

## POSUZOVÁNÍ TVAROVÝCH A BAREVNÝCH CHARAKTERISTIK SEMEN MODELOVÝCH PLODIN I V KORELACI S JEJICH OBSAHOVÝMI LÁTKAMI

IVA SMÝKALOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ HORÁČEK<sup>a</sup>,  
MIROSLAV HÝBL<sup>b</sup>, MARIE BJELKOVÁ<sup>c</sup>,  
MARTIN PAVELEK<sup>c</sup>, TEREZA  
KRULIKOVSKÁ<sup>d</sup> a DAVID HAMPEL<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Oddělení biotechnologií, <sup>b</sup> Oddělení luskovin, <sup>c</sup> Oddělení technických plodin, Agritec Plant Research, Ltd., Zemědělská 16, 787 01 Šumperk, <sup>d</sup> Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>e</sup> Oddělení metodik a informatiky, NOÚ ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno  
smykalova@agritec.cz

Došlo 16.9.09, přepracováno 12.5.10, přijato 17.5.10.

Klíčová slova: digitální obrazová analýza, len, hrách, charakteristika semen, klasifikace

### Úvod

Morfologický popis odrůd polních plodin je využíván od studia genů až po šlechtitelské uplatnění v polních podmínkách. Reprezentativní vzorky odrůd jsou pro jednotlivé plodiny sesbírány z celého světa a uchovávány v genových bankách a přesná charakteristika položek je zaznamenána v k tomu určených databázích. Tyto databáze genotypů jsou rozsáhlé a mnohdy obsahují duplicitu nebo multiplicitu položek<sup>1</sup> a nebo je jejich fenotypový popis poznamenán nepřesnostmi či chybami<sup>2</sup>. Před 20 lety digitální obrazová technologie přinesla do této oblasti popisování a třídění odrůd v genových kolekcích významný posun<sup>3,4</sup>. Analýza semen pomocí parametrů obrazové analýzy<sup>5</sup>, které identifikují nové kultivary, se stala dobrým nástrojem k určení původu genotypů, k detekci příměsí ve vzorcích a k testu pravosti šlechtitelského materiálu i uznání šlechtitelských práv.

Postup sejmutí a digitalizace obrazu objektu, jeho segmentace a vyhodnocení speciálními k tomuto účelu vytvořenými PC programy (KS-400, Carl Zeiss Vission, Německo) umožnil rychlé třídění genotypů na základě naměřených parametrů pro velikost, tvar a barvu objektu<sup>3</sup>. Digitální snímky často sledovaných objektů – listy, květy, stonky, kořeny nebo semena jsou segmentovány od pozadí tzv. prahováním. Barevný snímek se transformuje na čer-

no-bílý obraz a tento binární obraz se dále upraví prostřednictvím morfologických operací (eroze, dilatace, atp.) pro detekci oblastí zájmu, například pigmentové zabarvení květů<sup>6</sup>. U lnu bylo měření separovaných korunních lístků použito k vyhodnocení morfologických charakteristik květů lnu a vybrán parametr vykazující největší variabilitu a rozlišovací spolehlivost genotypů<sup>1</sup>. Protože genotypy plodin jsou v genových bankách uchovávány ve formě semen, může docházet ke změnám charakteristik semene (změna velikosti, tvaru, barvy) vlivem skladovacích podmínek nebo dozrávání semen<sup>7</sup>. Proto je prioritou před použitím genotypu ze sbírky postihnout tyto změny pro jejich praktické použití nebo před aplikací molekulárních analýz. Dvourozměrná obrazová analýza tvaru semen rýže<sup>8</sup> prokázala spolehlivost odlišení odrůd s hladinou pravděpodobnosti 94,5 % při kombinaci rozměrových a tvarových faktorů a její uplatnění při rozlišování odrůd.

Obrazová analýza důležitých charakteristik je nezapustitelným objektivním nástrojem pro identifikaci a katalogizaci v biodiverzitivním konzervačním systému např. luskovin<sup>9</sup>, zejména pro eliminaci subjektivního lidského faktoru. Technika obrazové analýzy může být použita k identifikaci semen různých druhů a také ke studiu proměnlivé morfologie semen uvnitř druhu. K posuzování barevnosti semen čocky<sup>9</sup> byla vyvinuta metoda obrazové analýzy využívající skener<sup>10,11,12</sup>. Tento třídící systém je založen na individuálním měření různého zabarvení a velikosti semen. Citované studie jsou relevantní např. i pro účely vyvinutí automatického třídícího systému<sup>4</sup>. Na semeni lnu (*Linum usitatissimum* L.) bylo za použití obrazové analýzy prováděno měření velikostních, tvarových a barevných charakteristik a z naměřených dat byly generovány významně odlišitelné odrůdové shluky<sup>13</sup>. Obdobný systém byl vyvinut pro hodnocení barevnosti suchých semen 73 odrůd polního hrachu (*Pisum sativum* L.)<sup>14</sup>. Změna barev semen spojená s postupným rozkladem chlorofylu osetení v průběhu zrání a uskladnění semen vyžaduje predikci změny. Pro tento účel je používán systém barevných odchylek „median optical density“ a jejich srovnání s referenčním vzorkem<sup>14</sup>. Rozlišovací automatizovaný 2D-digitální systém barevných změn (Red-Green-Blue data) je také využitelný pro posuzování viability semen<sup>7</sup>.

Technika skenování semen skenerem je nejen rychlá metoda, ale poměrně levný alternativní systém a jeho vývoj je v zájmu praktických aplikací. Pořízení kvalitního digitálního snímku s možností opakované reprodukce je prvotním předpokladem pro další zpracování obrazu. Vyladění barevných charakteristik před snímáním, a sladění všech součástí optického systému je základním předpokladem pro objektivní měření.

Cílem této práce bylo využít skeneru a makrooptiky k získání obrazových charakteristik semen, na jejich základě posoudit odlišitelnost malosemenných a velkosemenných odrůd a stanovit významnost korelací sledovaných parametrů s obsahovými nutričními látkami v semenech.

## Experimentální část

### Rostlinný materiál

Jako modelové plodiny byly pro experiment vybrány len setý (*Linum usitatissimum* L.) a hrách setý (*Pisum sativum* L.). Len jako zástupce plodiny s malými semeny oválného, plochého tvaru a barevnou škálou od žluté po tmavě hnědou. Hrách reprezentuje velká kulovitá semena s barevností mezi žlutou a šedě zelenou. Pro experimenty byla použita suchá vyzrálá semena z rostlin pěstovaných v polních podmínkách. Bylo použito celkem 15 odrůd z české kolekce genetických zdrojů hrachu a lnu vedené ve firmě AGRITEC s.r.o., Šumperk (viz tab. I). Vzorky semen testovaných odrůd byly analyzovány na nutriční obsahové látky v semenech a použity k obrazové analýze.

### Stanovení obsahu mastných kyselin a tuku

Obsah mastných kyselin ve vzorcích lnu byl stanoven podle ČSN ISO 5508 (Analýza methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií), metodou založenou na esterifikaci mastných kyselin methanolem, extrakci methylesterů petroletherem a následném stanovení plynovou chromatografií. Poměrné zastoupení jednotlivých mastných kyselin bylo určováno chromatografickým softwarem. Příprava methylesterů mastných kyselin byla prováděna podle ČSN ISO 5509 (Příprava methylesterů mastných kyselin). Vzorek 10 semen lnu byl homogenizován v třecí misce. Obsah tuku byl stanoven modifikovanou metodou Soxhletovy extrakce, kdy byl tuk z mletých semen extrahován horkým extrakčním činidlem (petrolether) v automatickém extraktoru Soxtherm (Gerhardt). Po odstranění extrakčního činidla (destilace a vysušení) se zbylý tuk zvažil. Metoda s využitím automatického extraktoru byla validována a ověřena pravidelnou účastí v kruhových testech ÚKZÚZ.

### Obsah celkového škrobu

Obsah celkového škrobu v semenech hrachu byl stanovován metodikou NIRS (Near Infra-Red Spektroskopy).

Kalibrace přístroje byla ověřena pomocí série standardních vzorků hrachu se známým obsahem škrobu. Obsah škrobu v těchto standardních vzorcích byl stanovován pomocí komerční soupravy Megazyme (AOAC metoda 996.11). Rezistentní škrob (tj. škrobu, který nepodléhá enzymatické hydrolyze) byl stanoven na komerční soupravě Megazyme (AOAC metoda 2002.02).

### Digitální obrazová analýza

Barevný digitální snímek semen byl pořízen tak, že semena byla srovnána prostřednictvím plastické mřížky na skenovací sklo plochého deskového skeneru Canon 4400F a Canon 8800F (Canon Inc., USA). Na snímku uloženém ve formátu tiff bylo 288 semen, 3 opakování, celkem 864 semen pro kultivar. Tímto způsobem byly pořízeny barevné snímky (RGB 8bit) pro hodnocení tvaru a velikosti semen. Pro hodnocení barevnosti byla semena umístěna na podstavec s černým sametem a k pořízení snímku byla použita sestava: digitální kamera DS-U1 (5 Mpx) Nikon a makrooptika Pentax, 2/3" Zoom objektiv Cosmicar, f=12,5–75 mm s předsádkou +3 (0,33 mm), (Nikon Instruments, CS-Optoteam, Prague, ČR), PC. Snímání bylo prováděno za nízké světelnosti, bez přímého osvětlení vzorku (expozice 1 s a zesílení expozice 2,8×). Pro objektivní porovnávání odrůd mezi sebou obě snímávací zařízení byly kalibrovány (viz níže), aby se zaručila stabilita vnímání barev a nedocházelo k změnám/posunům hodnot v průběhu opakovaného snímání vzorků. Vyhodnocování digitalizovaných snímků bylo provedeno speciálním softwarem NIS Elements AR 2.30 (LIM, Laboratory Imaging Prague, ČR).

### Sledované parametry

Pro posouzení velikosti a tvaru semen byly na snímcích ze skeneru sledovány tyto parametry:

**Area** (plocha) je hlavním kritériem velikosti, v případě kalibrovaného systému udává reálnou plochu.

**Perimetr** (obvod) je mírou celkové hranice, počítá se ze čtyř projekcí ve směrech 0, 45, 90 a 135° pomocí Croftonovy rovnice:  $\pi^*(Pr_0+Pr_{45}+Pr_{90}+Pr_{135})/4$

Tabulka I

Přehled analyzovaných odrůd a barevná a obsahová charakteristika semen

Odrůdy lnu	Charakteristika semen	Odrůdy hrachu	Charakteristika semen
Amon	nízkolinolenový (2,7 %) žlutý	Alan	škrob (53,81 %) žlutý
Bonet	vysokolinolenový (50,3 %) hnědý	Bohatýr	škrob (56,16 %) žlutý
Jantar	nízkolinolenový (2,1 %) žlutý	Herold	škrob (56,76 %) žlutý
Jítka	vysokolinolenová (55,2 %) hnědý	Janus	škrob (50,15 %) žlutý
Lola	nízkolinolenová (4,1 %) hnědý	Romeo	škrob (53,27 %) žlutý
Marylin	vysokolinolenová (57,8 %) hnědý	Smaragd	škrob (51,75 %) zelený
Rina	vysokolinolenová (61,4 %) hnědý	Tyrkys	škrob (54,02 %) zelený
		Zekon	škrob (50,62 %) zelený

**EqDiameter** (ekvivalentní průměr) je kritériem velikosti odvozeným z plochy a určuje průměr kružnice, která má stejnou plochu jako objekt:  $\sqrt{4 \cdot \text{Plocha} / \pi}$

**MaxFeret**, **MinFeret** (maximální/minimální Feretův průměr) je maximum/minimum z Feretových průměrů, kdy při úhlu  $\alpha$  se rovná délce projekce objektu při úhlu  $\alpha$ ,  $\alpha = \{0, 10, 20, \dots, 180^\circ\}$

**Elongation** (protáhlost) se určuje jako poměr MaxFeret/MinFeret, je to užitečná charakteristika tvaru

**Circularity** (kruhovitost) 1 pouze pro kruh a všechny ostatní tvary jsou charakterizovány kruhovostí  $< 1$ . Je to užitečná charakteristika tvaru, odvozená míra tvaru počítaná z plochy a obvodu:  $4 \cdot \pi \cdot \text{Plocha} / \text{Obvod}^2$

**MeanRed**, **MeanGreen**, **MeanBlue** (střední červená, zelená, modrá) jsou průměry z hodnot barevných složek obrazových bodů, obvyklý aritmetický průměr z hodnot intenzity barevné složky

**MeanSaturation** (střední nasycení) průměr hodnot saturace (sytosti) obrazových bodů

**HueTypical** (typický odstín) hodnoty odstínu s maximální frekvencí v histogramu odstínu popisuje nejpoužívanější odstín v objektu

Pro posouzení barevnosti semen byly na snímcích pořizovaných makrooptikou sledovány tyto příznaky:

**L, a, b** jsou souřadnice v barevném systému CIE-LAB

Na základě hodnot L, a, b byla vypočtena odchylka:

**Barevná odchylka  $\Delta E_{a,b}$**  je důležitou všeobecně přijímanou metodou hodnocení rozdílu barev:  $\Delta E_{a,b} = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$

#### Kalibrace skeneru a makrooptiky

Naměřená data představující minimum (MIN), maximum (MAX), průměrnou hodnotu (MEAN), směrodatnou odchylku (SD) byly exportovány do programu Excel (Microsoft Office 2007, USA) a byly dále hodnoceny statisticky. Před zahájením snímání byla provedena kalibrace měřených objektů určením přesné velikosti jednoho pixelu jednotkou velikosti (mm), tj. 0,08 mm/px pro určení skutečných rozměrů semen. Barevná kalibrace skeneru byla provedena nastavením vstupních parametrů barevného prostoru – mezní hodnoty: 0 (černá) do 255 (bílá), velikost rozlišení 300 dpi, kalibrace bílé barvy (R=243, G=243, B=242) pomocí tabulky MunsellColor Mini ColorChecker (X-Rite Inc. USA).

Při kalibraci makrooptiky bylo postupováno následovně: otevření clony a zaostření objektů objektivem, nastavení snímání v programu NIS Elements AR 2.30 (LIM, Laboratory Imaging Prague, ČR) při daných světelných podmínkách: nastavení černé (0,0,0) a bílé (255,255,255) barvy, vyvážení RGB kanálů, kontrastu, jasu a manuální nastavení expozice (1 s) a zesílení (2,8×). Kalibrace bílé barvy byla provedena pomocí vloženého bílého kancelářského papíru.

#### Statistické zpracování dat

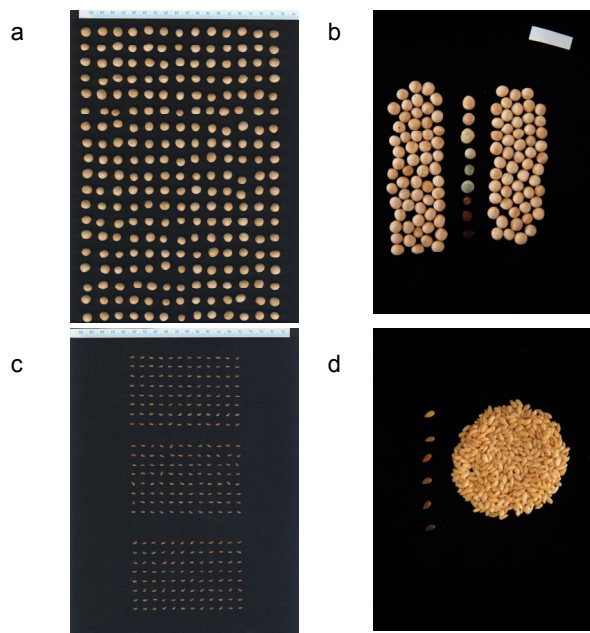
Možnost klasifikace jednotlivých odrůd na základě jednotlivých charakteristik získaných ze semen byla zjiš-

ťována metodou ANOVA, jako hodnotící systém byl použit výpočetní systém MATLAB R2009a (procedury pro automatické zpracování byly nově vytvořeny). V případě, že byly pro daný parametr zjištěny statisticky významné rozdíly mezi odrůdami (na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ), přistoupilo se k párovému porovnání jednotlivých odrůd. Hierarchickou shlukovou analýzou obrazových dat byl získán dendrogram pro obě plodiny. Multifaktorová analýza dat byla provedena s použitím software Statistica ver.8.0 (StatSoft Inc., USA) a stanovena korelační závislost naměřených parametrů semen a obsahových látek v semenech.

#### Výsledky a diskuse

Technické řešení snímání a kalibrace snímacích zařízení

Deskový plošný skener představuje výhodné snímací zařízení jednak z důvodu vyloučení externího osvětlení a jednak díky možnosti snímání velkého počtu semen (obr. 1a,c). Optické a fyzikální faktory světelného detektoru a různá hloubka ostroty mohou způsobit rozdíly v kvalitě snímků. Vznik stínů za objektem u kulatých semen hrachu nebo odlesky semen lnu je nutné odfiltrovat a nezahrnovat do prahování<sup>10</sup>. Nejprve byla testována barevná stabilita pozadí při opakovaném snímání – proměrováním RGB hodnot v různých uspořádáních barvy pozadí a objektů. Současně byly posuzovány dva typy skenerů Canon 4400F a 8800F. Ačkoliv studie 4 typů skenerů s odlišnou kvalitou od firem Umax, Canon a Microtek



Obr. 1. Uspořádání vzorků hrachu (a,b) a lnu (c,d) při snímání na skeneru (a,c) nebo makrooptikou (b,d)

poukazuje na použitelnost barevné kalibrace tabulkou Q60 (Kodak, Kanada) pro shodu s referenčními snímky<sup>10</sup>, naše výsledky prokázaly barevnou nestabilitu snímání komerčním typem deskového skeneru Canon 4400F. Při opakovaném snímání i při použití kalibrační barevné tabulky MunsellColor byl detegován posun RGB hodnot pozadí. Proto byl tento postup použit pouze v případě sledování nebarevných charakteristik, jako jsou tvar a velikost semen. Znamená to, že skenovací postup selhal v případě posuzování barevnosti semen, neboť nebylo dosaženo spolehlivé reprodukovatelnosti barvy semen. Proto bylo zahájeno snímání cca 50 semen (pro hrách), nebo 2,5 g vzorku (pro len) makrooptikou za přitmi (obr. 1b,d), což vyžadovalo dlouhý expoziční čas a vysokou fotografickou citlivost, ale zároveň bylo možné objektivní posouzení barevného vnímání u všech snímků vzhledem ke stabilitě nastavených parametrů snímání. Na takto získaných snímcích byly hodnoceny nezávislé parametry L,a,b. Snímky tedy nebyly využity k přímému hodnocení barvy, ale pouze k výpočtu odchylky  $\Delta E_{a,b}$  mezi barevností vzorku a barevným markerem. Nejnižší stanovená hodnota odchylky pouze indikovala změnu barvy a stanovila barevnou příslušnost vzorku k jedné z kontrolních odrůd (semeno se stanovenou barevnou charakteristikou a reprezentativní hodnotou pro daný barevný standard). Tento postup byl rychlý a spolehlivý. Pro posuzování tvarových, velikostních a barevných charakteristik semen byla vybrána drobná (len) a velká (hrách) semena, kde se tvar a zabarvení semen lišily a zároveň byl pro odrůdy chemicky stanoven obsah významných složek. V tab. I je uveden přehled analyzovaných odrůd lnu přadného/olejného typu a polního hrachu s udáním barevné charakteristiky semene a obsahu sledovaných komponent. Nízkolinolenové odrůdy lnu jsou olejné lny pěstované pro potravinářské a farmaceutické účely, vysokolinolenové odrůdy jsou přadné typy lnu. Polní odrůdy hrachu jsou charakterizovány vysokým obsahem škrobu.

Na těchto reprezentativních souborech odrůd byl vypracován systém, který umožňuje poměrně rychle a objektivně analyzovat větší soubory odrůd, které jsou součástí kolekcí genetických zdrojů. Systém tedy zahrnuje pořízení kvalitního snímku, naměření parametrů a jejich statistické vyhodnocení s tříděním odrůd do shluků<sup>11</sup>.

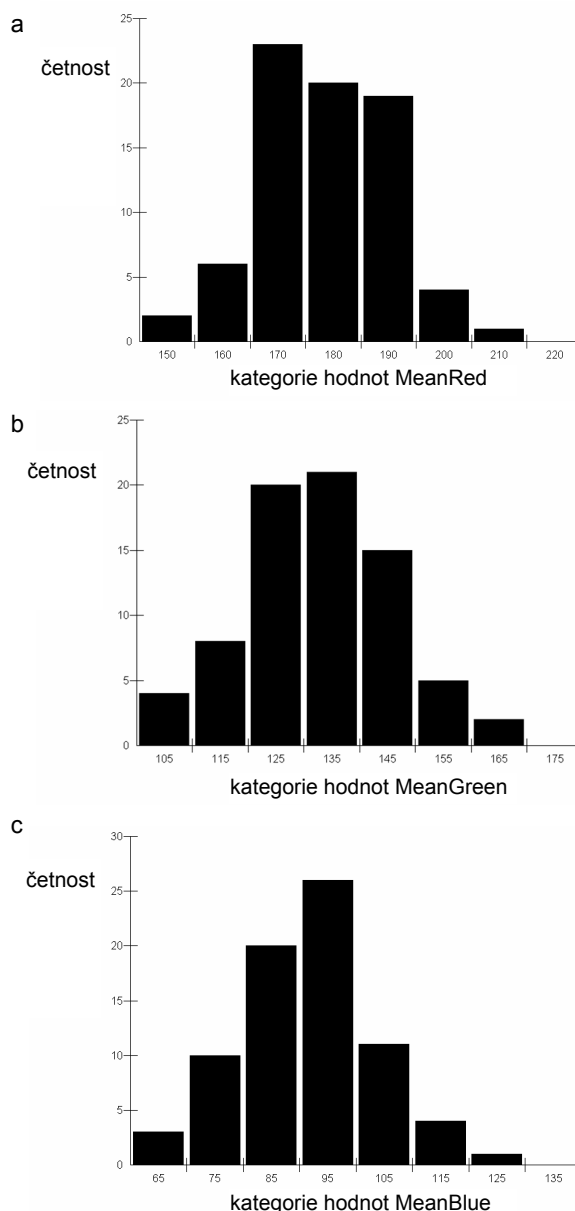
#### Charakteristika odrůd získaná obrazovou analýzou

V hodnoceném vzorku bylo analyzováno každé jednotlivé semeno zvlášť. Z naměřených hodnot bylo možné

#### Tabulka II

Základní statistické hodnocení odrůdy hrachu Bohatýr pro parametry charakterizující intenzitu 3 barevných kanálů (MeanRed, MeanGreen, MeanBlue); průměr (mean), směrodatná odchylka (s.d.), minimální a maximální hodnoty (min, max)

Parametr	Mean	s.d.	Min	Max
MeanRed	190,73	5,379	176,42	203,40
MeanGreen	159,42	7,890	141,98	177,88
MeanBlue	121,87	10,322	99,343	145,98



Obr. 2. Histogramy hodnot jednotlivých semen získaných pro parametr charakterizující průměrnou intenzitu tří barevných kanálů (MeanRed (a), MeanGreen (b) a MeanBlue (c)) a jednu odrůdu (Bohatýr); osa x kategorie hodnot parametru, osa y četnost jednotlivých kategorií ve vzorku semen

pro každou odrůdu stanovit průměr (mean), směrodatnou odchylku (s.d.) a najít minimální a maximální hodnotu (min, max) jak uvádí tab. II a zkonstruovat histogram (obr. 2). Přibližná normalita dat byla potvrzena a můžeme ji i testovat. Rozložení hodnot parametrů závisí na volbě prahování, tj. jaká část objektu bude použita k měření. Pro hodnoty MeanRed, MeanGreen a MeanBlue rozdělení hodnot odpovídá nejednotné barevnosti semen (obr. 1b), zapříčiněné přírodními podmínkami. Semena lnu nevykazovala tyto problematické odchylky v zabarvení, nicméně lesklý povrch semen lnu (obr. 1d) může rovněž způsobit změny v intenzitě zabarvení semen. Proto bylo při snímání vyloučeno přímé osvětlení vzorku, aby bylo možné eliminovat výskyt těchto problematických jevů. Získané základní statistické hodnoty pro daný parametr naměřené v souboru analyzovaných semen představují jedno z hodnotících kritérií odlišnosti odrůd. Volba širší kategorie osy x se dá nastavit podle požadavků hodnotitele, což má zásadní vliv na rozložení četností pro daný parametr. Stávající rozložení a každý posun některé z těchto hodnot vlivem vnějších faktorů může svědčit o biologické proměnlivosti odrůdy. Velmi důležitá je v tomto směru analýza dostatečně velkého souboru semen.

Tvarové a velikostní charakteristiky posuzovaných odrůd

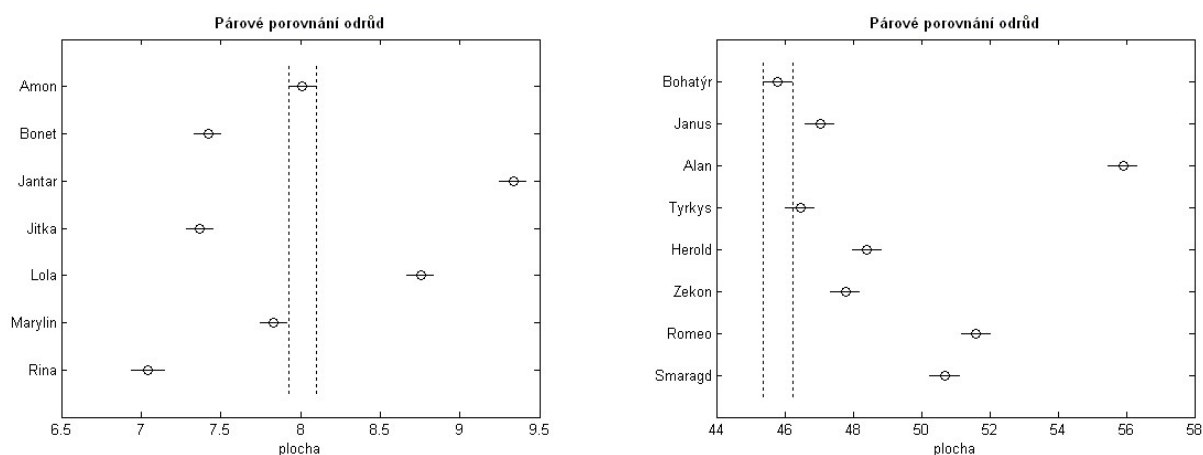
Pro tvarové a velikostní charakteristiky byla použita data ze skenovacího systému. Semena byla uspořádána na skleněné desce plošného skeneru tak, aby pro každé semeno mohlo být naměřeno 7 parametrů. Celkem bylo analyzováno cca 860 semen pro každou odrůdu. Velikost vzorku byla určena jako dostačující pro následné statistické zpracování. Průměrné hodnoty jsou uvedeny v tab. III. Na základě statistických výsledků mnohonásobného porovnání lze konstatovat, že sledované parametry statisticky významně ( $\alpha = 0,05$ ) pomohly odlišit vždy alespoň jednu odrůdu hrachu i lnu. Příklad mnohonásobného porovnání odrůd je znázorněn na obr. 3. Odrůda lnu Amon (vlevo) se v charakteristice Area (plocha) statisticky významně ( $\alpha = 0,05$ ) liší od ostatních odrůd, odrůda hrachu Bohatýr se ve znaku plocha statisticky významně ( $\alpha = 0,05$ ) liší od odrůd Janus, Zekon a Romeo, Alan, Herold a Smaragd, ne však od odrůdy Tyrkys. Lze tedy předpokládat, že i v širším souboru odrůd lze detegovat pomocí zvoleného přístupu statisticky průkazné rozdíly mezi odrůdami a vytvořit určitý systém shluků<sup>14</sup>, ke kterým se odrůdy budou přiřazovat.

Tabulka III

Semena hrachu a lnu, měřené tvarové a velikostní charakteristiky získané ze skenovacího systému. Plocha (mm<sup>2</sup>) semene kalibrovaná skutečnou velikostí na 1 px (velikost obrazové jednotky) = 0,08  $\mu\text{m}/\text{px}$ . Statisticky průkazně odlišné skupiny odrůd na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (ANOVA, mnohonásobné porovnávání)

Hrách	Plocha	Ekvivalentní průměr	Obvod	Maximální Feretův průměr	Minimální Feretův průměr	Kruhovitost	Protáhlost
Alan	55,91 <sup>b</sup>	8,416 <sup>b</sup>	26,69 <sup>b</sup>	8,85 <sup>b</sup>	8,040 <sup>b</sup>	0,982 <sup>ab</sup>	1,101 <sup>b</sup>
Bohatýr	45,81 <sup>a</sup>	7,626 <sup>a</sup>	24,13 <sup>a</sup>	7,96 <sup>a</sup>	7,347 <sup>a</sup>	0,986 <sup>a</sup>	1,084 <sup>a</sup>
Herold	48,42 <sup>b</sup>	8,406 <sup>b</sup>	26,66 <sup>b</sup>	8,85 <sup>b</sup>	8,030 <sup>b</sup>	0,981 <sup>ab</sup>	1,104 <sup>b</sup>
Janus	47,04 <sup>b</sup>	7,679 <sup>b</sup>	24,75 <sup>b</sup>	8,11 <sup>b</sup>	7,317 <sup>b</sup>	0,951 <sup>b</sup>	1,109 <sup>b</sup>
Romeo	51,60 <sup>b</sup>	7,841 <sup>b</sup>	24,81 <sup>b</sup>	8,23 <sup>b</sup>	7,506 <sup>b</sup>	0,986 <sup>b</sup>	1,098 <sup>b</sup>
Smaragd	50,70 <sup>b</sup>	7,788 <sup>b</sup>	25,17 <sup>b</sup>	8,22 <sup>b</sup>	7,476 <sup>b</sup>	0,950 <sup>ab</sup>	1,100 <sup>b</sup>
Tyrkys	46,46 <sup>ab</sup>	8,093 <sup>ab</sup>	25,82 <sup>b</sup>	8,58 <sup>b</sup>	7,676 <sup>ab</sup>	0,971 <sup>b</sup>	1,119 <sup>b</sup>
Zekon	47,78 <sup>b</sup>	8,022 <sup>b</sup>	25,43 <sup>b</sup>	8,47 <sup>b</sup>	7,636 <sup>b</sup>	0,983 <sup>b</sup>	1,110 <sup>b</sup>
Len	Plocha	Ekvivalentní průměr	Obvod	Maximální Feretův průměr	Minimální Feretův průměr	Kruhovitost	Protáhlost
Amon	8,01 <sup>a</sup>	3,192 <sup>a</sup>	11,19 <sup>a</sup>	4,586 <sup>a</sup>	2,339 <sup>a</sup>	0,804 <sup>a</sup>	1,963 <sup>a</sup>
Bonet	7,42 <sup>b</sup>	3,056 <sup>b</sup>	12,03 <sup>a</sup>	4,815 <sup>a</sup>	2,267 <sup>b</sup>	0,756 <sup>b</sup>	2,065 <sup>ab</sup>
Jantar	9,34 <sup>b</sup>	3,446 <sup>b</sup>	12,08 <sup>a</sup>	4,953 <sup>a</sup>	2,518 <sup>b</sup>	0,803 <sup>ab</sup>	1,969 <sup>ab</sup>
Jitka	7,37 <sup>b</sup>	3,062 <sup>b</sup>	10,58 <sup>a</sup>	4,164 <sup>a</sup>	2,399 <sup>b</sup>	0,828 <sup>b</sup>	1,738 <sup>b</sup>
Lola	8,76 <sup>b</sup>	3,337 <sup>b</sup>	11,85 <sup>a</sup>	4,731 <sup>a</sup>	2,522 <sup>b</sup>	0,785 <sup>b</sup>	1,879 <sup>ab</sup>
Marylin	7,83 <sup>b</sup>	3,156 <sup>b</sup>	11,37 <sup>a</sup>	4,472 <sup>a</sup>	2,393 <sup>b</sup>	0,771 <sup>b</sup>	1,874 <sup>ab</sup>
Rina	7,04 <sup>b</sup>	2,992 <sup>b</sup>	10,27 <sup>a</sup>	4,125 <sup>a</sup>	2,299 <sup>b</sup>	0,840 <sup>b</sup>	1,799 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup> Symbol a resp. b značí příslušnost konkrétní odrůdy do skupiny a resp. b dané na základě párového porovnání odrůd. Skupiny a a b nejsou vždy disjunktní



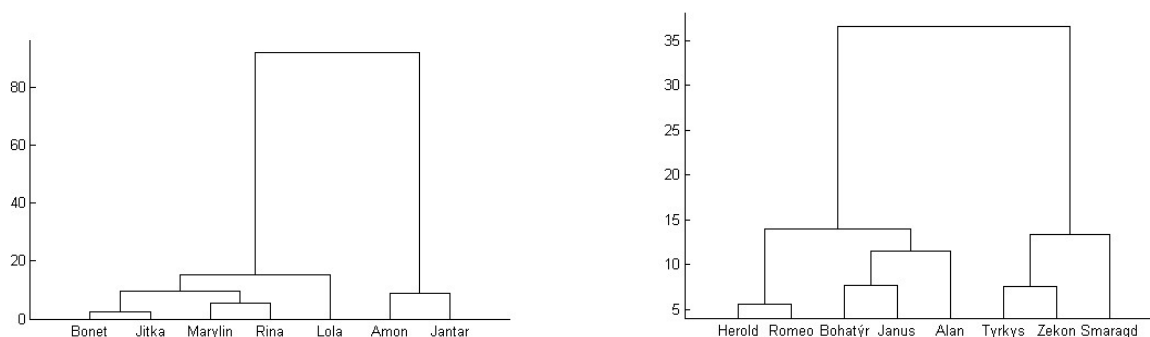
Obr. 3. Příklady statistického hodnocení parametru plocha; pro len (vlevo) odrůda Amon statisticky významně odlišná v parametru plocha od ostatních odrůd, pro hrách (vpravo) odrůda Bohatýr odlišná od 6 odrůd, pro odrůdu Tyrkys není v tomto parametru rozdíl od odrůdy Bohatýr statisticky významný

#### Hodnocení barevnosti semen – tvorba barevných kalibračních řad

Pro detailnější hodnocení semen je vyžadována metoda hodnocení měřených charakteristik pro barevnost (viz kapitola Materiál a metody). Podle vyhlášky č.329/1997 Sb. (zákon č. 110 Ministerstva zemědělství ČR) je barevnost semen hrachu rozdělena do dvou kategorií na žlutý (hnědožlutý, oranžový a žlutý) a zelený (světlezelený, olivový, zelený) hrách. U lnu byly stanoveny 4 odlišné skupiny – světle, středně a tmavě hnědé lny a žluté lny – obdobně definované i jinými barevnými stupnicemi analyzovány pomocí DOA (cit.<sup>13</sup>). Existuje i významnější variabilita v barevných odstínech semen, než je v současnosti používáno. Proto na základě existujících morfologických klasifikátorů<sup>15</sup> (příručka pro len) byly vybrány standardní odrůdy, které byly použity k získání typického „kalibračního“ semenného standardu (obr. 1b,d). Bylo postupováno tak, že pro cca 100 semen vybrané odrůdy byly zjištěny charakteristiky L,a,b, a z těchto hodnot byl

vypočítán průměr a semeno, které mělo nejbližší hodnotu průměru (stanoveno přes nejnižší  $\Delta E_{a,b}$ ), bylo vybráno jako barevný standard. Pro hrách byly definovány tyto barevné standardy: světležlutý (1), žltorůžový (2), voskový (3), žlutozelený (4), tmavězelený (5), šedozelelý (6), světlehnědý (7), hnědý (8), černý (9). Pro len byly definovány tyto barevné markery: žlutý (1), olivový (2), světle hnědý (3), vícebarevný (4), hnědý (5), černohnědý (6), tmavěhnědý (7). V případě lnu bylo pro tento postup upuštěno od vícebarevné kategorie (plochy žluté a plochy hnědé) vzhledem k nejednoznačnému výsledku (žlutohnědý odstín blízký markeru č. 3 nebo 5). Prostřednictvím obrazové analýzy lze velice přesně přiřadit vzorek k barevnému standardu, v případě pochybností o barevnosti semen by pak tento postup dokázal rozhodnout o příslušnosti k barevnému markeru.

Na základě 17 sledovaných charakteristik semen byl vytvořen souhrnný dendrogram (obr. 4). Pro len dendrogram naznačil 2 shluky: žlutosemenné (Amon, Jantar) a ostatní hnědosemenné odrůdy (Bonet, Jitka, Marylin,



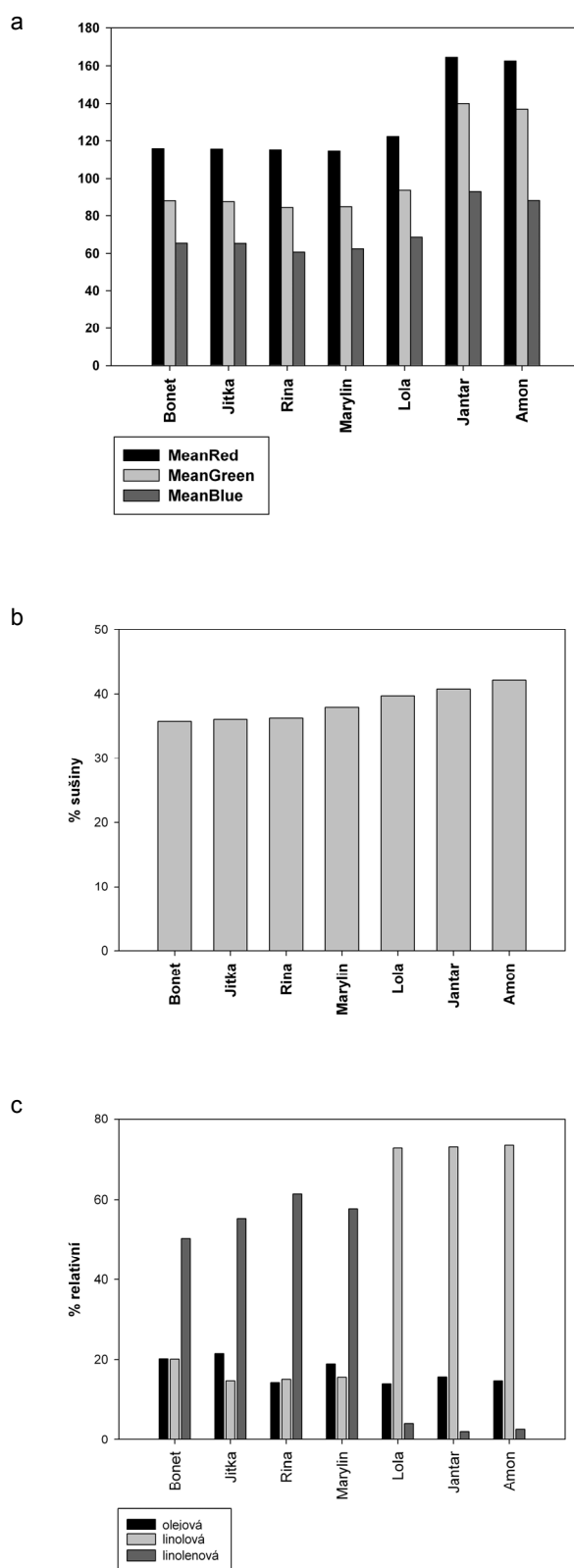
Obr. 4. Výsledné dendrogramy zkonstruované ze 17 parametrů; pro len (vlevo) a pro hrách (vpravo) byly vytvořeny 2 hlavní shluky odpovídající barevné charakteristice semen; osa y – vzdálenost mezi objekty

Rina, Lola). Pro hrách byly stanoveny 2 odlišné shluky: zelenosemenné (Tyrkys, Zekon, Smaragd) a ostatní žlutosemenné odrůdy (Herold, Romeo, Bohatýr, Janus, Alan). Obdobné zpracování dat do 7 shluků vytvořených pro 53 odrůd<sup>9</sup> podporuje náš postup pro výběr tzv. standardních odrůd, představujících extrémně odlišné odrůdy.

Barevná charakteristika semen je významným odlišovacím znakem. Následné hodnocení ostatních parametrů může mít význam v případě odrůd se shodnou barevností semen. Třídění semen na základě barevnosti může vycházet z poměrové hodnoty tří barevných kanálů R,G,B (cit.<sup>10</sup>). Například odrůdy Bonet a Lola jsou definovány jako středně hnědý len. Statistická analýza dat párovým t-testem však potvrdila významné rozdíly mezi středně hnědými odrůdami Bonet a Lola. Byl zjištěn významný rozdíl v obsahu linolenové kyseliny a také byl prokázán statisticky významný rozdíl ( $\alpha = 0,05$ ) ve sledovaných kvantitativních parametrech (plocha, kruhovitost, ekvivalentní průměr, Minimální Feretův průměr). Pro objektivní posuzování odrůd má rozhodující význam i řada faktorů jako lokalita, ročník, velikost vzorku, zdravotní stav semen, apod. Proto je nutné analyzovat data minimálně ze 3 nezávislých lokalit a 3 ročníků<sup>9</sup>, aby metoda bylo možné považovat za objektivní. Významnými faktory změn hodnot parametrů se mohou také jevit ročník (kvalita semen), podmínky skladování, zrání a stáří semen, testované např. na klíčivosti semen digitální technologií<sup>7</sup> nebo změna tvaru semen rýže při obroušování<sup>9</sup>. V této studii byla vypočtena odchylka  $\Delta E_{a,b}$  pro 3 ročníky (2005; 2007; 2008) a hnědou odrůdu lnu setého (5) Marylin: 3,467; 3,656; 3,837. Vliv ročníku na barvu semen se zdá být minimální, přesto je z tohoto pohledu vhodné vytvořit přepočítávací koeficient, který by mohl vliv ročníku odfiltrovat pro všechny odrůdy najednou. Touto problematikou se budeme zabývat v budoucnu. K úplné charakteristice odrůdy bude nutné posuzovat výsledky hodnocení obou skupin parametrů, kvantitativních (Area, EqDiameter atd.) i kvalitativních parametrů (L,a,b). Statistické zpracování dat prováděné výpočetním systémem (MATLAB R2009a) je funkčním a rychlým zautomatizováním celého procesu a může být právem pokládáno za technologickou jednotku využitelnou k charakterizaci a posuzování pravosti odrůd v kolekcích.

#### Korelace s vybranými obsahovými látkami semen

Nejen výživa, ale i barevná charakteristika semen, je spojena s vitalitou klíčení semen<sup>16</sup>. U lnu jsou všechna semena na jedné rostlině stejná, i když embrya se mohou lišit v obsahu mastných kyselin. Barevnost semen hrachu je dána obsahem pigmentů v dělohách embrya, protože osemení je průsvitné. Z výsledků je patrné, že barevnost semen by mohla vypovídat i o případné změně chemického složení semen (obr. 5), popřípadě by mohla být zjištěna statisticky významná korelace hodnot mezi některým z parametrů a obsahem látek v semenech. Test byl realizován pomocí p-hodnoty. Byla zjištěna statisticky významná korelace obsahu tuku v semenech lnu s veličinami EqDiameter ( $p=0,045$ ), MeanRed ( $p=0,013$ ), MeanGreen



Obr. 5. Grafické zhodnocení průměrných hodnot 3 barevných kanálů MeanRed, MeanGreen, MeanBlue (a), obsah tuku (b) a mastných kyselin (c) u sledovaných odrůd lnu setého

( $p=0,014$ ), MeanBlue ( $p=0,018$ ), HueTypical ( $p=0,021$ ), L ( $p=0,012$ ), a ( $p=0,015$ ), b ( $p=0,017$ ). Vztah mezi parametry a obsahem škrobu v semenech hrachu nebyl potvrzen. Předpokládá se, že u jiných obsahových složek, např. u obsahu karotenoidů, by statisticky významné korelace měly existovat a že by mohl být v budoucnu vypracován optický kalibrační systém pro osiva jako reference k analytickým metodám (<http://biometris.wur.nl> Wageningen). Pokud bude třeba kvalitně a spolehlivě analyzovat celé soubory odrůd v kolekcích, je nutné provést ucelenější statistické analýzy, které by pracovaly se soubory obsahujícími mnohonásobně více dat. V této studii je jen na omezeném počtu odrůd a vybraných obsahových složkách testován postup pro vyhodnocení dat.

Popsaná metodika zpracování digitálních snímků semen, pořízených na skeneru a makrosnímácím systému, poskytuje základní údaje o charakteristice semen, o jejich barvě, tvaru a velikosti. Uvedená metodika pořizování obrazových dat v kombinaci s metodami statistického hodnocení dává možnost objektivně hodnotit početné kolekce odrůd ve sbírkách významných kulturních plodin.

*Prezentované výsledky bylo možné získat za podpory projektu MŠMT č.: MSM2678424601.*

#### LITERATURA

1. Pavelek M., Smýkalová I., Vinklárková P.: Czech J. Gen. Plant Bree (přijato, 2010).
2. Diederichsen A., Fu Y.-B.: Genet. Resour. Crop Evol. 53, 77 (2006).
3. Draper S. R., Keefe P. D.: Plant Varieties Seeds 2, 53 (1989).
4. Shatadal P., Jayas D. S., Hehn J. L., Bulley N. R.: Can. Agricult. Eng. 37, 163 (1995).
5. Keefe P. D., Draper S. R.: Plant Varieties Seeds 1, 1 (1988).
6. Yoshioka Y., Ohsawa R.: J. Am. Soc. Sci. 131, 261 (2006).
7. De'Il Aquilla A.: Agron. Sustain. Dev. 28, 2 (2008).
8. Sakai N., Yonekawa S., Matsuzaki A.: J Food Eng. 27, 397 (1996).
9. Venora G., Grillo O., Shahin M. A., Symons S. J.: Food Res. Int. 40, 161 (2007).
10. Shanin M. A., Symons S. J.: Cereal Chem. 80, 285 (2003).
11. Shanin M. A., Symons S. J.: Can. Biosys. Eng. 43, 7.7 (2001).
12. De'Il Aquilla A.: Seed Sci. Technol. 34, 609 (2006).
13. Wiesnerová D., Wiesner I.: Comput. Electron. Agric. 61, 126 (2008).
14. Coles G. D.: J. Sci. Food Agric. 74, 435 (1997).
15. Pavelková A., Moravec J., Hájek D., Bareš I., Sehnalová J.: Genové Zdroje 32, 46 (1986).
16. West S. H., Harris E. C.: Crop Sci. 3, 190 (1963).

**I. Smýkalová<sup>a</sup>, J. Horáček<sup>a</sup>, M. Hýbl<sup>c</sup>, M. Pavelek<sup>b</sup>, M. Bjelková<sup>b</sup>, T. Krulíková<sup>c</sup>, and D. Hampel<sup>d</sup>**  
*(<sup>a</sup> Department of Biotechnology, <sup>b</sup> Department of Technical Crops, <sup>c</sup> Department of Grain Legumes, Agritec Plant Research, <sup>d</sup> National Plant Variety Office, Brno, <sup>e</sup> Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague): Seed Type Identification by Image Analysis – Correlation of Nutrients with Size, Shape and Colour Characteristics of Seeds*

Digital image analysis (DIA) has become a powerful technique for characterization and grading of plants in crops. DIA is utilized in determination of cultivar origin, detection of contaminants and in discrimination of new cultivars for registration purposes. Seed images, their digitization, segmentation and evaluation using special software enable rapid sorting of genotypes based on the measured size, shape and colour characteristics of seeds. In the study DIA was used for measurement of characteristics of small flax and large pea seeds followed by seed classification. The size and shape of seeds were evaluated from scanner images due to colour instability in scanning. Colour deviation calculated from the coordinates in colour space was used for colour classification of seeds. Some of the DIA data were correlated with fat nutrients in flax seeds.