2400 | 3000 | 1600 | Razem 8200 All cells 8200 |

Ze względu na duże zróżnicowanie wielkości komórek wśród badanych odmian i rodzajów tkanki uzyskiwano różne liczby komórek dla danej populacji, od ponad 400 do około 5500. Porównanie rozkładów można było prowadzić dla ograniczonej liczby komórek. W przypadku komórek większych przeprowadzono 3 testy, natomiast dla mniejszych 4 testy. Przykładowo dla odmiany Danusia RZ wykonano tylko 2 testy ze względu na niewystarczającą liczbę komórek.

Uzyskane wyniki wykazują, że dla wszystkich badanych przypadków liczba 300 komórek wystarcza do wyznaczenia rozkładów, które są reprezentatywne dla całej populacji. W przypadku odmian: Mila, Triada i Danusia rozkład reprezentatywny uzyskano już dla 100 komórek.

WNIOSEK

Na podstawie przeprowadzonych badań struktury komórkowej tkanki miękiszowej bulwy ziemniaka – czterech odmian, trzech lat uprawy, dwóch miejsc pobrania w bulwie i wyznaczeniu rozkładów powierzchni komórek oraz porównaniu rozkładów dla różnej liczby komórek:

wykazano, że 300 komórek jest minimalną liczbą niezbędną do uzyskania reprezentatywności rozkładu dla całej populacji.

PIŚMIENNICTWO

1. **Bohdziewicz J.:** Właściwości mechaniczne i reologiczne wybranych odmian buraka ćwikłowego. *Acta Agrophysica*, 45, 17-29, 2001.
2. **Cwajna J., Szala J., Maliński M.:** Image processing and image analysis in materials science: atlas-part I. Proc. Int. Conf. „Stereology and Image Analysis in Materials Science”-STERMAT’94, Wisła, Poland (October 3-6, 1994).
3. **Czachor G.:** Właściwości mechaniczne sublimowanych tkanek wybranych warzyw korzeniowych. Międzynarodowa Konferencja Naukowa PTA „Agrofizyka w badaniach surowców i produktów rolniczych” Kraków, 12-13.09.2002.
4. **Czachor H., Konstankiewicz K., Pawlak K., Wojnar L.:** Application of image analysis for the parametrisation of potato tuber tissue. STERMAT’2000 Kraków, Poland, 301-306, 2000.
5. **Fornal J.:** Mikrostruktura surowców roślinnych, ich wybrane właściwości fizyczne a jakośc produktów. Międzynarodowa Konferencja Naukowa PTA „Agrofizyka w badaniach surowców i produktów rolniczych” Kraków, 12-13.09.2002.
6. **Gancarz M., Konstankiewicz K., Król A., Pawlak K.:** Method for the microscopic image compilation of the potato tuber’s cellular structure. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 34, 81-85, 2003(3).
7. **Haman J., Konstankiewicz K.:** Procesy zniszczenia w komórkowym ośrodku roślinnym. *Acta Agrophysica*, 24, 67-86, 1999.
8. **Haman J., Konstankiewicz K.:** Agrofizyczne skutki biotechnologii. *Acta Agrophysica*, 60, 63-71, 2002.
9. **Konstankiewicz K.:** Wyznaczanie geometrycznych parametrów struktury komórkowej tkanek roślinnych. *Acta Agrophysica*, 72, 61-79, 2002.
10. **Konstankiewicz K., Czachor H., Gancarz M., Król A., Pawlak K., Zdunek A.:** Cell structural parameters of potato tuber tissue. *Int. Agrophysics*, 16, 2, 2002.
11. **Konstankiewicz K., Pawlak K., Zdunek A.:** Quantitative method for determining cell structural parameters of plant tissues. *Int. Agrophysics*, 15, 161-164, 2001.
12. **Kuc D.:** Zastosowanie metod stereologicznych do oceny zmian mikrostruktury stali austenitycznych odkształcanych na gorąco. „Wiadomości stereologiczne”, listopad 2000.
13. **Maliński M.:** Statystyka matematyczna wspomagana komputerowo. Gliwice 2000.
14. **Pawlak K., Król A.:** Zmiany struktury tkanki bulwy ziemniaka w wyniku deformacji. *Acta Agrophysica*, 24, 109-133, 1999.
15. **Petran M., Hadravsky M., Boyde A.:** The tandem scanning reflected light microscope. *Int. Agrophysics*, 9, 275-286, 1995.

16. Pitt R.E., Chen H.L.: Time-dependent aspects of the strength and rheology of vegetative tissue. Trans. ASAE, 26(4), 1275-1280, 1983.
17. Pospiech J., Wienczek K., Piątkowski A.: Estimation of grain boundary surface area in metals by crystallographic stereology method. STERMAT'2000 Kraków, Poland, 307-314.
18. Wojnar L., Kurzydłowski K. J., Szala J.: Praktyka analizy obrazu. Polskie Towarzystwo Stereologiczne, Kraków 2002.
19. Zdunek A. and Konstankiewicz K.: Emisja akustyczna w badaniu procesów pęknięcia tkanek roślinnych. Acta Agrophysica, 55, 2001.

DETERMINATION OF THE MINIMUM CELLS NUMBER REQUIRED FOR THE ANALYSIS OF TISSUE GEOMETRICAL PARAMETERS OF POTATO TUBERS

Krystyna Konstankiewicz, Marek Garncarz, Andrzej Król, Kamil Pawlak

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin
e-mail: konst@demeter.ipan.lublin.pl

Abstract. Results of determination of the minimum number of cells necessary for the quantitative determination of geometrical parameters of the potato tuber parenchyma structure have been presented. The study material consisted of 4 potato varieties over a three-year crop cycle. Microscopic images of tissue in its natural state were obtained by means of an optical confocal microscope. Several thousand cells were used for the analysis of the structure parameters. The surface distribution of flat cell cross-sections was obtained by means of specialist 'APHELION' software. A minimum number of cells determined by comparison carried out between empirical surface areas of flat cell cross-sections for a big database ensuring the randomness of the samples provided according to the following scheme: 200 (2×100), 400 (2×200), 600 (2×300), 800 (2×400) of cells by means of the 'Kolmogorov-Smirnov λ Compatibility Test'.

Key words: parenchyma tissue of the potato tuber, geometrical parameters of the cell structure, confocal optical microscope, image analysis

