

Методика микрофокусной рентгенографии для выявления скрытой дефектности семян древесных лесных пород и других видов сосудистых растений

© М.В. Архипов,^{1,5} Н.С. Прияткин,¹ Л.П. Гусакова,¹ А.В. Карамышева,² Л.П. Трофимук,³ Н.Н. Потрахов,⁴ В.Б. Бессонов,⁴ П.А. Щукина¹

¹ Агрофизический научно-исследовательский институт, 195220 Санкт-Петербург, Россия

² Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, 197376 Санкт-Петербург, Россия

³ Научно-опытная станция „Отрадное“ Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН, 188750 пос. Плодовое, Приозерский район, Ленинградская обл., Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет им. В.И. Ульянова (Ленина), 197376 Санкт-Петербург, Россия

⁵ Северо-Западный центр междисциплинарных проблем продовольственного обеспечения, 196608 Пушкин, Санкт-Петербург, Россия
e-mail: prini@mail.ru

Поступило в Редакцию 30 апреля 2019 г.

В окончательной редакции 30 апреля 2019 г.

Принято к публикации 29 июня 2019 г.

Приведены характеристики современных аппаратных решений, используемых для получения цифровых рентгеновских изображений семян. Описаны основные способы визуализации и приемы анализа цифровых рентгеновских изображений семян. Выявлены и проанализированы скрытые дефекты образцов семян исследуемых древесных лесных пород: сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* DuTour) и сосны кедровой корейской (*P. Koraiensis* Siebold & Zucc.), кукурузы сахарной (*Zeamays* L.), а также огурца посевного (*Cucumis sativum* L.) и перца овощного (*Capsicum annuum* L.) методом микрофокусной рентгенографии в сочетании с автоматическим анализом цифровых рентгеновских изображений. Показано, что пустозернистые и частично полнозернистые семена имеют пониженные значения показателя „Средняя яркость“ рентгенограмм. Проведена сравнительная оценка рентгеновских показателей и всхожести проростков как интегральных показателей для оценки биологической полноценности семян.

Ключевые слова: микрофокусная рентгенография семян, анализ изображений семян, посевные качества семян, семена древесных лесных пород, семена сельскохозяйственных культур.

DOI: 10.21883/JTF.2020.02.48830.178-19

Введение

Рентгеновский метод оценки качества семян подробно описан как в отечественной литературе [1,2], так и за рубежом [3–6]. С 1976 г. метод включен в международные и отечественные стандарты, в первую очередь по оценке зараженности и поврежденности зерна вредителями. С его помощью можно обнаруживать различные структурные дефекты семян, такие как трещиноватость, энзимомикозное истощение (ЭМИС), внутреннее прорастание, скрытая заселенность вредителями, повреждение клопом „вредная черепашка“, механические травмы и дефектность зародыша, пустозернистость. Методика может использоваться для семян, различных по плотности и размерам. Simak и Gustafsson в 1953 г. на базе метода рентгенографии разработали методику изучения внутреннего строения семян интродуцентов древесных пород с целью анализа полиэмбрионии зародышей, их индивидуальной и географической изменчивости, а также выбраковки пустых и поврежденных семян [7]. Kamra в 1976 г. показана эффективность рентгенографии для

выявления пустозернистости, скрытой поврежденности насекомыми, механических повреждений и других дефектов при исследовании семян тропических древесных лесных пород [8].

С появлением современных технических и программных средств в мировом семеноведении активно используются технологии компьютерного анализа изображений семян [9,10], в том числе денситометрического анализа цифровых рентгеновских изображений [5,11]. Например, с помощью автоматического анализа цифровых рентгеновских изображений семян древесных лесных пород стало возможным отделять жизнеспособные и нежизнеспособные семена хвойных пород на основании данных оптической плотности внутренних структур семени, а также определять их анатомическую зрелость [12].

Показательным представляется проведение рентгеновского анализа семян, за которым следует стандартный тест на энергию прорастания и всхожесть (ГОСТ 12038-84), тем более что после съемки семян в мягколучевом рентгене они полностью сохраняют свою жизнеспособность [13,14]. Ф.Б. Мусаевым с соавторами (2016)

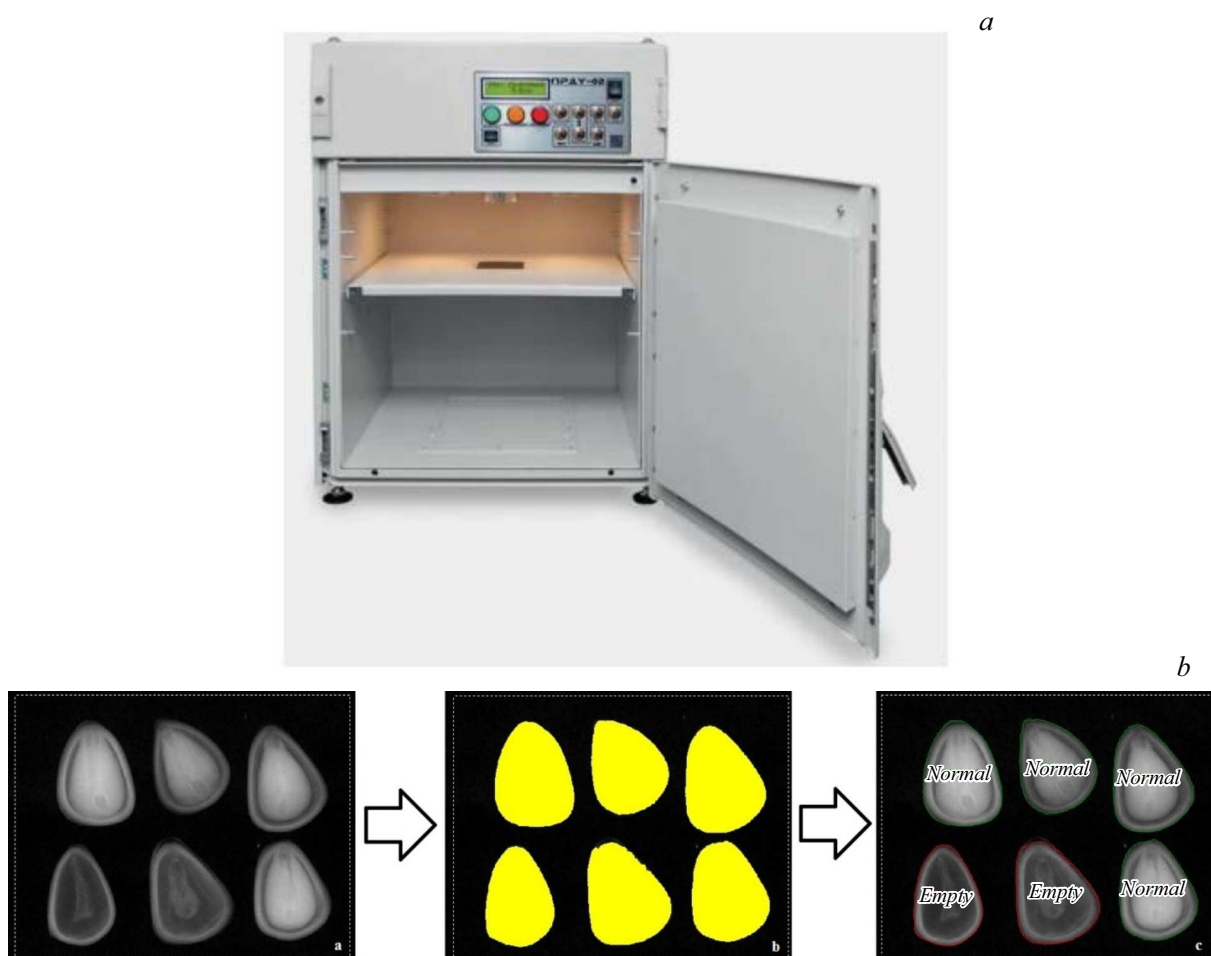


Рис. 1. Рентгенодиагностическая установка ПРДУ-02 (а) с универсальным программным обеспечением ARGUS-BIO (b) для анализа цифровых рентгеновских изображений семян.

детально изучена взаимосвязь ростовых показателей семян овощных культур и их скрытой дефектности, оцениваемой по рентгеновским снимкам [2]. Т.А. АITurki (2017) при сопряженном исследовании всхожести и рентгеновских изображений семян нескольких видов древесных лесных пород Саудовской Аравии показана высокая эффективность рентгенографии при выявлении недоразвитости эндосперма [15].

В Агрофизическом институте ведется многолетняя работа по исследованию скрытой дефектности семян различных видов сельскохозяйственных растений. Получены результаты как при использовании „длечной“ [16] технологии, так и микрофокусной рентгенографии в цифровом исполнении [1]. В последние годы показана информативность автоматического анализа цифровых рентгеновских изображений образцов зерновок пшеницы и ячменя, полученных в результате диэлектрической сепарации исследуемых партий зерна [17], семян кукурузы с дефектами биогенного происхождения [18], желудей дуба черешчатого для обнаружения микротрещин и энзимомикозного истощения [19].

Целью настоящей работы было рассмотрение методики микрофокусной рентгенографии и приемов автоматического анализа цифровых рентгеновских изображений для выявления скрытой дефектности семян древесных лесных пород и других видов сосудистых растений.

Основные задачи настоящей работы включают в себя рассмотрение следующих вопросов:

- характеристики современных аппаратных решений, используемых для получения цифровых рентгеновских и компьютерных микротомографических изображений семян;
- обсуждение основных способов визуализации и приемов анализа цифровых рентгеновских изображений семян;
- сравнительная оценка рентгеновских показателей и всхожести проростков как интегральных показателей для оценки биологической полноценности семян.

Основная часть

Объектами исследований служили семена сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* DuTour) и сосны кедр-

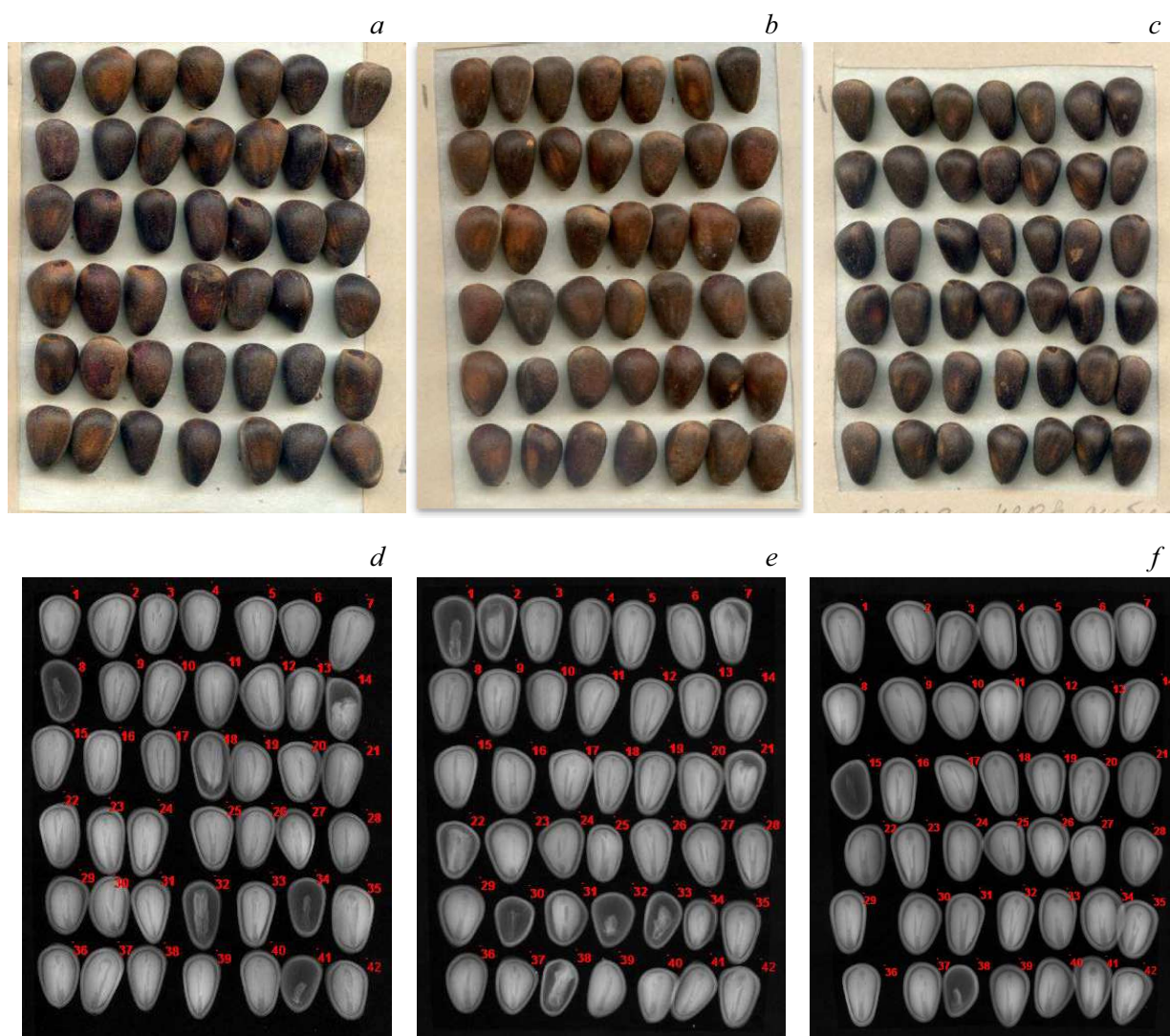


Рис. 2. Цифровые сканированные (*a, b*) и рентгеновские (*c, d*) изображения *Pinussibirica*, происхождение — Новосибирск (*a, b, d, e*) и Республика Тыва (*c, f*).

ровой корейской (*P. Koraiensis* Siebold & Zucc.) из Новосибирска и Республики Тыва, кукурузы сахарной (*Zea mays* L.), огурца посевного (*Cucumis sativus* L.) и перца овощного (*Capsicum annuum* L.).

Для расположения семян в нужной для рентген-съемки позиции были использованы специальные карточки, изготавливаемые из тонкой клеящейся ленты на бумажной или целлофановой основе. Вследствие малых размеров и низкой плотности семян важны толщина ленты, тип клея и равномерность его нанесения. Карточки усиливаются рамками, вырезанными из картона толщиной 2–3 мм.

Для реализации метода микрофокусной съемки семян специалистами Агрофизического научно-исследовательского института и Санкт-Петербургского государственного электротехнического университета „ЛЭТИ“ им. В.И. Ульянова (Ленина) был разработан совместно аппаратно-программный комплекс на осно-

ве передвижной рентгенодиагностической установки ПРДУ-02 для контроля качества семян и зерна; организация-разработчик и предприятие-изготовитель: ЗАО „ЭЛТЕХ-Мед“, Санкт-Петербург, Россия [20]. В состав установки ПРДУ-02 (рис. 1, *a*) входят: рентгенозащитная камера для проведения рентгенографических работ; источник рентгеновского излучения моноблочного типа РАП70М-0,1Н-1; приемник рентгеновского изображения на основе многофункционального портативного плоско-панельного детектора для цифровой рентгенографии; управляющая рабочая станция с универсальным программным обеспечением (рис. 1, *b*) для анализа цифровых рентгеновских изображений семян. Коэффициент увеличения изображения составлял $3.0\times$ для рентгеновской съемки.

Программная обработка цифровых изображений семян осуществлялась в программе ARGUS-BIO. Анализируются параметры „средняя яркость“, „минимальная

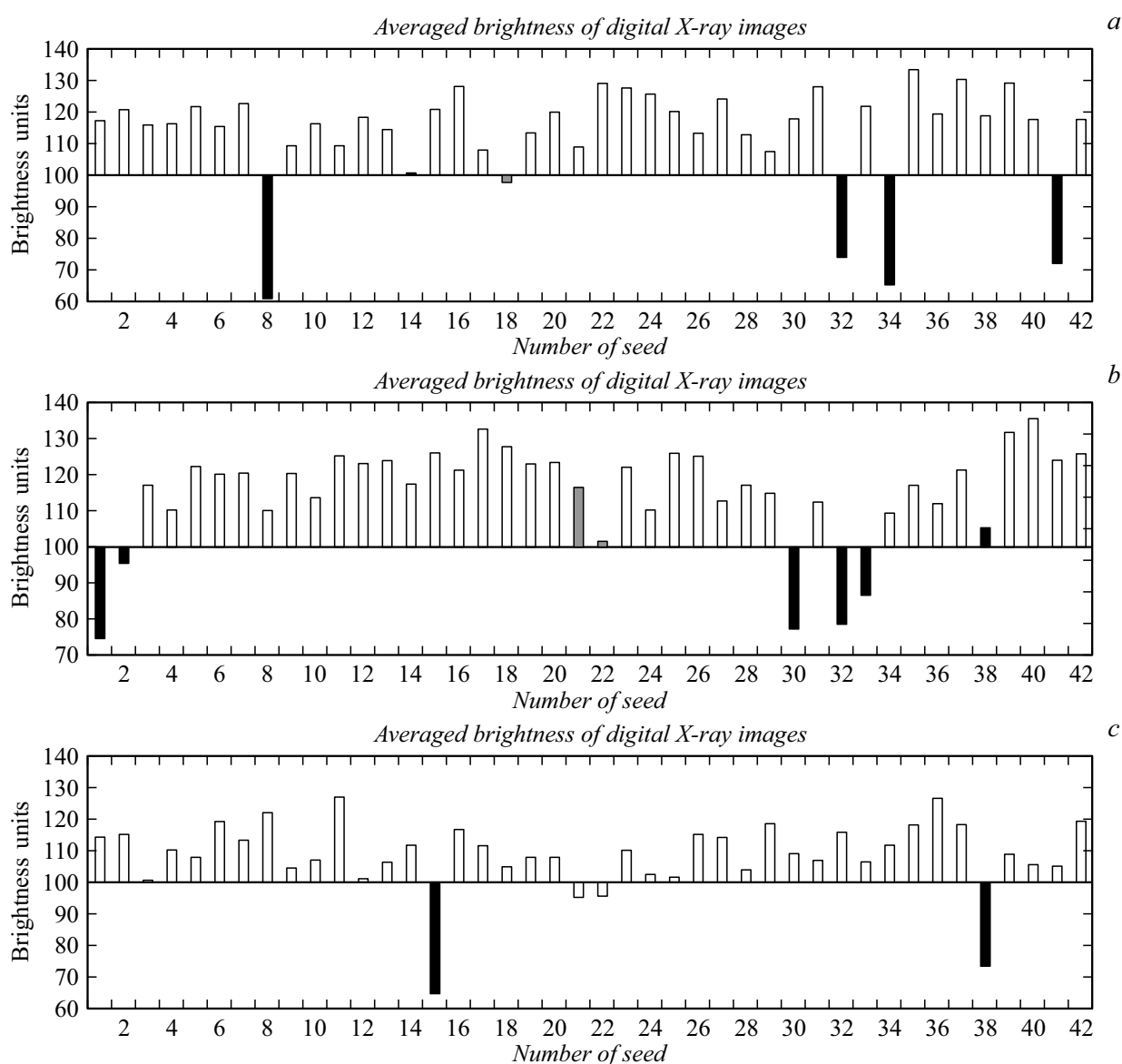


Рис. 3. Средняя яркость цифровых рентгеновских изображений семян сосны кедровой сибирской: *a* — образец № 1, *b* — образец № 2 (происхождение Новосибирск), *c* — образец происхождения Республика Тыва. Столбы белого цвета (класс А) — нормальные (полнозернистые семена), серого (класс В) — частично пустозернистые, черного (класс С) — пустозернистые невыполненные семена.

яркость“, единицы яркости, яркостные разрезы [21], размерные и яркостные параметры отдельных структур и органов семени.

Масса индивидуальных семян оценивалась с использованием лабораторных весов ВЛТЭ-150 с точностью 0.001 g.

Цифровые сканированные и рентгеновские изображения *Pinus sibirica* представлены на рис. 2, результаты исследований цифровых рентгеновских изображений сосны кедровой сибирской — на рис. 3).

Данные, представленные на рис. 3, показывают, что при пороговом значении средней яркости 100 единиц яркости возможно отделить пустозернистые и нормальные семена.

Результаты исследований веса индивидуальных семян сосны кедровой сибирской представлены на рис. 4.

Результаты сравнения эффективности методик микрофокусной рентгенографии в сочетании с анализом цифровых рентгеновских изображений и измерений веса индивидуальных семян по данным анализа семян сосны кедровой сибирской представлены в табл. 1.

Согласно нашим исследованиям, на выбранных образцах оба метода показали высокую эффективность (> 90%) точности при выявлении невыполненных семян сосны кедровой сибирской и среднюю степень точности (50%) — невыполненных семян этого вида (табл. 1).

На рис. 5 представлен пример дифференцированного анализа цифровых рентгеновских изображений семян

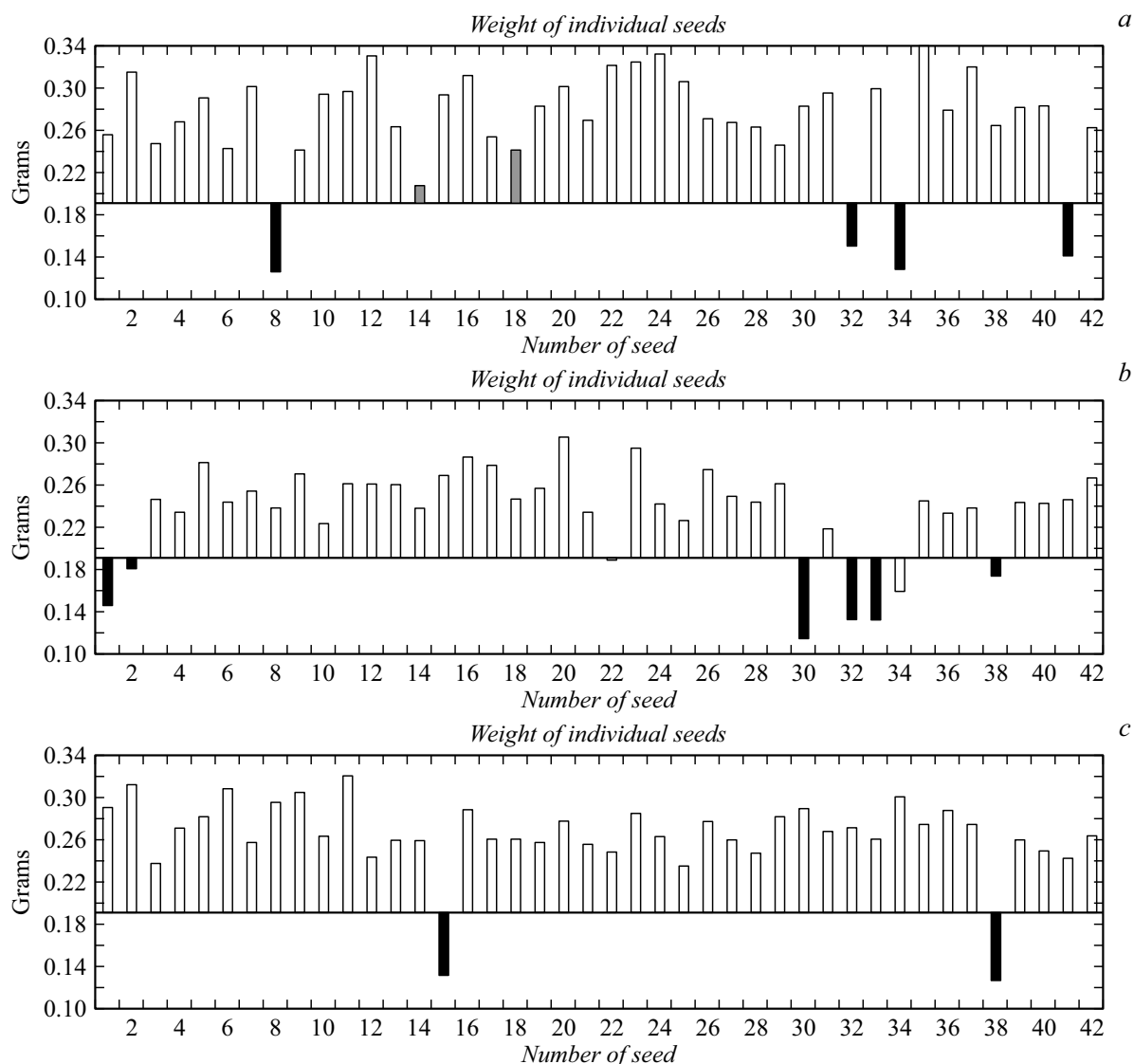


Рис. 4. Вес индивидуальных семян сосны кедровой сибирской: *a* — образец № 1, *b* — образец № 2 (происхождение Новосибирск), *c* — образец происхождения Республика Тыва. Столбцы белого цвета (класс А) — нормальные (полнозернистые семена), серого (класс В) — частично пустозернистые, черного (класс С) — пустозернистые невыполненные семена.

Таблица 1. Результаты сравнения эффективности методик микрофокусной рентгенографии в сочетании с анализом цифровых рентгеновских изображений и измерений веса индивидуальных семян

Классы объектов	Количество объектов	Точность, % / Погрешность, %	
		Рентгенография + анализ изображений	Вес индивидуальных семян
А	110	98/2	99/1
В	4	50/50	50/50
С	12	92/8	00/0
Всего объектов	126	—	—

сосны кедровой корейской: семя № 1, имеющее скрытые дефекты внутренней структуры, и семя № 2 — без скрытых дефектов. По нанесенным контурам в программе автоматически производятся геометрические и денситометрические измерения.

Основные характеристики, полученные по результатам дифференцированных измерений цифровых рентгеновских изображений семян, приведены в табл. 2.

Данные табл. 2 иллюстрируют разницу размерных и яркостных характеристик отдельных структур и орга-

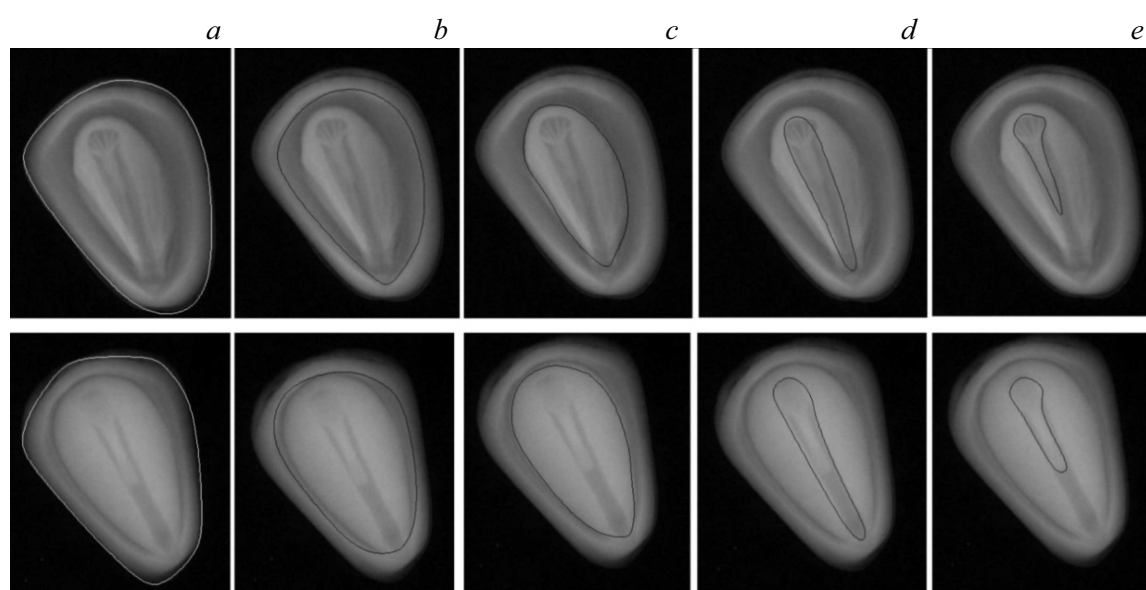


Рис. 5. Пример программной обработки цифровых рентгеновских изображений семян сосны кедровой, выполняемой путем интерактивного нанесения нескольких контуров, соответствующих отдельным структурам и органам семени: *a* — внешний контур, соответствующий наружной оболочке (кожуре); *b* — внутренний контур кожуры; *c* — контур, соответствующий области эндосперма; *d* — контур, соответствующий области ложа; *e* — контур, соответствующий области зародыша. Верхний ряд — семя, имеющее дефектный зародыш и эндосперм; нижний ряд — семя без дефектов.

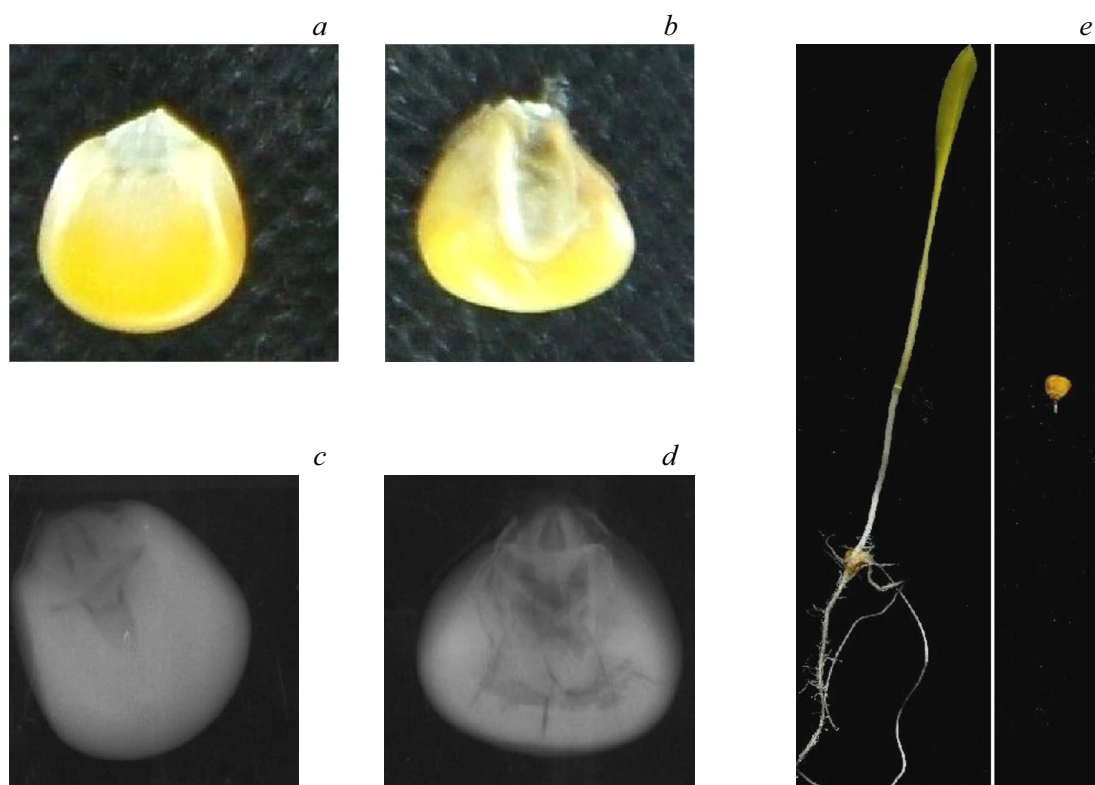


Рис. 6. Результаты рентгенографического анализа и сопряженного теста на проращивание семян кукурузы: цифровые сканированные изображения: *a* — нормальное семя, *b* — семя с дефектом биогенного происхождения (системное поражение инфекцией бактериальной этиологии), цифровые рентгеновские изображения: *c* — нормальное семя, *d* — семя с дефектом биогенного происхождения (системное поражение инфекцией бактериальной этиологии), *e* — результат проращивания нормального и дефектного семени.

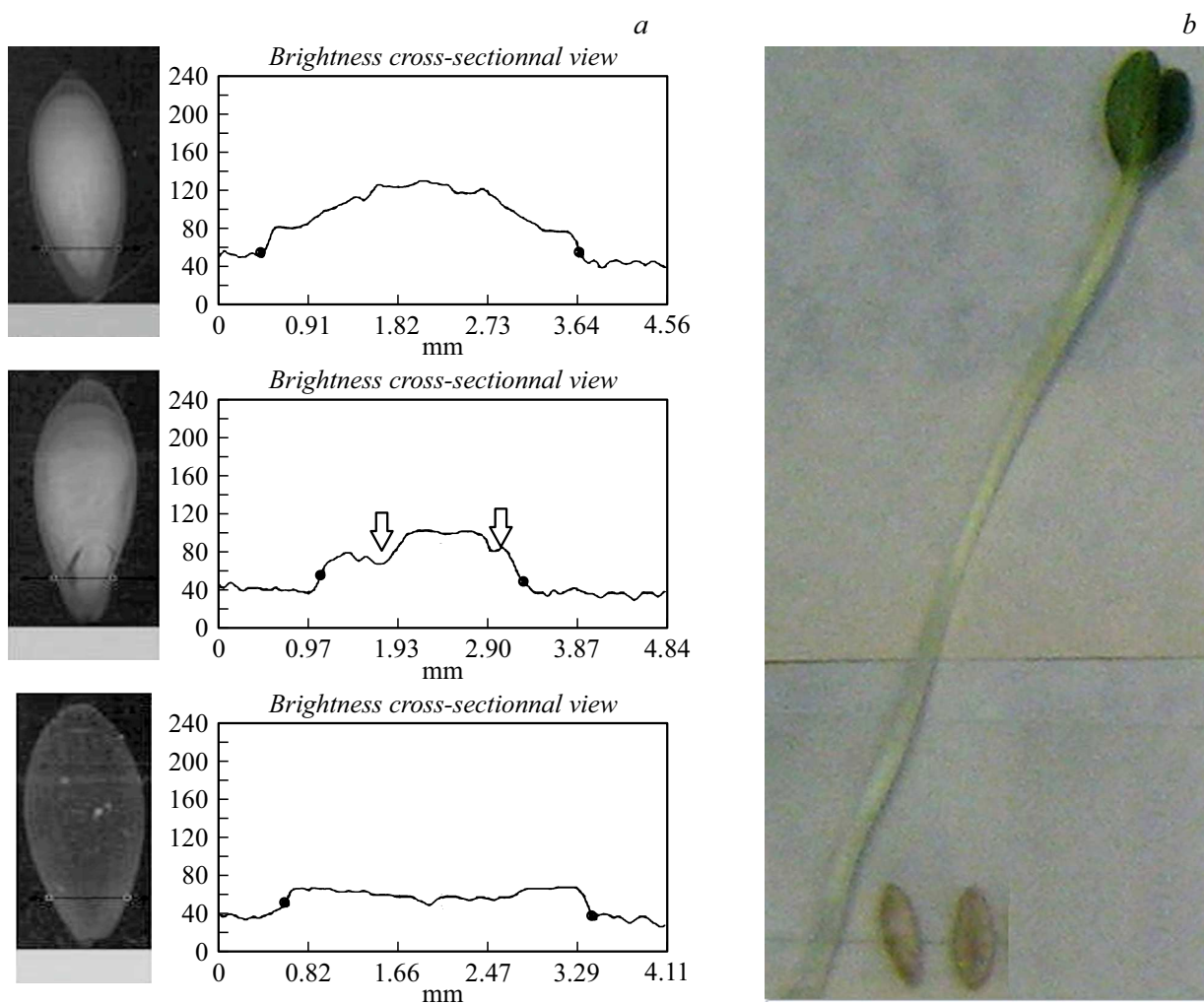


Рис. 7. Денситометрический анализ (яркостные разрезы) рентген-образов и результаты проращивания семян огурца: *a* — сверху слева — норма; в середине слева — дефекты семядолей, внизу слева — невыполненность; *b* — результаты теста на всхожесть.

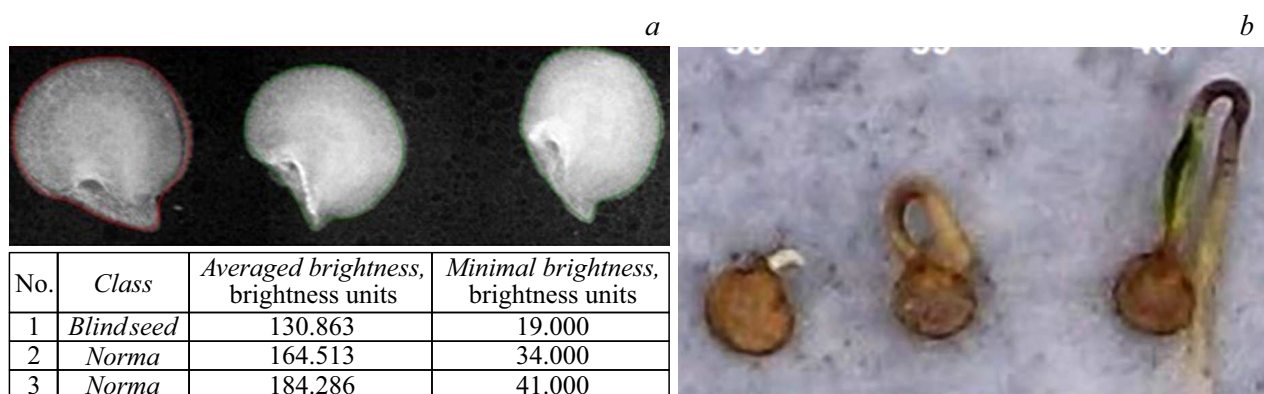


Рис. 8. Пример денситометрического анализа (*a*) (яркостные параметры) рентген-образов семян перца: невыполненность, близкая к норме, норма и результаты проращивания (*b*) семян перца — невыполненность, близкая к норме, норма.

нов семени. Аномалии развития зародыша могут быть объективированы через следующие характеристики: площадь проекции зародыша, mm^2 (снижена), отношение площадей проекции зародыша и проекции ложа, %

(снижена), относительная площадь проекции зародыша, % (снижена), фактор эллипса области проекции зародыша, относительные единицы (снижен), по сравнению с семенем с нормально развитым зародышем.

Таблица 2. Количественные характеристики отдельных структур и органов семян, полученные путем дифференцированного анализа цифровых рентгеновских изображений

№ п.п.	Показатель, единицы измерения	Значения показателей	
		Семя № 1	Семя № 2
1	Площадь проекции зародыша, мм ²	10.61	13.07
2	Средняя яркость проекции зародыша, единицы яркости	118.46	143.13
3	Отношение площадей проекции зародыша и проекции ложа, %	42.66	48.52
4	Относительная площадь проекции зародыша, %	5.32	7.00
5	Фактор эллипса области проекции зародыша, отн. ед.	0.865	0.929
6	Площадь проекции эндосперма, мм ²	44.31	65.20
7	Относительная площадь области эндосперма, %	34.67	49.37
8	Относительная площадь области отслоения оболочки, %	28.27	15.62

Результаты рентгенографического анализа и сопряженного теста на проращивание семян кукурузы представлены на рис. 6.

Согласно изображениям, представленным на рис. 6, дефектное семя характеризуется более темной рентген-проекцией по сравнению с нормальным семенем. При проращивании последнее в отличие от первого дало нормальный проросток.

Невыполненность семени огурца посевного показывает, что средняя яркость рентгенограмм понижена (54.853 единиц яркости) по сравнению нормальным семенем (113.578 единиц яркости). Семя с дефектом семядолей характеризуется промежуточным значением показателя средней яркости (99.989 единиц яркости) (рис. 7).

Яркостные разрезы демонстрируют степень неоднородности рентген-проекции семени огурца. Максимальная вариабельность кривой средней яркости просматривается на семени с дефектом семядолей (рис. 7, а). Рис. 7, б показывает, что проращивание семян подтверждает рентгенографический анализ. Семя с нормальным строением проросло, дефектные — нет.

Таким образом, яркостные параметры рентгеновских изображений позволяют характеризовать степень дефектности семян огурца.

Невыполненность семени перца овощного показывает, что средняя яркость рентгенограмм понижена (130.863 единиц яркости) по сравнению с нормальным семенем (184.286 единиц яркости), а также семенем по рентгенографическим характеристикам, близким к норме (средняя яркость 164.513 единиц яркости) (рис. 8, а). Максимальные ростовые показатели наблюдаются у семени с нормальным анатомическим строением, семя с пониженными значениями показателя „средняя яркость“ характеризуется минимальным ростовым потенциалом (рис. 8, б).

Таким образом, средняя яркость позволяет характеризовать степень дефектности семян перца.

На рентгеновском изображении (проекции) нормального семени присутствуют затемнения регулярного, ожидаемого характера. Такие затемнения, как и темные линии границ деталей зародыша, называемые регуляр-

ными, непременно присутствуют на проекциях нормального семени. Нерегулярные затемнения, например, наблюдаемые в каком-либо месте того же корешка, говорят о локальной потере плотности этого органа, т.е. о его поврежденности, не позволяющей относить данное семя к полноценному, нормальному [2]. Классическими примерами нерегулярных затемнений могут служить дефекты биогенного происхождения, в частности, энзимомикозное истощение [22], поврежденность насекомыми [23] и дефекты, связанные с аномалиями развития семени (невыполненность) [2].

Проблема сопоставления рентгеновских и морфофизиологических характеристик проростков является сложной по ряду причин как технического, так и биологического свойства, а именно:

- цифровые рентгеновские изображения семян были получены только в одной (единственной) проекции. При изменении положения семени при рентген-съемке визуализация и соответственно количественная оценка дефекта может быть отличной от первоначальной [24];

- биологически полноценные семена также гетерогенны по показателям энергии прорастания, всхожести и силы роста, отражающим потенциальную продуктивность [25]. Причина такого разнообразия может быть связана, в частности, с различиями в морфологических признаках зародыша, которые могут быть идентифицированы как рентген-позитивные признаки [26].

В этом случае необходим количественный анализ цифровых рентгеновских изображений, с использованием методов классификации снимков [27,23].

Заключение

Представлена методика микрофокусной рентгенографии и приемы автоматического анализа цифровых рентгеновских изображений для выявления скрытой дефектности семян древесных лесных пород и других видов растений.

Приведены характеристики современных аппаратных решений, используемых для получения цифровых рентгеновских изображений семян.

Описаны основные способы визуализации и приемы анализа цифровых рентгеновских изображений семян. Выявлены и проанализированы скрытые дефекты образцов семян исследуемых древесных лесных пород, кукурузы сахарной, огурца посевного и перца овощного методом микрофокусной рентгенографии в сочетании с автоматическим анализом цифровых рентгеновских изображений. Показано, что пустозернистые и частично полнозернистые семена имеют пониженные значения показателя „средняя яркость“ рентгенограмм.

Проведена сравнительная оценка рентгеновских показателей и всхожести проростков как интегральных показателей для оценки биологической полноценности семян.

Представленные данные позволяют сделать заключение о том, что метод микрофокусной рентгенографии в сочетании с автоматическим анализом цифровых рентгеновских изображений может являться эффективным дополнительным инструментом для оперативного выявления дефектных семян древесных лесных пород и других видов растений и стать основой для создания промышленных сортировщиков (сепараторов) семян для нужд сельского и лесного семеноводства.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Архипов М.В., Потрахов Н.Н. Микрофокусная рентгенография растений. СПб.: Технолит, 2008. 192 с.
- [2] Мусаев Ф.Б., Потрахов Н.Н., Архипов М.В. Рентгенография семян овощных культур. СПб.: ЛЭТИ, 2016. 206 с.
- [3] Burg W.J., van der Jalink H., Zwol R.A., van Aartse J.W., Bino R.J. // *Acta Horticulturae*. 1995. Vol. 362. P. 149–157.
- [4] Moreira M.L. de, Aelst A.C. van, Eck J.W. van, Hoekstra F.A. // *Seed Science Research*. 1999. Vol. 9. P. 227–236.
- [5] Gomes-Junior F.G., Yagushi J.T., Belini U.L., Cicero S.M., Tomazello-Filho M. // *Seed Sci. Technol.* 2012. Vol. 40. N 1. P. 102–107.
- [6] Silva V.N., Cicero S.M., Bennett M. // *Seed Sci. Technol.* 2013. Vol. 41. N 2. P. 225–234.
- [7] Simak M., Gustafsson A. // *Hereditas*. 1953. N 3. P. 458–468.
- [8] Kamra S.K. // *Studia Forestalia Suecica*. 1976. N 131. P. 1–34.
- [9] Sandeep Varma V., Kanaka Durga K., Keshavulu K. // *A Rev. Intern. Res. J. Agricultural Sci.* 2013. Vol. 1. N 2. P. 30–36.
- [10] Kapadia V.N., Sasidharan N., Patil K. // *Adv. Biotechnol. Microbiol.* 2017. Vol. 7. N 2. P. 1–3. DOI: org/10.19080/AIBM.2017.07.555709.017
- [11] Мусаев Ф.Б. Научно-практические аспекты совершенствования контроля качества семян овощных культур. Автореф. канд. дис. М. 2018. 50 с.
- [12] Sahlen K., Bergsten U., Wiklund K. // *Seed Sci. Technol.* 1995. Vol. 23. P. 405–414.
- [13] ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести.
- [14] Zappala S., Helliwell J.R., Tracy S.R., Mairhofer S., Sturrock C.J., Pridmore T., Bennett M., Mooney S.J. // *PLOS ONE*. 2013. Vol. 8. N 6. P. 1–8. DOI: org/10.1371/journal.pone.0067250
- [15] Al Turki T.A., Baskin C.C. // *Saudi J. Biolog. Sci.* 2017. Vol. 24. P. 822–829.
- [16] Архипов М.В., Алексеева Д.И., Батыгин Н.Ф., Великанов Л.П., Гусакова Л.П., Дерунов И.В., Желудков А.Г., Николенко В.Ф., Никитина Л.И., Савин В.Н., Пономаренко Е.Н., Якушев В.П. Методика рентгенографии в земледелии и растениеводстве / Под ред. М.В. Архипова. М. 2001. 94 с.
- [17] Архипов М.В., Прияткин Н.С., Гусакова Л.П., Потрахов Н.Н., Дмитриев С.В. // *Агрофизика*. 2018. № 3. С. 38–42. DOI: 10.25695/AGRPH.2018/03/07
- [18] Прияткин Н.С., Кузнецова Т.А., Кузнецова М.А., Гусакова Л.П., Пищик В.Н. Исследование интроскопических характеристик и ростовых показателей образцов зерен кукурузы с использованием инструментальных физических и стандартных методов для оценки их посевных качества и степени фитосанитарных рисков. Неделя науки СПбПУ: материалы научн. конф. с международ. участием. Высшая школа биотехнологий и пищевых технологий. СПб.: Изд-во Политех. ун-та, 2017. С. 128–131.
- [19] Прияткин Н.С., Архипов М.В., Гусакова Л.П., Шабунин Д.С., Бутенко О.Ю., Бойцов А.А., Потрахов Н.Н., Староверов Н.Е., Саввина К.А. // *Тр. Санкт-Петербургского НИИ Лесного хозяйства*. 2018. № 2. С. 4–17. DOI: 10.21178/2079-6080.2018.1.4
- [20] Архипов М.В., Демьянчук А.М., Великанов Л.П., Потрахов Н.Н., Грязнов А.Ю., Потрахов Е.Н. Устройство для рентгенодиагностических исследований зерна и семян. Пат. РФ № 85292, МПК А01С 1/02. Заявлено Бюл. № 22. 10.08.2009.
- [21] Пантелеев В.Г., Егорова О.В., Клыкова Е.И. Компьютерная микроскопия. М.: Техносфера, 2005. 303 с.
- [22] Темирбекова С.К. О проблеме энзимо-микозного истощения семян („истеканий“ зерна) в растениеводстве. М.: Россельхозакадемия, 1998. 306 с.
- [23] Прияткин Н.С., Архипов М.В., Гусакова Л.П., Бойцов А.А., Потрахов Н.Н., Староверов Н.Е., Шукина П.А., Капусткина А.В. // *Изв. СПб ГЭТУ ЛЭТИ*. 2018. № 6. С. 60–67.
- [24] Grundas S., Velikanov L., Archipov M. // *Int. Agrophysics*. 1999. Vol. 13. P. 355–361.
- [25] Савин В.Н., Архипов М.В., Баденко А.Л., Иоффе Ю.К., Грун Л.Б. // *Вестник сельскохоз. науки*. 1981. № 10. С. 99–104.
- [26] Дерунов И.В. Рентгенографическое исследование семян различных сельскохозяйственных культур и продуктов их переработки. Автореф. канд. дис. СПб. 2004. 22 с.
- [27] Narvankara D.S., Singha C.B., Jayasa D.S., White N.D.G. // *Biosystems Engineering*. 2009. Vol. 103. P. 49–56.