

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 424 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Цымбала Григория Александровича

Научный руководитель:

доцент, к.б.н.



М.Ю. Касаткин

Зав. кафедрой:

профессор, д.б.н.



С.А. Степанов

Саратов 2023

Введение

Методы машинного обучения сейчас распространены во многих отраслях нашей жизни. В том числе активное их применение может использоваться в физиологии растений. С помощью машинного обучения можно определить содержание определенных пигментов в растении, болезнь растений, качество минерального питания и т.д.

Научная новизна:

Исследование сортов пшеницы с применением метода цветофотометрии и метода определения пигментов в листьях с применением машинного обучения.

Цель исследования – разработка общего алгоритма, позволяющего количественно определять хлорофиллы в тканях растений на основе анализа фотоизображений.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

1. Исследовать вытяжки пигментов на спектрофотометре с использованием стандартного двухволнового метода. Определить содержание хлорофиллов пигментов. Произвести фотографирование верхней, средней и нижней частей листовой пластинки первого листа непосредственно перед их гомогенизацией.

2. С применением библиотеки компьютерного зрения OpenCV языка программирования Python обработать полученные цифровые изображения и получить информацию о средних значениях яркости основных цветов – красного, зеленого и синего. На основе полученных данных рассчитать модель, описывающую зависимость яркости цветовых каналов и концентрации хлорофиллов и каротиноидов в листьях.

3. При помощи машинного обучения нейронных сетей определить наличие связи между особенностями цветового распределения пикселей на изображении и содержанием пигментов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе приводятся основы оптики, поглощения и отражения света. Во второй главе рассматриваются строение и свойства пигментов растений. В третьей главе рассматривается лист, как сложная оптическая система. В четвертой главе приводятся методы измерения оптических параметров. В пятой главе – материалы и методы исследования. В шестой главе рассматривается спектрофотометрическая и цветометрическая характеристика распределения пигментов по элементам фитомера растений. В седьмой главе – определение пигментов в листьях с применением машинного обучения.

1 Основы оптики. В основе оптики лежат четыре закона, установленные опытным путем: 1) закон прямолинейного распространения света; 2) закон независимости световых пучков; 3) закон отражения; 4) закон преломления. Первые три закона были известны еще древним грекам, четвертый закон вошел в науку в формулировке Р.Декарта (1637 г.) [1].

Поглощение света – это явление уменьшения интенсивности света при прохождении его через вещество.

Отражение света — это изменение направления световой волны при падении на границу раздела двух сред, в результате чего волна продолжает распространяться в первой среде [2].

2 Строение и свойства пигментов растений. Основу молекулы хлорофилла составляют четыре пиррольных кольца (I, II, III и IV). Зеленый цвет хлорофилла определяется наличием металла в его молекуле.

Помимо хлорофилла а, обладающего сине-зеленой окраской, в хлоропластах зеленых водорослей и высших растений обнаружена еще другая форма желто-зеленого цвета — хлорофилл b. В отличие от хлорофилла а, имеющего эмпирическую формулу $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$, хлорофилл b содержит лишь на два атома водорода меньше и на один атом кислорода больше.

Наряду с хлорофиллами к постоянным компонентам комплекса пигментов фотосинтезирующих систем относятся каротиноиды. Обычно это желтые,

оранжевые и светло-красные пигменты, которые хорошо растворяются в жирах и растворителях жиров, но не растворяются в воде [3].

Общее количество хлорофилла невелико и составляет в среднем около 1 % от сухого вещества листа, но оно может сильно варьировать, изменяясь у водорослей от 0,6 до 1,5%, а у высших наземных растений от 0,7 до 1,3%.

Светочувствительные пигменты клетки - это окрашенные вещества, содержащиеся в клетке, которые способны поглощать, запасать, передавать и преобразовывать энергию солнечного света определенной длины волны.

3 Лист растения как сложная оптическая система. Лист высшего растения – сложная оптическая система, обладающая способностью оптимально использовать солнечную энергию.

Отражение света листом это переменная величина, зависящая от типа растения, строения листовой пластинки, времени суток (уровня освещения) и т.д. [4].

Клетки верхнего эпидермиса благодаря своей форме способны фокусировать свет, увеличивая его интенсивность в 15–20 раз по сравнению со светом, упавшим на поверхность листа [5].

4 Методы измерения оптических параметров

Цитофотометрия — спектральный метод количественного и качественного изучения химических веществ клетки по избирательному поглощению ими ультрафиолетовых, видимых или инфракрасных лучей.

Двухволновой метод

Выполнение закона Бугера–Бэра для равномерного слоя красителя означает, что для любых длин волн полосы поглощения отношение оптических плотностей равно отношению соответствующих показателей поглощения. Если равномерность слоя нарушается, то указанное соотношение тоже нарушается, так как появляется ошибка распределения, нелинейно связанная с оптической плотностью [6].

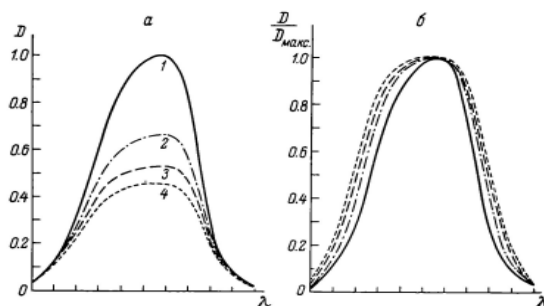


Рисунок 3 – Влияние ошибки распределения на форму экспериментальной кривой поглощения.

Цифровой цветометрический подход к оценке оптических свойств растительных тканей

Метод цифровой цветометрии заключается в определении количественных характеристик цвета и установлении их взаимосвязи с содержанием определяемых веществ в анализируемых объектах.

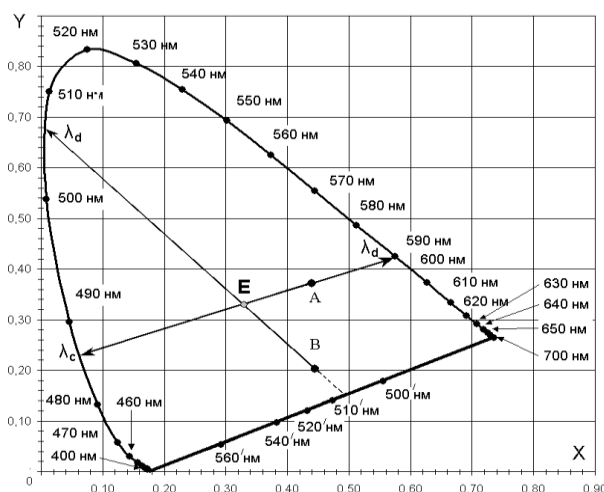


Рисунок 4 – Цветовой график системы XYZ

С помощью преобразования координат можно перейти из одной цветовой системы в другую. Например, для перехода от системы RGB к системе XYZ используются следующие формулы:

$$X = 0,49 * R + 0,31 * G + 0,20 * B$$

$$Y = 0,18 * R + 0,81 * G + 0,01 * B$$

$$Z = 0,01 * G + 0,99 * B [7].$$

5 Материалы и методы исследования.

Материалы: Исследования проводились на кафедре микробиологии и физиологии растений Саратовского государственного университета им. Н.Г.Чернышевского. Объектом изучения являлись однолетние побеги древесных растений, произрастающих в условиях урбанизированной среды и широко используемых в озеленении города: вяз малый (*Ulmus minor* Mill.), сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris* L.), ясень обыкновенный (*Fraxinus excelsior* L.). Пробы отбирались в середине июня 2022 г. у отдельно стоящих растений для исключения эффекта затенения. Исследовались листья и междоузлия верхнего и нижнего фитомера однолетнего прироста бокового побега.

В качестве модельного объекта для разработки модели количественного определения хлорофилла на основе анализа фотоизображений были выбраны сорта мягкой пшеницы (Саратовская 59 и Николаша).

Методы: Определение фотосинтетических пигментов проводилось по общепринятой методике двухволновым методом на спектрофотометре Leki SS2109UV. Долю хлорофиллов в ССК рассчитывали по методу Лихтенталера, согласно которому принимается, что практически весь хлорофилл b находится в ССК, а соотношение хлорофиллов a и b в этом комплексе составляет 1,2 [30].

Результаты исследований подвергались статистической обработке по Б.А. Доспехову (1985) в табличном процессоре Excel пакета MS Office 2010 [31].

Для анализа листьев пшеницы по фотоизображениям осуществлялось фотографирование на цифровую фотокамеру Panasonic LUMIX GH4 с блокировкой автоматической экспозиции, баланса белого и фокусного расстояния. Световой прибор находился на фиксированном расстоянии 8см. Уровень световой температуры составлял 9000К. В программу ImageJ последовательно загружали сделанные изображения. На каждом изображении выбиралось 5 зон 10x10px без дефектов листа. Усредненные по выделенной области интересов уровни цветности получали с помощью инструмента «гистограмма» во вкладке «анализ». Усредненные значения измеряемого канала

цвета R, G, B заносили в таблицы Excel и находили содержание $C_{\text{хл.а+b}}$ по данным формулам:

$$C_{\text{хл.а+b}} = 0,50 + 0,27 \log_e \left(\frac{G - B}{G + B} \right) + 0,01;$$

$$C_{\text{хл.а+b}} = -0,27 \log_e \left(\frac{G - B}{G + B} \right) * 3,5;$$

6 Содержание пигментов в листьях проростков пшеницы

6.1 Спектрофотометрическая характеристика распределения пигментов по элементам фитомера растений

Анализ данных выявил, что концентрация зеленых пигментов (сумма хлорофиллов а и b) в листьях и стеблях исследованных видов варьирует в широком диапазоне, 0,75–15 мг/дм² (Табл. 1). Максимальное содержание хлорофиллов обнаруживается у сирени в нижнем листе однолетнего побега и составляет 15,0 мг/дм² поверхности органа. В верхнем листе у данного вида наблюдается снижение концентрации суммы хлорофиллов до 13,6 мг/дм². У двух остальных видов (вяза и ясеня) наблюдается максимальное количество хлорофиллов в листьях верхних фитомеров. Листья нижних фитомеров обнаруживают небольшое снижение концентрации указанных пигментов.

Общее содержание хлорофиллов в стебле исследованных видов примерно в 6-10 раз меньше, чем у листьев. Максимальное содержание обнаруживается в верхнем междоузлии сирени и ясеня, тогда как у вяза в нижнем фитомере концентрация в 2 раза больше, чем в верхнем.

Концентрация хлорофилла а максимальна в листе нижнего междоузлия сирени и составляет 11,1 мг/дм² поверхности органа, снижаясь до 9,6 мг/дм² у верхнего листа. У вяза и ясеня содержание хлорофилла а не сильно варьирует в листьях верхнего и нижнего междоузлия и составляет в среднем 7,3 мг/дм² и 6,2 мг/дм² соответственно.

Таблица 1 – Содержание хлорофиллов и каротиноидов в элементах фитомеров однолетних побегов древесных растений, мг/дм² поверхности органа

Вид	Элемент фитомера	Фитомер	Хл <i>a</i>	Хл <i>b</i>	Хл <i>a + b</i>	Каротиноиды
Вяз (<i>Ulmus minor</i> Mill.)	Лист	верхний	7,72±0,19	2,09±0,03	9,81±0,12	3,01±0,08
Вяз (<i>Ulmus minor</i> Mill.)	Лист	нижний	6,92±0,17	2,05±0,07	8,97±0,09	2,59±0,07
Вяз (<i>Ulmus minor</i> Mill.)	Стебель	верхний	0,66±0,05	0,08±0,01	0,75±0,03	0,40±0,02
Вяз (<i>Ulmus minor</i> Mill.)	Стебель	нижний	1,03±0,06	0,52±0,06	1,56±0,06	0,43±0,03
Сирень (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	Лист	верхний	9,61±0,08	4,02±0,09	13,63±0,12	3,42±0,05
Сирень (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	Лист	нижний	11,09±0,14	3,91±0,07	15,01±0,17	3,32±0,09
Сирень (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	Стебель	верхний	1,63±0,04	0,69±0,01	2,32±0,09	0,51±0,05
Сирень (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	Стебель	нижний	1,25±0,03	0,55±0,03	1,81±0,07	0,41±0,08
Ясень (<i>Fraxinus excelsior</i> L.)	Лист	верхний	6,45±0,06	2,25±0,10	8,70±0,11	2,52±0,09
Ясень (<i>Fraxinus excelsior</i> L.)	Лист	нижний	5,94±0,05	1,55±0,09	7,50±0,12	2,40±0,09
Ясень (<i>Fraxinus excelsior</i> L.)	Стебель	верхний	1,38±0,03	0,57±0,05	1,96±0,08	0,62±0,04
Ясень (<i>Fraxinus excelsior</i> L.)	Стебель	нижний	0,69±0,03	0,32±0,03	1,01±0,09	0,31±0,05

Содержание каротиноидов в листьях максимально у сирени и обнаруживает достаточно близкие значения по фитомерам со средним показателем 3,37 мг/дм². У ясеня концентрация жёлтых пигментов также статистически не различается и составляет в среднем 2,46 мг/дм². У вяза обнаружено уменьшение концентрации каротиноидов в листе нижнего междоузлия с 3,01 до 2,59 мг/дм² соответственно.

Содержание каротиноидов в стебле примерно в 6-8 раз меньше, чем в листьях у всех фитомеров. Близкие значения отмечены у вяза и сирени (в среднем 0,41 и 0,46 мг/дм² соответственно). У ясеня в нижнем междоузлии концентрация каротиноидов падала в 2 раза (с 0,63 до 0,32 мг/дм²).

Оценка соотношения форм пигментов позволяет оценить функциональные свойства хлоропластов, связанные с пигментным составом светособирающих комплексов фотосинтетических единиц [8]. Прослеживается тенденция увеличения соотношения хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* в нижних листьях (Таблица 2). Особенно ярко это можно проиллюстрировать у листьев ясеня (в

верхнем листе 2,8, в нижнем – 3,8). У вяза в разных фитомерах обнаруживаются близкие значения и в верхнем листе однолетнего побега указанное значение максимально для данного вида. Большие значения соотношения хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* означают высокую потенциальную интенсивность фотосинтеза и в норме составляют 3:1 [10]. Повышение данного соотношения вполне ожидаемо у более старых листьев, где сформирована уже вполне зрелая система фотосинтетического аппарата. Соотношение хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* в стебле у сирени и ясеня в нижнем и верхнем междоузлиях не отличаются в пределах ошибки эксперимента и составляют в среднем 2,3 и 2,28 соответственно. У вяза в верхнем междоузлии обнаружено максимальное значение равное 7,6. В нижнем междоузлии соотношения хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* в 4 раза меньше.

Таблица 2 – Параметры фотосинтетического аппарата элементов фитомеров однолетних побегов древесных растений

Вид	Элемент фитомера	Фитомер	Хл а / Хл b	Хл / Кар	Доля Хл в ССК, %
Вяз (<i>Ulmus minor</i> Mill.)	Лист	верхний	3,69±0,09	3,25±0,08	46,85
Вяз (<i>Ulmus minor</i> Mill.)	Лист	нижний	3,37±0,08	3,46±0,08	50,27
Вяз (<i>Ulmus minor</i> Mill.)	Стебель	верхний	7,62±0,11	1,85±0,05	25,50
Вяз (<i>Ulmus minor</i> Mill.)	Стебель	нижний	1,98±0,03	3,62±0,09	73,60
Сирень (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	Лист	верхний	2,38±0,03	3,98±0,10	64,93
Сирень (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	Лист	нижний	2,83±0,04	4,51±0,08	57,41
Сирень (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	Стебель	верхний	2,36±0,03	4,48±0,07	65,44
Сирень (<i>Syringa vulgaris</i> L.)	Стебель	нижний	2,26±0,03	4,38±0,08	67,40
Ясень (<i>Fraxinus excelsior</i> L.)	Лист	верхний	2,86±0,05	3,44±0,05	56,92
Ясень (<i>Fraxinus excelsior</i> L.)	Лист	нижний	3,83±0,07	3,12±0,08	45,52
Ясень (<i>Fraxinus excelsior</i> L.)	Стебель	верхний	2,40±0,04	3,11±0,05	64,53
Ясень (<i>Fraxinus excelsior</i> L.)	Стебель	нижний	2,15±0,02	3,20±0,06	69,80

Соотношения суммы хлорофиллов к каротиноидам во всех элементах изученных фитомеров колебалось вокруг нормального значения, равного 3. Исключение составили только верхнее междоузлие вяза (1,8) и стебель сирени –

около 4,4. Отклонение соотношения пигментов от нормальных значений связано с активной фазой их синтеза в растущих органах.

Доля хлорофилла в светособирающем комплексе у вяза и ясеня была выше в стебле и примерно одинакова у всех элементов фитомеров сирени.

Таким образом проведенные исследования позволяют сказать о физиологической значимости особенностей распределения пигментов фотосинтеза в целом растении. Определенные особенности в содержании пигментов между элементами одного метамера указывают на их разную цель функционирования.

6.2 Цветометрическая оценка содержания фотосинтетических пигментов. Применение цветометрической оценки основывается на том, что имеются корреляционные связи между содержанием хлорофилла в листьях и яркостью цветочных каналов на фотографиях этих листьев [11]. Таким образом, измеряя среднюю яркость канала (RGB) на фотографии, можно количественно оценить содержание хлорофиллов в них.

В качестве модельного объекта для установления функциональной зависимости между яркостями каналов изображения и содержанием хлорофиллов были выбраны сорта твердой яровой пшеницы. Проращивание в контролируемых изменяемых условиях позволило получать проростки с разным содержанием хлорофиллов в листьях. Учитывалось градиентное распределение пигментов в листе, что позволило выделить верхнюю, среднюю и базальную части данного элемента фитомера. Кроме того, особенности ультраструктуры поверхности листовой пластинки определили неоднородность в оптических параметрах её адаксиальной и абаксиальной поверхностей. В связи с этим отдельно проводился анализ фотографий верхней и нижней поверхностей первого листа.

Анализ литературы показал, что динамики содержания хлорофиллов и изменения цветочных каналов носит нелинейный характер. В связи с этим в моделях обычно применяется преобразование переменных: вычисление

натуральных логарифмов и возведение в степень. Для исследования были выбраны 3 модели расчёта содержания суммы хлорофиллов в листе.

$$\text{Модель 1: } -0,27 * \text{LN}((G - B)/(G + B)) * 3,5$$

$$\text{Модель 2: } 1/(1 + \text{EXP}(-(G - R/3 - B/3) / 255)) * 1,703$$

$$\text{Модель 3: } 1/(1 + \text{EXP}(-((R - G)/(R + G + B)))) * 2$$

Варьирование содержания пигментов у 2 сортов по вариантам опыта в различных частях первого листа с учётом разных его сторон позволило создать необходимый массив данных для вычисления коэффициентов функций. Расчёты показали, что наиболее близкие величины к истинным значениям содержания хлорофилла даёт модель 1. При этом, расчёты согласно данной модели явились универсальными, поскольку не зависели от сорта и соотношения разных форм хлорофилла и каротиноидов в контроле и при моделировании условий засухи. Наиболее точные значения в большинстве случаев оказывались при расчёте средних значений цветовых каналов, полученных на верхней и нижней поверхностях листовой пластинки.

7 Определение пигментов в листьях с применением машинного обучения.

Цветометрическая оценка пигментов в растении является достаточно проработанной методикой. Для оценки пигментов в растении применяются различные алгоритмы и индексы цветности. Основная сложность при этом состоит в том, что, зная основные нелинейные характеристики зависимости содержания хлорофиллов от значений цветовых каналов, необходимо найти дополнительные коэффициенты уравнения. С помощью них происходит конечная адаптация цветометрической модели к конкретному растительному образцу.

Данный процесс можно реализовать и с помощью машинного обучения, используя технологии компьютерного зрения и анализа изображений. Применение машинного обучения может ускорить, упростить и автоматизировать процесс анализа пигментов в листьях растений.

Машинное обучение - процесс создания статистических моделей для нахождения закономерностей на основе подготовленных массивов данных.

Для реализации оценки содержания пигментов в растении необходимо применить задачу регрессии — по данным восстанавливается зависимость между переменными. Регрессия, как правило, выполняется с помощью обучения с учителем на этапе тестирования, является частным случаем задач прогнозирования.

Выбранный нами подход состоит в следующем:

1. Сбор образцов листьев разных ярусов со стебля разных сортов пшеницы;
2. Изготовление высококачественных фотографий образцов на бинокулярном микроскопе;
3. Применение алгоритмов машинного обучения с использованием модулей компьютерного зрения для распознавания фотографий;
4. Тестирование обученной модели на новых образцах и сравнение результатов с изначальными данными;

5. Разработка приложений или программного обеспечения для простого и быстрого анализа пигментов в листьях.

В качестве языка программирования использовался Python версии 3.11 для Windows. Для реализации возможностей машинного обучения применялась библиотека scikit-learn. В качестве модели обучения была выбрана линейная регрессия.

Набор признаков для обучения представлялся в виде значений яркостей цветовых каналов, полученных из оцифрованных изображений листьев. В качестве целевого признака обучения использовалось общее содержание хлорофиллов, рассчитанных на спектрофотометре для каждого сфотографированного образца. Для обучения модели использовались данные из примерно 500 фотоизображений листьев.

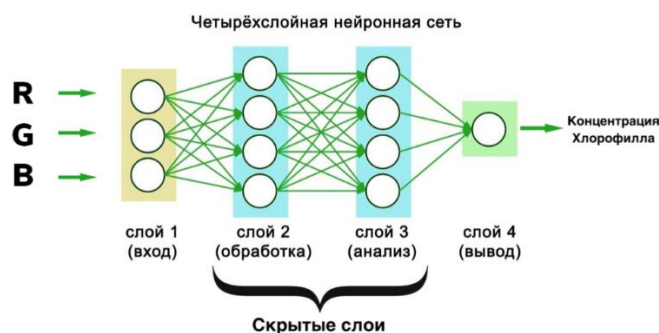


Рисунок 5 – Принципиальная схема нейросети

По сравнению с адаптированной нами моделью для цветометрических расчётов применение искусственного интеллекта повышает точность определения концентрации суммы хлорофиллов в листьях в 2-5 раз. Ещё одним преимуществом такого подхода является быстрота создания рабочей модели - необходимо только подготовить обучающие данные для начала анализа образцов. Чем больше набор данных - тем точнее будет работать обученная нейронная сеть.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптические свойства растений зависят от содержания в них хлорофиллов. Хлорофиллы распределены по-разному в элементах фитомера, в то же время имеется градиент, связанный с ростовой активностью.

Получается, что пигменты различаются по элементам фитомера. Распределение пигментов связано с разной ростовой активностью. В молодых частях меньше хлорофилла. В более старых - больше.

На основе проведенного анализа выбрана оптимальная модель и предложен общий алгоритм, позволяющий количественно оценивать содержание зеленых пигментов в листьях растений на основе анализа фотоизображений.

На основании вышеизложенного можно сделать следующие выводы:

1. Особенность распределения пигментов фотосинтеза по элементам фитомера определяется их ростовой активностью.

2. Точность расчётов содержания суммы хлорофиллов повышается при использовании средних значений цветовых каналов изображений верхней и нижней поверхностей листовой пластинки.

3. Использование метода машинного обучения нейросетей "обучение с учителем" повышает точность цветометрических расчётов.

