

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Определение содержания меланина и антоцианов в зернах ячменя на основе анализа цифровых изображений методами машинного обучения

Е.Г. Комышев¹✉, М.А. Генаев^{1,2,3}, И.Д. Бусов^{1,3}, М.В. Кожекин², Н.В. Артеменко^{2,3}, А.Ю. Глаголева¹, В.С. Коваль¹, Д.А. Афонников^{1,2,3}

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

² Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ komyshev@bionet.nsc.ru

Аннотация. Пигментный состав оболочек семян растений влияет на такие важные их свойства, как устойчивость к действию патогенов, прорастание на корню, а также механическая прочность. У ячменя (*Hordeum vulgare* L.) темная окраска зерен может быть обусловлена синтезом и накоплением двух групп пигментов. Голубая и фиолетовая окраска зерна связана с синтезом антоцианов. Серую и черную окраску придают пигменты меланины. Данные пигменты могут накапливаться в оболочках зерна независимо либо совместно, поэтому визуально определить, накопление каких именно пигментов придает темный цвет зерна, затруднительно. Для точного определения наличия/отсутствия пигментов используются химические и генетические методы, которые дороги и трудоемки. Поэтому создание нового метода для быстрой оценки наличия определенных пигментов в зерновке является актуальной задачей, решение которой поможет при исследовании механизмов генетического контроля пигментного состава зерна. Настоящая работа посвящена разработке метода оценки пигментного состава зерен ячменя на основе анализа цифровых изображений с помощью алгоритмов компьютерного зрения и машинного обучения. Разработан протокол съемки для получения двумерных цифровых цветных изображений зерен. С использованием данного протокола получено 972 изображения для 108 образцов ячменя. Каждый образец мог содержать пигменты антоцианы и/или меланины. Для точного определения содержания пигментного состава образцов применялись химические методы. Для предсказания пигментного состава зерна на основе изображений было разработано четыре модели, основанных на методах компьютерного зрения и сверточных нейронных сетях различной архитектуры. Лучшую производительность на отложенной выборке показала модель сети U-Net, основанная на топологии EfficientNetB0 (значение параметра «точность» составило 0.821).

Ключевые слова: анализ цифровых изображений; машинное обучение; зерна ячменя; пигментный состав.

Для цитирования: Комышев Е.Г., Генаев М.А., Бусов И.Д., Кожекин М.В., Артеменко Н.В., Глаголева А.Ю., Коваль В.С., Афонников Д.А. Определение содержания меланина и антоцианов в зернах ячменя на основе анализа цифровых изображений методами машинного обучения. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(7):859-868. DOI 10.18699/VJGB-23-99

Determination of the melanin and anthocyanin content in barley grains by digital image analysis using machine learning methods

E.G. Komyshev¹✉, M.A. Genaev^{1,2,3}, I.D. Busov^{1,3}, M.V. Kozhekin², N.V. Artemenko^{2,3}, A.Y. Glagoleva¹, V.S. Koval¹, D.A. Afonnikov^{1,2,3}

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ komyshev@bionet.nsc.ru

Abstract. The pigment composition of plant seed coat affects important properties such as resistance to pathogens, pre-harvest sprouting, and mechanical hardness. The dark color of barley (*Hordeum vulgare* L.) grain can be attributed to the synthesis and accumulation of two groups of pigments. Blue and purple grain color is associated with the biosynthesis of anthocyanins. Gray and black grain color is caused by melanin. These pigments may accumulate in the grain shells both individually and together. Therefore, it is difficult to visually distinguish which pigments are responsible for the dark color of the grain. Chemical methods are used to accurately determine the presence/absence of pigments; however, they are expensive and labor-intensive. Therefore, the development of a new method for quickly assessing the presence of pigments in the grain would help in investigating the mechanisms

of genetic control of the pigment composition of barley grains. In this work, we developed a method for assessing the presence or absence of anthocyanins and melanin in the barley grain shell based on digital image analysis using computer vision and machine learning algorithms. A protocol was developed to obtain digital RGB images of barley grains. Using this protocol, a total of 972 images were acquired for 108 barley accessions. Seed coat from these accessions may contain anthocyanins, melanins, or pigments of both types. Chemical methods were used to accurately determine the pigment content of the grains. Four models based on computer vision techniques and convolutional neural networks of different architectures were developed to predict grain pigment composition from images. The U-Net network model based on the EfficientNetB0 topology showed the best performance in the holdout set (the value of the "accuracy" parameter was 0.821).

Key words: digital image analysis; machine learning; barley grains; pigment composition.

For citation: Komyshev E.G., Genaev M.A., Busov I.D., Kozhekin M.V., Artemenko N.V., Glagoleva A.Y., Koval V.S., Afonnikov D.A. Determination of the melanin and anthocyanin content in barley grains by digital image analysis using machine learning methods. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(7):859-868. DOI 10.18699/VJGB-23-99

Введение

Цвет оболочки зерен злаков – важный признак, характеризующий содержащиеся в ней пигменты и метаболиты. Наличие пигментов в оболочке влияет на различные технологические свойства зерна (Souza, Marcos-Filho, 2001; Flintham et al., 2002). Образцы с темной окраской зерновки являются более холодо- и засухоустойчивыми, а также обладают повышенной устойчивостью к действию патогенов (Сессарелли et al., 1987; Choo et al., 2005). Такие свойства окрашенных растений связаны с высоким содержанием антиоксидантов, а также с дополнительной механической прочностью оболочек зерна (Ferdinando et al., 2012; Jana, Mukherjee, 2014). Темная окраска зерен ячменя может быть обусловлена синтезом и накоплением двух групп пигментов. Голубая и фиолетовая окраска зерна связана с синтезом антоцианов. Серую и черную окраску зернам ячменя придают пигменты меланины. Данные пигменты могут накапливаться в оболочках зерна растений в зависимости от генотипа как по отдельности, так и совместно. Поэтому визуально определить, накоплением каких именно пигментов вызван темный цвет зерна, затруднительно.

Генетический контроль формирования окраски зерен и других органов растений осуществляется генами, кодирующими ферменты, вовлеченные в биосинтез пигментов, и регуляторными генами. На данный момент путь биосинтеза антоцианов исследован достаточно хорошо, однако молекулярные механизмы биосинтеза меланина все еще слабо изучены (Шоева и др., 2018; Glagoleva et al., 2020). При исследовании механизмов генетического контроля окраски зерен селекционеры и генетики постоянно сталкиваются с необходимостью оценки цветовых характеристик их оболочки. К техническим средствам решения этой задачи относятся спектрофотометры, спектрометры, гиперспектральные камеры. Однако это дорогостоящие камеры, в особенности с высоким разрешением, как пространственным, так и спектральным. Альтернативой является использование цифровых фотокамер, позволяющих получать высококачественные изображения с высоким пространственным и цветовым разрешением (Afonnikov et al., 2016; Li et al., 2020; Kolhar, Jagtap, 2023). В связи с этим в последнее время в области фенотипирования растений интенсивно развиваются методы оценки цветовых и текстурных характеристик зерен злаков, основанные на анализе двумерных изображений, полученных цифро-

выми камерами или сканерами (Комышев и др., 2020; Sharma et al., 2021; Afonnikov et al., 2022; Arif et al., 2022; Khojastehnazhand, Roostaei, 2022; Wang, Su, 2022).

Цель данной работы – разработка метода оценки пигментного состава зерна ячменя на основе анализа цифровых изображений с помощью алгоритмов компьютерного зрения и машинного обучения.

Материалы и методы

Растительный материал. Для исследования были выбраны семена 39 образцов ячменя с темной окраской оболочек зерна, а также 40 образцов с неокрашенным зерном. Материал получен из коллекции ячменя Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР, <https://www.vir.nw.ru>), коллекции ячменя Института цитологии и генетики СО РАН (ИЦиГ, <https://www.icgbio.ru/>). Также был использован материал популяции Oregon Wolfe Barleys (OWB, <https://barleyworld.org/owb>). Данные о каждом образце приведены в Приложении 1¹. Отдельно были выбраны 29 образцов ячменя из коллекции ВИР с различными комбинациями пигментов в зерне (Приложение 2). Дополнительно образцы были охарактеризованы по пленчатости/голозерности. В обучающей и тестовой выборке было 58 пленчатых и 21 голозерный, а в отложенной выборке – 22 пленчатых и 7 голозерных образцов.

Химические и генетические методы определения пигментного состава зерен. Для определения качественного присутствия антоцианов в зерне была проведена экстракция в 1 % растворе HCl в метаноле с последующей детекцией окрашивания раствора в розовый цвет (Abdel-Aal, Hucl, 1999). Присутствие меланина определялось при помощи 2 % NaOH, в котором происходит экстрагирование меланина и окрашивание раствора в темный цвет (Downie et al., 2003). На основе этих методов каждому из образцов был присвоен тип пигментации «антоцианы», «меланины» (по наличию пигментов) либо «без пигментации», если оба пигмента в образцах отсутствовали. Данные о наличии пигментов определенного типа приведены в Приложениях 1 и 2.

Получение изображений. Цветные изображения зерен получены с помощью цифровой фотокамеры Canon EOS 600D, объектив Canon EF 100mm f/2.8 Macro USM с

¹ Приложения 1–8 см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx28.pdf>



Рис. 1. Пример изображения, полученного в результате выполнения протокола для фенотипирования образцов ячменя по интенсивности окраски зерна.

разрешением 18 Мп. На белый матовый лист бумаги формата А3 помещали пластиковую чашку Петри диаметром 55 мм, заполненную зернами без промежутков. По бокам располагался рассеивающий свет, камеру фиксировали на штативе сверху, объективом вертикально вниз (Приложение 3). Изображения сохранялись в формате jpg. Пример изображения, полученного в результате выполнения протокола, приведен на рис. 1.

При съемке в чашке Петри находилось около 100–160 зерен, принадлежащих одному образцу. Для каждого образца было сделано 9 изображений его реплик, полученных путем случайного перемешивания зерен в чашке Петри.

Разметка данных. С целью разработки алгоритма сегментации для 212 изображений 59 образцов, отобранных случайным образом, была выполнена ручная разметка зерен и границ чашки Петри с помощью программы LabelMe (<https://github.com/wkentaro/labelme>). Пример фрагмента размеченного изображения показан в Приложении 4. Кроме того, каждому изображению была присвоена метка в зависимости от типа пигментации соответствующего образца на основе экспериментально полученных данных.

Предсказание пигментации зерен с помощью методов машинного обучения. Общая схема предсказания типа пигментации включала сегментацию изображения для выделения на нем области, занятой зернами, и предсказание наличия пигментов определенного типа с помощью трех методов: 1) методом случайного леса с использованием цветowych дескрипторов изображения; 2) сверточной нейронной сетью архитектуры ResNet-18; 3) сверточной нейронной сетью архитектуры EfficientNetB0.

Схема разбиения данных для валидации и тестирования. Для методов машинного обучения изображения были разделены на три подвыборки: обучающую (60 % данных: 423 изображения, 47 образцов) – для обучения модели; валидационную (20 % данных: 144 изображения, 16 образцов) – для выбора лучшей модели в процес-

се обучения; тестовую (20 % данных: 144 изображения, 16 образцов) – для оценки точности выбранной модели. Для финальной оценки точности была использована отложенная выборка из 29 образцов, включавшая 261 изображение. Данные о разбиении образцов представлены в Приложении 5.

Оценка точности классификации образцов. Выходные данные обученных моделей классификации для каждого изображения были представлены двумя бинарными числами, каждое из которых характеризовало наличие или отсутствие антоцианов и меланина. Чтобы оценить точность метода на тестовой выборке, для каждого изображения сравнивались предсказанный набор таких чисел и истинный набор, так что если тестовая выборка содержала M изображений, проводилось $2M$ бинарных сравнений и на их основе подсчитывались следующие метрики: истинно положительные предсказания класса (TP, true positive), истинно отрицательные предсказания класса (TN, true negative), общее количество представителей положительного (P) и отрицательного (N) классов. С использованием этих величин вычислялось значение метрики «точность» (ACC, accuracy) согласно формуле

$$ACC = \frac{TP + TN}{P + N}.$$

Модель для идентификации области зерен на изображении. Чтобы на изображении выделить зерна в чашках Петри, была реализована модель нейронной сети, сегментирующая исходные изображения. Ее выходными данными являлись бинарные маски. Для этого использовалась сеть U-Net с кодером ResNet-18. Архитектура U-Net разрабатывалась специально для сегментации биомедицинских изображений (Ronneberger et al., 2015). Модель основана на использовании преобразования свертки (convolution) и состоит из двух частей: кодер и декодер (рис. 2). Полноразмерное изображение на входе сети преобразуется кодером в результате нескольких шагов, включающих два последовательных слоя свертки размером 3×3 , после которых идет преобразование ReLU (слой ‘conv 3×3 , ReLU’ на рис. 2) и пулинг с функцией максимума 2×2 с шагом 2 (слой ‘max pool 2×2 ’). Кодер осуществляет понижающую дискретизацию изображения. Декодер, наоборот, выполняет повышающую дискретизацию изображения, используя серию операций, обратных пулингу, расширяющих карту признаков. Затем следует свертка 2×2 , которая уменьшает количество каналов признаков (слой ‘up-conv 2×2 ’). Далее идет конкатенация с соответствующим образом обрезанной по краям картой признаков из сжимающего пути и две свертки 3×3 (слои ‘conv and skip’ на рис. 2), после каждой из которой применяется операция ReLU.

Сегментация позволяла выделить на изображении область чашки Петри с зернами, которая использовалась для вычисления их цветowych дескрипторов. Для каждого изображения было извлечено 2380 числовых параметров, характеризующих цвет пикселей зерен. Это средние значения интенсивности каналов для четырех цветowych пространств (RGB, HSV, Lab, YCrCb), значения гистограмм распределений интенсивностей цветowych компонент и т. п. Детальное описание полученных характеристик приведено в Приложении 6.

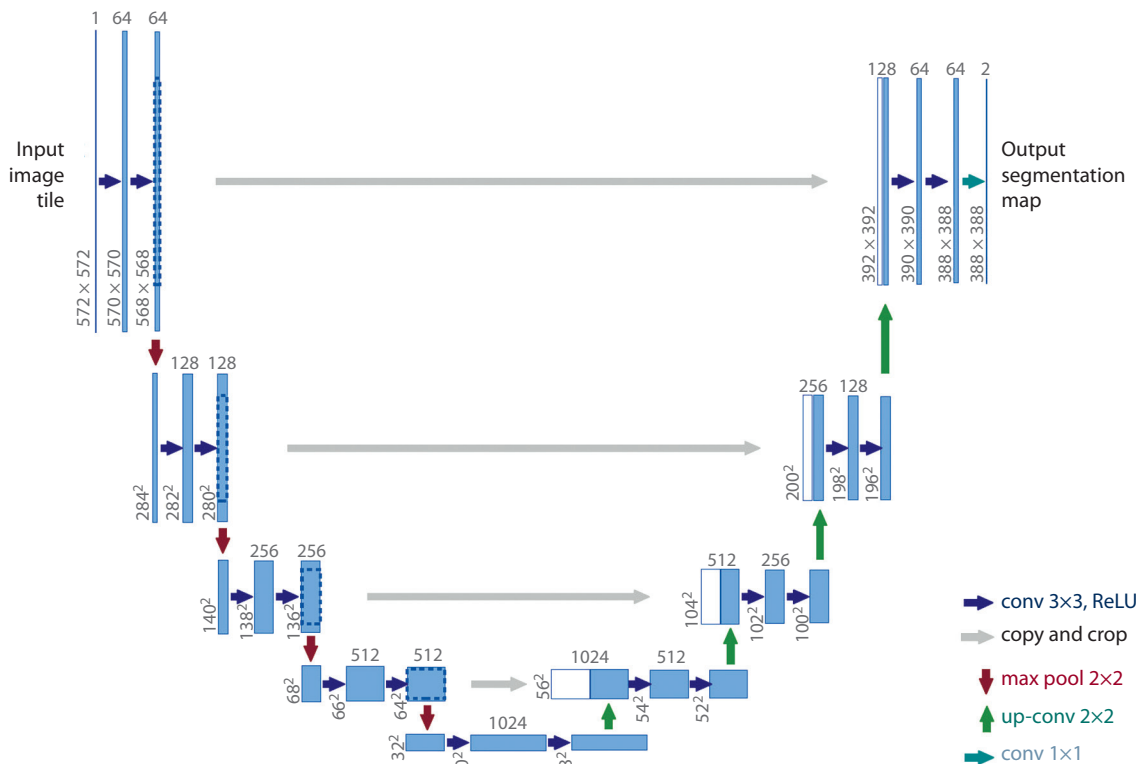


Рис. 2. Архитектура сети U-Net, из (Ronneberger et al., 2015).



Рис. 3. Схема модели классификации зерен ячменя на основе изображений и алгоритма случайного леса с использованием цветowych дескрипторов.

Фильтрация данных. Для фильтрации малозначимых признаков были удалены следующие из них: значения которых одинаковы для всех изображений, значения которых не превышают 0.01 на более 20 % изображений. Дополнительно для уменьшения избыточности были удалены признаки, которые имели значение коэффициента корреляции Спирмена более 0.97 с другими признаками. В результате фильтрации осталось 345 дескрипторов из 2380.

Анализ данных. Для того чтобы оценить распределение образцов в пространстве изучаемых признаков, использовались метод главных компонент (Jolliffe, 2002) и нелинейный алгоритм снижения размерности t-SNE (van der Maaten, Hinton, 2008). Эти методы позволяют визуализировать многомерные данные путем отображения объектов в многомерном пространстве в пространство меньшей размерности (обычно двух- или трехмерное).

Модель классификации пигментного состава зерен на основе цветowych дескрипторов методом случайного леса

Рассматривалась классификация изображений зерен на четыре класса: без пигментации, пигментация антоцианами и/или меланинами, так что изображение зерен с пигментацией могло быть классифицировано как «содержащие антоцианы и меланины одновременно». Первая модель классификации была построена на основе алгоритма «случайный лес» (Random Forest), реализованного в пакете Scikit-learn (Pedregosa et al., 2011). На вход алгоритма подавались значения 345 дескрипторов цвета, описанных выше. Схема обработки данных для этой модели показана на рис. 3. Дополнительно при помощи метода главных компонент количество признаков было уменьшено до 13, которые объясняют 81.2 % дисперсии данных и дают мак-

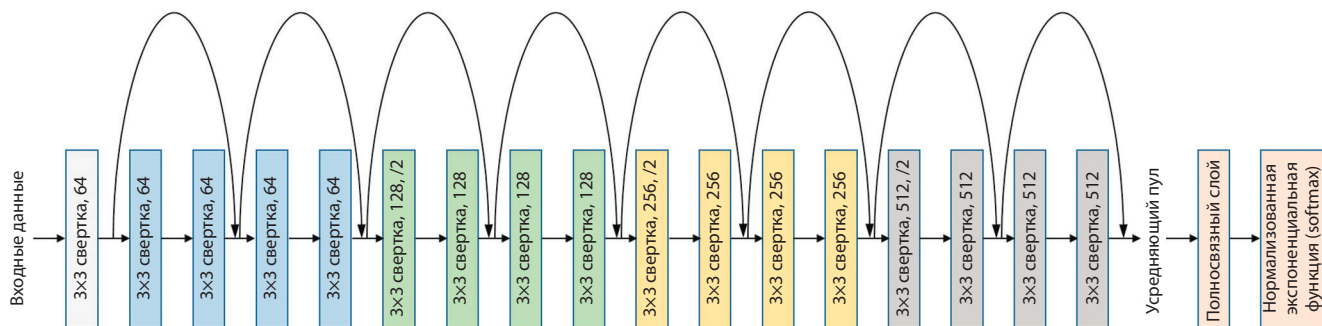


Рис. 4. Схема архитектуры сети ResNet-18.

Разноцветными прямоугольниками показаны слои сети различной структуры.

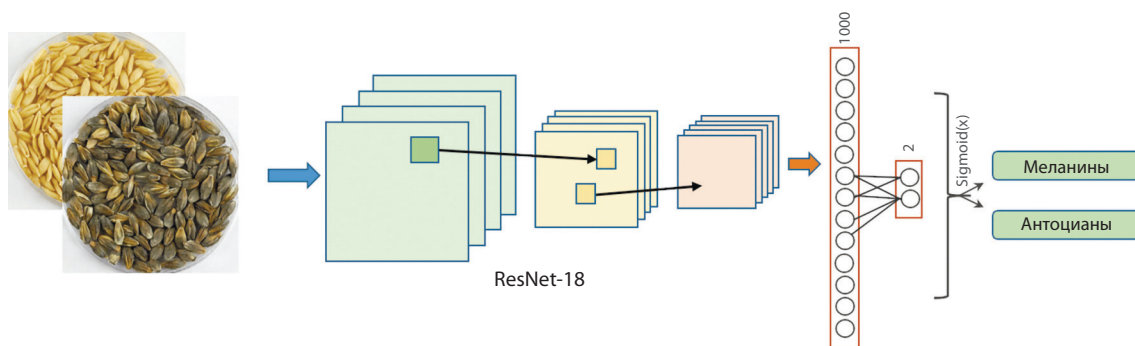


Рис. 5. Схема модели ResNet-18 классификации изображений зерен ячменя на основе сверточной нейронной сети.

симальную точность на тестовой выборке. Модель классификации обозначена нами как RF13.

Модели классификации пигментного состава зерен с использованием метода глубокого машинного обучения

Модель классификации на основе сети архитектуры ResNet-18. В дополнение к методу классификации изображений с помощью модели случайного леса, для предсказания типа образца были реализованы три модели, основанные на методах глубокого машинного обучения. Эти методы в настоящее время широко используются для анализа изображений растений и показали свою высокую точность.

Одна из моделей – нейронная сеть архитектуры ResNet-18, описанная в статье (He et al., 2016). ResNet – это семейство сверточных нейронных сетей (convolutional neural networks, CNN) сходной архитектуры, отличающихся количеством слоев (18, 34, 50, 101 и 152). В нашей работе использовалась модель глубиной 18 слоев, как наиболее простая и быстрая. Она состоит из последовательно идущих 17 слоев, включающих преобразование свертки, соединенных альтернативным путем для сигнала, и одного полносвязного слоя (рис. 4). Каждые четыре слоя происходит операция субдискретизации, при которой длина и ширина слоя становятся меньше в два раза, а число каналов двукратно возрастает. На рис. 4 это слои, обозначенные как «3×3 свертка, N», где N – число каналов.

На вход данной сети подавались прямоугольные изображения, в которые были вписаны области чашек Петри (рис. 5). Выходной слой включал два числа в интервалах

от 0 до 1, предсказывающих присутствие (1) меланина или антоциана. В случае если значение числа было больше 0.5, считалось, что соответствующий пигмент присутствует в оболочке зерна. Такой метод позволял классифицировать изображения по наличию в зернах двух пигментов как по отдельности, так и совместно, а также идентифицировать их отсутствие в случае, если оба числа были меньше 0.5. Эта модель классификации была обозначена нами в работе как ResNet-18.

Модель на основе сегментации с головой для классификации. Для классификации зерен по наличию пигментов можно использовать параметры нейронной сети, которые были получены при сегментации изображений с помощью модели на основе U-Net. Это позволяет улучшить точность предсказания для алгоритмов подобного рода и решать две задачи одновременно (сегментация и классификация). Для решения этой задачи в уже имеющуюся модель на основе сегментации с архитектурой U-Net был добавлен дополнительный выходной классифицирующий слой («голова классификации») (рис. 6). На выходе классифицирующего слоя, как и в модели ResNet-18, имеются два числа, которые позволяют определить наличие в зернах антоцианов и/или меланинов (см. рис. 6). Для этой сети была использована топология кодера архитектуры EfficientNetB0, подробно представленная в статье (Tan, Le, 2019). Такая топология сети позволяла не только сегментировать изображение, выделяя на нем область зерен в чашке Петри, но и одновременно производить классификацию всего изображения по наличию или отсутствию двух пигментов. Данная модель классификации обозначена в работе как U-Net+ClassHead.

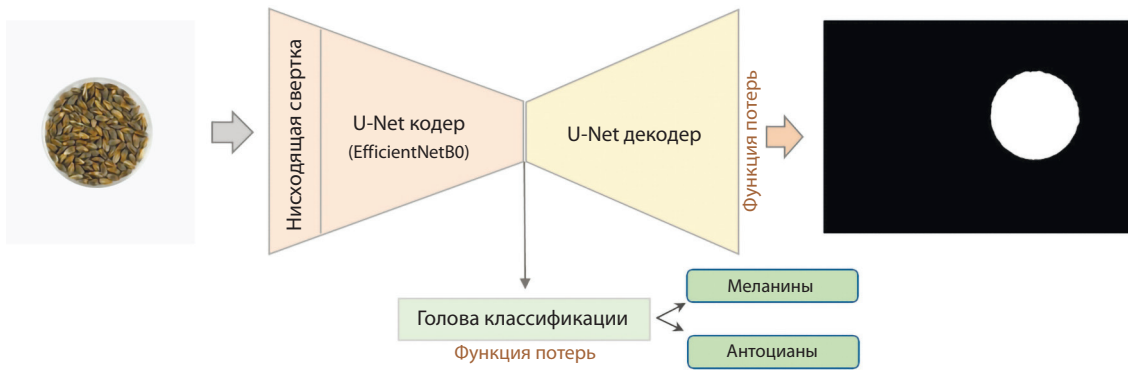


Рис. 6. Схема модели U-Net+ClassHead на основе U-Net сегментации с головой для одновременной сегментации и классификации изображений зерен ячменя.

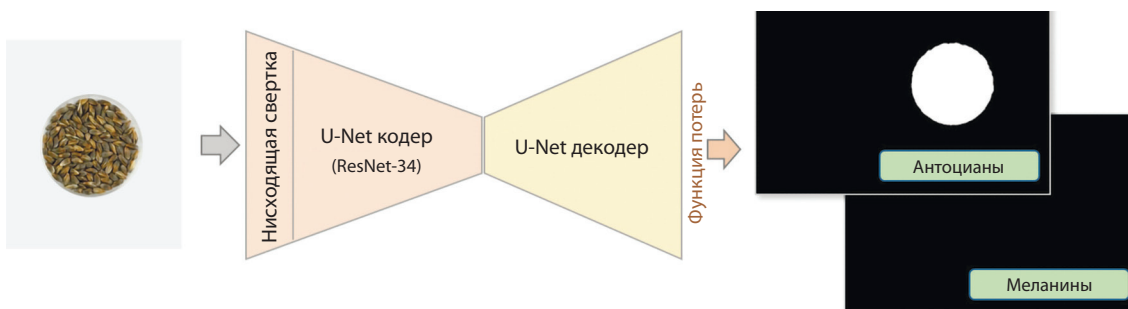


Рис. 7. Схема модели U-Net+ClassSegment для классификации на основе 2-канальной сегментации.

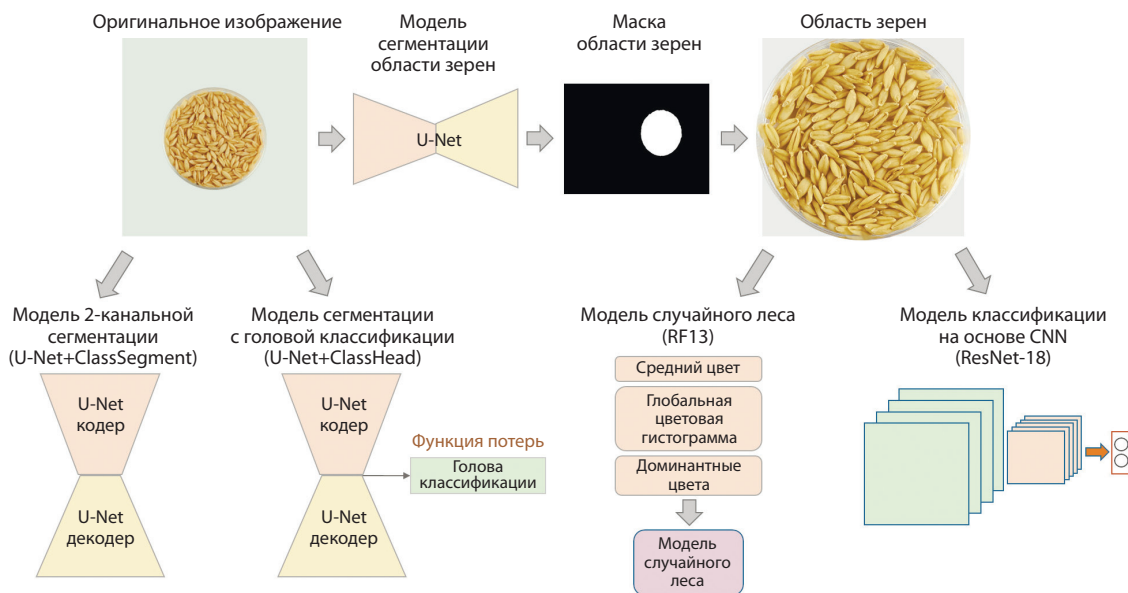


Рис. 8. Общая схема анализа изображений предложенными в работе моделями.

Модель 2-канальной сегментации. Для классификации изображений можно использовать сеть U-Net, видоизмененную таким образом, что она будет сегментировать каждый пиксель по наличию определенной пигментации. На выходе эта сеть выдает двухканальную маску, в которой каждый канал сегментирует область изображения, если образец содержит определенный пигмент (рис. 7). Эта модель, U-Net+ClassSegment, была основана на архитектуре

U-Net с кодером ResNet-34. Для определения класса всего изображения мы считали, что если хоть один пиксель после сегментации был классифицирован как содержащий пигмент, то весь образец содержит данный пигмент.

Остальные технические параметры обучения моделей, такие как число эпох обучения, размер батча, использованная функция потерь и параметры оптимизатора, приведены в Приложении 7.

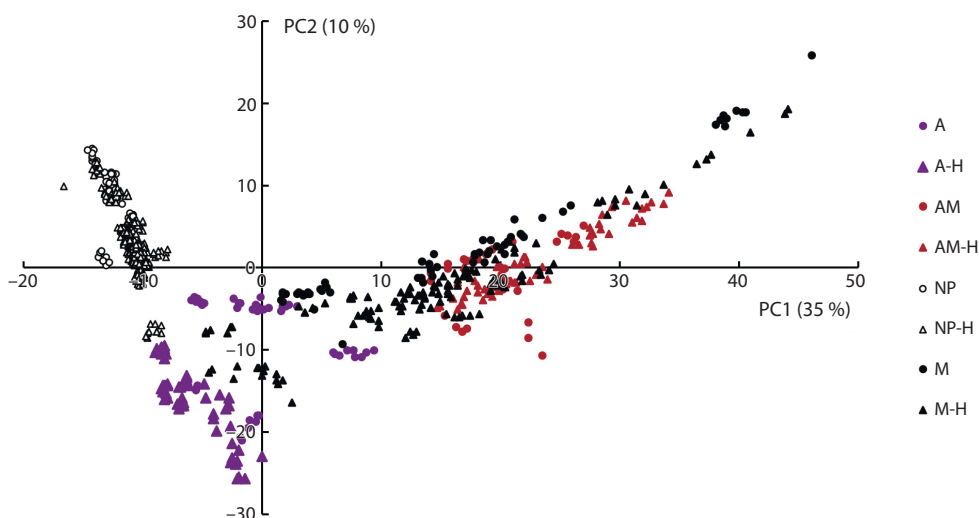


Рис. 9. Диаграмма рассеяния образцов в пространстве первых двух компонент, полученных на основе PCA для цветовых характеристик зерен.

Ось X – компонента PC1, ось Y – компонента PC2. В скобках для компонент указаны доли дисперсии. Здесь и на рис. 10 обозначения образцов по наличию антоцианов и пленчатости/голозерности: A, AM, M, NP – антоцианы, антоцианы и меланины, меланины и отсутствие пигментов соответственно; H – пленчатые зерна.

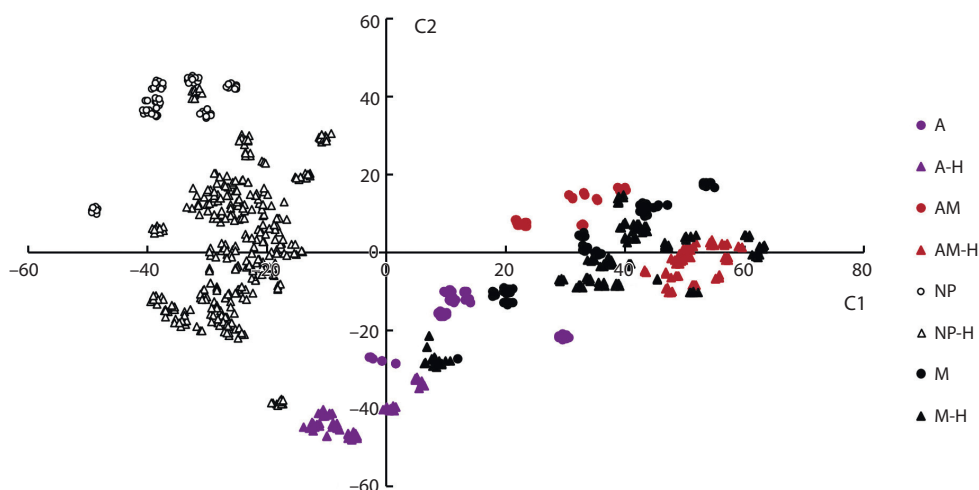


Рис. 10. Диаграмма рассеяния образцов в пространстве первых двух компонент, полученных в результате алгоритма t-SNE для цветовых характеристик зерен.

Ось X – компонента C1, ось Y – компонента C2.

Таким образом, в работе рассматривались две модели классификации на основе U-Net сегментации на исходном изображении (U-Net+ClassHead и U-Net+ClassSegment) и две модели классификации, для которых отдельно выделялась область зерен на исходных изображениях с помощью модели U-Net сегментации (RF13 и ResNet-18). Общая схема анализа изображений предложенными в работе моделями сегментации и классификации приведена на рис. 8.

Результаты

Цветовые характеристики зерен

Методы PCA и t-SNE были применены для отображения образцов зерен в пространстве обобщенных характери-

стик размерности 2 с использованием 345 информативных характеристик (см. Материалы и методы). Отфильтрованные признаки были подвергнуты нормализации (центрирование по математическому ожиданию и приведение к единичной дисперсии). При этом все изображения анализировались независимо, т. е. каждая точка на диаграммах PCA (рис. 9) и t-SNE (рис. 10) соответствует одному изображению.

Пигментированные (залитые значки) и непигментированные образцы (незалитые значки) хорошо разделяются на обеих диаграммах (см. рис. 9 и 10). При этом на диаграмме t-SNE (см. рис. 10) различия более выражены. Также образцы с антоцианами (фиолетовые значки) на диаграмме отделены от образцов, содержащих оба пигмента (красные). Области, занимаемые этими образцами

Таблица 1. Оценка точности классификации (ACC) образцов ячменя по содержанию антоцианов и меланинов в оболочке зерен для четырех моделей на валидационной, тестовой и отложенной выборках

Модель классификации	Валидационная выборка	Тестовая выборка	Отложенная выборка
RF13	0.896	0.903	0.652
ResNet-18	0.938	0.934	0.817
U-Net+ClassHead	0.906	0.962	0.821
U-Net+ClassSegment	0.917	0.903	0.819

Таблица 2. Параметры оценки точности классификации образцов ячменя по содержанию антоцианов и меланинов в оболочке зерен для модели U-Net+ClassHead на тестовой и отложенной выборках

Параметр	Тестовая выборка		Отложенная выборка	
	Меланин	Антоцианы	Меланин	Антоцианы
F-мера	1.0	0.937	0.983	0.488
Чувствительность	1.0	0.881	1.0	0.389
Положительное предсказуемое значение	1.0	1.0	0.966	0.656

на диаграммах, не пересекаются. В то же время области, занимаемые образцами с антоцианами (фиолетовые значки) и меланинами (черные), имеют пересечение. Образцы, содержащие как антоцианы, так и меланины, и образцы, содержащие только меланины, тесно пересекаются (справа по оси X и ближе к 0 по оси Y).

Отметим также влияние пленчатости зерен на характеристики их цвета, которое заметно на двух указанных графиках. Прежде всего, пленчатость/голозерность не влияет на разделение областей для разных классов зерен по пигментации за исключением пар, содержащих антоцианы либо меланин: пленчатые и голозерные образцы с одним типом окраски находятся ближе друг к другу, чем образцы с другим типом окраски. Особенно явно это проявляется для зерен без пигментации (незалитые значки). Для зерен с меланином одна из групп пленчатых образцов имеет цветовые характеристики, весьма схожие с зернами, содержащими антоцианы (на графиках эта группа расположена внутри области, занимаемой образцами с антоцианами, и отстоит далеко от других зерен с окраской меланином). Внутри одного пигментного класса голозерные и пленчатые образцы занимают разные области и хорошо разделяются (см. рис. 10, образцы без пигментации, образцы с антоцианами и образцы с антоцианами и меланинами). Эти результаты показывают, что в большинстве случаев пленчатость не изменяет тип окраски зерен, но вносит существенный вклад в изменение цветовых характеристик оболочки.

Классификация зерен по содержанию пигментов

В результате обучения моделей классификации образцов зерен по содержанию пигментов были получены оценки точности на валидационной, тестовой и отложенной выборках (табл. 1).

Лучший результат классификации на отложенной выборке демонстрирует модель сегментации с «головой

классификации» (U-Net+ClassHead). Данные о параметрах оценок точности данной модели приведены в табл. 2.

Матрица ошибок предсказания класса образцов зерен (Приложение 8) позволяет определить, что большинство неверных классификаций модели приходится на предсказание содержания антоцианов в пленчатых образцах, что согласуется с графиками PCA и t-SNE (см. рис. 9 и 10), на которых области для пленчатых образцов, содержащих меланины и антоцианы, значительно перекрываются с областями образцов, содержащих только меланины. Причем образцов, для которых сеть предсказала отсутствие пигментов, но содержащих антоцианы, значительно больше образцов, для которых предсказано наличие антоцианов, тогда как они отсутствовали. Ошибки наблюдаются и для голозерных образцов. В первую очередь это образцы, содержащие антоцианы, для которых сеть предсказала их отсутствие. В небольшом числе образцов, содержащих меланины, эти пигменты не были идентифицированы с помощью нейронной сети. В то же время образцы, содержащие антоцианы, были классифицированы сетью как содержащие меланины.

Согласно непараметрическому тесту Манна–Уитни, точность определения антоцианов различается (p -value = 0.004) для голозерных и пленчатых образцов. На определение меланинов пленчатость/голозерность не оказывает влияния.

Несколько меньшую точность показал метод U-Net+ClassSegment. Можно сделать вывод о лучшей обобщающей способности моделей, которые одновременно решают несколько разных задач (multi task learning). Обе модели, основанные на этом подходе, существенно выигрывают как у метода случайного леса, использующего цветовые дескрипторы (наиболее низкая точность), так и у классификации при помощи модели ResNet-18. Надо отметить, что результаты точности на отложенной выборке существенно ниже, чем на тестовой.

Обсуждение

Методы анализа цифровых RGB изображений для изучения физиологических свойств зерен широко применяются для злаков (Neuman et al., 1989; Huang et al., 2015; Sabanci et al., 2017; Kozłowski et al., 2019; Комышев и др., 2020; Zuykin et al., 2020). Они используются в том числе для классификации зерен как по пигментному составу, так и по сортам.

В нашей работе мы анализировали методы классификации зерен по цветовым характеристикам на классы по наличию двух типов пигментов. Мы показали, что методы глубокого машинного обучения позволяют получить более высокую точность классификации зерен, чем использование цветовых дескрипторов. Аналогичные выводы были сделаны при классификации зерен ячменя по видам (Kozłowski et al., 2019). Наши результаты также демонстрируют, что применение многозадачного подхода (multi task learning) дает более высокую точность классификации.

На отложенной выборке точность классификации оказалась существенно меньшей по сравнению с тестовой выборкой. Предположительно, одной из причин этого могло быть то, что баланс меток различных классов в обучающей, валидационной и тестовой выборках был одинаковым и не совпадал с соотношением в отложенной выборке. В частности, изображений с зернами без пигментов в отложенной выборке было в 1.5 раза меньше, чем в обучающей, а для классификации такие зерна представляют собой наиболее простой случай. Также на основании извлеченных цветовых дескрипторов был обучен бинарный классификатор, который отличал зерна из отложенной выборки от других зерен с точностью ACC = 1. Это означает, что между данными сериями изображений есть существенные различия, которые могут быть объяснены тем, что в отложенной выборке были выбраны зерна из других коллекций или вариации в условиях съемки этих изображений могли оказать существенное влияние. Этим можно объяснить небольшое уменьшение точности при качестве классификации у модели случайного леса.

Наш анализ также показал, что пленчатость или голозерность у ячменя – это признак, который влияет на его цветовые характеристики. Этот признак может оказывать влияние и на классификацию зерен по наличию пигментов.

Заключение

Предложенные методы на основе анализа цифровых изображений с помощью алгоритмов компьютерного зрения и машинного обучения показали приемлемую классифицирующую способность в задаче определения содержания меланина и антоцианов в зернах ячменя. Результаты демонстрируют, что применение алгоритма Random Forest с использованием цветовых дескрипторов уступает в итоговой точности подходам на основе сверточных нейронных сетей. Метод случайного леса, кроме того, оказывается чувствительным к малым вариациям протокола или условий съемки, теряя обобщающую способность по сравнению со сверточными нейронными сетями. Возможные пути улучшения модели на основе данного алгоритма – тщательный подбор признаков и предвари-

тельная нормализация изображений, подаваемых на вход. Классическая архитектура классификационной модели уступает по точности модели 2-канальной сегментации целого изображения. Сегментация с «головой классификации» дала наилучшие результаты (ACC = 0.821) и является предпочтительной в задаче определения содержания пигментов ячменя.

Список литературы / References

- Комышев Е.Г., Генаев М.А., Афонников Д.А. Анализ цветовых и текстурных характеристик зерен злаков на цифровых изображениях. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(4): 340-347. DOI 10.18699/VJ20.626
- [Komyshev E.G., Genaev M.A., Afonnikov D.A. Analysis of color and texture characteristics of cereals on digital images. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):340-347. DOI 10.18699/VJ20.626]
- Шоева О.Ю., Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Гены, контролирующие синтез флавоноидных и меланиновых пигментов ячменя. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(3):333-342. DOI 10.18699/VJ18.369
- [Shoeva O.Yu., Strygina K.V., Khlestkina E.K. Genes determining the synthesis of flavonoid and melanin pigments in barley. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(3):333-342. DOI 10.18699/VJ18.369 (in Russian)]
- Abdel-Aal E.S.M., Hucl P. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem*. 1999;76(3):350-354. DOI 10.1094/CCHEM.1999.76.3.350
- Afonnikov D.A., Genaev M.A., Doroshkov A.V., Komyshev E.G., Pshenichnikova T.A. Methods of high-throughput plant phenotyping for large-scale breeding and genetic experiments. *Russ. J. Genet*. 2016;52(7):688-701. DOI 10.1134/S1022795416070024
- Afonnikov D.A., Komyshev E.G., Efimov V.M., Genaev M.A., Koval V.S., Gierke P.U., Börner A. Relationship between the characteristics of bread wheat grains, storage time and germination. *Plants*. 2022;11(1):35. DOI 10.3390/plants11010035
- Arif M.A.R., Komyshev E.G., Genaev M.A., Koval V.S., Shmakov N.A., Börner A., Afonnikov D.A. QTL analysis for bread wheat seed size, shape and color characteristics estimated by digital image processing. *Plants*. 2022;11(16):2105. DOI 10.3390/plants11162105
- Ceccarelli S., Grando S., Van Leur J.A.G. Genetic diversity in barley landraces from Syria and Jordan. *Euphytica*. 1987;36(2):389-405. DOI 10.1007/BF00041482
- Choo T.M., Vigier B., Ho K.M., Ceccarelli S., Grando S., Franckowiak J.D. Comparison of black, purple, and yellow barleys. *Genet. Resour. Crop Evol*. 2005;52(2):121-126. DOI 10.1007/s10722-003-3086-4
- Downie A.B., Zhang D., Dirk L.M.A., Thacker R.R., Pfeiffer J.A., Drake J.L., Levy A.A., Butterfield D.A., Buxton J.W., Snyder J.C. Communication between the maternal testa and the embryo and/or endosperm affect testa attributes in tomato. *Plant Physiol*. 2003; 133(1):145-160. DOI 10.1104/pp.103.022632
- Ferdinando M.D., Brunetti C., Fini A., Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants under abiotic stresses. In: Ahmad P., Prasad M. (Eds.) *Abiotic Stress Responses in Plants*. New York: Springer, 2012;159-179. DOI 10.1007/978-1-4614-0634-1_9
- Flintham J., Adlam R., Bassoi M., Holdsworth M., Gale M. Mapping genes for resistance to sprouting damage in wheat. *Euphytica*. 2002; 126:39-45. DOI 10.1023/A:1019632008244
- Glagoleva A.Y., Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Melanin pigment in plants: current knowledge and future perspectives. *Front. Plant Sci*. 2020;11:770. DOI 10.3389/fpls.2020.00770
- He K., Zhang X., Ren S., Sun J. Deep residual learning for image recognition. In: *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*, Las Vegas, NV, USA, 2016. IEEE, 2016;770-778. DOI 10.1109/CVPR.2016.90

- Huang M., Wang Q.G., Zhu Q.B., Qin J.W., Huang G. Review of seed quality and safety tests using optical sensing technologies. *Seed Sci. Technol.* 2015;43(3):337-366. DOI 10.15258/sst.2015.43.3.16
- Jana B.K., Mukherjee S.K. Notes on the distribution of phytomelanin layer in higher plants – a short communication. *J. Pharm. Biol.* 2014;4(3):131-132
- Jolliffe I.T. Principal Component Analysis. Springer Series in Statistics. New York: Springer, 2002. DOI 10.1007/b98835
- Khojastehnazhand M., Roostaei M. Classification of seven Iranian wheat varieties using texture features. *Expert Syst. Appl.* 2022;199:117014. DOI 10.1016/j.eswa.2022.117014
- Kolhar S., Jagtap J. Plant trait estimation and classification studies in plant phenotyping using machine vision. A review. *Inf. Process. Agric.* 2023;10(1):114-135. DOI 10.1016/j.inpa.2021.02.006
- Kozłowski M., Górecki P., Szczypiński P.M. Varietal classification of barley by convolutional neural networks. *Biosyst. Eng.* 2019;184:155-165. DOI 10.1016/j.biosystemseng.2019.06.012
- Li Z., Guo R., Li M., Chen Y., Li G. A review of computer vision technologies for plant phenotyping. *Comput. Electron. Agric.* 2020;176:105672. DOI 10.1016/j.compag.2020.105672
- Neuman M.R., Sapirstein H.D., Shwedyk E., Bushuk W. Wheat grain colour analysis by digital image processing II. Wheat class discrimination. *J. Cereal Sci.* 1989;10(3):183-188. DOI 10.1016/S0733-5210(89)80047-5
- Pedregosa F., Varoquaux G., Gramfort A., Michel V., Thirion B., Grisel O., Blondel M., Prettenhofer P., Weiss R., Dubourg V., Vanderplas J., Passos A., Cournapeau D., Brucher M., Perrot M., Duchesnay E. Scikit-learn: machine learning in Python. *J. Mach. Learn. Res.* 2011;12:2825-2830
- Ronneberger O., Fischer P., Brox T. U-Net: convolutional networks for biomedical image segmentation. In: Navab N., Hornegger J., Wells W., Frangi A. (Eds.) Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015. Lecture Notes in Computer Science. Vol. 9351. Cham: Springer, 2015;234-241. DOI 10.1007/978-3-319-24574-4_28
- Sabancı K., Kayabasi A., Toktas A. Computer vision-based method for classification of wheat grains using artificial neural network. *J. Sci. Food Agric.* 2017;97(8):2588-2593. DOI 10.1002/jsfa.8080
- Sharma R., Kumar M., Alam M.S. Image processing techniques to estimate weight and morphological parameters for selected wheat refractions. *Sci. Rep.* 2021;11(1):20953. DOI 10.1038/s41598-021-00081-4
- Souza F.H., Marcos-Filho J. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. *Braz. J. Bot.* 2001;24(4):365-375. DOI 10.1590/S0100-84042001000400002
- Tan M., Le Q. EfficientNet: rethinking model scaling for convolutional neural networks. In: Proceedings of the 36th International Conference on Machine Learning, Long Beach, California, 9–15 June 2019. ICML, 2019;6105-6114
- van der Maaten L., Hinton G. Visualizing data using t-SNE. *J. Mach. Learn. Res.* 2008;9(11):2579-2605.
- Wang Y.H., Su W.H. Convolutional neural networks in computer vision for grain crop phenotyping: a review. *Agronomy.* 2022;12(11):2659. DOI 10.3390/agronomy12112659
- Zykin P.A., Andreeva E.A., Tsvetkova N.V., Voylokov A.V. Anatomical and image analysis of grain coloration in rye. *Preprints.* 2020; 2020110530. DOI 10.20944/preprints202011.0530.v1

ORCID ID

D.A. Afonnikov orcid.org/0000-0001-9738-1409

Благодарности. Разработка протокола фенотипирования, алгоритма классификации и тестирования проводилась при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-00122, <https://rscf.ru/project/22-74-00122/>). Для анализа данных использовались вычислительные ресурсы ЦКП «Биоинформатика» при поддержке бюджетного проекта FWNР-2022-0020.

Авторы выражают благодарность Е.А. Заварзину и А.И. Ивлевой за участие в обучении моделей нейронных сетей.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.06.2023. После доработки 27.09.2023. Принята к публикации 28.09.2023.