

УДК 631.547:581.19:633.521

С. В. Кубрак, мл. науч. сотрудник (ИГиЦ НАН Беларуси);
Т. В. Никитинская, мл. науч. сотрудник (ИГиЦ НАН Беларуси);
Л. В. Ивашко, ст. науч. сотрудник (Институт льна); В. Г. Лугин, директор Центра ФХМИ (БГТУ);
В. Н. Леонтьев, доцент (БГТУ); В. В. Титок, директор (ЦБС НАН Беларуси)

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕЛЕКЦИОННОЙ ЦЕННОСТИ СОРТООБРАЗЦОВ ЛЬНА КУЛЬТУРНОГО (*LINUM USITATISSIMUM* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЬЮТЕРНОЙ МОРФОМЕТРИИ

Исследованы метрические характеристики элементарных волокон 17 сортов льна культурного. Компьютерный анализ изображений, полученных при электронной микроскопии образцов волокна, эффективен для идентификации количественных морфологических различий, а также удобен для сравнительного анализа и скрининга уникальных генотипов. На основе анатомо-морфологических показателей стебля и волокна из анализируемой коллекции выделены сорта льна культурного, обладающие высокими хозяйственно-ценными признаками, которые станут основой для создания новых сортов льна-долгунца.

The article concerns the study on metric characteristics of elementary fibers in 17 common flax cultivars. Computer analysis of images, obtained by electron microscopy of fiber specimens is effective for identification of quantitative morphologic differences as well as convenient for comparative analysis and screening of unique genotypes. On the basis of anatomical and morphological characteristics of the stem and the fibers were isolated samples of flax with high economic-valuable characteristics, which will be a source for creating new varieties of flax.

Ведение. «Чистейшее из растений, один из самых лучших плодов земли» – так характеризовали лен римские историки. В зависимости от технологической обработки изо льна можно изготавливать любые ткани: от брезента до тончайшего батиста [1]. Технические ткани используются в автомобильной, авиационной, резиновой, обувной и многих других отраслях промышленности [2, 3]. Льняные ткани хорошо противостоят гниению и медленно изнашиваются. При повышении влажности прочность льняной ткани увеличивается, что очень важно в промышленности. Льняная пряжа значительно прочнее хлопчатобумажной и шерстяной, уступает по прочности только шелку и волокну рами [1].

Качество льняного волокна определяется морфологической и анатомической структурой льняных стеблей и зависит от почвенно-климатических условий, сорта, технологии возделывания и первичной обработки льна [4].

В последнее время в морфологии стал преобладать количественный подход в анализе как гистологических, так и электронно-микроскопических препаратов. Традиционные визуальные исследования количественных морфологических и анатомических признаков обладают меньшей надежностью при получении первичной информации в связи с ограниченными возможностями человеческого глаза, в то время как программы-анализаторы изображений обладают большей точностью и объективностью, и, соответственно, лучше определяют идентичность сорта и его индивидуальность на фоне всего генофонда.

Современные компьютерные анализаторы позволяют получить точную количественную

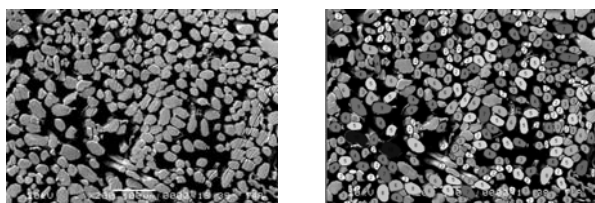
информацию по десяткам и сотням объектов изображения за доли секунды, что далеко превосходит возможности человека [5]. Предлагаемый разными фирмами-производителями набор параметров варьирует, но в любом случае измеряемые параметры могут быть сгруппированы следующим образом: площадные (площадь и периметр); размерные (диаметр, хорда, габарит, длина, ширина и др.); описывающие форму (фактор формы, округлость, удлиненность и др.); характеризующие положение и ориентацию объектов (координаты X и Y, направление и др.); денситометрические или оптические (яркость, оптическая плотность и др.). Как правило, набор параметров объектов, измеряемых с помощью анализатора, достаточно широк, и пользователь всегда имеет возможность выбрать только те измерения, которые необходимы.

Цель: на основе анатомо-морфологических показателей стебля и волокна выделить из анализируемой коллекции сорта льна культурного, обладающие высокими хозяйственно-ценными признаками, которые станут основой для создания новых сортов льна-долгунца.

Материал и методы. Материалом исследования служили 17 сортов льна-долгунца. Морфологические параметры оценивали по электронно-микроскопическим снимкам поперечных срезов пучков элементарных волокон. В качестве контроля использовали морфологические параметры сорта Блакит, который характеризуется высоким качеством волокна (рисунок).

При анализе сортов льна-долгунца использовали методы световой и сканирующей электронной микроскопии, т. к. световая

микроскопия недостаточно информативна для изучения структурных компонентов клеток лубяного волокна. Для изучения анатомического строения стебля методом световой микроскопии использовали поперечные срезы, взятые на середине технической длины у 10 одинаковых по длине и толщине зрелых растений. Отрезки стеблей 2–3 см фиксировали в размягчительной смеси спирт : вода : глицерин (1 : 1 : 1). Подсчет числа пучков, элементарных волокон и измерение диаметра среза стебля производили с помощью светового микроскопа Amplival при увеличении 15×4, а подсчет числа пучков и элементарных волокон в пучке и на срезе – при увеличении (15×20), с использованием компьютерной программы анализа изображений ImageTool 300. Подсчет одревесневших клеток волокна осуществлялся при окрашивании среза серно-кислым анилином. Одревесневшие клетки окрашивались в темно-желтый цвет.



а

б

Электронно-микроскопические снимки поперечных срезов элементарных волокон до (а) и после (б) обработки компьютерной программой AutoScan 3.0 (сорт Блакит)

Электронно-микроскопический анализ волокон растений льна проводили при помощи сканирующего электронного микроскопа JSM-5610 LV. Изображения поперечных срезов волокон получали в низковакуумном режиме работы электронного микроскопа с использованием детектора обратно отраженных электронов, что позволяло получать структуру об-

разцов без нанесения проводящих покрытий. Для получения очищенных элементарных волокон был использован химический метод, основанный на применении хелатирующих агентов и автоклавирования [6]. Сухие стебли льна, отрезки по 4–5 см из средней части 20–25 растений, погружали в дистиллированную воду (350 мл) с хелатирующими агентами (0,05 М ЭДТА в 0,05 М Трис-буфере, pH 8,0). Фрагменты стеблей автоклавировали при 120°C в течение 30 мин, отмывали в проточной воде и ополаскивали дистиллированной водой. Высушивание проводили в условиях 23°C в течение 2 дней, затем вычесывали для лучшего разделения элементарных волокон. Для обработки и анализа полученных изображений использовали программный комплекс AutoScan 3.0 (ЗАО «Спектроскопические системы», Минск), позволяющий анализировать снимки в полуавтоматическом режиме и проводить их первичную статистическую обработку [7]. Многофакторный статистический анализ проводили с использованием пакета Statistica 7.0 (StatSoft, США). Достоверность генотипических различий оценивали по наименьшей существенной разнице при $\alpha < 0,05$ (НСР₀₅).

Результаты и обсуждение. Анализ изображений [6, 8, 9] используется для исследований анатомических показателей волокон хлопка, конопли и льна и является хорошей альтернативой традиционным методам оценки.

Проведенные нами исследования выявили разнообразие по анатомическим особенностям строения стебля у 17 экспериментальных образцов льна-долгунца. Полиморфизм наблюдался по всем анализируемым признакам: диаметр стебля, длина окружности стебля, число, форма, размер волокнистых пучков, число, форма, размер элементарных волокон, степень одревеснения, площадь, периметр, длина, ширина поперечного среза элементарного волокна (табл. 1, 2).

Таблица 1

Анатомическое строение стебля сортообразцов льна-долгунца

Сорт	ДС, д. о. м.	ДО, д. о. м.	КП, шт.	КП на ЕДО, шт.	Количество ЭКВ в пучке, шт.	Количество ЭКВ на срезе, шт.	Количество ЭКВ на ЕДО, шт.	КОК, шт.	Процент одревесне- ния, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Блакит	5,78	18,15	34,00	1,87	30,14	1025,32	56,51	186,56	18,20
СИ-01	6,02	18,91	36,75	1,97	19,61	721,70	38,58	347,40	49,15
СИ-02	6,06	19,01	37,15	1,96	22,05	814,65	43,24	344,55	40,92
СИ-03	6,10	19,14	35,35	1,88	19,82	697,35	37,06	231,35	33,22
СИ-04	6,76	21,24	35,35	1,68	21,25	751,50	35,61	229,65	31,37
СИ-06	5,63	17,66	35,75	2,04	20,44	731,35	41,66	119,10	16,48
СИ-07	6,28	19,70	34,85	1,78	21,27	739,60	37,82	274,70	37,14
СИ-09	6,29	19,76	35,70	1,85	20,38	728,45	37,44	292,85	38,42
СИ-10	6,60	20,73	35,10	1,71	27,78	955,55	46,33	154,35	16,32
СИ-11	7,13	22,37	38,60	1,73	21,64	836,30	37,45	283,35	33,93

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
СИ-14	5,60	17,58	34,45	1,98	18,14	625,05	35,83	91,25	14,65
СИ-15	6,62	20,80	33,90	1,64	20,88	707,85	34,13	222,95	31,76
СИ-16	6,27	19,67	36,50	1,88	20,99	766,90	39,51	246,25	33,07
СИ-17	6,77	21,26	38,00	1,79	20,43	776,00	36,67	212,80	27,51
СИ-19	6,22	19,52	37,65	1,94	20,08	756,20	38,86	378,65	50,46
СИ-20	5,79	18,31	37,55	2,08	19,78	742,45	41,04	83,00	11,24
СИ-23	6,48	20,33	35,65	1,76	22,81	813,20	40,11	249,35	30,66
СИ-26	6,72	21,11	33,15	1,57	20,92	693,40	33,06	192,00	27,65
НСР ₀₅	0,46	1,43	1,68	0,15	1,39	59,96	3,45	44,99	5,66

Примечание. ДС – диаметр стебля; ДО – длина окружности; КП – количество пучков; ЕДО – единица длины окружности; ЭКВ – элементарные клетки волокна; КОК – количество одревесневших клеток; д. о. м. – делений окуляр-микрометра.

От толщины стебля льна-долгунца зависят важные качественные и технические показатели сортов – устойчивость к полеганию, урожай льносоломки, содержание волокна в стебле, степень лигнификации. Поскольку форма стебля льна приближается к конусу, то есть равномерно становится более тонкой к вершине, толщину стебля определяют на середине технической длины. В наших исследованиях толщину стебля оценивали по двум показателям – диаметр стебля и длина окружности стебля. С увеличением толщины стебля до определенного предела возрастает число лубяных пучков и элементарных волокон на поперечном срезе, лубяные пучки становятся более крупными, увеличивается диаметр элементарных волокон, что приводит к увеличению волокнистости сортов. Тем не менее толщина стебля не должна быть слишком большой – в более толстых стеблях сильнее развивается вторичная ксилема, а лубяные пучки и волоконца становятся более грубыми, при этом

снижается качество волокна (крепость, гибкость, тонина). Для текстильной промышленности более ценными являются сорта с тонким стеблем и большим выходом длинного волокна.

Сравнительная характеристика анализируемых сортообразцов льна-долгунца выявила, что их диаметр стебля варьирует в пределах от 5,6 до 7,13 делений окуляр-микрометра (д. о. м.) (или соответственно 17,58–22,37 д. о. м. для длины окружности). У контрольного сорта Блакит величины этих признаков составили 5,78 и 18,15 д. о. м. Наибольший диаметр стебля отмечен у образца СИ-11 (7,13 д. о. м.), немного меньшим, но тоже достаточно большим диаметром стебля характеризуются образцы СИ-17 (6,77 д. о. м.), СИ-04 (6,76 д. о. м.), СИ-26 (6,72 д. о. м.). Большой диаметр стебля у данных образцов сочетается с большим количеством пучков и высоким числом элементарных волокон на срезе, что свидетельствует о высокой волокнистости образцов.

Таблица 2

Количественные признаки поперечного среза индивидуального волокна сортообразцов льна-долгунца

Сорт	Площадь, мкм ²	Периметр, мкм	Длина, мкм	Ширина, мкм	Разность длины и ширины, мкм	Округлость	Фактор формы
Блакит	185,93	49,45	17,24	14,39	2,85	1,04	0,92
СИ-01	182,07	50,13	18,47	13,21	5,26	1,06	0,89
СИ-02	188,85	50,95	18,68	13,59	5,09	1,06	0,89
СИ-03	147,13	44,41	15,92	12,39	3,53	1,05	0,91
СИ-04	220,32	54,40	19,70	14,86	4,84	1,05	0,90
СИ-06	213,73	53,75	19,61	14,53	5,08	1,06	0,90
СИ-07	195,82	51,40	18,61	14,10	4,51	1,05	0,91
СИ-09	255,83	58,67	21,18	16,21	4,97	1,05	0,90
СИ-10	311,25	64,10	23,19	17,51	5,68	1,06	0,90
СИ-11	220,48	54,60	19,73	15,05	4,68	1,05	0,90
СИ-14	174,84	48,38	17,37	13,38	3,99	1,05	0,90
СИ-15	247,45	57,14	20,49	16,00	4,49	1,05	0,91
СИ-16	275,85	60,85	22,08	16,50	5,58	1,06	0,90
СИ-17	246,16	57,61	20,71	15,97	4,74	1,05	0,90
СИ-19	212,77	53,55	19,17	15,07	4,10	1,05	0,91
СИ-20	244,36	57,81	21,15	15,59	5,56	1,06	0,89
СИ-23	211,22	53,22	19,06	14,95	4,11	1,05	0,91
СИ-26	355,09	68,93	24,81	19,33	5,48	1,05	0,90
НСР ₀₅	0,89	0,37	0,42	0,37	0,39	0,05	0,09

Однако образцы СИ-11 и СИ-17 характеризуются невысокими значениями показателей «количество пучков на единицу длины окружности» и «количество волокон на единицу длины окружности» и, следовательно, крупными элементарными волокнами, что отрицательно сказывается на качестве. Наименьший диаметр стебля отмечен у образцов СИ-06 и СИ-14 (5,63 и 5,60 д. о. м., соответственно).

Большое число пучков и волокон на срезе у данных сортов свидетельствует о мелких размерах элементарных волокон, а низкий процент одревеснения позволяет судить о высоком качестве волокна. По особенностям анатомии элементарных волокон и строению волокнистых пучков можно сделать вывод о степени развития волокнистой ткани (флоэмы) в экспериментальных образцах льна-долгунца. В наших исследованиях рассматривались анатомические признаки, характеризующие содержание волокна, — число пучков на срезе, и качество волокна — число пучков на единицу окружности. На поперечном срезе в зависимости от толщины стебля и сортовых особенностей может насчитываться от 15 до 40 пучков. В наших исследованиях число пучков на срезе в зависимости от исследуемого образца варьирует от 33,15 (у образца СИ-26) до 38,60 (у образца СИ-11). Наибольшее число пучков наблюдается у образцов СИ-11, СИ-17, СИ-19, СИ-20, также эти генотипы характеризуются большим числом волокон на срезе, а образец СИ-20 имеет максимально низкое среди исследуемых образцов значение процента одревеснения, что делает данный образец перспективным селекционным материалом.

Чтобы охарактеризовать величину лубяных пучков и площадь, занимаемую ими на срезе стебля, использовали показатель «количество пучков на единицу длины окружности». У всех исследуемых образцов количество пучков на единицу длины окружности приближалось к двум, следовательно, данные образцы характеризуются некрупными хорошо сформированными компактными пучками, что повышает качество получаемого из них волокна. У образца СИ-26 более крупные волокнистые пучки, чем у остальных образцов, но этот недостаток компенсируется большим числом волокон в пучке и крупными клеточными стенками.

Для оценки качества исследуемых образцов льна-долгунца использовали следующие характеристики элементарных волокон: число волокон в пучке, число волокон на срезе, число волокон на единицу длины окружности.

Высоковолокнистые сорта могут образовывать на поперечном срезе до 1600 и более волокон. У исследуемых нами образцов количество элементарных волокон на срезе варьиро-

вало в широком диапазоне: от 625 у СИ-14 до 956 у СИ-10. Наиболее волокнистыми являются СИ-10 (956), СИ-11 (836), СИ-02 (815) и СИ-23 (813), но не превосходили контрольный сорт Блакит у которого среднее значение этого признака составило 1025,32 волокна на срезе. Кроме высокой волокнистости образцы СИ-10, СИ-02 и СИ-23 имеют толстые клеточные стенки с не-большим просветом, что делает их волокно более качественным.

Показатель «число волокон на единицу длины окружности среза» позволяет охарактеризовать величину волокон и площадь, занимаемую ими по сравнению с другими тканями. Чем выше данный показатель, тем меньше размеры волокон и тем плотнее они располагаются, что свидетельствует о высокой волокнистости и высоком качестве. У всех исследуемых образцов отмечено более 30 волокон на единицу длины окружности. У 5 образцов значение данного показателя 40 и более: СИ-23 и СИ-16 (по 40), СИ-20 (41), СИ-06 (42), СИ-02 (43) и максимально большое значение в исследуемой коллекции у СИ-10 (46).

Число волокон в пучке может варьировать от 10 до 60. В нашем эксперименте наибольшее число волокон в пучке наблюдалось у образцов СИ-10 (28), СИ-23 (23), СИ-11 и СИ-02 (по 22), также эти образцы имеют толстостенные элементарные волокна, то есть признаки, характеризующие высокое качество волокна.

Образцы льна-долгунца с крупными сформированными пучками и с большим количеством лубяных волокон, то есть имеющие хорошо развитую флоэмную ткань, как правило, характеризуются и значительным развитием ксилемы. В наших исследованиях минимальный процент одревесневших клеток наблюдался у образцов СИ-20 и СИ-14, СИ-06, СИ-10 и составлял менее 17% от общего числа клеток, чем превосшел контрольный сорт льна-долгунца Блакит, у которого процент одревеснения клеток составил 18,20%. У восьми образцов процент одревеснения составляет от 27,51% до 33,93%. Максимальное количество одревесневших клеток наблюдается на срезах стебля образцов СИ-07, СИ-09, СИ-02, СИ-01, СИ-19 и составляет от 37,14% до 50,46%.

При рассмотрении размера и формы элементарных волокон исследованы следующие параметры: площадь индивидуального волокна, периметр волокна, длина, ширина, округлость и фактор формы индивидуального волокна (табл. 2). Точечная полость и толстая клеточная стенка свидетельствуют о том, что волокна хорошо вызрели и определяют высокую крепость волокна. Площадь и периметр поперечного среза элементарного волокна влияет на такой по-

казатель качества, как тонины. Более длинные элементарные волокна с меньшим диаметром обуславливают получение более тонкого и, следовательно, более ценного волокна. В наших исследованиях площадь и периметр элементарных волокон варьируют от 147,13 мкм² (44,41 мкм) до 355,09 мкм² (68,93 мкм) соответственно (табл. 2). Большими площадью и периметром элементарных волокон характеризуются образцы СИ-09 (255,83 мкм²; 58,67 мкм), СИ-16 (275,85 мкм²; 60,85 мкм), СИ-10 (311,25 мкм²; 64,10 мкм) и СИ-26 (355,09 мкм²; 68,93 мкм). Анализ данных табл. 2 показал, что 14 изученных генотипов из 17 по величине этого параметра превосходили контрольный сорт Блакит. Относительно низкими величинами этих параметров характеризовались образцы СИ-03 (147,13 мкм²; 44,41 мкм), СИ-14 (174,84 мкм²; 48,38 мкм), СИ-01 (182,07 мкм²; 50,13 мкм), у сорта Блакит величина этих показателей составила (185,93 мкм²; 49,45 мкм).

Известно, что у качественного волокна величины параметров длины и ширины поперечного среза элементарного волокна должны иметь достаточно близкие значения. В данной выборке сортообразцов длина поперечного среза элементарного волокна изменялась от 17,37 мкм (СИ-14) до 24,81 мкм (СИ-26), а ширина поперечного среза колебалась в пределах 12,39–19,33 мкм (у образцов СИ-03 и СИ-26 соответственно), у сорта Блакит величины этих показателей составили 17,24 и 14,39 мкм. Минимальная разница между параметрами длины и ширины были у генотипов СИ-03 (3,53 мкм), СИ-14 (3,99 мкм), СИ-19 (4,10 мкм) и СИ-23 (4,11 мкм), а максимальная – у образцов СИ-10 (5,68 мкм), СИ-16 (5,58 мкм), СИ-20 (5,56 мкм) и СИ-26 (5,48 мкм), у сорта Блакит разница между параметрами длины и ширины была 2,85 мкм.

Округлая форма волокна способствует более плотному соединению волокон между собой, что обеспечивает механическую прочность волокнистых пучков, и таким образом повышает крепость и гибкость волокна. Сравнительный анализ полученных результатов по критериям «округлость» и «фактор формы» существенных различий между исследуемыми генотипами не выявил. Значение признака «округлость» варьировало в пределах 1,05–1,06, значение признака «фактор формы» – от 0,89 (СИ-01, СИ-02, СИ-20) до 0,91 (сортообразцы СИ-03, СИ-07, СИ-15, СИ-19, СИ-23), у сорта Блакит величина этих признаков составила 1,04 и 0,92 соответственно.

Таким образом, проведен анализ 17 образцов льна-долгунца по признакам волокнистости и качеству волокна. Оценка сортов по анатомическим характеристикам стебля позволила выделить ге-

нотипы льна: СИ-02, СИ-03, СИ-06, СИ-10, СИ-14, СИ-20 и СИ-23, которые являются потенциальными источниками генов качества и продуктивности этой ценной технической культуры.

Заключение. Исследованы анатомические признаки волокна сортообразцов льна при помощи комплексного метода, включающего световую и сканирующую электронную микроскопию в сочетании с компьютерным анализом полученных изображений. Показана эффективность компьютерного морфометрического анализа для идентификации и сравнительного анализа ряда электронно-микроскопических параметров. Из коллекции сортообразцов выделены генотипы с высокими показателями качества и продуктивности, которые станут основой создания новых сортов льна-долгунца.

Литература

1. Экологический центр «Экосистема» [Электронный ресурс]. – 2004–2010. – Режим доступа: <http://www.ecosystema.ru/07referats/cultrast/058.htm> – Дата доступа: 15.02.10.
 2. Sharma, H. Enzyme treatment of flax / H. Sharma, C. Van Sumere // Genet Eng. Biotechnol. – 1992. – Vol. 12, № 1. – P. 19–23.
 3. Sharma, H. The biology and processing of flax / H. Sharma, C. Van Sumere.; in eds. C. Van Sumere. – Belfast, Northern Ireland: M. Publ., 1992. – 216 p.
 4. Анатомическое строение стебля и качество волокна новых отечественных сортов льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) в условиях Кировской области / А. А. Хлопов [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2008. – Т. 50, № 12. – С. 23–27.
 5. News of Infectology and Parasitology [Электронный ресурс]. – 1998–2005. – Режим доступа: http://www.infectology.ru/microscopy/today/analysis/read_analysis8.aspx. – Дата доступа: 11.02.10.
 6. Improved method for fibre content and quality analysis and their application to flax genetic diversity investigations / M. J. A. van den Oever [et al.] // Industrial crop and products. – 2003. – Vol. 18, № 3. – P. 231–243.
 7. AutoScan // [Электронный ресурс]: методическое руководство к программному пакету. – Электрон. дан. (5,72 Мб). – ЗАО «Спектроскопические системы», 2002.
 8. Himmelsbach, D. S. FT-IR microspectroscopic imaging of flax (*Linum usitatissimum* L.) stems / D. S. Himmelsbach, S. Khalili, D. E. Akin // Cell. Mol. Biol. – 1998. – Vol. 44, № 1. – P. 99–108.
 9. Wang, H. M. Evaluation of the fineness of degummed bast fibers / H. M. Wang, X. Wang // Fibers and Polymers. – 2004. – Vol. 5, № 3. – P. 171–176.
- Поступила 26.03.2010