

WYZNACZANIE PARAMETRÓW STRUKTURY TKANKI MIĘKISZOWEJ BULWY ZIEMNIAKA ODMIAN 'DANUSIA' I 'KUBA'

Krystyna Konstankiewicz, Marek Gancarz, Andrzej Król, Kamil Pawlak

Streszczenie. Praca przedstawia metodę ilościowego wyznaczania parametrów struktury tkanki miękiszowej bulwy ziemniaka, takich jak: powierzchnia, obwód, średnice Fereta, wydłużenie, zwartość. W metodzie wykorzystano składane obrazy mikroskopowe wycinków tkanki uzyskane w optycznym mikroskopie konfokalnym. Zaprezentowano wyniki, wartości średnich i rozkładów parametrów struktury dla rdzenia wewnętrznego i zewnętrznego tkanki miękiszowej dwóch wybranych odmian (*Solanum tuberosum* v. 'Danusia' i v. 'Kuba'). Badania przeprowadzono dla tkanki w stanie naturalnym, bez preparacji.

Słowa kluczowe: struktura tkanki roślinnej, obrazy mikroskopowe, parametry geometryczne struktury komórkowej, tkanka miękiszowa bulwy ziemniaka

WSTĘP

Ekonomiczne uwarunkowania współczesnego rolnictwa zwiększają wymagania co do lepszego wykorzystania produkowanej żywności, głównie poprzez ograniczenie strat plonów i zwiększenie przetwórstwa. Wiąże się z tym konieczność poznawania coraz szerszej gamy właściwości fizycznych roślinnych surowców rolniczych, a także ich zmian w trakcie całego procesu technologicznego i przechowywania.

Do podstawowych fizycznych właściwości rolniczych ośrodków roślinnych – surowców i produktów – należy ich struktura. Struktura tkanki roślinnej, ilościowo opisana za pomocą parametrów wielkości i kształtu komórek oraz ich rozkładów, jest cechą charakterystyczną badanych ośrodków i ma wpływ na zachowanie się materiału w trakcie całego procesu produkcyjnego, [Jackman i Stanley 1995, Fornal 1998, Haman i Konstankiewicz 2000, Konstankiewicz i in. 2002a].

Do prowadzenia obserwacji i uzyskiwania obrazów struktury zalecane są metody mikroskopowe niewymagające wstępnej preparacji próbek, a ich ilościową analizę można wykonać przy użyciu nowoczesnych metod komputerowych [Cwajna i in. 1994, Wojnar i Majorek 1994, Petran i in. 1995, Czachor i in. 2000, Pospiech i in. 2000, Kon-

stankiewicz 2002a]. Nie istnieją uniwersalne metody i procedury komputerowe, które można zastosować do różnych typów materiałów. Wynika stąd konieczność doboru odpowiedniej metody uzyskiwania obrazu struktury oraz jego rejestracji i analizy, dobranej do analizowanego obiektu [Pawlak i Król 1999, Czachor i in. 2000, Pospiech i in. 2000, Konstankiewicz i in. 2002a]. Przeprowadzenie analizy ilościowej parametrów struktury możliwe jest dla mikroskopowych obrazów o dobrej jakości oraz wystarczającej liczby elementów strukturalnych, w przypadku tkanki roślinnej – komórek [Cwajna i in. 1994, Czachor i in. 2000, Gancarz 2002].

Parametry struktury mają istotny wpływ na właściwości badanej tkanki, a szczególnie na właściwości mechaniczne, [Haman i in. 2000, Konstankiewicz i in. 2001, Konstankiewicz i Zdunek 2001, Zdunek i Konstankiewicz 2001]. Układ ścian komórkowych spełnia rodzaj szkieletu przenoszącego naprężenia, natomiast wielkość poszczególnych komórek ma wpływ na naprężenia rozciągające w ścianach komórkowych i w konsekwencji na inicjację pęknięcia. Nieodwracalne procesy pękania zachodzą na poziomie pojedynczych komórek w miejscach o niskiej wytrzymałości, a dalszy ich rozwój uzależniony jest od prawdopodobieństwa rozkładu wielkości sąsiadujących komórek. Powstają w ten sposób pęknięcia wewnątrz obiektu, bardzo trudne do wykrycia, i obniżają jego wytrzymałość, a także stanowią źródło zmian biologicznych prowadzących do ciemnych plam i zmian nekrotycznych. Uszkodzenia wewnętrzne widoczne są przeważnie dopiero u konsumenta lub w czasie obróbki przemysłowej [Zgórska 1989, 1995, Haman i Konstankiewicz 2000].

Badania wykazują, że mikrostruktura ma wpływ na mechaniczną odporność tkanek roślinnych w skali makro oraz na jakość produktu końcowego [Pitt i Chen 1983, Pawlak i Król 1999, Konstankiewicz i in. 2001, Zdunek i Konstankiewicz 2001, Bohdziewicz 2002, Czachor G. 2002, Fornal 2002].

Ciągle rosnące wymagania co do jakości plonu są szczególnie ważne w przypadku ziemniaka, który należy do powszechnie uprawianych roślin na świecie, a Polska zajmuje jedno z czołowych miejsc w jego produkcji. Problem lepszego zagospodarowania ziemniaka wiąże się m.in. z ograniczeniem strat ze względu na uszkodzenia wewnętrzne bulw oraz z rozwojem przetwórstwa spożywczego i przemysłowego wymagającego surowca o coraz wyższej jakości [Zgórska 1989, 1995]. Dlatego też do szczegółowych badań jako przykładową tkankę roślinną wybrano ziemniak.

W prezentowanej pracy przedstawiamy wyniki z zakresu mikroskopowych obserwacji oraz wyznaczania geometrycznych parametrów struktury wraz z rozkładami tkanki miękiszowej bulwy ziemniaka wybranych dwóch odmian 'Danusia' i 'Kuba'. Badania wykonano dla próbek w stanie naturalnym, bez preparacji, przy uwzględnieniu dwóch rodzajów tkanek – rdzenia wewnętrznego i zewnętrznego.

MATERIAŁ I METODY

Do obserwacji struktury komórkowej tkanek roślinnych wykorzystujemy optyczny mikroskop konfokalny (Tandem Scanning Light Microscope – TSRLM), który umożliwia badania próbek biologicznych w stanie naturalnym, bez utrwalania i szlifowania. Stosowane zaś obiektywy Plan 10/0.25 i 20/0.4, pozwalają uzyskiwać na jednym obra-

Wyznaczanie parametrów struktury tkanki miękiszowej bulwy ziemniaka...

zie od kilku do kilkunastu przekrojów całych komórek – rys. 1 [Petran i in. 1995, Konstankiewicz i in. 2002a].



- Rys. 1. Obraz struktury komórkowej tkanki bulwy ziemniaka odmian 'Danusia' i 'Kuba' dla Rw i Rz optyczny mikroskop konfokalny, obiektyw Plan 20/0.4
- Fig. 1. Microscopic image of potato tuber tissue, var. 'Danusia' and 'Kuba' for the Rw and Rz optic confocal microscope, lens Plan 20/0.4



- Rys. 2. Obraz struktury komórkowej tkanki bulwy ziemniaka złożony z 16 pojedynczych obrazów – optyczny mikroskop konfokalny, obiektyw Plan 20/0.4
- Fig. 2. Composition of the 16 microscopic images of potato tuber tissue optic confocal microscope, lens Plan 20/0.4

Zastosowany precyzyjny, ciągły przesuw obiektu w płaszczyźnie x–y umożliwia 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 powoduje jej wysychania. System ten umożliwia precyzyjne złożenie kilku sąsiadujących ze sobą obrazów w taki sposób, że w efekcie otrzymujemy na jednym obrazie dużą liczbę (kilkadziesiąt) całych komórek – rys. 2 [Gancarz 2002]. Procedura taka ułatwia uzyskanie wystarczającej liczby komórek (\geq 300) do wnioskowania statystycznego, wyznaczone średnie są reprezentatywne dla całej badanej próbki [Konstankiewicz i in. 2002b].

Obrazy mikroskopowe otrzymane z optycznego mikroskopu konfokalnego wymagają pewnej procedury przygotowawczej do analizy parametrów struktury. Polega ona na uzyskaniu szkieletu struktury w postaci siatki przylegających do siebie wielokątów – najczęściej są to 6- i 5-kąty o różnych rozmiarach, utworzonych z odcinków łączących widoczne węzły ścian komórkowych. Tak uzyskane binarne szkielety obrazów mikroskopowych można poddawać komputerowej analizie w celu wyznaczenia parametrów struktury, rys. 3 [Gancarz 2002, Konstankiewicz i in. 2002a].



- Rys. 3. Szkielet struktury komórkowej tkanki bulwy ziemniaka uzyskany na podstawie obrazu mikroskopowego pokazanego na rys. 2
- Fig. 3. Skeleton of the cell structure of the potato tuber tissue according to the microscope image from fig. 2



- Rys. 4. Schemat pobierania próbek do badań, Rw rdzeń wewnętrzny, Rz rdzeń zewnętrzny, T wierzchołek, S stolon, B bok
- Fig. 4. Schematic diagram of the collection of the samples, Rw inner core, Rz outer core, T top, S stolon, B side

Analiza obrazów pozwala na wyznaczenie średnich wartości parametrów związanych z rozmiarem każdej komórki: powierzchni – A, obwodu – P, średnic Fereta, maksymalnej – F_{max} i minimalnej – F_{min} , oraz z kształtem komórki: stosunku średnic Fereta –

 F_{min}/F_{max} , wydłużenia – E (stosunek różnicy maksymalnej i minimalnej średnicy elipsy wpisanej w komórkę do sumy tych średnic), zwartości – C (16 A/P²). Oczywiście wielkości te dotyczą płaskiego przekroju badanej struktury, dla liczby komórek N \ge 300.

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

Badania przeprowadzono dla tkanki miękiszowej bulwy ziemniaka (*Solanum tubero-sum* L.), dwóch polskich odmian: 'Danusia' i 'Kuba', ze zbiorów Zakładu Przetwórstwa i Przechowalnictwa Ziemniaka Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Jadwisinie w 2001 roku.

Tabela 1. Średnie wartości zmierzonych parametrów struktury wraz z odchyleniem standardowym i liczba komórek dla odmiany 'Danusia' i 'Kuba' oraz dla typu rdzenia

					21		
		Rz (s.d.)	Rw (s.d.)			Rz (s.d.)	Rw (s.d.)
v. 'Danusia'	Ν	483	452		Ν	741	1375
	А	13,1* (8,2)	13,8* (7,4)	v. 'Kuba'	А	9,1 (6,4)	5,5 (3,3)
	Р	559,3* (170,5)	552,1* (153,4)		Р	447,6 (166,5)	356,1 (103,6)
	F _{max}	148,0 (47,3)	146,6 (40,8)		F _{max}	122,7 (47,0)	95,7 (29,2)
	F _{min}	112,0* (39,3)	117,5* (37,7)		F _{min}	90,1 (36,7)	73,4 (24,0)
	F _{min} /F _{max}	0,76 (0,15)	0,79 (0,13)		F _{min} /F _{max}	0,74 (0,16)	0,77 (0,15)
	Е	0,33 (0,16)	0,28 (0,15)		Е	0,35 (0,18)	0,32 (0,16)
	С	0,60 (0,08)	0,66 (0,08)		С	0,62 (0,08)	0,63 (0,08)

Table 1. Mean values of the structural parameters measured with standard deviation and number of cells for 'Danusia' and 'Kuba' varieties and types of core

 $\begin{array}{l} N-liczba \ komórek, \ A-powierzchnia \ (10^3 \ \mu m^2), \ P-obwód \ (\mu m), \ F_{max}-maksymalna \ średnica \ Fereta \ (\mu m), \\ F_{min}-minimalna \ średnica \ Fereta \ (\mu m), \ E-wydłużenie, \ C-zwartość, \ (s.d.)-odchylenie \ standardowe, \\ Rz, \ Rw-rdzeń \ zewnętrzny \ i \ wewnętrzny, \ *oznacza \ wartości \ nieróżniące \ się \ istotnie \end{array}$

N – number of cells, A – area (10³ μm^2), P – perimeter (μm), F_{max} – Feret's maximum diameter (μm), F_{min} - Feret's minimal diameter (μm), E – elongation, C – compactness, s.d. – standard deviation, Rz, Rw – outer and inner core, respectively, *marks values not differ significantly

Wybrano dwie odmiany ziemniaka o różnym użytkowaniu – 'Danusia': średnio późna, jadalna, duże owalne bulwy, przydatna do bezpośredniej konsumpcji i do przetwórstwa na produkty mrożone i sterylizowane, oraz 'Kuba': średnio wczesna, skrobiowa, bulwy okrągło-owalne, przydatna do przerobu przemysłowego, jak i do przetwórstwa na chipsy i susze. Badane odmiany uprawiano na tej samej glebie i przy jednakowym nawożeniu, a zbiór przeprowadzano w fazie pełnej dojrzałości zbiorczej, na przełomie września i października ('Danusia' – rdzeń zewnętrzny: zaw. suchej masy 21,9%, zaw. skrobi 14%, odpowiednio dla rdzenia wewnętrznego: 17,9 i 11,3, 'Kuba' – 21,7 i 15,0 oraz 19,3 i 13,0). Badania laboratoryjne prowadzono dla bulw przechowywanych, w kontrolowanych warunkach temperatury i wilgotności, nie dłużej niż 2 miesiące po zbiorze. Do obserwacji i analizy struktury wybrano dwa obszary tkanki miękiszowej, rdzeń zewnętrzny i wewnętrzny, z których pobierano walcowe próbki, o wymiarach: średnica 10 mm, wysokość 1 mm. Schemat pobierania próbek pokazano na rysunku 4, natomiast liczebność komórek uwzględnioną w badaniach zestawiono wraz z parametrami struktury w tabeli 1.

WYNIKI I DYSKUSJA

Przeprowadzone badania pozwoliły na ilościowe wyznaczenie parametrów geometrycznych struktury komórkowej dwóch rodzajów tkanki miękiszowej bulwy ziemniaka, rdzenia wewnętrznego i zewnętrznego. Wyniki dla dwóch badanych odmian, dotyczące wartości średnich wszystkich parametrów wraz z odchyleniami standardowymi zestawiono w tabeli 1, natomiast uzyskane rozkłady, przedstawiające częstość występowania danej cechy, zestawiono na rysunkach 5 i 6.

Wartości średnie parametrów opisujących wielkość komórek – powierzchnia, obwód i średnice Fereta – pokazują, że wybrane do badań odmiany różnią się. Odmiana 'Danusia' ma większe komórki niż odmiana 'Kuba', zarówno rdzenia wewnętrznego, jak



Rys. 5. Rozkłady pola powierzchni A i obwodu P komórek, Rw, Rz – odpowiednio rdzenia wewnętrznego i zewnętrznego, f_o – częstotliwość występowania

Fig. 5. Distribution of the cell surface area A and perimeter P of the cells Rw and Rz – inner and outer core, respectively, f_0 – frequency occur



Rys. 6. Rozkłady F_{min}/F_{max}, wydłużenia E i zwartości C komórek, Rw, Rz – odpowiednio rdzenia wewnętrznego i zewnętrznego, f_o – częstotliwość występowania

i zewnętrznego. Odmiana 'Danusia' charakteryzuje się też małym zróżnicowaniem wielkości komórek między badanymi rdzeniami, statystycznie różnice wielkości są nieistotne. Natomiast odmiana 'Kuba' wykazuje istotne zróżnicowanie wielkości tych dwóch typów tkanek, komórki rdzenia zewnętrznego mają około 1,65 razy większą powierzchnię niż komórki rdzenia wewnętrznego.

Wysokie wartości błędów standardowych mogą być związane z trudnością jednoznacznego wybrania obszaru poszczególnych rdzeni przy pobieraniu próbki do badań, granica między rdzeniami jest nieostra i pofalowana.

Parametry związane z kształtem komórek – stosunek średnic Fereta, wydłużenie, zwartość – pokazują, że obie odmiany są podobne. Zarówno w odmianie 'Danusia', jak

Fig. 6. Distribution of the F_{min}/F_{max} , elongation E and compactnes C of the cells, Rw and Rz – inner and outer core, respectively, f_o – frequency occur

i 'Kuba' bardziej wydłużone komórki występują dla rdzenia zewnętrznego (mniejsza wartość parametrów F_{min}/F_{max} i C, natomiast większa wartość E), co można zaobserwować także na zaprezentowanych obrazach struktury na rysunku 1. Bardziej zróżnicowane pod względem kształtu komórek są rdzenie odmiany 'Danusia', co pokazuje różnica zarówno parametru E, jak i C.

Rozkłady parametrów powierzchni (P) i obwodu (A) – rys. 5 – wykazują, że bardziej jednorodne są komórki rdzenia wewnętrznego dla odmiany 'Kuba', około 60% komórek ma powierzchnię i obwód w bardzo wąskim przedziale wielkości. Natomiast odmiana 'Danusia', podobnie jak wykazano powyżej, ma dla obydwu badanych rdzeni rozkłady zbliżone i obejmujące szerszy przedział wielkości tych parametrów.

Rozkłady parametrów związanych z kształtem komórek (rys. 6), pokazują że komórki rdzenia wewnętrznego dla odmiany 'Danusia' mają więcej komórek w wąskim przedziale wartości parametrów F_{min}/F_{max} niż dla rdzenia zewnętrznego. Rozkłady parametrów wydłużenia (E) dla obydwu odmian wykazują, że komórki rdzenia wewnętrznego są mniej wydłużone niż rdzenia zewnętrznego, szczególnie w przypadku odmiany 'Danusia'. Rozkłady parametrów zwartości (C) mają podobny kształt dla obydwu odmian, natomiast występują różnice między rdzeniami – większe w przypadku odmiany 'Danusia'.

PODSUMOWANIE

Uzyskane wyniki pokazują, że struktura tkanki miękiszowej bulwy ziemniaka jest charakterystyczną cechą badanych odmian 'Danusia' i 'Kuba'. W eksperymentach uwzględniono rdzeń wewnętrzny i zewnętrzny badanej tkanki obydwu odmian. Odmiana 'Danusia' ma większe komórki niż odmiana 'Kuba', zarówno rdzenia wewnętrznego, jak i zewnętrznego. Odmiana 'Danusia' charakteryzuje się małym zróżnicowaniem wielkości komórek między badanymi rdzeniami, statystycznie różnice wielkości są nieistotne, natomiast odmiana 'Kuba' wykazuje istotne zróżnicowanie wielkości tych dwóch typów tkanek Dla obydwu odmian stwierdzono, że komórki rdzenia zewnętrznego są bardziej wydłużone niż wewnętrznego, szczególnie dla odmiany 'Danusia'.

Zastosowane metody badawcze, zarówno uzyskiwania obrazu mikroskopowego, jak i jego analizy mogą być wykorzystane w badaniach innych struktur tkanek roślinnych.

PIŚMIENNICTWO

- Bohdziewicz J., 2001. Właściwości mechaniczne i reologiczne wybranych odmian buraka ćwikłowego. Acta Agrophysica 45, 17–29.
- Czachor G., 2002. Właściwości mechaniczne sublimowanych tkanek wybranych warzyw korzeniowych. Międzynarodowa Konferencja Naukowa PTA "Agrofizyka w badaniach surowców i produktów rolniczych". Kraków, 12–13.09.2002.
- Czachor H., Konstankiewicz K., Pawlak K., Wojnar L., 2000. Application of image analysis for the parametrisation of potato tuber tissue. STERMAT'2000 Krakow, Poland, 301–306.
- Cwajna J., Szala J., Maliński M., 1994. Image processing and image analysis in materials science: atlas-part I. Proc. Int. Conf. "Stereology and Image Analysis in Materials Science" STER-MAT'94, Wisła, Poland, 3–6.10.1994.

- Fornal J., 1998. The changes in plant material microstructure during processing. Pol. J. Food Nutr. Sci. 7/48, 3(S), 9–23.
- Fornal J., 2002. Mikrostruktura surowców roślinnych, ich wybrane właściwości fizyczne a jakość produktów. Międzynarodowa Konferencja Naukowa PTA "Agrofizyka w badaniach surowców i produktów rolniczych". Kraków, 12–13.09.2002.
- Gancarz M., 2002. Composition method of microscope images for the potato tuber tissue structure investigation. BioPhys Springs 2002, 1st International Workshop for Young Scientists. Czech Republic, Praque, 27–18.05.2002.
- Haman J., Konstankiewicz K., 2000. Destruction processes in the cellular medium of a plant Theoretical Approach. Int. Agrophysics 14, 37–32.
- Haman J., Konstankiewicz K., Zdunek A., 2000. Influence of water potential on the failure of potato tissue. Int. Agrophysics 14, 181–186.
- Jackman R.L., Stanley D.W., 1995. Perspectives in the textural evaluation of plant foods. Trends in Food Science and Technology 6, 187–195.
- Konstankiewicz K., Czachor H., Gancarz M., Król A., Pawlak K., Zdunek A., 2002a. Cell structural parameters of potato tuber tissue. Int. Agrophysics 16, 2, 119–127.
- Konstankiewicz K., Gancarz M., Król A., Pawlak K., 2002b. Wyznaczanie minimalnej liczby komórek do analizy parametrów struktury tkanki bulwy ziemniaka. Międzynarodowa Konf. Naukowa "Agrofizyka w badaniach surowców i produktów rolniczych". PTA, Kraków 12–13.09.2002.
- Konstankiewicz K., Pawlak K., Zdunek A., 2001. Influence of structural parameters of potato tuber cells on their mechanical properties. Int. Agrophysics 15(4), 243–246.
- Konstankiewicz K., Zdunek A., 2001. Influence of turgor and cell size on the cracking of potato tissue, Int. Agrophysics 15(1), 27–30.
- Pawlak K., Król A., 1999. Zmiany struktury tkanki bulwy ziemniaka w wyniku deformacji. Acta Agrophysica 24, 109–133.
- Petran M., Hadravsky M., Boyde A., 1995. The tandem scanning reflected light microscope. Int. Agrophysics 9(4), 275–286.
- Pitt R. E., Chen H. L., 1983. Time-dependent aspects of the strength and reology of vegetative tissue. Trans. ASAE 26(4), 1275–1280.
- Pospiech J., Wiencek K., Piątkowski A., 2000. Estymation of grain boundary surface area in metals by crystallographic stereology method. STERMAT'2000 Krakow, Poland, 307–314.
- Wojnar L., Majorek M., 1994. Komputerowa analiza obrazu, FOTOBIT-DESIGN s.c., Kraków, 1994.
- Zdunek A., Konstankiewicz K., 2001. Emisja akustyczna w badaniach procesów pękania tkanek roślinnych. Acta Agrophysica 55, 95.
- Zgórska K., 1989. Biologiczne i ekologiczne czynniki warunkujące podatność bulw ziemniaka na powstawanie ciemnej plamistości pouszkodzeniowej. Instytut Ziemniaka, Bonin, 91.
- Zgórska K., 1995. Stan obecny i przyszłość ziemniaka z uwzględnieniem doboru odmian hodowli rodzimej i zagranicznej. Biul. Inst. Ziemniaka 45, 87–96.

DETERMINATION OF STRUCTURAL PARAMETERS OF POTATO TUBER TISSUE, V. 'DANUSIA' AND V. 'KUBA'

Abstract. The present work focuses on a method for quantitative evaluation of cell structural parameters of parenchyma tissues of potato tuber such as: surface area, perimeter, Feret's diameters, elongation, compactness. The use method is based on analysis of tissue section combine images obtained by an optical confocal microscope. Results of structural parameters, mean values and distribution, for inner and outer core of potato tuber parenchyma of two chosen varieties (*Solanum tuberosum v.* 'Danusia' and *v.* 'Kuba') are presented. Experiments were carried out for the samples in natural state, without preparation.

Key words: plant tissue structure, microscopic images, geometrical parameters of the cell structure, parenchyma tissue of potato tuber

Krystyna Konstankiewicz, Marek Gancarz, Andrzej Król, Kamil Pawlak, Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, e-mail: konst@demeter.ipan.lublin.pl