

Оценка количественных характеристик клубнеобразования дикого картофеля на основе анализа изображений клубней с использованием компьютерного приложения SeedCounter

К.А. Иванова¹, Е.Г. Комышев¹, М.А. Генаев^{1, 2}, А.А. Егорова^{1, 2}, К.А. Колошина¹, Н.А. Чалая³,
Д.А. Афонников^{1, 2}, А.В. Кочетов^{1, 2}, Е.В. Рогозина³, С.В. Герасимова^{1, 2} ✉

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

✉ e-mail: gerson@bionet.nsc.ru

Применение методов количественного цифрового фенотипирования для анализа параметров клубнеобразования диких клубненосных видов картофеля актуально для аннотации коллекций и для отбора оптимального донорного материала в работах по селекции культурного картофеля. На сегодняшний день в литературе не описано методов, позволяющих объективно количественно оценить морфологические параметры клубней дикого картофеля. В настоящей работе был проведен эксперимент по оценке морфологических характеристик клубней диких видов секции *Petota Dumort.* рода *Solanum L.* при помощи мобильного приложения SeedCounter, анализирующего изображения объектов, размещенных на стандартном листе бумаги. Двенадцать образцов генотипов из коллекции ВИР, относящихся к девяти диким видам, были выращены в вегетационных сосудах, расположенных в парнике, обтянутом укрывным материалом, в сроки вегетации культурного картофеля (Новосибирская область). Урожай клубней получен с представителей девяти генотипов. Измерена масса клубней с одного растения, урожай каждого растения проанализирован при помощи настольной версии приложения SeedCounter (<http://wheatdb.org/seedcounter>). Произведен подсчет клубней, для каждого клубня получены следующие характеристики: длина, ширина, площадь проекции на лист бумаги, отношение длины к ширине, округлость, закругленность, шероховатость и компактность. При попарном сравнении девяти видов по перечисленным параметрам были выявлены достоверные различия в 86 % исследуемых пар. На основании показателей отношения длины к ширине и площади проекции клубня предложена формула для вычисления объема урожая клубней с одного куста. Вычисленные значения объема урожая имеют высокую корреляцию со значениями массы урожая с одного куста. Показатель объема урожая предлагается использовать для общей характеристики клубнеобразования дикого картофеля по четырехбалльной шкале (от 0 до 3). В исследуемой группе образцов выявлены генотипы, обладающие нулевым, слабым, средним и высоким клубнеобразованием. Полученные данные частично соответствуют оценке клубнеобразования, проведенной по критериям ВИР. Различия в результатах оценки, вероятно, связано с условиями выращивания материала. Результаты применения метода позволяют рассматривать его как перспективный способ стандартного фенотипирования образцов коллекций диких видов картофеля. Ключевые слова: *Solanum*; *Petota*; цифровое фенотипирование растений; дикие виды картофеля; SeedCounter; клубнеобразование.

Для цитирования: Иванова К.А., Комышев Е.Г., Генаев М.А., Егорова А.А., Колошина К.А., Чалая Н.А., Афонников Д.А., Кочетов А.В., Рогозина Е.В., Герасимова С.В. Оценка количественных характеристик клубнеобразования дикого картофеля на основе анализа изображений клубней с использованием компьютерного приложения SeedCounter. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(5):519-526. DOI 10.18699/VJ19.35-o

Image-based analysis of quantitative morphological characteristics of wild potato tubers using the desktop application SeedCounter

К.А. Иванова¹, Е.Г. Комышев¹, М.А. Генаев^{1, 2}, А.А. Егорова^{1, 2}, К.А. Колошина¹, Н.А. Чалая³,
Д.А. Афонников^{1, 2}, А.В. Кочетов^{1, 2}, Е.В. Рогозина³, С.В. Герасимова^{1, 2} ✉

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

✉ e-mail: gerson@bionet.nsc.ru

The development of quantitative digital phenotyping methods for evaluation of wild potato (section *Petota Dumort.*, genus *Solanum L.*) tuberization is required for annotation of genebank collections and selection of the suitable donor material for potato breeding. There are no available methods specifically designed for the quantitative analysis of wild potato tuber morphology. The current study is devoted to evaluation of wild potato tubers' morphological characteristics using a digital image processing technique. For this purpose, the mobile application SeedCounter developed previously for grain analysis was specifically adapted for tuber phenotyping. The application estimates the number and

shape of objects scattered on a standard sheet of white paper (i. e. A3 or A4). Twelve accessions from the VIR genebank collection belonging to nine *Petota* species were grown in pots protected with garden fabric during the growing season of cultivated potato (Novosibirsk region). Tubers were collected from plants of nine genotypes. Three genotypes did not produce tubers. The weight of tubers collected from each plant was measured. The tuber yield from each plant was analyzed using SeedCounter (<http://wheatdb.org/seedcounter>). The number of tubers per plant was counted; the following characteristics were extracted from the images of individual tubers: length, width, projected area, length to width ratio, circularity, roundness, rugosity and solidity. One-way ANOVA showed a significant effect of genotype on all measured characteristics. A pairwise comparison of nine *Petota* accessions using all measured parameters revealed statistically significant differences between 86 % of pairs. The overall tuber yield volume for each plant was calculated as a sum of volumes of individual tubers; tuber volume was calculated from its length to width ratio and projected area. A strong correlation between the evaluated tuber yield volume and yield weight was shown. We propose tuber yield volume as a characteristic for a general evaluation of tuberization for wild potato, implementing the four-step scale from 0 to 3. According to this characteristic, the twelve wild potato accessions studied could be divided into four groups with different tuberization abilities. The evaluated tuberization ability is partially in accordance with previously obtained VIR data. The results presented demonstrate the possibility to use SeedCounter for wild potato collections phenotyping.

Key words: *Solanum*; *Petota*; digital phenotyping of plants; wild potato species; SeedCounter; tuberization.

For citation: Ivanova K.A., Komyshev E.G., Genaev M.A., Egorova A.A., Koloshina K.A., Chalaya N.A., Afonnikov D.A., Kochetov A.V., Rogozina E.V., Gerasimova S.V. Image-based analysis of quantitative morphological characteristics of wild potato tubers using the desktop application SeedCounter. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(5):519-526. DOI 10.18699/VJ19.35-o (in Russian)

Введение

Основу современной селекции картофеля составляют использование диких видов в качестве источника устойчивости к неблагоприятным факторам среды и межвидовая гибридизация (Киру, Рогозина, 2017). Необходимость фенотипирования больших популяций – это ключевой момент в исследованиях разнообразия культурного картофеля и родственных ему видов. В процессе одомашнивания и направленной на нужды потребителя селекции культурный картофель приобрел значительные отличия от диких видов как по фенотипу, так и по генотипу (Aversano et al., 2015). Одно из главных отличий – уровень клубнеобразования. Этот признак связан с наиболее важной характеристикой сортов культурного картофеля – высокой урожайностью. Высокопроизводительная морфометрия клубней возделываемого картофеля является развитым полем исследования, для которого уже предложены определенные инструменты, базирующиеся на различных методах, в том числе на получении и обработке цифровых изображений клубней (Rady, Guyer, 2015). Чтобы оценить клубнеобразование культурного картофеля, получают изображения клубней с помощью цветных, мультиспектральных и гиперспектральных камер. Для анализа этих цифровых изображений разработаны методы подсчета основных показателей размера клубня, таких как отношение его длины к ширине, методы прогнозирования для длины, ширины и массы клубня, дефектов внутри и снаружи образца, а также метод предсказания трехмерной модели клубня (Si et al., 2017, 2018; Su et al., 2017). Существует также мобильное приложение Potatosize (<https://www.hutton.ac.uk/research/groups/information-and-computational-sciences/potatosize>) для измерения пропорций клубней культурного картофеля.

В отличие от культурного *Solanum tuberosum* с высокой адаптивной способностью к условиям выращивания, большинство диких видов картофеля переходят к клубнеобразованию только при коротком фотопериоде и имеют выраженные различия в оптимальных характеристиках внешней среды для получения максимального урожая. При изучении образцов картофеля и родственных ему ви-

дов из коллекции ВИР проводят оценку морфологических признаков клубня: формы, поверхности кожуры, глубины глазков и столонного следа, окраски кожуры (основной и вторичной) и мякоти (Киру и др., 2010). У культурных видов картофеля морфологические признаки клубней отличаются заметным многообразием (Huaman et al., 1977). У дикорастущих видов секции *Petota* форма клубней, их окраска и глубина глазков не столь причудливы и разнообразны и не всегда указаны в ботаническом описании, хотя в некоторых монографиях приведены изображения клубней (Correll, 1962; Ochoa, 2004). Таксономический анализ морфологии клубней дикого картофеля никогда не проводился (Spooner et al., 2004).

Для диких видов картофеля нет устоявшихся критериев оценки клубнеобразования и специфических характеристик клубней. Как правило, при поддержании коллекций дикого картофеля растения выращивают в климатической камере или защищенном грунте с различными настраиваемыми параметрами. Фенотипические данные, получаемые в такой искусственно созданной среде, трудно поддаются обработке и стандартной характеристике, поскольку фенотип растения, выращенного в климатической камере, может значительно отличаться от фенотипа растения, выращенного «в поле».

В настоящей работе эксперимент по выращиванию диких видов картофеля был поставлен в вегетационных условиях региона (Новосибирская область), в сроки выращивания культурного картофеля. С целью ускорения и стандартизации оценки клубнеобразования и фенотипа клубней диких видов, фенотипирование полученного урожая было проведено путем получения и обработки цифровых изображений клубней, с использованием приложения SeedCounter (Komyshev et al., 2017), адаптированного для анализа клубней дикого картофеля.

Материалы и методы

В работе было использовано 12 генотипов образцов, относящихся к девяти диким видам секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L. в соответствии с классификацией Букасова (1980), из коллекции ВИР (табл. 1).

Таблица 1. Генотипы диких видов картофеля коллекции ВИР*

№ п/п	Вид	Номер в каталоге ВИР	Генотип	Клубнеобразование (данные ВИР)
1	<i>S. dolichostigma</i> Buk. (syn. <i>S. chacoense</i> Bitter)	7613	6-2-н-2002	Хорошее
2	<i>S. chacoense</i> Bitter	19759	3-42-2	»
3	<i>S. chacoense</i> Bitter	22687	16-2016	»
4	<i>S. commersonii</i> Dunal	21355	19-2016	»
5	<i>S. fendleri</i> A. Gray	18242	549-3-2016	»
6	<i>S. ehrenbergii</i> Bitter (Rydb.)	24207	715-2011	Среднее
7	<i>S. jamesii</i> Torr.	24923	649-2011	Хорошее
8	<i>S. pinnatisectum</i> Dunal	23569	18-7	»
9	<i>S. pinnatisectum</i> Dunal	24239	Д-36-2011	Слабое
10	<i>S. polyadenium</i> Greenm.	24957	618-2011	Умеренное
11	<i>S. verrucosum</i> Schldtl.	23015	346-2011	Слабое
12	<i>S. tarijense</i> Hawkes	12637	14-1-2007	»

* Данные из Каталога мировой коллекции ВИР, вып. 816 (2014).

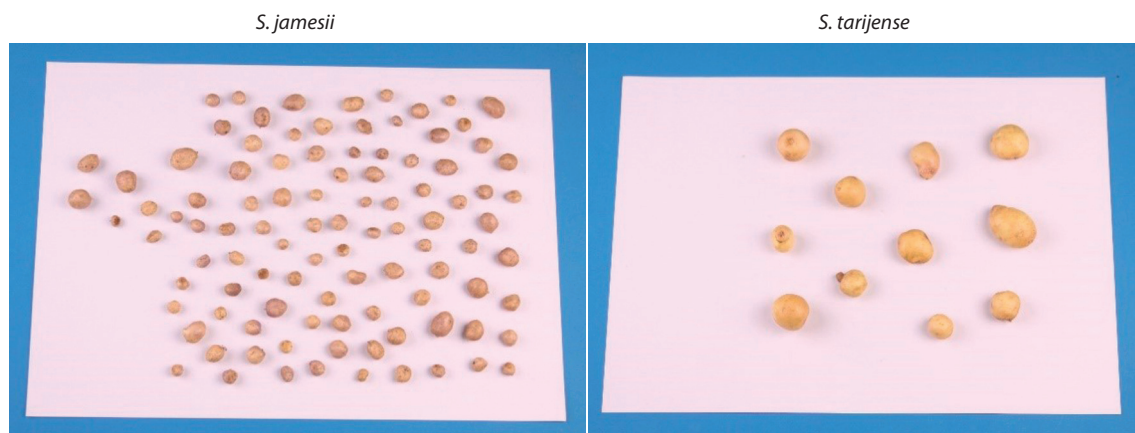


Рис. 1. Цифровое изображение клубней двух генотипов дикого картофеля.

Условия культивирования образцов. Растения содержали в парнике, обтянутом укрывным материалом, пропускающим свет, влагу и воздух, но задерживающим насекомых и пыльцу других растений (Россия, Новосибирская область, поля СибНИИРС). В ходе эксперимента образцы растений, выращенные *in vitro*, высаживали в трех повторностях в 15 л ведра с землей «TERRA VITA, питательный грунт универсальный» (ЗАО «МНПП «Фарт», Санкт-Петербург), смешанной в равных пропорциях с естественным грунтом, добытым из-под дерна в березовой роще, и содержали при регулярном поливе до конца вегетации. Дата посадки – 20.06.18, сбор урожая производился после прохождения вегетации и гибели надземной части растений (20.09.18). Собран урожай клубней растений, относящихся к девяти разным генотипам. Три образца: *S. polyadenium*, *S. commersonii* и *S. chacoense* (22687) не дали клубней.

Получение и обработка изображений. Клубни, собранные с одного растения, располагали на белом листе бумаги формата А3, в условиях искусственного освещения (рис. 1). Фотографии были сделаны с использованием ка-

меры Canon EOS 50D (разрешение 4752 × 3168), согласно протоколу съемки приложения SeedCounter (Komyshev et al., 2017).

Анализ изображений приложением SeedCounter. Изображения клубней были проанализированы Desktop-версией приложения SeedCounter (Komyshev et al., 2017, <http://wheatdb.org/seedcounter>), модифицированной для распознавания клубней картофеля вместо зерен пшеницы. Помимо длины, ширины и проецируемой на поверхность листа площади, рассчитывались также индексы формы контура клубней (Cervantes et al., 2016).

Были реализованы следующие индексы формы контура:

- Показатель отношения длины к ширине (length to width ratio, L/W), отражающий одну из основных характеристик формы клубня (Si et al., 2017).
- Округлость (circularity, C); индекс отражает, насколько форма контура близка окружности. Значения индекса варьируют от 0 до 1, при этом 1 соответствует идеальному кругу:

$$C = \frac{4\pi \times \text{area}}{\text{perimeter}^2}.$$

- Индекс закругленности (roundness, R); целесообразно использовать для контуров, имеющих много небольших выпуклостей на поверхности. В этих случаях периметр увеличивается и индекс округлости принимает более низкие значения, тогда как величина индекса закругленности не зависит от неровностей периметра:

$$R = \frac{4 \times \text{area}}{\pi [\text{Major axis}]^2}.$$

- Индекс шероховатости (rugosity, Rg); определяется как отношение периметра контура к выпуклому периметру:

$$Rg = \frac{Ps}{Pc},$$

где Ps – периметр контура, а Pc – выпуклый периметр контура, известный также как выпуклая оболочка, т.е. наименьшая выпуклая фигура, которая содержит все точки изображения.

- Индекс компактности (solidity, Sl) – отношение площади контура к площади его выпуклой оболочки:

$$Sl = \frac{\text{Contour Area}}{\text{Convex Hull Area}}.$$

Для оценки объема урожая клубней с каждого куста были сделаны следующие допущения: 1) клубни имеют форму эллипсоида, ширина и высота которого равны между собой, а длина больше ширины в k раз ($k = L/W$ – измеренное соотношение длины к ширине); 2) площадь главного сечения эллипсоида по длинной оси равна площади проекции клубня на поверхность листа (S). На основе этих допущений выведена формула для оценки объема урожая одного растения, где объем урожая равен сумме объемов каждого клубня:

$$V = \sum_{i=1}^n V_i,$$

$$V_i = \frac{4}{3} \pi k_i \left[\frac{S_i}{\pi k_i} \right]^{\frac{3}{2}},$$

где n – количество клубней; V_i – объем одного клубня; S_i – площадь проекции одного клубня; k_i – коэффициент, равный отношению длины к ширине.

Формула была предложена исходя из следующих рассуждений. Объем эллипсоида равен

$$V = \frac{4}{3} \pi abc.$$

Проекцией эллипсоида на плоскость является эллипс. Площадь эллипса, в свою очередь, вычисляется по формуле

$$S = \pi ab.$$

Связь объема эллипсоида с площадью его проекции на плоскость можно выразить следующим образом (учитывая допущение, что $b = c$):

$$V = \frac{4}{3} Sb.$$

Выразим b через S :

$$a = kb,$$

$$S = \pi kb^2,$$

$$b = \sqrt{\frac{S}{\pi k}}.$$

Тогда

$$V = \frac{4}{3} Sb = \frac{4}{3} S \sqrt{\frac{S}{\pi k}} = \frac{4}{3} \pi k \left(\frac{S}{\pi k} \right)^{\frac{3}{2}}.$$

Поскольку приложение SeedCounter вычисляет площадь проекции клубней на плоскость на основе ее контура, такой расчет более точно учитывает особенности формы отдельно взятого клубня. Поэтому аппроксимационная оценка объема клубня была выражена через площадь проецируемого на поверхность листа контура.

Суммарный объем урожая был рассчитан также исходя из оценки объема клубня картофеля на базе уравнения нелинейной регрессии отношения площади проекции клубней на плоскость и объема для смешанных сортов картофеля, полученной в работе (Tabatabaeefar, 2002):

$$A = 1.1 V^{0.71},$$

$$V = \left(\frac{A}{1.1} \right)^{1.408},$$

где величина A соответствует площади проекции клубня.

Статистическая обработка данных произведена в среде R (<http://www.r-project.org>). Для каждого из измеряемых параметров выполнен однофакторный дисперсионный анализ влияния генотипа на значения параметра (ANOVA, <https://www.rdocumentation.org/packages/stats/versions/3.5.2/topics/aov>). Чтобы определить, какие именно пары образцов имеют значимые статистические различия, было проведено множественное попарное сравнение образцов по средним значениям каждого параметра с использованием критерия Тьюки (TukeyHSD, <https://www.rdocumentation.org/packages/stats/versions/3.5.2/topics/TukeyHSD>). Корреляция значений массы урожая клубней с одного растения с вычисленными значениями объема урожая оценивалась с использованием критерия Пирсона (Pearson's product-moment correlation) и с помощью функции `cor.test` в среде R (<http://www.r-project.org>).

Результаты

Общая характеристика урожайности исследуемых образцов

Полученный урожай был охарактеризован по показателям среднего количества и средней массы клубней с одного растения. Данные представлены в табл. 2. Три генотипа не дали ни одного клубня во всех трех повторностях. Один генотип (*S. chacoense* 3-42-2 № 19759) дал урожай только в двух повторностях.

Оценка морфологии клубней

Индексы, характеризующие размер и форму клубней, были рассчитаны программой SeedCounter (табл. 3). Однофакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние генотипа на каждый из параметров, рассчитанных с помощью приложения SeedCounter (табл. 4).

В качестве примера в табл. 3 выделены три генотипа (*S. jamesii* 649-2011, *S. tarijense* 14-1-2007 и *S. chacoense* 3-42-2) и показаны достоверные отличия одного из генотипов от двух других. Исследованный генотип *S. jamesii* достоверно отличается от генотипов *S. tarijense* и *S. chacoense* по длине, ширине и площади проекции клубня.

Таблица 2. Основные характеристики урожая (mean ± SD) исследованных генотипов диких видов картофеля

№ п/п	Вид	Номер в каталоге ВИР	Генотип	С одного куста	
				кол-во клубней, шт.	масса клубней, г
1	<i>S. dolichostigma</i>	7613	6-2-н-2002	27.3 ± 5.5	143.3 ± 43.6
2	<i>S. chacoense</i> *	19759	3-42-2	15.5 ± 0.7	109.0 ± 66.5
3	<i>S. chacoense</i>	22687	16-2016	–	–
4	<i>S. commersonii</i>	21355	19-2016	–	–
5	<i>S. fendleri</i>	18242	549-3-2016	13 ± 5.3	73.7 ± 3.7
6	<i>S. ehrenbergii</i>	24207	715-2011	32.7 ± 7	64.3 ± 1.5
7	<i>S. jamesii</i>	24923	649-2011	85.7 ± 13.2	100.0 ± 15.0
8	<i>S. pinnatisectum</i>	23569	18-7	33.3 ± 7	96.3 ± 29.5
9	<i>S. pinnatisectum</i>	24239	Д-36-2011	8.7 ± 4.5	35.0 ± 25.2
10	<i>S. polyadenium</i>	24957	618-2011	–	–
11	<i>S. verrucosum</i>	23015	346-2011	5.3 ± 3.2	9.2 ± 11.6
12	<i>S. tarijense</i>	12637	14-1-2007	8.3 ± 2.5	95.7 ± 40.9

* Две повторности.

Таблица 3. Значения параметров размера и формы контура клубней (mean ± SE)

№ п/п	Вид	Генотип	Длина, мм	Ширина, мм	Площадь проекции клубня, мм ²	Длина/ширина	Округлость	Закругленность	Шероховатость	Компактность
1	<i>S. dolichostigma</i>	6-2-н-2002	22.07 ± 5.55	18.57 ± 4.27	334.99 ± 154.96	1.19 ± 0.13	0.77 ± 0.07	0.84 ± 0.09	1.13 ± 0.05	0.98 ± 0.01
2	<i>S. chacoense</i>	3-42-2	29.45 ± 8.47	22.48 ± 6.07	545.79 ± 266.40	1.31 ± 0.16*	0.72 ± 0.10	0.76 ± 0.10*	1.16 ± 0.11	0.98 ± 0.01
5	<i>S. fendleri</i>	549-3-2016	22.69 ± 7.21	19.21 ± 5.76	366.09 ± 207.36	1.19 ± 0.16	0.75 ± 0.09	0.84 ± 0.11	1.14 ± 0.06	0.98 ± 0.02
6	<i>S. ehrenbergii</i>	715-2011	17.49 ± 4.68	14.70 ± 3.50	211.06 ± 102.29	1.19 ± 0.14	0.77 ± 0.08	0.84 ± 0.09	1.14 ± 0.07	0.98 ± 0.01
7	<i>S. jamesii</i>	649-2011	13.32 ± 2.82*	11.41 ± 2.19*	122.82 ± 47.83*	1.17 ± 0.12	0.82 ± 0.05	0.86 ± 0.08	1.11 ± 0.04	0.98 ± 0.01
8	<i>S. pinnatisectum</i>	18-7	18.76 ± 4.95	14.17 ± 2.75	211.72 ± 88.38	1.32 ± 0.23	0.68 ± 0.12	0.76 ± 0.13	1.19 ± 0.12	0.97 ± 0.02
9	<i>S. pinnatisectum</i>	Д-36-2011	19.88 ± 3.58	17.51 ± 3.19	279.58 ± 95.11	1.14 ± 0.08	0.77 ± 0.05	0.88 ± 0.06	1.14 ± 0.04	0.98 ± 0.00
11	<i>S. verrucosum</i>	346-2011	14.46 ± 5.05	12.51 ± 4.33	156.05 ± 109.35	1.16 ± 0.09	0.79 ± 0.05	0.86 ± 0.06	1.14 ± 0.05	0.98 ± 0.01
12	<i>S. tarijense</i>	14-1-2007	28.63 ± 6.65	25.19 ± 5.42	587.38 ± 253.86	1.14 ± 0.10	0.78 ± 0.07	0.88 ± 0.07	1.14 ± 0.05	0.99 ± 0.01

Примечание. Серым фоном выделены генотипы, упомянутые в качестве примера в тексте. * Достоверное отличие показателя у данного образца относительно двух других выделенных образцов (по критерию Тьюки).

Таблица 4. Результаты однофакторного дисперсионного анализа влияния генотипа на значения измеряемых параметров

Критерий достоверности	Площадь, мм ²	Длина, мм	Ширина, мм	Длина/ширина	Округлость	Закругленность	Шероховатость	Компактность
F value	91.35	83.33	97.44	12.82	31.08	13.31	11.04	18.69
Pr (>F)	<2e-16	<2e-16	<2e-16	<2e-16	<2e-16	<2e-16	1.05e-14	<2e-16

S. chacoense достоверно отличается от *S. jamesii* и *S. tarijense* по округленности и отношению длины к ширине (см. табл. 3). По округлости, морщинистости (шероховатости) и компактности у представленных образцов нет достоверных отличий.

Таким образом, клубни выбранного генотипа вида *S. tarijense* можно предварительно охарактеризовать как

крупные, гладкие, круглые; клубни выбранного генотипа вида *S. jamesii* – мелкие, гладкие, круглые; генотипа *S. chacoense* – крупные, гладкие, продолговатые.

С использованием критерия Тьюки было показано, что при попарном сравнении генотипов по всем измеряемым показателям выделяются достоверные отличия у 31 пары образцов из 36 пар (86 %). Три четверти пар генотипов

Таблица 5. Количество достоверно разделяемых пар генотипов по параметрам, полученное с помощью приложения SeedCounter

Параметр	Кол-во достоверно разделяемых пар	Отношение среднего кол-ва разделяемых пар видов к кол-ву пар
Ширина	28	0.78
Длина	27	0.75
Площадь	26	0.72
Длина/ширина	14	0.39
Закругленность	14	0.39
Округлость	13	0.36
Цельность	8	0.22
Морщинистость	7	0.19

(75 %) можно достоверно разделить, анализируя показатели размера клубня (площадь проекции клубня, длину и ширину). Только по параметрам размера достоверно различаются 40 % пар генотипов, при этом они не различаются по другим параметрам. На основе индексов формы, без учета размера клубней, в среднем достоверно можно разделить около 30 % пар генотипов исследуемых видов, при этом три пары (8 %) отличаются только по признакам формы и не отличаются по индексам размера. Было показано, что генотип 18-7 № 23569 *S. pinnatisectum* достоверно отличается от генотипа 649-2011 № 24923 *S. jamesii* и 6-2-н-2002 № 7613 *S. dolichostigma* по всем восьми показателям. В табл. 5 приведены данные об абсолютном и относительном количестве пар генотипов, которые достоверно можно отличить, используя каждый из показателей в отдельности.

Общая оценка клубнеобразования

На основе полученных данных была выделена характеристика для оценки клубнеобразования растений диких клубненосных видов картофеля. В качестве главного критерия был выбран объем урожая клубней с одного растения, поскольку этот показатель возможно вычислить, используя анализ изображений. Согласно литературным источникам (Tabatabaefar, 2002; Su et al., 2017), объем клубней картофеля имеет высокую степень корреляции с массой, которую применяют, как правило, для оценки урожайности. Расчетная оценка объема урожая была выполнена путем аппроксимации формы клубней эллипсоидом, с использованием результатов, описывающих площадь проекции каждого клубня на поверхность листа бумаги и отношение длины к ширине, а также при помощи ранее предложенной формулы для культурного картофеля (Tabatabaefar, 2002).

В качестве критерия верификации предложенного метода оценки объема урожая с куста была выбрана корреляция с измеренным значением массы урожая. Суммарный объем урожая оценивали по двум предложенным формулам для каждого из 26 растений и затем вычисляли коэффициент корреляции Пирсона полученных значений с измеренными значениями массы урожая. Коэффици-

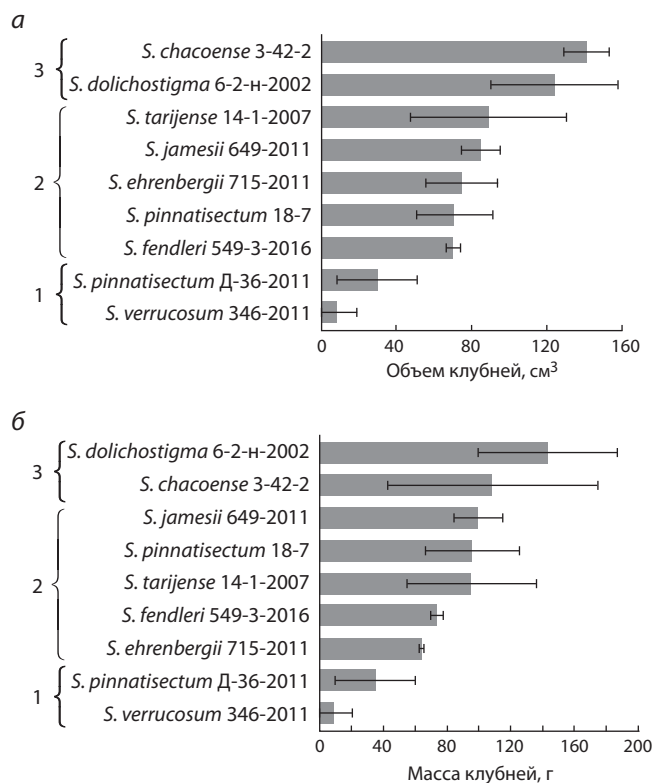


Рис. 2. Данные оценки клубнеобразования: объем урожая (а) и масса клубней с одного растения (б).

1–3 – группы генотипов со слабым (1), средним (2) и хорошим (3) клубнеобразованием. Приведены средние значения, показано стандартное отклонение.

ент корреляции для значений, вычисленных по формуле объема эллипсоида, выраженного через проектируемую площадь контура, составил 0.87 (p -value = 7.839e-09; 95 % доверительный интервал 0.7278559–0.9404020). Для значений, рассчитанных из отношения объема и проектируемой площади клубня на базе нелинейной регрессии, коэффициент корреляции равен 0.88 (p -value = 2.359e-09; 95 % доверительный интервал 0.7533180–0.9465927). Полученные статистические результаты позволяют оценить степень корреляции как высокую и сделать вывод о применимости предложенных формул для оценки объема урожая диких видов картофеля.

Характеристики средней массы и среднего объема урожая для каждого из генотипов приведены на рис. 2. Образцы кластеризуются в три условные группы со слабым, средним и хорошим клубнеобразованием как по показателю массы, так и по показателю объема урожая.

Генотипы *S. pinnatisectum* Д-36-2011 № 24239 и *S. verrucosum* 346-2011 № 23015 составляют группу со слабым клубнеобразованием. Представители одного вида, генотипы *S. dolichostigma* (синоним *S. chacoense*) 6-2-н-2002 № 7613 и *S. chacoense* 3-42-2 № 19759, образуют группу с хорошим клубнеобразованием. Остальные генотипы входят в промежуточную (среднюю) группу.

Группам были присвоены значения показателя клубнеобразования от 1 до 3. Генотипам, которые не дали урожая, присвоено значение клубнеобразования равное нулю. Полученные результаты сравнивались между собой и с

Таблица 6. Группировка генотипов по введенным критериям в соответствии с показателями урожая

№ п/п	Вид	Генотип	Клубнеобразование		
			с одного куста по расчетам данной работы		по данным ВИР
			средний объем	средняя масса	
1	<i>S. dolichostigma</i> *	6-2-н-2002	3	3	Хорошее
2	<i>S. chacoense</i> *	3-42-2	3	3	»
3	<i>S. chacoense</i>	16-2016	0	0	»
4	<i>S. commersonii</i>	19-2016	0	0	»
5	<i>S. fendleri</i>	549-3-2016	2	2	»
6	<i>S. ehrenbergii</i> *	715-2011	2	2	Среднее
7	<i>S. jamesii</i>	649-2011	2	2	Хорошее
8	<i>S. pinnatisectum</i>	18-7	2	2	»
9	<i>S. pinnatisectum</i> *	Д-36-2011	1	1	Слабое
10	<i>S. polyadenium</i>	618-2011	0	0	Умеренное
11	<i>S. verrucosum</i> *	346-2011	1	1	Слабое
12	<i>S. tarijense</i>	14-1-2007	2	2	»

* Совпадение оценки клубнеобразования по среднему объему урожая, средней массе урожая и по данным ВИР.

данными, опубликованными сотрудниками ВИР (Каталог..., 2014) (табл. 6). Для генотипов № 1, 2, 6, 9 и 11 наша оценка клубнеобразования совпала с оценкой ВИР (см. табл. 6).

Обсуждение

В настоящей работе представлен новый подход для сбора и анализа информации о морфологических характеристиках клубней дикого картофеля, а также предложен критерий оценки клубнеобразования диких видов картофеля.

Подобные методы, основанные на получении цифровых изображений клубней и их анализе, созданы для оценки урожая сортов культурного картофеля и позволяют получить информацию о его качестве и потребительских свойствах. Специальных методов оценки клубнеобразования для диких видов картофеля в литературе не описано, существующие ботанические описания клубней разрозненны и не дают возможности адекватно сопоставить одинаковые характеристики для разных образцов. В то же время клубнеобразование и характеристики клубней являются базовыми хозяйственными признаками картофеля. При выборе адекватного донорного материала для селекции информация о клубнеобразовании образцов представляет высокую ценность.

Сложность оценки клубнеобразования связана, в частности, с несопоставимыми условиями культивирования и широкой нормой реакции диких видов. В нашей работе проведен эксперимент по культивированию диких видов картофеля в вегетационных условиях региона, по ряду параметров приближенных к полевым (состав почвы, длина светового дня и температура), что позволяет учесть степень адаптации образцов к региональным климатическим особенностям.

Обработка цифровых изображений клубней дикого картофеля с помощью предложенного приложения Seed-Counter позволяет количественно зафиксировать их фено-

типические характеристики, относящиеся к числу, размеру и форме клубней. Наиболее достоверно различия между видами можно описать параметрами размера клубней (длина, ширина и площадь проекции), остальные морфологические параметры имеют меньшую специфичность, однако комбинация этих параметров позволяет выявить достоверные различия между образцами с высокой точностью. Предложенный метод позволяет достоверно различать не только разные виды, но и разные образцы одного вида по признакам морфологии клубней. Эта особенность метода может оказаться полезной при подборе оптимального образца конкретного вида для различных селекционных задач.

Фенотипирование дикого картофеля рассмотренным методом представляет собой емкую базу для интерпретации полученных данных. На основе результатов цифрового фенотипирования можно разрабатывать собственные характеристики описываемых фенотипов и генотипов. В частности, значения этих показателей можно использовать для оценки клубнеобразования. Введенный новый критерий клубнеобразования – объем урожая куста, выделен по результатам измерения площади проекции каждого клубня на лист бумаги и отношения длины к ширине. Визуальная оценка формы клубней и тот факт, что среди изучаемых видов параметры формы колеблются незначительно, как правило в пределах 10 % (см. табл. 2), дают возможность полагать, что форма клубня может быть аппроксимирована эллипсоидом. Ранее было показано, что величины объема и массы клубней культурного картофеля демонстрируют стабильно высокую степень корреляции и оценка объема клубней может использоваться в качестве инструмента предсказания массы (Tabatabaeefar, 2002; Su et al., 2017). Сравнение расчетной оценки объема урожая с одного куста и результатов измерения массы урожая показало высокую степень корреляции. Таким образом, полученный результат соответствует литературным дан-

ным и дает основание заключить, что введенный показатель позволяет корректно оценить клубнеобразование внутри одного эксперимента.

При дальнейшем применении данного метода для характеристики большого спектра генотипов необходимо учитывать вероятность межвидовых различий в удельной массе клубней. Поэтому при постановке метода на новом наборе образцов можно рекомендовать параллельно проводить построение регрессионной модели зависимости объема клубней от их массы. Рассчитанные данные соотносятся с данными ВИР в пяти случаях из двенадцати. Вероятно, различие в результатах оценки клубнеобразования объясняется разными условиями выращивания растений. Предложенный метод оценки клубнеобразования может быть легко адаптирован для различных условий выращивания. Проведение такой оценки в нескольких независимых экспериментах позволит определить и стабильно закрепить за каждым образцом показатель степени клубнеобразования по четырехбалльной шкале (от 0 до 3).

Заключение

Оценка количественных характеристик клубнеобразования на основе анализа изображений клубней с использованием приложения SeedCounter представляет собой перспективный метод фенотипирования видов секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L. Введение фенотипирования с использованием приложения SeedCounter в практику описания коллекций дикого картофеля позволит собрать и систематизировать большое количество новых фенотипических данных и выделить новые характеристики, полезные при принятии решений о введении конкретных образцов в селекцию.

Список литературы / References

- Букасов С.М. Обзор таксономии видов картофеля секции *Tubera-rium* (Dun.) Buk. Бюл. ВИР. 1980;105:6.
[Bukasov S.M. Taxonomy of potato species of the section *Tubera-rium* (Dun.) Buk: a review. Byulleten VIR = Bulletin of the Institute of Plant Industry (Leningrad). 1980;105:6. (in Russian)]
- Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 816. Клоновая коллекция диких видов картофеля. СПб., 2014.
[Catalog of the VIR Global Collection. Issue 816. Clone Collection of Wild Potato Species. St. Petersburg, 2014. (in Russian)]
- Киру С.Д., Костина Л.И., Трускинов Э.В., Зотеева Н.М., Рогозина Е.В., Королева Л.В., Фомина В.Е., Палеха С.В., Косарева О.С., Кириллов Д.А. Методические указания по поддержа-

- нию и изучению мировой коллекции картофеля. СПб.: ВИР, 2010.
- [Kiru S.D., Kostina L.I., Truskinov E.V., Zoteeva N.M., Rogozina E.V., Koroleva L.V., Fomina V.E., Palekha S.V., Kosareva O.S., Kirillov D.A. Guidelines for the Maintenance and Study of the World Collection of Potatoes. St. Petersburg: VIR Publ., 2010. (in Russian)]
- Киру С.Д., Рогозина Е.В. Мобилизация, сохранение и изучение генетических ресурсов культивируемого и дикорастущего картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):7-15. DOI 10.18699/VJ17.219.
- [Kiru S.D., Rogozina E.V. Mobilization, conservation and study of cultivated and wild potato genetic resources. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):7-15. DOI 10.18699/VJ17.219. (in Russian)]
- Aversano R., Contaldi F., Ercolano M.R., Grosso V., Iorizzo M., Tatino F., Delledonne M., Xumerle L., Molin A.D., Avanzato C., Ferrarini A., Sanseverino W., Cigliano R.A., Capella-Gutierrez S., Galdón T., Frusciante L., Bradeen J.M., Carpato D. The *Solanum commersonii* genome sequence provides insights into adaptation to stress conditions and genome evolution of wild potato relatives. Plant Cell. 2015;27(4):954-968. DOI 10.1105/tpc.114.135954.
- Cervantes E., Martín J.J., Saadaoui E. Updated methods for seed shape analysis. Scientifica. 2016;2016:5691825. DOI 10.1155/2016/5691825.
- Correll D.S. The Potato and its Wild Relatives. Renner: Texas Res. Found., 1962.
- Huaman Z., Williams J., Salhuna W., Vincent L. Descriptors for the Cultivated Potato. Rome, Italy: Int. Board for Plant Genet. Res., 1977;77(32):47.
- Komyshev E., Genaev M., Afonnikov D. Evaluation of the SeedCounter, a mobile application for grain phenotyping. Front. Plant Sci. 2017;7:1990. DOI 10.3389/fpls.2016.01990.
- Ochoa C.M. The Potatoes of South America: Peru. Int. Potato Center, 2004.
- Rady A.M., Guyer D.E. Rapid and/or nondestructive quality evaluation methods for potatoes: a review. Comput. Electron. Agr. 2015;117:31-48. DOI 10.1016/j.compag.2015.07.002.
- Si Y., Sankaran S., Knowles N.R., Pavék M.J. Potato tuber length-width ratio assessment using image analysis. Am. J. Potato Res. 2017;94(1):88-93. DOI 10.1007/s12230-016-9545-1.
- Si Y., Sankaran S., Knowles N.R., Pavék M.J. Image-based automated potato tuber shape evaluation. J. Food Meas. Charact. 2018;12(2):702-709. DOI 10.1007/s11694-017-9683-2.
- Spooner D.M., Van den Berg R.G., Rodrigues A., Bamberg J., Hijmans R.J., Lara-Cabrera S.I. Wild Potatoes (*Solanum* section *Petota*; Solanaceae) of North and Central America. Syst. Bot. Monogr. 2004;68.
- Su Q., Kondo N., Li M., Sun H., Al Riza D.F. Potato feature prediction based on machine vision and 3D model rebuilding. Comput. Electron. Agr. 2017;137:41-51. DOI 10.1016/j.compag.2017.03.020.
- Tabatabaefar A. Size and shape of potato tubers. Int. Agrophys. 2002;16(4):301-306.

ORCID ID

K.A. Ivanova orcid.org/0000-0002-1868-635X
D.A. Afonnikov orcid.org/0000-0001-9738-1409
A.V. Kochetov orcid.org/0000-0003-3151-5181
E.V. Rogozina orcid.org/0000-0002-2743-068X
S.V. Gerasimova orcid.org/0000-0001-8626-1831

Благодарности. Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 18-316-00068) с использованием растительного материала, поддерживаемого темой № 0662-2019-0004 (ВИР). Работа с растениями проводилась в ЦКП ЛИВР и на экспериментальных полях по госзаданию ИЦиГ СО РАН. Доработка мобильного приложения SeedCounter для анализа формы клубней выполнена в рамках проекта РНФ № 17-74-10148. При анализе данных использованы вычислительные ресурсы ЦКП «Биоинформатика» (при поддержке госзадания ИЦиГ СО РАН).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.02.2019. После доработки 08.04.2019. Принята к публикации 15.04.2019. Опубликована онлайн 29.04.2019.