УДК 004.896, 58.085

О.А. ИВАЩУК, В.И. ФЕДОРОВ, Н.В. ЩЕРБИНИНА, А.А. ШАМРАЕВ

O. A. IVASHCHUK, V. I. FEDOROV, N. V. SHCHERBININA, A.A. SHAMRAEV

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА РАСТЕНИЙ IN VITRO С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕЙРОСЕТЕВОГО АППАРАТА**

**OPTIMIZATION OF THE PROCESS OF PLANT PRODUCTION IN VITRO WITH THE USE OF A NEURAL NETWORK**

*В статье рассмотрена модернизация традиционного процесса микроклонального размножения растений за счет оптимизации его параметров на основе специально разработанных методов и моделей, обеспечивающих возможность оценки и прогнозирования результатов различных этапов рассматриваемого процесса. Проведено системное описание данного процесса и представлены: функциональная модель c учетом возможности проведения имитационных экспериментов и осуществления модельных оценок, прогнозов, оптимизации его параметров; теоретико-множественная модель этапа стерилизации растительных эксплантов позволяющая выявить параметры состояния и причинно-следственные связи, определяющие качество асептического материала. Разработаны и исследованы нейросетевые модели оценки и прогнозирования результатов этапа стерилизации, позволяющие оптимизировать его параметры, проводить необходимое количество имитационных экспериментов с одновременным изменением нескольких (в том числе всех) параметров.*

*Ключевые слова: моделирование, оптимизация, искусственные нейронные сети, имитационный эксперимент, микроклональное размножение, стерилизация растительных эксплантов*

*This article describes the development and study of models of neural networks for the evaluation and prediction of the results of the sterilization stage. These results allow to optimize its parameters, to conduct required amount of simulation experiment with simultaneous changes of several (including all) parameters. For modelling study researchers used two paradigms of artificial neural network, that is multilayer perceptron and radial basis function network. Preliminary laboratory experiments confirmed the adequacy of the developed models, while the smallest approximation error corresponds to the model in the form of a radial basis function network.*

*Keywords: modelling, optimization, artificial neural networks, simulation experiment, microclonal propagation, sterilization of plant explants*

Настоящее время характеризуется стремительным сокращением ареалов и полным исчезновением многих видов растений в связи с активной хозяйственной деятельностью человека. Так, из 1400-1500 видов растений, распространенных в таком экономически развитом регионе России, как Белгородская область, сегодня более 30 видов растений включены в список Красной книги России и более 200 видов требуют действенной охраны как редкие и исчезающие на региональном уровне [1,2]. Сохранение биологического разнообразия растений необходимо для поддержания экологических условий существования и экономического развития человеческого общества, а сохранение генетических ресурсов является основным источником важных селекционных признаков [3,4]. Таким образом, проблема сохранения и воспроизводства редких и исчезающих видов растений сегодня становится крайне актуальной. Ее эффективное решение возможно при использовании технологии микроклонального размножения, основанной на методе культуры клеток и тканей. [5,6].

Однако следует отметить, что процесс оптимизации параметров микроклонального размножения растений для получения качественного посадочного материала, является длительным, трудоемким и затратным; требует постановки и повторения значительного числа лабораторных экспериментов. При этом происходит большой расход дорогостоящих компонентов, входящих в состав питательных сред, а также значительные затраты временных и людских ресурсов (на сбор материалов для опытов, обеспечение перед каждой серией опытов стерильных инструментов, посуды, питательных сред, необходимых условий в помещении и т.п.). Кроме того, при анализе результатов подобных экспериментов необходимо работать с большими объёмами разнородной, иногда слабоструктурированной, информации.

Вышесказанное определяет перспективность использования при решении задач оптимизации параметров микроклонального размножения растений современных средств информационных технологий и методов моделирования, в том числе методов интеллектуального анализа данных, которые успешно применяются при прогнозировании и управлении процессами и объектами в различных сферах, в том числе при решении различных задач в биотехнологии.

Специализированные математические и ситуационные модели позволят выявить причинно-следственные связи как между параметрами процессов внутри отдельных этапов микроклонального размножения, так и между параметрами, являющимися выходами и входами различных этапов данной технологии.

Процесс микроклонального размножения является многоэтапным и включает в себя: выбор и подготовку растительных эксплантов; процесс стерилизации растительных эксплантов; введение их в культуру in vitro; получение и культивирование асептических растений на синтетической питательной среде; микроклональное размножение растений-регенерантов; адаптация микроклонов к почвенным условиям, при этом одну из определяющих ролей играет стерильность полученной культуры, поэтому особое значение имеет оптимизация параметров этапа стерилизации. В данной работе лабораторные опыты, процесс моделирования и имитационные эксперименты проводились для данного этапа.

В качестве растительных эксплантов рассматривались семена редких, исчезающих и лекарственных растений, произрастающих на территории Белгородской области, относящиеся к семейству Labiatae Juss. (Lamiaceae) Губоцветные: *Bellevalia sarmatica* (Georgi) Woronow, *Nigella damascena* (L.), *Echinacea purpurea* (L), *Hyssopus cretaceus* Dubjan, *Prunella grandiflora* (L.) Sholl. и *Salvia sclarea* L [7-10].

Осуществлялась разработка моделей оценки и прогнозирования результатов этапа стерилизации с использованием аппарата искусственных нейронных сетей (ИНС). Конкретная топология и параметры ИНС определялись путем построения и последующей проверки на адекватность двух видов ИНС: RBF- сеть и многослойный персептрон. Рассматривались различные структуры данных ИНС, в которых варьировалось число скрытых слоев (1 или 2), число нейронов в скрытых слоях, а также вид функции активации.

Для оценки адекватности построенных моделей использовались следующие критерии:

- Средняя квадратичная ошибка *mse*, минимизируемся в процессе обучения ИНС;

- Коэффициент детерминации R2, характеризующий долю разброса относительно среднего значения требуемого выхода (полученного по обучающей выборке), которую объясняет построенная модель;

- Средние ошибки аппроксимации на обучающей и тестовой выборках  и , которые дают общее представление о качестве построенной математической модели.

Для построения ИНС и осуществления имитационных экспериментов использовался пакет прикладных программ и функций Neural Network Toolbox системы MATLAB, позволяющий реализовывать ИНС различных парадигм.

Лабораторные опыты проводились с использованием различных стерилизаторов: Лизоформин 3000, Биoцид, Белизна (5-15%), Хлорамин Б, Нитрат серебра. Для каждого вида стерилизатора проводилось изменение его концентрации (%) и времени обработки семян (мин), как это показано в таблице 1. Стерилизация питательных сред, материалов, инструментов и оборудования проводилась согласно методикам, принятым в работе по культуре клеток и тканей [11,12]. Для каждого режима с учетом времени и концентрации стерилизующего агента использовали по 10 семян каждого вида. Опыт проводили в 3-х кратной повторности. Оценку влияния режима стерилизации проводили по количеству стерильных и жизнеспособных эксплантов (%).

Таблица 1 – Изменение параметров стерилизации при проведении лабораторных опытов

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | Стерилизатор | Пределы изменения концентрации,  шаг,% | Пределы изменения времени обработки, шаг, мин |
| 1 | Лизоформин 3000 | [5;15], 5 | [10;30], 10 |
| 2 | Биoцид | [1;5], 2 | [10;30], 10 |
| 3 | Белизна (5-15%) | [50;100], 50 | [10;30], 10 |
| 4 | Хлорамин Б | [1;10], 5 | [10;30], 10 |
| 5 | Нитрат серебра | [0,05; 0,1], 0,05 | [10;30], 10 |

Для построения, обучения и проверки на адекватность моделей было проведено всего 585 экспериментов: по 195 экспериментов с каждым видом растений. Полученные результаты были разбиты на обучающую (450 экспериментов) и тестовую (135 экспериментов) выборки.

Лабораторный и имитационный эксперименты проводились согласно техническому заданию НИР «Исследование методов и моделирование процессов в биотехнологии и систематике растений» (№ 40.5084.2017/БЧ).

Авторами предлагается модернизация традиционного процесса микроклонального размножения за счет оптимизации его параметров на основе специально разработанных моделей оценок и прогнозов.

Проведено системное описание исследуемого биотехнологического процесса и построена его функциональная модель, с использованием графической нотации IDEF0, продемонстрированная на рисунках 1.

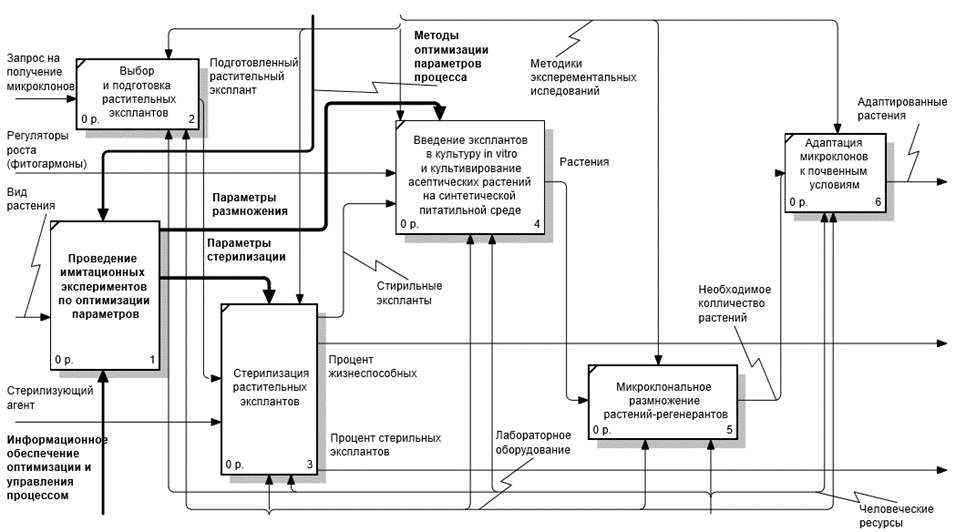


Рисунок 1– Декомпозиция процесса микроклонального размножения растений с оптимизацией его параметров

Данная модель позволяет выявить взаимосвязь всех этапов и параметров процесса микроклонального размножения.

Модернизация процесса отражена в представленной функциональной модели за счет введения новых информационных потоков и подпроцесса. Так, на рисунках 1, 2 в качестве механизма введен поток «Информационное обеспечение оптимизации управлению процессом»; на рисунке 2 при детализации процесса вводиться подпроцессс «Проведение имитационных экспериментов» выход которого определяет информационные управляющие потоки для подпроцессов стерилизации и введение эксплантов в культуру *in vitro.* Таким образом вводятся новые контуры управления с участием этих подпроцессов.

Построенная функциональная модель показывает, что состояние этапа стерилизации (как одного из составляющих внутреннего контура управления введенного модернизированного процесса) определяет не только качество асептического материала, но и количество жизнеспособных стерильных проростков, что в целом определяет результат процесса микроклонального размножения. Таким образом, выявление причинно-следственной связи между входами и выходами этапа стерилизации и оптимизация его параметров позволит повысить эффективность управления процессом микроклонального размножения.

Исходя из теоретико-множественного подхода, формально этап стерилизации растительных эксплантов предлагаемого авторами модернизированного процесса микроклонального размножения растений можно представить с помощью следующей модели:

*ST=**<W, Ω, X,* *Y, F, O>,* (4)

где *W* – множество подпроцессов этапа стерилизации;

*Ω* – множество внешних воздействий на элементы *W*, а также заданные параметры среды и оборудования;

*X* – множество варьируемых входных параметров, определяющих условия и результат этапа стерилизации растительных эксплантов. Проведенные предварительные эмпирические исследования показали[8,9], что результат получения стерильной культуры, которая будет характеризоваться хорошим ростом, напрямую зависит от правильного выбора таких параметров, как вид стерилизующего агента (*X1*), его концентрация (*X2,%*), а также время обработки стерилизующим агентом растительных эксплантов (*X3,*мин*.*);

*Y* – выходные переменные модели: количество стерильных эксплантов (*Y1*,%), асептических жизнеспособных проростков (*Y2,*%);

*F* – множество отображений осуществляемых на *W; Ω, Х, Y, F*: (*W, Ω, Х, Y*) → *Y;*

*O*– множество отношений над элементами *W; Ω, Х, Y, O*: (), арности *k, i, l, j* зависят от лабораторных условий и вида растительных эксплантов.

Важнейшими составляющими множества отображений *F* являются функциональные зависимости, отражающие причинно-следственные связи между входными и выходными параметрами этапа стерилизации: *Y1* = *F1*(*X1, X2,X3, Ω*), *Y2* = *F2*(*X1, X2,X3, Ω*), *Y2* = *F3*(*Y1, Ω*). Для моделирования данных зависимостей авторами использовался аппарат ИНС, важным свойством которых является возможность параллельной обработки информации одновременно всеми нейронами [13,14]. На основе подобных моделей возможно проведение имитационных экспериментов с изменением одновременно нескольких (в том числе, всех) параметров.

Для получения модели, обеспечивающей возможность оценки и прогнозирования результатов этапов стерилизации растительных эксплантов с выбором оптимальных параметров, были реализованы ИНС двух парадигм: многослойный персептрон и RBF-сеть. Как указано в пункте 2.1, обучающие и тестовые выборки сформированы на основе экспериментальных данных, полученных при стерилизации семян редких и исчезающих видов растений семейства губоцветных *B. Sarmatica, N. Damascena, E. Purpurea*.

В результате исследования и оценки адекватности нейросетевых моделей с различными структурами получено, что лучшими прогностическими способностями обладает ИНС в виде RBF-сети с 143 нейронами в скрытом слое и радиально-базисными функциями активации. Для данной модели среднеквадратичная ошибка обучения составит *mse* = 10-6; коэффициент детерминации R2 =99,89; средние ошибки аппроксимации на обучающей и тестовой выборках: = 0,86 %,  = 0,98 %.

Входами ИНС являются параметры *X1, X2, X3* ∈ *X,* выходами параметры *Y1, Y2* ∈ *Y.* Промежуточные слои отражают биохимические процессы, протекающие в обрабатываемых эксплантах.

Разработанная модель была использована для проведения имитационных экспериментов по выбору оптимальных параметровэтапастерилизации семян при введении в культуру *in vitro* растений *H. Cretaceus, P. Grandiflora, S. Sclarea,* относящихся к семейству губоцветных, произрастающих на территории Белгородской области. С данными видами растений не проводились лабораторные эксперименты. На вход модели подавались различные комбинации входных параметров *X1, X2, X3* в более широком диапазоне пределов изменения и с меньшим шагом варьирования, чем это возможно реализовать в лабораторном эксперименте. Так, концентрация стерилизующего агента варьировалась в пределах от 1 до 100% с шагом 0,01, время стерилизации – от 1 до 30 мин. с шагом 1. Результаты, полученные в ходе имитационных экспериментов, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Оптимальные параметры этапа стерилизации, полученные на основе имитационных экспериментов.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Вид растения | Стерилизующий агент *X1* | Время стерилизации *X3*, мин | Концентрация стерилизующего агента *X2*, % | Колличество стерильных эксплантов *Y*1, % | Количество жизнеспособных эксплантов *Y*2, % |
| H. cretaceus | Лизоформин 3000 | 9 | 7,12 | 74,2 | 15,9 |
| P. grandiflora | Белизна (5-15%) | 16 | 77,1 | 79,3 | 32,1 |
| S. sclarea | Нитрат серебра | 18 | 0,12 | 94,3 | 55,3 |

**Заключение.**

На основе проведенного исследования получены следующие результаты и выводы.

Представлен модернизированной процесс микроклонального размножения растений с оптимизацией его параметров что достигается введением нового подпроцесса: проведение имитационного эксперимента по оптимизации параметров.

Проведено системное описание исследуемого процесса и разработана его функциональная модель, которая демонстрирует появление внутренних контуров управления за счет введения новых информационных потоков и подпроцесса.

Разработана теоретико-множественная модель этапа стерилизации растительных эксплантов, представленного авторами модернезированного процесса микроклонального размножения растений с оптимизацией параметров. Выявлены причинно-следственные связи необходимые для осуществления оптимизации параметров данного этапа.

Для моделирования зависимостей *F1, F2, F3* использовался аппарат ИНС. Построены и исследованы различные структуры ИНС двух парадигм: многослойный персептрон и RBF -сеть. Для формирования обучающих и тестовых выборок использовались данные лабораторных экспериментов по стерилизации семян редких, исчезающих и лекарственных растений, произрастающих на территории Белгородской области: *B. Sarmatica, N. Damascena, E. Purpurea*.

Анализ результатов моделирования позволил выбрать адекватную нейросетевую модель для проведения имитационных экспериментов по оценке и прогнозированию результатов процесса стерилизации с выбором оптимальных параметров: RBF-сеть с 143 нейронами в скрытом слое и радиально-базисными функциями.

С помощью разработанной модели были проведены имитационные эксперименты и выбраны оптимальные параметры стерилизации для трех видов растений, относящихся к семейству губоцветных, для которых не проводился лабораторный эксперимент: *H. Cretaceus* – стерилизующий агент Лизоформин 3000 с концентрацией 7,12% и временем стерилизации 9 мин; *P. grandiflora* – стерилизующий агент Белизна (5-15%) с концентрацией 77,1% и временем стерилизации 16 мин; *S. sclarea* – стерилизующий агент Нитрат серебра с концентрацией 0,12% и временем стерилизации 18 мин.

Количество жизнеспособных стерильных проростков для данных растений, определённое имитационным экспериментом, составило 15,9, 32,1, 55,3% соответственно.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Красная книга Российской Федерации (Растения, грибы) / Отв. редактор Л.В. Бардунов, В.С. Новиков. – Москва, 2008. – 847 с.
2. Красная книга Белгородской области. Редкие и исчезающие растения, грибы, лишайники и животные. Официальное издание/Общ. науч. ред. А.В. Присный. – Белгород, 2004. – 532 с.
3. Флинт В.Е. Сохранение и восстановление биоразнообразия: серия учебных пособий / В.Е. Флинт. – М.: Издательство Научного и учебно-методического центра, 2002. – 286 с.
4. Бутенко Р.Г., 1999. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе. Москва: ФБК-ПРЕСС, 160 с.
5. Sudhersan C., Jibi S., Al-sabah L., AShkanani J., Al-melhem S. Plant micropropagation in desert rehabilitation - a success story/Biotechnology Program, Environment and Life Sciences Research Center, Kuwait Institute for Scientific Research, 2016.
6. Żebrowska J.I. Effect of quantitative plant traits on the efficiency of in vitro cloning of strawberry (fragaria × ananassa duch)/ Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 2015. Т. 90. № 4. С. 407-412.
7. Маевский П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 11-е изд. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. – 635 с.
8. Думачева Е.В., Чернявских В.И., Бородаева Ж.А. Биологические ресурсы семейства Lamiaceae Lindl. в условиях мелового юга Среднерусской возвышенности //Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2015. – 36-41 с.
9. Тризна А.А. Растения – жизнь и здоровье. – Тула: Приок. кн. изд-во, 1992. – 192 с.
10. Калинин Ф. Л., Сариацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наук. думка, 1980 — 488 с;
11. Сорокина И.К., Старичкова Н.И., Решетникова Т.Б. Основы биотехнологии растений. – Саратов: Издательство СГУ, 2002. – 34 с;
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and with tobacco tissue cultures / Physiologia Plantarum. – 1962. – №15. – 473-397 с.
13. Ivashchuk O.A., Lazarev S.A., Ivashchuk O.D., Fedorov V.I. Situational modeling for the control of technospheric safety/Journal of current research in science: 4 (1), 2016: 84-90
14. Ivashchuk Olga Alexandrovna, Igor Sergeevich Konstantinov, Sergej Aleksandrovich Lazarev, Vjacheslav Igorevich Fedorov. Research in the Field of Automated Environmental Safety Control for Industrial and Regional Clusters/ International Journal of Applied Engineering Research ISSN 0973-4562 Volume 9, Number 22 (2014) pp. 16813-16820.

**Иващук Ольга Александровна**

Белгородский государственный национальный

исследовательский университет, г. Белгород

д.т.н., профессор, профессор кафедры информационных и робототехнических систем

Тел.: +7(4722) 30-13-76

E-mail: [ivaschuk@bsu.edu.ru](mailto:ivaschuk@bsu.edu.ru)

**Федоров Вячеслав Игоревич** Белгородский государственный национальный

исследовательский университет, г. Белгород

ст. преподаватель кафедры информационных и робототехнических систем

Тел.: +7(4722) 30-13-76

E-mail: ivaschuk@bsu.edu.ru

**Щербинина Наталья Владимировна**

Белгородский государственный национальный

исследовательский университет, г. Белгород

К.т.н. доцент кафедры информационных и робототехнических систем

Тел.: +7(4722) 30-13-76

E-mail: [ivaschuk@bsu.edu.ru](mailto:ivaschuk@bsu.edu.ru)

**Шараев Анатолий Анатольевич**

Белгородский государственный национальный

исследовательский университет, г. Белгород

К.т.н., доцент кафедры информационных и робототехнических систем

Тел.: +7(4722) 30-13-76

E-mail: ivaschuk@bsu.edu.ru