

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

ШУРЫГИН БОРИС МИХАЙЛОВИЧ

**Неинвазивная оценка состояния растительных объектов
посредством пространственно-разрешённого анализа их
оптических свойств**

Специальность 1.5.2. Биофизика (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре биоинженерии биологического
факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель – *Соловченко Алексей Евгеньевич, доктор биологических наук*

Официальные оппоненты – *Погосян Сергей Иосифович, доктор биологических наук, доцент, кафедра биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор*

Дымова Ольга Васильевна, доктор биологических наук, лаборатория экологической физиологии растений Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, ведущий научный сотрудник

Сухов Владимир Сергеевич, кандидат биологических наук, доцент, кафедра биофизики Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, доцент

Защита диссертации состоится «20» февраля 2025 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 24, ауд. «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3290>

Автореферат разослан « » января 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

П.В. Фурсова

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Повышение климатической нестабильности и антропогенной нагрузки на биосферу в последние десятилетия приводит к росту интенсивности стрессовых воздействий на растительные организмы в составе природных и искусственных экосистем (Fernandez *et al.*, 2021). Природные и антропогенные стрессоры нарушают процессы роста и развитие растений, вызывают повреждения, снижают продуктивность растительных сообществ. При этом потребность человечества в продукции сельского хозяйства постоянно растёт, требуя применения передовых практик, включая методы точного земледелия (precision farming) и ускоренной селекции стресс-толерантных культур. Методология данных подходов включает высокопроизводительное фенотипирование — методы массового получения количественной, детальной и объективной информации о различных аспектах состояния растительных объектов, в идеале — неинвазивными методами (Yang *et al.*, 2020; Großkinsky *et al.*, 2023).

Наиболее разработанными и устоявшимися методами неинвазивного мониторинга растительных объектов являются оптические методы, основанные на регистрации интенсивности и спектрального состава света, отражённого растениями, прошедшего сквозь них либо испускаемого ими в результате люминесценции (Li *et al.*, 2014; Kior *et al.*, 2021). В последнее время этот арсенал пополнился мощными методами анализа изображений на основе машинного обучения (Fahlgren *et al.*, 2015; Demidchik *et al.*, 2020). В зависимости от расстояния до объекта, данные подходы условно разделяются на методы дистанционного и проксимального зондирования. Несмотря на достижения последних лет, существующие методы дистанционного и проксимального зондирования не позволяют оценивать динамику состояния растений (например, работу фотосинтетического аппарата) с достаточной точностью и гранулярностью.

Так, традиционные методы дистанционного зондирования растений оперируют «точечными» измерениями и характеризуются сравнительно низким пространственным разрешением. Эти методы с успехом применяются в мониторинге обширных экосистем и полевых культур, позволяя оценивать продуктивность растений (например, накопление биомассы) и регистрировать прохождение фенологических фаз. Однако использовать методы, основанные на «точечной» спектрометрии, для анализа деталей структуры и морфологии растений (например, архитектуры крон и количественного учета органов, таких как отдельные листья и плоды) практически невозможно. В частности, по этой причине классические методы дистанционного зондирования не нашли

применения в автоматизированной морфометрии растений и в промышленном точном садоводстве. Несмотря на обширность накопленного опыта в спектроскопии растений, вопросы пространственной гетерогенности растительных объектов не рассматривались системно; учёт её влияния на наблюдаемые оптические характеристики сводился, как правило, к ручному выделению на изображениях однородных участков с последующим анализом их спектров.

В то же время взрывной рост распространённости и доступности вычислительной и измерительной техники в последние десятилетия сделал технически осуществимым сбор данных с высоким разрешением в пространстве и во времени (порядка сантиметров и секунд, соответственно) на протяжении всего жизненного цикла растения (Yang *et al.*, 2020). Стало возможным автоматизированное выделение на изображениях отдельных органов растений и их частей даже *in natura*, в условиях сложной светотеневой обстановки, благодаря развитию методов технического зрения — в особенности основанных на использовании искусственных нейронных сетей (Tardieu *et al.*, 2017).

К настоящему времени стало очевидно, что синтез традиционных подходов проксимального оптического зондирования с современными высокопроизводительными методами сбора и обработки пространственно-разрешенной спектральной, амплитудно-кинетической и морфологической информации открывает новые горизонты для биологии растений. Принципиально также, что внедрение комбинированных методов мониторинга и анализа повысит достоверность и точность оценок и прогнозов развития агробиоценозов, что ценно для сельского хозяйства и селекции. Однако реализация этих подходов требует глубокого понимания связи пространственной и временной вариации оптических свойств растений с параметрами их состояния, таким как пигментный состав, развитие повреждений, функциональным статусом фотосинтетического аппарата, что и обусловило необходимость проведения настоящего исследования.

Цели и задачи

Целью работы является получение неинвазивной оценки функционального состояния и биохимического состава растительных объектов методами, основанными на измерениях их оптических свойств, разрешённых в пространстве и во времени.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить изменения пространственно-разрешённых оптических характеристик растительных объектов и их связь с физиологическим состоянием растений в норме и при действии неблагоприятных факторов, а также в ходе развития.
2. Проанализировать взаимосвязь динамики локальных оптических свойств органов растения и оценки общего состояния растения с учётом гетерогенности физиолого-биохимических свойств его органов и тканей.
3. Сопоставить информативность текстурных и оптических характеристик спектральных изображений в задачах неинвазивного фенотипирования растений на примере детекции повреждений плодов яблони.
4. Изучить связь показателей состояния фотосинтетического аппарата с глубиной зимнего покоя растений яблони.

Научная новизна и практическая значимость работы

Продемонстрирована возможность количественной оценки пространственной гетерогенности содержания пигментов в плодах и листьях и неоднородность органов растения в плане темпов созревания и старения. Показано, что учет данной гетерогенности повышает чувствительность и информативность неинвазивной оценки пигментного состава по гиперспектральным изображениям. Предложены методы описания состояния растений и их органов на основе пространственных распределений наблюдаемых оптических характеристик.

Проведено экспериментальное сравнение использования вегетационных индексов и спектральных коэффициентов отражения, а также текстурных дескрипторов в алгоритмах машинного обучения на примере задачи детекции повреждений плодов яблони. Показан рост устойчивости и точности результирующих классификаторов при использовании вегетационных индексов по сравнению с коэффициентами отражения в качестве входных параметров. Продемонстрирована возможность использования мультиспектральных камер вместо гиперспектральных без снижения надёжности и точности детекции повреждений. Установлена значимость пространственного контекста пикселей спектрального изображения.

Разработан способ неинвазивного определения глубины зимнего покоя древесных растений (на примере яблони), основанный на вейвлет-анализе временных рядов вариации параметров переменной флуоресценции хлорофилла, измеренных методом РАМ-флуориметрии. Показана важность сбора данных в течение длительных промежутков времени и возможность определения долгосрочной динамики физиологических параметров на фоне суточных осцилляций.

Методология и методы исследования

Работа проведена в рамках методов пространственно-разрешённой оптической спектроскопии, методов компьютерной обработки изображений и машинного обучения, методов биохимического анализа. Объектом исследования являются растения в различном физиологическом состоянии и их оптические свойства. Предметом исследования является связь спектральных коэффициентов отражения, их пространственного распределения и временной динамики с физиолого-биохимическими и фенологическими параметрами растительных объектов.

Положения, выносимые на защиту

1. В силу сложности изменений оптических свойств растений в ходе их развития и при адаптации к неблагоприятным факторам корректное описание состояния растения в целом возможно только с учётом пространственной гетерогенности этих свойств.
2. Эффективная неинвазивная оценка физиологического состояния растений по их спектральным изображениям методами машинного обучения возможна при оптимальном соотношении пространственного и спектрального разрешения исходных данных.
3. При прохождении растениями фенологических фаз долгосрочная перестройка фотосинтетического аппарата происходит на фоне адаптации к быстро меняющимся условиям окружающей среды; при неинвазивном мониторинге показателей состояния фотосинтетического аппарата эти процессы разделены методами частотного анализа.

Личный вклад автора

Формулирование гипотез, расчёты и обработка полученных данных, включая разработку и реализацию алгоритмов, интерпретация результатов выполнены автором самостоятельно. Планирование исследований и получение экспериментальных данных проводилось в составе коллектива авторов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационной работы обеспечивается современными методами исследования, которые соответствуют цели работы и поставленным задачам. Полученные результаты согласуются с известными из литературы данными о физиологии исследованных растительных объектов.

Результаты исследований были представлены в виде устных докладов на Российских и международных конференциях: Агробиофотоника (Москва – 2022), IV Международная Черноморская научно-практическая конференция МГУ «Проблемы информатики, управления и искусственного интеллекта» (Севастополь – 2022), Агроэкологическая безопасность, энергоэффективные спектральные и лазерные технологии в повышении продуктивности сельского хозяйства (Москва – 2021), III Международная конференция «Биотехнологии – драйвер развития территорий» (Вологда – 2020), International Symposium on Precision Management of Orchards and Vineyards (Италия, Палермо – 2019), XXIII ISPRS Congress (Чехия, Прага – 2016).

Публикации

По материалам работы опубликовано 11 статей в изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RCSI, из списка рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки). Получено 2 свидетельства о регистрации программ для ЭВМ и 1 патент РФ.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 176 страницах машинописного текста и включает введение, основную часть, состоящую из трёх глав, заключение, список сокращений и условных обозначений и список литературных источников, состоящий из 317 наименований. Работа содержит 53 рисунка и 11 таблиц, а также одно приложение.

Основное содержание работы

Введение

Во введении обосновывается актуальность выбранной темы исследований, излагается научная новизна и практическая значимость полученных результатов, формулируется цель и ставятся задачи диссертационного исследования.

Обзор литературы

Глава «Обзор литературы» разбита на четыре раздела. Первый из них содержит краткий обзор подходов к фенотипированию растительных объектов и основных задач фенотипирования.

Второй раздел посвящён механизмам индукции стресса и реализации стрессовых реакций у растений. Особое внимание уделяется проблеме зимнего покоя растений как направления, обрётшего повышенную актуальность в связи с климатическими изменениями. Приводятся сведения о модуляции фотосинтетической активности в ходе прохождения холодного сезона и различных фаз зимнего покоя, рассмотрены способы неинвазивного наблюдения за состоянием фотосинтетического аппарата.

В третьем разделе рассмотрены основные растительные пигменты, их роль в жизнедеятельности растения и развитии устойчивости к воздействию стрессоров, а также накопление и преобразование пигментов в ходе онтогенеза и при развитии повреждений. Описание сопровождается сведениями об оптических свойствах пигментов – спектральных коэффициентах отражения и пропускания – как в виде выделенных из растений препаратов (экстрактов), так и *in vivo*.

Четвёртый раздел посвящён приборам и методам оптической спектроскопии растений. В контексте оптических свойств пигментов рассматриваются границы применимости теории Кубелки-Мунка и закона Бугера-Ламберта-Бера, используемые приближения. Приводятся сведения о численных моделях взаимодействия излучения с листом и кроной высших растений (Kuusk, PROSPECT, SAIL), основах построения вегетационных индексов (ВИ). Рассматриваются современные методы анализа изображений на основе искусственных нейронных сетей глубокого обучения, вопросы стабильности и обобщимости нейросетевых моделей, их интерпретируемость.

Материалы и методы

Растительные объекты

Объектами исследования служили плоды яблони (*Malus × domestica* Borkh.) сортов Лигол, Гала, Голден Делишес, Антоновка Обыкновенная (сбор через 80–110 дней после пика цветения), и растения салата (*Lactuca sativa* var. *crispa* ‘Revolution’; инкубация в климатостате при температуре +15 °С, относительной влажности 45% и освещённости 50 мкмоль фотонов × м⁻² × с⁻¹).

Деструктивные анализы

Зрелость плодов оценивалась по индексу Штрайфа (Streif, 1994). Содержание хлорофиллов и каротиноидов в плодах и листьях определяли спектрофотометрически, в ацетоновых либо хлороформных экстрактах (Соловченко *и др.*, 2001) на спектрофотометре Agilent Cary Bio 300 (Agilent, США) со сферой Ульбрихта. Спектры диффузного отражения были измерены на том же приборе. Содержание воды в листьях салата определяли гравиметрически (Seccato *et al.*, 2001).

Получение гиперспектральных изображений

Спектральные изображения были получены гиперспектрометром IQ (SPECIM, Финляндия), а также сканирующим гиперспектрометром BaySpec OCI-F (Bayspec Inc., США). Радиометрическая калибровка снимков проводилась с синхронной (в случае SPECIM IQ) или предварительной (в случае Agilent Cary Bio 300 и BaySpec OCI-F) съёмкой отражательного стандарта, в качестве которого использовалась панель из спектралона. Съёмки проводились как при естественном освещении, так и при искусственном. В качестве источников искусственного освещения при съёмках яблок использовали галогенные лампы, при съёмках листьев салата — люминесцентные лампы холодного света.

Мониторинг зимнего покоя растений

Для мониторинга переменной флуоресценции хлорофилла и глубины зимнего покоя использовали трёхлетние деревья яблони сорта «Флагман» на подвое 62-396 и высаженные по схеме 2.5 × 0.8. Для неинвазивных экспериментов РАМ-флуориметры, разработанные на кафедре биофизики биологического факультета МГУ (Antal *et al.*, 2019), крепили в средней части побега (диаметр ок. 1.5 см) на высоте ок. 1.5 м. Для объективного контроля глубины зимнего покоя срезали пять 20-см побегов с пяти экспериментальных деревьев и инкубировали их в водопроводной воде при комнатной температуре. Критерием перехода растений из глубокого покоя в фазу вынужденного покоя служило распускание почек в 10-дневный период после начала проращивания.

Измерения переменной флуоресценции хлорофилла

Измерения флуоресценции листьев салата проводили изображающим РАМ-флуориметром FluorCAM 800 (Photon Systems Instruments, Чехия) с

предварительной темновой адаптацией растений в течение 15 минут. Рассчитывался и анализировался потенциальный максимальный фотохимический квантовый выход второй фотосистемы $Q_y = \frac{F_m - F_0}{F_m} = \frac{F_v}{F_m}$ и его пространственное распределение по поверхности листа.

Измерения переменной флуоресценции для ветвей яблони проводились импульсным флуориметром с быстро повторяющимися вспышками (fast repetition rate, FRR). Для количественного описания характеристик первичных процессов фотосинтеза использовали методологию ЛР-теста (Strasser *et al.*, 2004), извлечение основных параметров переменной флуоресценции проводилось методом мультиэкспоненциальной аппроксимации (Plyusnina *et al.*, 2015).

Обработка спектров и изображений

Для обработки спектров отражений и спектральных изображений использовалось три основных подхода.

В первом из них спектральные коэффициенты поглощения, рассчитанные в рамках модели Кубелки-Мунка по коэффициентам отражения как $\alpha(\lambda) \sim R^{-1}(\lambda)$, раскладывали на вклады четырёх основных групп пигментов — хлорофиллов и первичных каротиноидов, R_C ; кутикулярных и вакуолярных фенольных соединений, R_P ; вторичных каротиноидов, R_X и антоцианов, R_A на основании их лабораторно измеренных спектров:

$$R^{-1}(\lambda) = C * R_C^{-1}(\lambda) + P * R_P^{-1}(\lambda) + X * R_X^{-1}(\lambda) + A * R_A^{-1}(\lambda) + r,$$

$$C, P, X, A \geq 0,$$

где C , P , X и A – удельные вклады соответствующих групп пигментов, r – остаточный член (Merzlyak, 2006).

Во втором подходе использовали вегетационные индексы $CI_{678} = R_{800} / R_{678}$ и $PSRI = (R_{678} - R_{480}) / R_{800}$, описывающие общее содержание хлорофиллов и соотношение концентраций хлорофиллов и вторичных каротиноидов, соответственно (Merzlyak *et al.*, 1999). Анализировали пространственное распределение значений индексов на спектральном изображении объектов, результаты сопоставляли с независимо определенным состоянием растения.

В третьем подходе пиксели изображения классифицировали на основе их спектров отражения и пространственного контекста. Для описания пространственного контекста использовались локальные бинарные шаблоны, LBP (Harwood *et al.*, 1995). Помимо коэффициентов отражения, в качестве спектральных признаков использовались вегетационные индексы CI_{700} , $mARI$, $mBRI$ (Horler *et al.*, 2007; Gitelson *et al.*, 2006; Solovchenko *et al.*, 2021). Классификация проводилась методами опорных векторов и случайного леса (random forest), на вход которым подавались различные сочетания измеренных и

вычисленных параметров. Критериями информативности признаков для решения целевой задачи выступали полнота и точность детекции повреждённых участков плодов.

Результаты и обсуждение

Мониторинг трансформации пигментов при созревании плодов

Для решения задачи мониторинга изменений пигментного состава, связанных с развитием растительных объектов, в качестве модели использовали созревающие плоды яблони. Для извлечения количественной информации из гиперспектральных изображений плодов впервые использовали метод разложения спектров, ранее разработанный для «точечных» спектральных измерений (Merzlyak, 2006). Анализ пространственного распределения вкладов индивидуальных групп пигментов позволил напрямую пронаблюдать трансформацию пигментов (деградацию хлорофиллов и первичных каротиноидов при накоплении вторичных каротиноидов, рис. 1а) для целых плодов неинвазивным способом. Полученные результаты хорошо согласуются с ранее описанными трендами изменения пигментного состава (Knee, 1988; Johnston *et al.*, 2002; Hörtensteiner, 2006).

Существенно, что использованный метод позволил неинвазивно зарегистрировать гетерогенность динамики содержания пигментов в разных участках поверхности одних и тех же плодов в ходе их созревания. Показано, что эта гетерогенность сохранялась в течение всего периода наблюдений. Оценка спелости по усреднённому вкладу пула фотосинтетических пигментов в поглощение света коррелировала с независимой оценкой спелости по методу Штрайфа (рис. 1б, $r^2 > 0,75$).

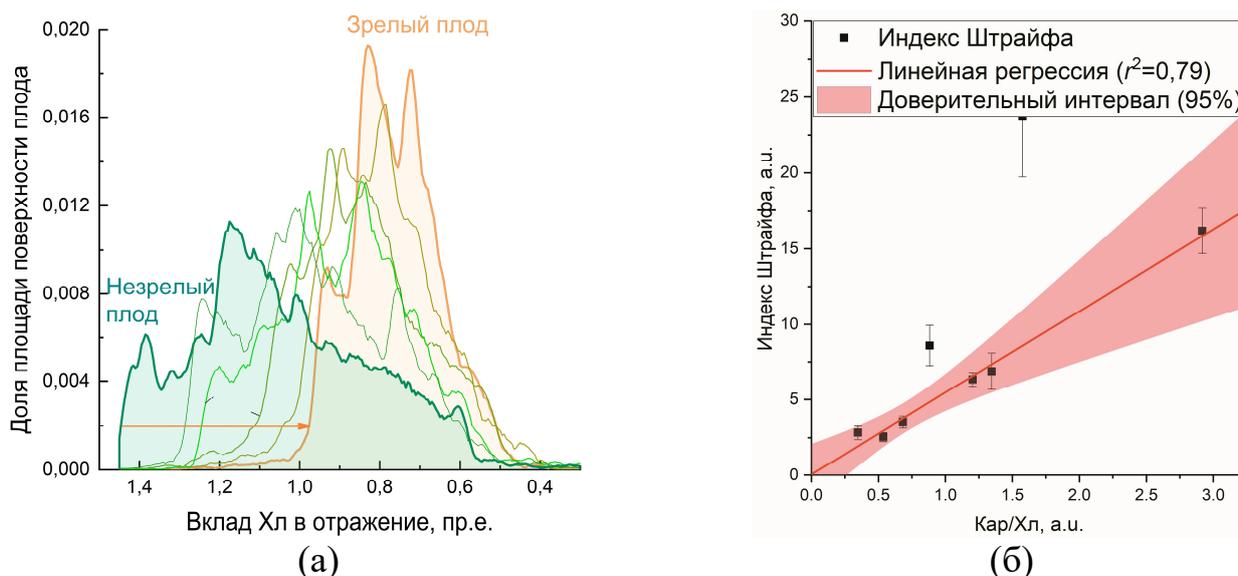


Рисунок 1 — Динамика вкладов хлорофиллов и первичных каротиноидов в общий спектральный коэффициент поглощения созревающих плодов яблони. а) Изменения распределения значений удельного вклада; б) Сопоставление усреднённых вкладов с динамикой традиционной инвазивной оценки зрелости плодов.

Следует отметить мультимодальность распределения спектральных вкладов, отражающих динамику концентраций групп пигментов, в особенности на поздних стадиях созревания. Поскольку каждое распределение соответствует целому плоду, подобная форма гистограммы свидетельствует о существенной пространственной неоднородности распределения пигментов в тканях одного и того же плода. Вероятным источником данной гетерогенности является неравномерная освещённость плода в период созревания на дереве (Соловченко, 2002). При этом оценка гетерогенности важна, поскольку она является одним из детерминантов лёжкости плодов (Chalker-Scott, 2002; Guo *et al.*, 2008) — характеристики, важной с точки зрения потребительских качеств, а также технологии производства и хранения плодов.

Таким образом, описываемый метод позволил вести количественный и неинвазивный мониторинг динамики пигментного состава на уровне целых плодов в ходе процессов созревания. При этом удалось визуализировать и оценить степень гетерогенности пигментного состава тканей плодов.

Мониторинг деградации тканей листа: сравнение флуоресценции хлорофилла и вегетационных индексов

В качестве модели в данных экспериментах использовали срезанные растения салата, разделенные на две группы. В одной растения хранили в герметичной полиэтиленовой упаковке, в другой — в условиях открытой атмосферы. В обеих группах наблюдалось резкое (67% для упакованных листьев салата и 46 % — для неупакованных) снижение содержания воды в листьях на первые сутки хранения, а в дальнейшем — изменения пигментного состава (снижение содержания хлорофилла и сложный, двухфазный паттерн изменения содержания каротиноидов). За время эксперимента содержание хлорофилла снизилось вдвое для упакованных растений и втрое — для неупакованных, а рост соотношения содержания каротиноидов к содержанию хлорофилла составил 99% для упакованных растений и 173% для неупакованных.

Вопреки ожиданиям, водный стресс не вызвал выраженного роста нефотохимического тушения в листьях салата при хранении. На фоне снижения суммарной площади листа доля пикселей с высокими (более 0,7) значениями максимального квантового выхода (Q_y) ФСII росла, а доля пикселей с низкими значениями Q_y ($Q_y < 0,6$), напротив, снижалась (рис. 2).

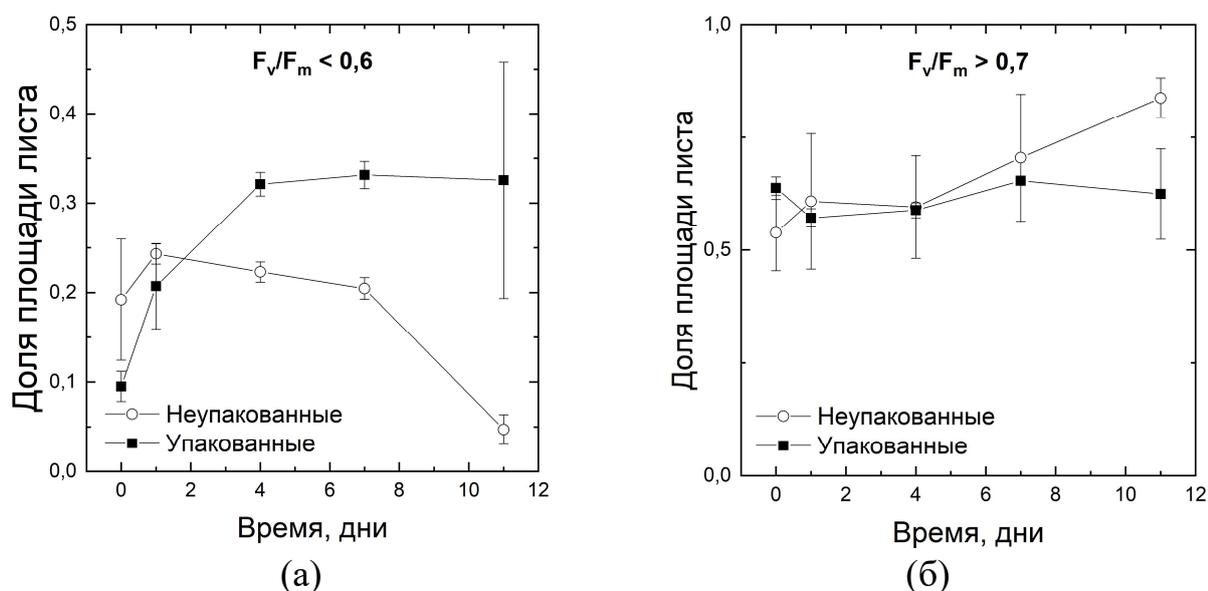


Рисунок 2 — Динамика доли тканей с различным максимальным квантовым выходом ФСII в срезанных растениях *Lactuca sativa* L. при хранении. а) Низкая фотосинтетическая активность б) высокая фотосинтетическая активность.

Таким образом, измерения переменной флуоресценции хлорофилла не проявили прямого сродства к наблюдаемым дегенеративным процессам в силу высокой физиологической пластичности растений (Huang *et al.*, 2010; Kouřil *et al.*, 2013). Вместо них в качестве перспективного индикатора состояния растительного объекта в данных экспериментах были выбраны ранее разработанные вегетационные индексы, связанные с содержанием Хл (CI_{678}) и отношением Кар/Хл (PSRI). Последний показатель является надёжным маркером процессов старения растительных тканей (Merzlyak *et al.*, 1999; Solovchenko *et al.*, 2005). В ходе эксперимента наблюдалась неоднородность распределения значений спектральных индексов по поверхности листа. Усреднённые значения индексов на начальных стадиях развития повреждений при этом находились в пределах вариативности среднего значения. Дополнительную проблему представляла автоматизация исключения съёмочного фона из расчётов, актуальная даже при измерениях в лабораторных условиях.

Установлено, что распределение значений PSRI в ходе деградации тканей является выражено бимодальным, и изоляция мод этого распределения позволяет повысить точность оценки степени и темпов трансформации пигментов в тканях растений по сравнению с использованием усреднённых значений. Так, значения индекса CI_{678} в начале эксперимента находились в диапазоне 6–20; при увядании и деградации пигментов в ходе инкубации срезанных растений наиболее заметно росла доля пикселей изображения с значениями CI_{678} в диапазоне 2–4 (рис. 3). Для индекса PSRI описанные состояния соответствовали диапазонам значений индекса 0–0,1 и 0,2–0,5, соответственно.

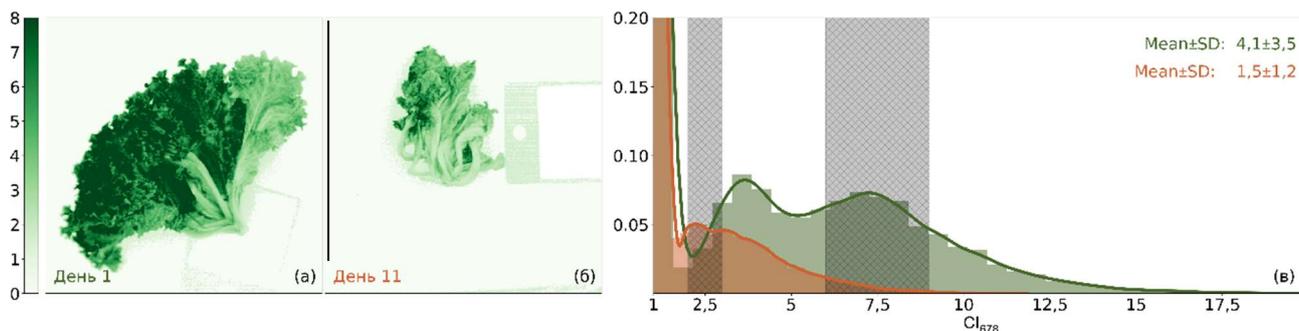


Рисунок 3 — Распределение значений индекса CI_{678} а) пространственное б) кумулятивное.

Подобные распределения были построены для всех образцов, вычислена дисперсия для каждого участка распределения. Установлено, что наиболее выраженной динамикой в ходе увядания обладали диапазоны распределений, соответствующие значениям индексов от 2 до 4 и от 6 до 10 для CI_{678} и от 0 до 0,1 и от 0,2 до 0,5 для PSRI.

Исходя из этого, на основе вегетационных индексов CI_{678} и PSRI были построены производные интегральные характеристики:

$$hCI_{678} = \int_6^{10} n(CI_{678})dCI_{678} \times \left(\int_2^4 n(CI_{678})dCI_{678} \right)^{-1}$$

и

$$hPSRI = \int_{0.2}^{0.5} n(PSRI)dPSRI \times \left(\int_0^{0.1} n(PSRI)dPSRI \right)^{-1},$$

где n — количество пикселей изображения с соответствующими значениями выбранного вегетационного индекса. Биохимический анализ показал, что результирующие интегральные индексы тесно связаны с физиологически значимыми параметрами (рис. 4).

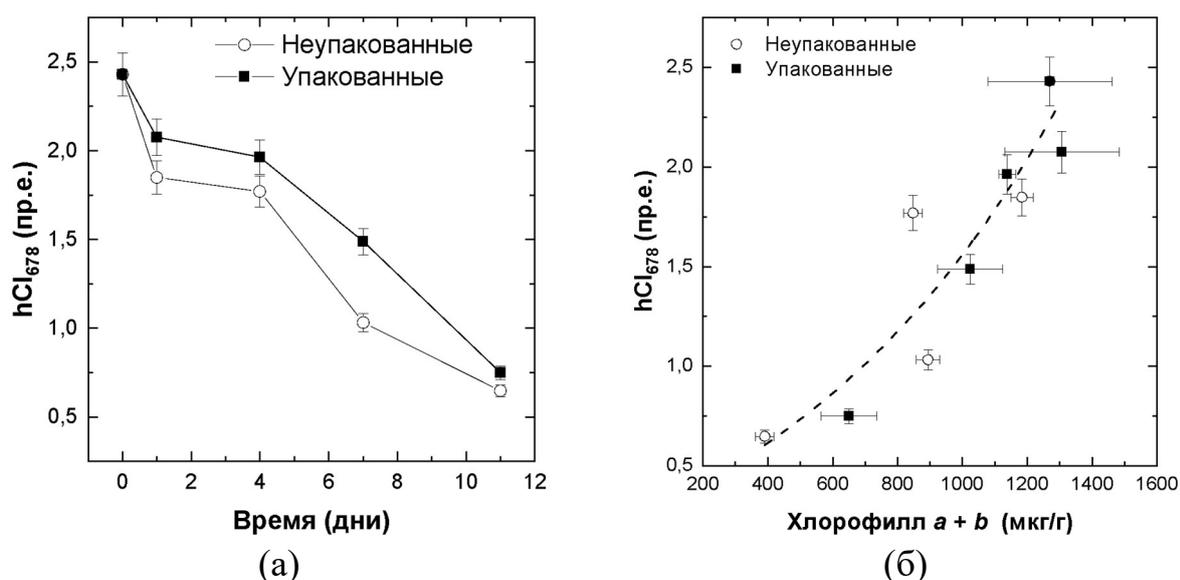


Рисунок 4 — Использование индекса hCI_{678} для фенотипирования растений. а) кинетика hCI_{678} при деградации пигментов в срезанных растениях салата; б) зависимость индекса от суммарного содержания хлорофилла в листе.

В рамках описанного эксперимента было продемонстрировано, что ни флуоресценция хлорофилла, ни усреднённые по всему изображению вегетационные индексы не являются точными и надёжными предикторами практически значимых характеристик листьев при хранении. Это становится возможным только с учётом пространственной гетерогенности распределения пигментов по поверхности исследуемых органов растения.

Информативность спектральных и пространственных признаков и использование машинного обучения

В качестве модельной задачи для изучения информативности спектральных признаков была выбрана задача детекции повреждений яблок. В её рамках становится возможным изучить взаимодействие выбранной методики извлечения информативных признаков из спектральных изображений с остальными элементами алгоритмов машинного обучения, проанализировать её устойчивость по отношению к сложной геометрии съёмки и оценить применимость для различных типов деградации тканей. Поскольку этап извлечения признаков предполагается использовать в качестве универсального для различных архитектур классификаторов, в работе были использованы случайные леса (random forest, RF) как один из наиболее интерпретируемых, но в то же время производительных “классических” подходов. Исходные данные представляли собой гиперспектральные изображения со 122 спектральными каналами, сравнивалось использование спектральных данных в неизменённом виде с эмуляцией данных от гипер- и мультиспектральных камер с более низким (до 32 раз) спектральным разрешением и использованием вегетационных индексов и текстурных дескрипторов (local binary patterns, LBP). После проведения попиксельной классификации изображения яблок подвергались бинарной классификации (здоровое-повреждённое) на её основе (рис. 5).

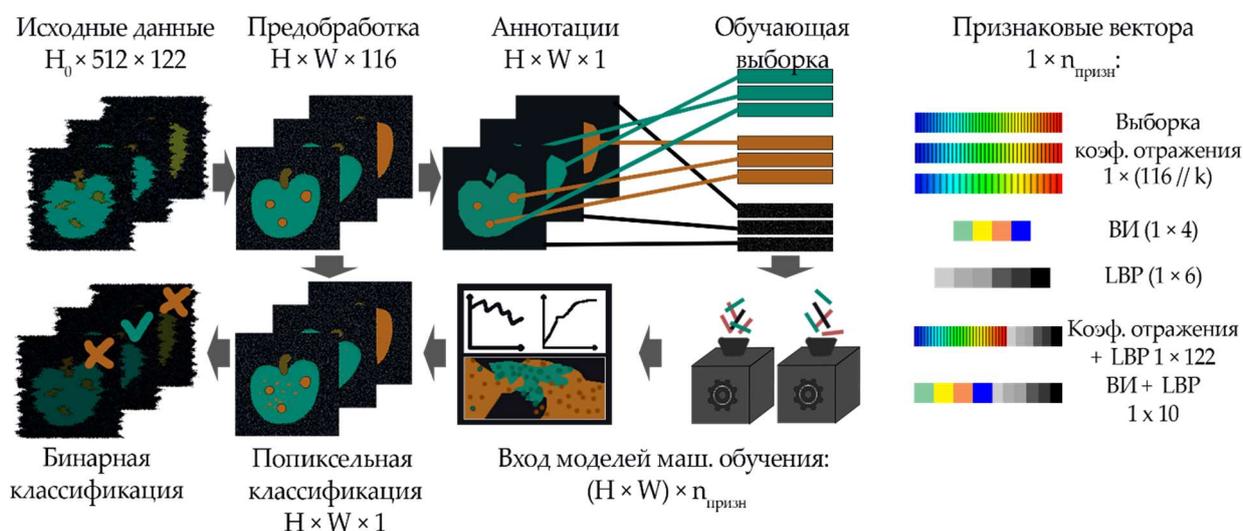


Рисунок 5 — Архитектура алгоритма машинного обучения для детекции повреждений плодов яблоки.

Было показано, что снижение спектрального разрешения в широких пределах, до 8 раз, не приводит к существенной потере точности классификации. Учёт разницы в частоте встречаемости исходных классов пикселей даёт существенный прирост к точности последующей бинарной классификации (3–4%), близкий прирост даёт и использование текстурных признаков (суммарное повышение точности составляло 6–7%).

При этом во всех случаях наблюдалось расхождение с экспертной разметкой, вызванное, в первую очередь, геометрией съёмки. Области с бликами и затенённые области, включая механические повреждения, не сопровождавшиеся вторичным заражением, были основной причиной ошибок в попиксельной классификации. Использование вегетационных индексов в качестве признаков было более устойчивым к эффектам освещения. В рамках исследования было показано, что для задачи выявления деградации хлорофилла спектральные коэффициенты отражения в большом количестве спектральных каналов избыточны, и гиперспектральная съёмка может быть заменена мультиспектральной. В то же время, гиперспектральные данные могут быть использованы в исследовании динамики содержания пигментов в растениях, разработке вегетационных индексов, проектировании мультиспектральных съёмочных систем.

Мониторинг зимнего покоя древесных растений методами РАМ-флуориметрии

Наряду с анализом пространственно-разрешенных данных, полученных оптическими методами, были разработаны подходы к анализу временных рядов кривых индукции флуоресценции хлорофилла *a* для оценки глубины зимнего покоя древесных растений на примере яблони домашней. Проведённый эксперимент охватил три зимних сезона — с осени 2020 года по весну 2022 года. Всего было получено и обработано свыше 35000 индукционных кривых.

Корреляционный анализ выявил сравнительно сильную ($r = 0,75$) зависимость максимального квантового выхода ФС II от температуры воздуха. Существенная часть этой зависимости, по-видимому, вызвана суточными колебаниями температуры и акклимации к ним. Эта тесная взаимосвязь нарушается при температурах ниже 0 °С, соответствующих физиологичному прохождению зимнего покоя большинством хозяйственно ценных плодовых культур, включая яблоню.

Для выделения медленной компоненты наблюдаемой динамики состояния ФС II использовался частотный анализ на основе Фурье- и вейвлет-преобразований. Кривые, соответствующие производным параметрам, были подвергнуты низкочастотной фильтрации. При частоте среза, соответствующей одной неделе, проявляется описанная выше зависимость F_v/F_m от температуры и

её нарушение при холодном стрессе (рис. 6). В то же время переход растений в фазу вынужденного покоя сопровождается резким ростом тепловой диссипации энергии, что можно связать с ростом потока энергии к ФС II. Нефотохимическое тушение в рамках эксперимента было специфичным для холодного стресса и не наблюдалось вне зимнего периода. Для собранного массива данных было показано, что F_v/F_m – волатильная характеристика, сильно ($r^2 = 0,68$) зависящая от стохастических изменений в температуре и инсоляции.

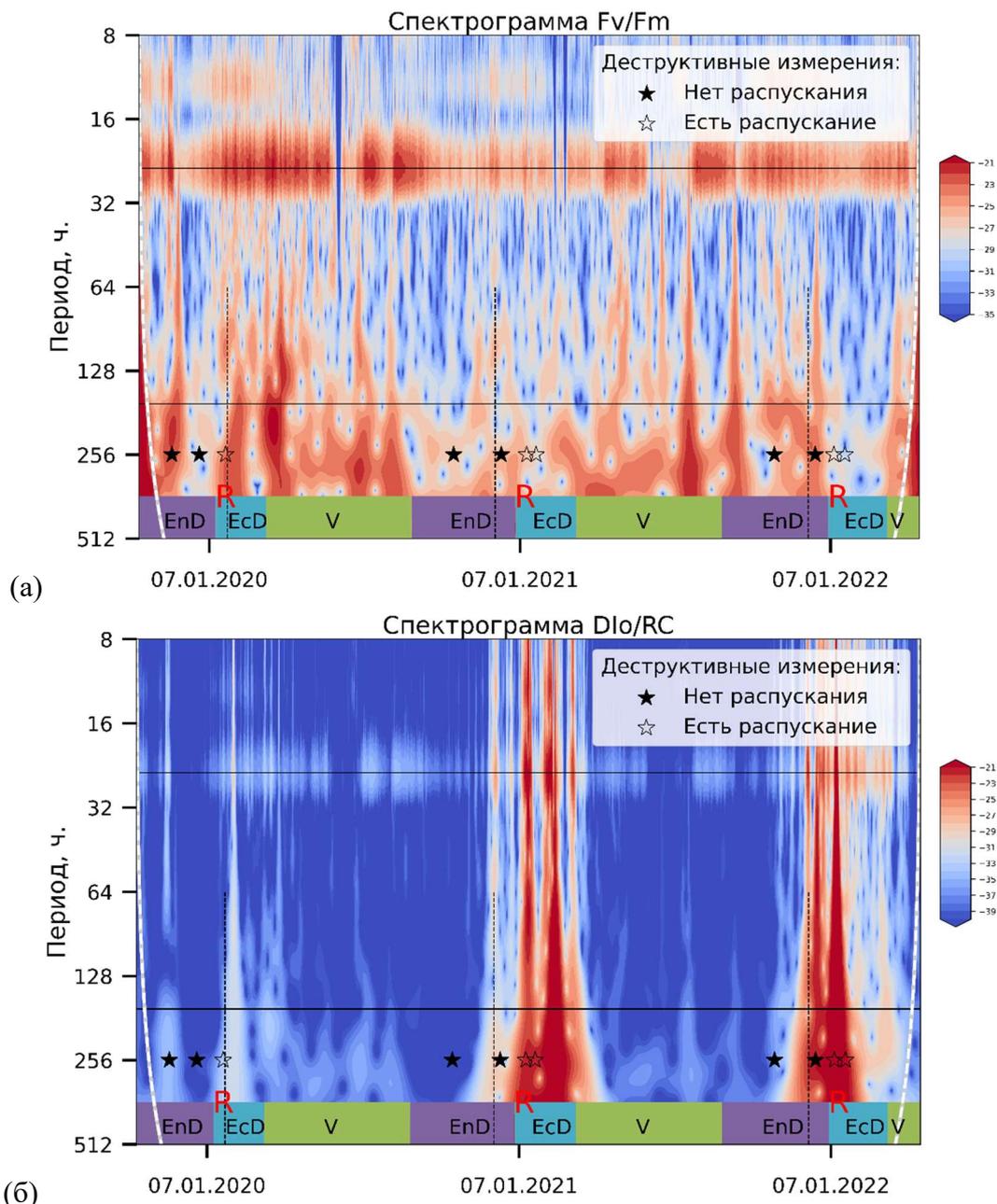


Рисунок 6 — Спектральная плотность изменения (а) максимального квантового выхода ФС II (F_v/F_m) и (б) тепловой диссипации энергии в пересчёте на реакционный центр (DI_0/RC). Шкала внизу — фенологические фазы: V — вегетационный период; EnD — глубокий покой; EcD — вынужденный покой. Открытые и закрытые символы (☆ и ★) обозначают даты и результаты деструктивных измерений.

Эти результаты позволяют с уверенностью связать вариацию тепловой диссипации энергии света, поглощенной фотосинтетическим аппаратом, с прохождением фазы глубокого покоя и предложить её на роль фенологического индикатора. Предсказания, полученные в рамках предложенной модели, были сопоставлены с классическими моделями зимнего покоя и показали хорошее соответствие с ними (рис. 7).

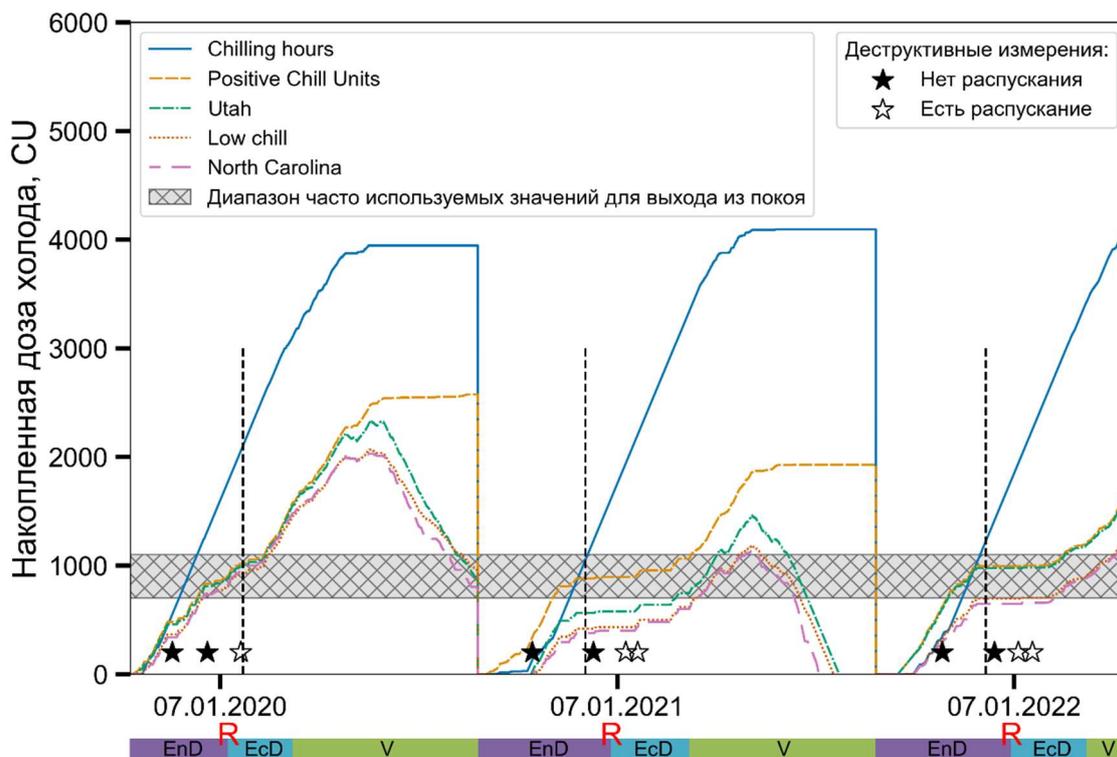


Рисунок 7 — Сопоставление предложенного подхода с результатами объективных измерений и классическими моделями зимнего покоя. Вертикальные заштрихованные линии — предсказания модели.

В необычно тёплую зиму 2020-2021 гг. изменения активности растений были детектируемы по тепловой диссипации энергии, однако наблюдаемый эффект был на два порядка слабее, чем в более типичный сезон 2021-2022 гг. Аномальность зимы 2020-2021 гг. наблюдалась и в деструктивных измерениях — четверть из отобранных проб не вышла из глубокого покоя вовсе, и срезанные побеги проявили заметно более слабый рост, нежели в последующие сезоны.

Таким образом, анализ временных рядов вариации параметров индукционных кривых флуоресценции хлорофилла — эффективный способ визуализации работы механизмов медленной акклимации растений, таких как индукция глубокого покоя в осенне-зимний период под действием внешних сигналов и гормональных перестроек на фоне суточных осцилляций освещенности и стохастических флуктуаций температуры и облачности.

Заключение

Проксимальное пространственно-разрешённое оптическое зондирование, сбор и обработка временных рядов наблюдений являются собой сдвиг парадигмы в фенотипировании растений. Пространственная гетерогенность является неотъемлемым свойством живых систем, и в рамках концепции дистанционного зондирования она является помехой, подлежащей упрощению и устранению. В проксимальном зондировании же, напротив, она становится объектом изучения.

В свою очередь, это требует пересмотра подходов к разработке методов и алгоритмов обработки спектральных изображений. На передний план выходят семантические категории и качественные признаки, анализ которых продолжает становиться всё целесообразнее и доступнее благодаря успехам в области машинного обучения и искусственного интеллекта. Уже сейчас выделение функционально и физиологически однородных зон способно выявлять сравнительно тонкие, не обнаруживаемые «точечной» спектрометрией изменения на фоне естественной адаптации к условиям внешней среды, что было продемонстрировано в рамках настоящей работы. Наблюдение динамики изменений фенотипа во времени позволяет учесть вариативность, вызванную видовыми и сортовыми особенностями. Физиологическая пластичность растений, во многих случаях затрудняющая фенотипирование, сама по себе является привлекательным объектом для изучения в силу интенсификации природных и антропогенных воздействий на биоценозы. В силу вышеперечисленных причин оптические методы пространственно-разрешенного проксимального зондирования растений – мощнейший инструмент для её изучения.

Основную трудность в рамках описываемой парадигмы представляет накопление знания — в отличие от традиционных подходов с небольшим количеством переменных, современные алгоритмы машинного обучения используют миллионы и десятки миллионов слабо интерпретируемых параметров. Применение этих алгоритмов требует особой тщательности в планировании эксперимента. Тем не менее, достигаемый прирост производительности фенотипирования неоспорим.

В свою очередь, выбор биофизически обоснованных характеристик в качестве информативных признаков, рассмотрение алгоритмов машинного обучения с точки зрения их структурных параметров позволяют повысить точность и надёжность их работы. Подобный целостный подход, основанный на синтезе классических методов оптической спектроскопии растений и современных алгоритмов компьютерного зрения, открывает новые горизонты для исследования акклимационных механизмов в растениях и позволит создавать высокопроизводительные, массовые и неинвазивные экспресс-методы фенотипирования растений.

Выводы

1. Установлено, что акклимация растений салата (*Lactuca sativa* L.) к условиям водного дефицита сопровождается сохранением фотосинтетической активности при потере листом до 50% воды, в то время как снижение общего содержания хлорофиллов $a + b$ составило до 70%. Показано, что на ранних этапах этого процесса признаки деградации фотосинтетического аппарата проявляются в отдельных участках листа, суммарная площадь которых не превышает 25% от его общей площади.
2. Разработана методика, позволяющая неинвазивно и с высокой точностью ($r^2 = 0,84$) оценивать суммарное содержание хлорофиллов и каротиноидов в растительном организме с учётом его пространственной гетерогенности.
3. Доказано, что созревание плодов яблони тесно связано с ростом вклада вторичных каротиноидов в поглощение света, рассчитанного для каждой точки спектрального изображения с учетом вкладов других пигментов (хлорофиллов и антоцианов).
4. Выявлено, что максимальная точность при обработке спектральных изображений растений методами машинного обучения достигается при совместном анализе морфологических и спектральных характеристик изображаемых объектов. При детекции повреждений плодов яблони достигнута точность в 98,3%.
5. Разработан метод неинвазивного мониторинга зимнего покоя растений яблони, основанный на измерении индукционных кривых флуоресценции хлорофилла a . Выявлена взаимосвязь глубины покоя со скоростью изменения удельного потока поглощённой энергии света, рассеянной в виде тепла (DI_0/RC). Установлено, что наиболее активно этот параметр меняется в фазе вынужденного покоя.

Основные публикации Шурыгина Бориса Михайловича по теме диссертационной работы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах):

1. **Shurygin B.**, Chivkunova O., Solovchenko O., Solovchenko A., Dorokhov A., Smirnov I., Astashov M., Khort D. Comparison of the Non-Invasive Monitoring of Fresh-Cut Lettuce Condition with Imaging Reflectance Hyperspectrometer and Imaging PAM-Fluorimeter // *Photonics*. – 2021. – Vol. 8, № 10. – P. 425. **(JIF 2.1, 1.55 / 1.1 п.л.)**.
2. Solovchenko A., Lukyanov A., Nikolenko A., **Shurygin B.**, Akimov M., Gitelson A. Physiological foundations of spectral imaging-based monitoring of apple fruit ripening // *Acta Horticulturae*. – 2021. № 1314. – P. 419–428. **(SJR 0.151, 0.47 / 0.15 п.л.)**.
3. Solovchenko A., Dorokhov A., **Shurygin B.**, Nikolenko A., Velichko V., Smirnov I., Khort D., Aksenov A., Kuzin A. Linking Tissue Damage to Hyperspectral Reflectance for Non-Invasive Monitoring of Apple Fruit in Orchards // *Plants*. – 2021. – Vol. 10, № 2. – С. 310. **(JIF 4.0, 1.38 / 0.4 п.л.)**.
4. **Shurygin B.**, Smirnov I., Chilikin A., Khort D., Kutyrev A., Zhukovskaya S., Solovchenko A. Mutual Augmentation of Spectral Sensing and Machine Learning for Non-Invasive Detection of Apple Fruit Damages // *Horticulturae*. – 2022. – Vol. 8, № 12. – P. 1111. **(JIF 3.1, 0.95 / 0.7 п.л.)**.
5. **Shurygin B.**, Konyukhov I., Khruschev S., Solovchenko A. Non-Invasive Probing of Winter Dormancy via Time-Frequency Analysis of Induced Chlorophyll Fluorescence in Deciduous Plants as Exemplified by Apple (*Malus × domestica* Borkh.) // *Plants*. – 2022. – Vol. 11, № 21. – P. 2811. **(JIF 4.0, 1.38 / 0.9 п.л.)**.
6. Соловченко А.Е., Ткачев Е.Н., Цуканова Е.М., **Шурыгин Б.М.**, Хрущев С.С., Конюхов И.В., Птушенко В.В. Зимний покой древесных растений и его неинвазивный мониторинг // *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. – 2022. – Т. 77, № 2. – С. 51–64. **(РИНЦ 0.631, 0.98 / 0.3 п.л.)**.
7. Nesterov D.A., **Shurygin B.M.**, Solovchenko A.E., Krylov A.S., Sorokin D.V. A CNN-Based Method for Fruit Detection in Apple Tree Images // *Computational Mathematics and Modeling*. – 2022. – Vol. 33, №3. – P. 354–364. **(SJR 0.173, 0.39 / 0.15 п.л.)**.
8. Solovchenko A.E., **Shurygin B.M.**, Kuzin A.I., Solovchenko O.V., Krylov A.S. Extraction of Quantitative Information from Hyperspectral Reflectance Images for Noninvasive Plant Phenotyping // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2022. – Vol. 69. – P. 144. **(JIF 1.1, 0.79 / 0.35 п.л.)**.

9. Solovchenko A.E., **Shurygin B.M.**, Nesterov D.A., Sorokin D.V. Towards the synthesis of spectral imaging and machine learning-based approaches for non-invasive phenotyping of plants // *Biophysical Reviews*. – 2023. – Vol. 15, № 5. – P. 939–946. (**JIF 4.9, 0.52 / 0.2 п.л.**).
10. Plouviez M., Bhatia N., **Shurygin B.**, Solovchenko A. Advanced imaging for microalgal biotechnology // *Algal research*. – 2024. – Vol. 82. – P. 103649. (**JIF 4.6, 1.48 / 0.3 п.л.**).
11. Peng Y., Solovchenko A., Zhang C., **Shurygin B.**, Liu X., Wu X., Gong Y., Fang S., Gitelson A. Remote sensing of rice phenology and physiology via absorption coefficient derived from unmanned aerial vehicle imaging // *Precision Agriculture*. – 2024. – Vol. 25, № 1. – P. 285–302. (**JIF 5.4, 1.0 / 0.2 п.л.**).

Патенты и свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ:

1. Пат. 2641630 С2 Рос. Федерация, МПК⁷ G01C 11/02. Способ устранения геометрических искажений изображений дистанционного зондирования, полученных щелевым сканирующим сенсором / О. Ю. Казанцев, С. В. Кудрявцев, А. А. Николенко, П. В. Страхов, **Б. М. Шурыгин**, Г. А. Щербина ; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВО "Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)". – № 2016126236 ; заявл. 30.06.2016 ; опубл. 18.01.2018, Бюл. № 2. – 14 с. : ил.
2. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2015618299. Albedo / П. В. Страхов, Е. В. Бадасен, **Б. М. Шурыгин**, В. В. Каушан, А. А. Николенко, Л. Н. Чабан, К. Н. Капитонова, М. Г. Степанова ; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВО "Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)". – № 2015614861 ; заявл. 08.06.2015 ; опубл. 20.09.2015. – 2,28 Мб.
3. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2021619496. Информационная система интеллектуального прогнозирования урожайности промышленных плодовых садов / **Б.М. Шурыгин**; заявитель и патентообладатель ООО "ИРИДИС ГРУПП". – №2021618494; заявл. 01.06.2021. ; опубл. 10.06.2021, Бюл. № 6. – 1 Мб.

Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке Научно-образовательной школы МГУ «Мозг, искусственный интеллект и когнитивные технологии», а также РФФИ (грант 19-016-00016) и РНФ (грант 23-44-00006).