



FI000104128B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 104128 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 15.11.1999

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

G 01N 21/64

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 970462

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 04.02.1997

(24) Alkupäivä - Löpdag 04.02.1997

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 05.08.1998

(73) Haltija - Innehavare

1. Voivalvatin Etikettipalvelu Ky, PL 143, 20521 Turku, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Tyystjärvi, Esa, Mestarinkatu 15 as. 28, 20810 Turku, (FI)

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Klorofylliä sisältävien eliöiden tunnistamismenetelmä

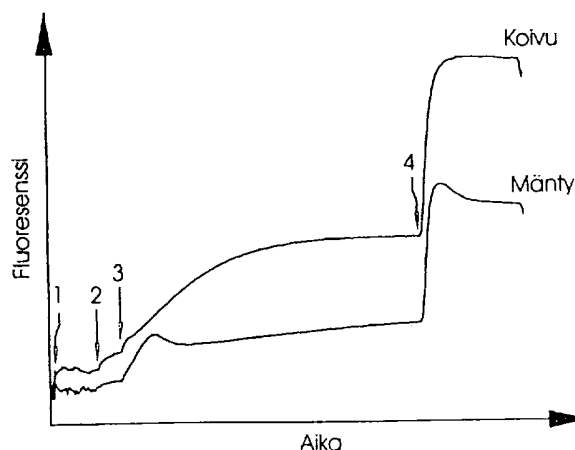
Ett förfarande för att identifiera organismer som innehåller klorofyll

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 61809 (G 01N 15/07), US A 4650336 (G 01J 3/50), US A 5412219 (G 01N 21/64),
US A 5507115 (A 01M 7/00), US A 5426306 (G 01N 21/64), US A 4084905 (G 01J 3/30),
Chemical Abstracts 125:135324 (J. Plant Physiol., 148(5), 574-578, 1996)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää, jonka avulla voidaan automaattisesti tunnistaa klorofylliä sisältäviä eliöitä kuten kasveja. Eliöt tunnistetaan antamalla niistä kullekin valokäsittelysarja, mittaamalla valokäsittelysarjan aikana eliön emittoiman klorofylli a:n suhteellisen fluoresenssisaaliin vaihteluita ja vertaamalla hahmontunnistusmenetelmin näin saatua suhteellisen fluoresenssisaaliin vaihteluita kuvaavaa käyrää käyriin, jotka on samalla valokäsittelysarjalla tuotettu tunnetuista lajeista. Keksinnön tyypillinen käyttömuoto on pellolla kasvavien kasvien kartoittaminen, jolloin pellolta ensin paikannetaan kaikki kasvit niiden emittoiman klorofylli a:n fluoresenssin perusteella ja sitten käytetään keksinnön kohteena olevaa menetelmää kunkin kasviyksilön tunnistamiseksi.



Uppfinningen är en metod med vilken man automatiskt kan identifiera organismer som innehåller klorofyll, såsom växter. Organismernas identifiering sker genom att ge varje organism en ljusbehandlingsserie. Under ljusbehandlingsseriens gång mätes växlingarna av den relativa fluoresensmängden av klorofyll *a* som organismen avsondrar. De relativa fluoresensmändernas växlingskurvor formidentifieras och de erhållna kurvorna jämförs med kurvor som med samma ljusbehandlingsserie erhållits från kända arter. En typisk användning av uppfinningen är kartläggning av växter på en åker. Först lokaliseras alla växter enligt den fluoresens av klorofyll *a* de avsondrar och sedan används den uppfunna metoden att identifiera varje växtindivid.

5 Tämän keksinnön kohteena on patenttivaatimuksen 1 mukainen
klorofylliä sisältävien eliöiden tunnistamismenetelmä.
Yhdistettynä kaikkien pelloilla kasvavien kasviyksilöiden
kartoittamiseen, joka voi tapahtua samalla laitteella kuin
kasvien tunnistaminen, menetelmä mahdollistaa kasvit lajilleen
yksilöivän kartan laatimisen pellosta. Tällaisen kartan avulla
10 voidaan esimerkiksi rikkakasvihävitteet kohdistaa haluttuihin
kasvilajeihin.

15 Rikkakasvihävitteet eli herbisidit ovat merkittävä ympäristöuhka.
Maataloustutkimus pyrkii herbisidien käytön vähentämiseen myös
herbisidien kalleuden vuoksi. Tavanomaisissa herbisidien
levitysmenetelmissä suuri osa herbisidistä joutuu hävitettävien
kasvien sijasta maahan. Onkin kehitetty menetelmiä, joiden avulla
herbisidi voidaan kohdistaa rikkakasveihin. Varhaiset menetelmät
perustuivat yleensä viljelykasvustoa korkeampien rikkakasvien
20 mekaaniseen havainnointiin. Esimerkiksi patentista US 3 959 924
tunnetaan laite, jossa herbisidiruiskun eteen on ripustettu
tanko, joka laukaisee herbisidiruiskun koskettaessaan korkeata
rikkakasvia. Riviviljelyssä tapahtuvaan rikkaruohontorjuntaan ja
kasvien harventamiseen soveltuvia laitteita, joissa
herbisidilevitintä ohjataan rivillä kasvien mekaanisen tai
25 optisen havainnoinnin perusteella, on kuvattu patenteissa US 3
609 913 ja US 1 193 963. Näistä patenteista tunnetut
kasvinpaikannusmenetelmät soveltuvat huonosti pienille tai maata
myöten kasvaville kasveille.

30 Viime vuosina on kehitetty myös järjestelmiä, joissa kasvipeite
erotetaan maapohjasta kasvipeitteelle tunnusomaisen
heijastusspektrin eli olennaisesti lehtien vihreän värin
perusteella (Stafford ja Miller 1993, Computers and Electr. in
35 Agric. 9, 217-229). Näin kerättyä informaatiota käytetään sitten
joko välittömästi herbisidisuihkun suuntaamiseen tai tiedosta
kerätään satelliittipaikannusjärjestelmää hyödyntäen tietokanta,

jonka avulla herbisidien jakelu maastoon toteutetaan. Kasvien heijastusspektriin perustuvat laitteet ovat erottelukyvyltään huonoja, koska pienten kasvien vaikutus heijastusspektriin on vähäinen, ja koska maanpinta heijastaa huomattavasti myös niitä aallonpituuksia, joissa maanpinnan ja kasvipeitteen heijastusspektrin ero on suurin (A.W. Hooper, G.O. Harries ja B. Ambler 1976, J. Agric. Engng. Res. 21, 145-155; W.L. Felton 1995, Proc. Brighton Crop Prot. Conf. -Weeds). Heijastusspektrimenetelmän erottelukyky riippuu myös mm. maanpinnan laadusta ja sääoloista; esimerkiksi aamukaste pienentää merkittävästi maanpinnan ja kasvipeitteen heijastusspektrin eroa avainaallopituuksilla (Felton, m.t.) ja joidenkin kasvien erottaminen joistakin maalajityypeistä on käytännössä mahdotonta (Hooper et al., m.t.).

Kasvien paikantamista klorofyllin fluoresenssin perusteella on ehdotettu aikaisemminkin, joskaan ei herbisidien levitystarkoituksiin. Esimerkiksi silleen jätetystä patenttihakemuksesta FI914249 tunnetaan menetelmä, jossa istutettavia taimia sisältävissä kennostoissa olevat taimettomat paakat tunnistetaan klorofyllin fluoresenssin puuttumisen perusteella. Myös klorofyllin fluoresenssin käyttö kasvien stressitilojen ja muiden fysiologisten parametrien mittaamiseen on tunnettua esimerkiksi G.H. Krausen ja E. Weisin (1991) artikkelista (Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 313-349).

Herbisidien käyttömäärien minimoimisen ja tehon maksimoimisen sekä laajemminkin ns. täsmäviljelyn (ks. S. Blackmore 1994, Outlook on Agric. 23, 275-280) tavoitteiden kannalta on tärkeätä kehittää menetelmiä, joilla pystytään kartoittamaan ja lajilleen tunnistamaan pellolla kasvavat kasvit. Lajien tunnistaminen ei ole mahdollista heijastusspektriin perustuvilla menetelmillä, koska lajityypilliset erot heijastusspektrissä ovat pieniä (Hooker et al., m.t.) ja koska kasvin koko vaikuttaa ratkaisevasti maanpinnan ja kasvin heijastusspektrin yhdistelmään. Lajintunnistusta on yritetty kuva-

analyssaattorilaitteiston avulla, mutta tämä erittäin tehokasta tietojenkäsittelylaitteistoa vaativa menetelmä ei ole toiminut käytännössä (Stafford ja Miller, m.t.). Klorofyllin fluoresenssin spektrissä on aiemmin osoitettu olevan lajienvälisiä eroja, joita mahdollisesti voitaisiin käyttää lajien tunnistamiseen (E.W. Chappelle, F.M. Wood, Jr., J.E.McMurtrey III ja W.W. Newcomb 1984, Applied Optics 23: 134-138). Fluoresenssispektrin mittaaminen vaatii kuitenkin erittäin herkkää fluoresenssidetektoria, eikä fluoresenssispektrin erojen perusteella ole osoitettu voitavan tunnistaa kasveja kahta lajia suuremmasta joukosta.

Tämän keksinnön tarkoituksena on mahdollistaa sellaisen kasviyksilökartan laatiminen, jossa kasviyksilöt luokitellaan fylogeneettisen ryhmän, esimerkiksi lajin perusteella. Kasvien tunnistamiseen käytettävä, patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä erottaa kasvilajit helposti toisistaan.

Keksinnön tyypillisessä käyttömuodossa kasvit ensin paikannetaan käyttäen hyväksi sitä, että muut luonnonesineet emittoivat vähän tai ei lainkaan näkyvää valoa, kun taas kasvien sisältämä klorofylli *a* fluoresoi. Klorofylli *a*:n fluoresenssi siis kertoo, että tietyssä paikassa on kasvi. Kukin paikannettu kasvi tunnistetaan antamalla sille sarja valokäsittelyjä, seuraamalla klorofylli *a*:n fluoresenssin vaihteluita ajan funktiona valokäsittelyjen aikana ja vertaamalla näin saatua käyrää tunnetuista lajeista mitattuihin vastaaviin käyriin.

Kasvien lisäksi menetelmää voidaan käyttää myös muiden klorofylliä sisältävien eliöiden tunnistamiseen.

Täsmällisemmin sanottuna keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista se, mikä on esitetty patenttivaatimuksen 1 tunnusmerkkiosassa.

Keksinnön avulla saavutetaan huomattavia etuja.

Keksintö mahdollistaa kasvilajien automaattisen tunnistamisen. Tällöin kasveja käsittävät laitteet voidaan säätää käsittelmään eri kasvilajeja eri tavoin. Esimerkiksi rikkakasvi-häviteruisku voidaan rakentaa käsittelmään kukin rikkakasvilaji herbisidillä, joka parhaiten kyseiseen lajiin tehoaa ja jättämään viljelykasvit käsittelemättä. Keksintöä voidaan käyttää myös maataloustutkimuksen ja ekologisen tutkimuksen vaatimien laitteiden rakentamiseen, koska kasviyksilöt identifioivan lajikartan laatiminen helpottuu keksinnön avulla huomattavasti.

5 Lajinmäärityksen sijasta keksintöä voidaan käyttää luokittelemaan kohteena olevia eliöitä lajia laajempiin fylogeneettisiin ryhmiin, esimerkiksi koppisiemenisiin ja paljassiemenisiin, tai lajia suppeampiin ryhmiin kuten lajikkeisiin. Keksintöä voidaan käyttää myös yhteyttävien mikro-organismien kuten syanobakteerien

10 tunnistamiseen, jolloin esimerkiksi vesistöjen tilan seuraaminen näyteorganismien avulla helpottuu.

15

Keksintöä selostetaan seuraavassa lähemmin oheisen piirustuksen avulla.

20

Kuvio 1 esittää männynneulaskimpun ja koivunlehden yläpinnan suhteellisen fluoresenssisaaliin vaihteluja kuvaavia käyriä menetelmää testattaessa käytetyn keksinnön suoritusmuodon mukaisen valokäsittelyn aikana.

25

Tämän keksinnön kohteena oleva klorofylliä sisältävien eliöiden tunnistamismenetelmä perustuu klorofylli a:n fluoresenssiemission kvanttisaaliissa tapahtuvien muutosten mittaamiseen. Termiä 'suhteellinen fluoresenssisaalis' käytetään tässä hakemuksessa tarkoittamaan vakiona pidettävän herätevalon virittämän fluoresenssin mitattua intensiteettiä; keksinnön käyttömuodoissa käytetään näin mitatun intensiteetin muutoksia, jotka ovat verrannollisia fluoresenssin kvanttisaaliissa tapahtuviin muutoksiin. Klorofylli a:ta on korkeammissa kasveissa, sanikkaisissa, sammalissa, useimmissa levissä sekä

30 syanobakteereissa. Lähes kaikki korkeampien kasvien klorofylliä sisältävien osien emissio on klorofylli a:n fluoresenssia;

35

levillä ja syanobakteereilla esiintyy myös muiden pigmenttien emissiota. Govindjee (1995) on esittänyt yhteenvedon klorofylli a:n fluoresenssista (Aust. J. Plant Physiol. 22: 131-160).

5 Klorofylli a:n fluoresenssin absoluuttinen kvanttisaalis on kasvilla melko pieni, korkeintaan noin 5 % absorboituneesta valosta. Elävässä kasvilla klorofylli a:n fluoresenssia vaimentavat mm. fotosynteesin valokemialliset reaktiot, jotka kilpailevat fluoresenssin kanssa klorofyllin absorboimasta
10 viritysenenergiasta. Maapallon pinnalla vallitsevissa lämpötiloissa lähes kaikki klorofylli a:n fluoresenssi emittoituu fotosynteesin valoreaktio II:n (PSII) klorofyllimolekyyleistä. PSII on fotosynteesin kahden valoreaktion ketjusta toiminnallisesti 'ensimmäinen', sillä tämä valoreaktio syöttää vedeltä riistämänsä
15 elektronit valoreaktioiden väliseen elektroninsiirtoketjuun, ja vasta ketjun toisessa päässä toimivan valoreaktio I:n tuottama pelkistin toimii hiilidioksidia pelkistävän yhteytysreaktion pelkistimenä.

20 Maksimiteholla toimiessaan PSII:n valokemialliset reaktiot vaimentavat fluoresenssin kvanttisaaliin noin viidesosaan maksimiarvosta, joka voidaan mitata pysäyttämällä valokemiallinen reaktio kokonaan esimerkiksi käsittelemällä kasvi diuron-herbisidillä. Kun kasvia pidetään jonkin aikaa pimeässä ja
25 aletaan sitten äkkiä valaista, PSII:n valokemialliset reaktiot alkavat. PSII pystyy kuitenkin syöttämään elektroninsiirtoketjuun elektroneja nopeammin kuin ketju aluksi pystyy vetämään, jolloin PSII:n valokemiallinen reaktio pimeäjakson jälkeen äkkiä valaistaessa hidastuu hetkeksi. Valokemiallisen reaktion
30 hetkellinen hidastuminen näkyy fluoresenssin nousupiikkinä. Valokemiallisen reaktion ja fluoresenssin kilpailu viritysenenergiasta tekee fluoresenssista tärkeän kasvifysiologian tutkimusmenetelmän (Krause ja Weis, m.t.).

35 Edellä kuvatulla fluoresenssin nousupiikillä on tunnusomainen kaava, fluoresenssi-induktiokäyrä eli ns. Kautsky-käyrä. Kautsky-käyrän kaava on samanlainen kaikilla kasveilla. Kautsky-käyrän

eri osiin vaikuttavat erittäin monet fotosynteesikoneiston piirteet. Esimerkiksi käyrän nousevan osa on sitä jyrkempi, mitä suurempi valoa keräävä ns. antennipigmenttijärjestelmä tutkittavan kasvin PSII:lla on. Itse asiassa käyrä heijastaa niin monien fotosynteesikoneiston piirteiden summaa, että käyrän osia ymmärretään vuosikausien intensiivisistä tutkimuksesta huolimatta melko huonosti. Kasvitiede on toistaiseksi keskittynyt tutkimaan sellaisia fluoresenssi-induktiokäyrän piirteitä, jotka ovat kaikille kasvilajeille yhteisiä. Esimerkiksi O. Björkman ja B. Demmig osoittivat (Planta 170, 489-504, 1987), että ns. vaihtelevan ja maksimifluoresenssin suhde on kaikilla korkeammilla kasveilla sama. Tämän keksinnön kohteena oleva kasvilajin tunnistaminen perustuu siihen, että kasveilla on lajityypillisiä eroja fysiologisissa ominaisuuksissa. Jotkut näistä erikoispiirteistä voidaan havaita eroina Kautsky-käyrässä, ja eroja voidaan vahvistaa käyttämällä fluoresenssi-induktion mittaamiseen sarjaa erilaisia valotusjaksoja.

Klorofylliä sisältävien eliöiden tunnistamismenetelmä toimii seuraavasti.

Tunnistettava kasvi tai muu klorofylliä sisältävä eliö varjostetaan kirkkaalta luonnonvalolta ainakin tunnistamisen ajaksi. Kohdetta valaistaan herätevalolla, jonka aallonpituus-huippu on alle 700 nm, mieluummin noin 450 nm. Herätevalon virittämää klorofylli a:n fluoresenssia mitataan kohteeseen suunnatulla valodetektorilla, joka voi olla valodiodi tai valomonistinputki. Detektori suojataan herätevalon aallonpituus-kaistalta suodattimella, joka päästää lävitseen vain herätevalon aallonpituutta pitkäaaltoisempaa, klorofyllin fluoresenssin aallonpituuskaistalle osuvaa valoa. Käynnistetään sarja yhden tai useamman valokäsittelyn jaksoja, jotka aiheuttavat Kautsky-käyrän tyyppisiä muutoksia kohteen suhteellisessa fluoresenssisaaliissa. Fluoresenssisaaliin muutokset ovat suoraan verrannollisia detektorin mittaaman fluoresenssi-intensiteetin muutosten kanssa. Detektorin tuottama informaatio muunnetaan digitaaliseen muotoon ja käsitellään jollakin hahmontunnistusmenetelmällä. Lajin-

tunnistusta varten on etukäteen tuotettu sarja vastaavia signaaleja paikalla mahdollisesti esiintyvistä lajeista, ja hahmontunnistus tapahtuu vertaamalla juuri saatua tuntematonta signaalia ennestään tunnettuihin. Hahmontunnistusmenetelmien käytöstä biosignaalien analysointiin ja diagnosointiin ks. A. Cohen Biomedical Signal Processing. Vol. II. Compression and Automatic Recognition (CRC, Boca Raton, 1988).

Herätevalona käytetään mieluummin välkkyvää eli amplitudi-moduloitua valoa, jolloin valokäsittelyjen suora vaikutus fluoresenssi-intensiteettiin voidaan suodattaa pois ja havainnoida ainoastaan niiden vaikutusta suhteelliseen fluoresenssisaaliiseen. Amplitudimoduloidun herätevalon käyttö klorofylli a:n fluoresenssin mittaamiseen on tunnettua esimerkiksi patentista DE 3518527 A1.

Tämän keksinnön kohteena olevan tunnistusmenetelmän tyypilliset käyttötavat vaativat, että tunnistamisen kohteet paikannetaan ennen tunnistusprosessin alkua. Paikantaminen tehdään samalla tai samantyyppisellä laitteistolla kuin tunnistaminen kartoittamalla klorofyllin fluoresenssin esiintyminen tutkittavalla alueella. Myös paikantamisessa fluoresenssin herätevalona käytetään mieluiten amplitudimoduloitua valoa, jolloin esimerkiksi auringonpaiste ei haittaa kartoittamista. Klorofylli a:n fluoresenssin aallonpituuskaistalla havaittava emissio kertoo, että valodetektorin näkökentässä on klorofylliä sisältävä eliö. Tieto eliön paikasta talletetaan tarvittaessa esimerkiksi satelliittipaikannusjärjestelmän avulla paikkatietokantaan.

Kasvien paikannusmenetelmäksi valitaan klorofyllin fluoresenssiin perustuva menetelmä kahdesta syystä. Ensiksikin sama laite voi sekä havaita kasvin yleensä että tunnistaa sen. Toiseksi kasvit voidaan fluoresenssin avulla havaita herkemmin kuin esimerkiksi Staffordin ja Millerin (m.t.) kuvaamalla heijastusspektriin perustuvilla menetelmillä. Parempi herkkyys perustuu siihen, ettei klorofylli a:n emissioaallonpituuksilss (680-750 nm) esiinny merkittävää muista luonnonesineistä kuin kasveista

tulevaa fluoresenssiemissiota, jota voitaisiin virittää klorofyllin absorboimalla valolla. Tämän vuoksi käytännössä kaikki maastossa havaittava klorofylli a:n fluoresenssi on merkki kasvista. Fluoresenssin intensiteetti on suoraan verrannollinen virittävän valon intensiteettiin, joten kasvien paikannuksen osalta menetelmä voidaan säätää lähes mielivaltaisen herkäksi yksinkertaisesti käyttämällä niin kirkasta virittävää valoa, että halutun kokoiset kasvit tulevat havaituiksi.

- 10 Kasvien paikantamisessa voidaan herätevalona käyttää myös auringonvaloa. Tällöin auringonvalon spektristä on suodatettava pois ne aallonpituudet (esimerkiksi 670 nm ylittävät), joita käytetään klorofyllin fluoresenssin mittaamiseen. Koska auringonvalon intensiteetti vaihtelee, täytyy yhtä aikaa
- 15 fluoresenssin mittaamisen kanssa seurata auringonvalon intensiteetin vaihtelua. Parhaiten tämä tapahtuu suuntaamalla samaan kohtaan tutkittavalle alueelle kaksi valodetektoria, joista toinen on herkkä fluoresenssin aallonpituuksille ja toinen niille aallonpituuksille, joita herätevalosuodatin päästää läpi.
- 20 Heijastuneen valon mittaamiseen perustuvan herätevalon kompensointijärjestelmä toimii hyvin käytettäessä keinovaloa klorofylli a:n fluoresenssin virittämiseen (E. Tyystjärvi ja J. Karunen 1990, Photosynth. Res. 26: 127-132).

- 25 Kasvikartoituksen tuottama tieto voidaan välittömästi siirtää toimilaitteen ohjaustiedoksi. Esimerkiksi herbisidilevittimelle voidaan antaa käsky avata suutin, jos detektorin alla on tuhottava kasvi, tai sulkea suutin, jos kasvia ei havaita. Informaatio voidaan myös tallettaa esimerkiksi GPS-
- 30 satelliittipaikannuslaitteen avulla tietokantaan, jonka avulla ohjataan toimilaitetta.

Tunnistusmenetelmän tekninen teho testattiin laboratorio-oloissa seuraavasti.

35 Testauksen tekivät yhteistyössä keksijä (dosentti Esa Tyystjärvi, Turun yliopiston biologian laitos) sekä assistentti Antti Koski

ja professori Olli Nevalainen (Turun yliopiston tietojenkäsittelyopin laitos). Maastosta kerättiin voikukan ja koivun lehtiä sekä kuusen- ja männynneulasia. Lisäksi kasvatettiin kontrolloiduissa olosuhteissa kasvatuskammioissa kurpitsaa, hennettä ja ruista. Lehtiä säilytettiin noin kahden tunnin ajan kosteiden paperien välissä pimeässä, minkä jälkeen kustakin lajista mitattiin 200 fluoresenssi-induktiokäyrää. Kurpitsan ja rukiin induktiokäyrät mitattiin lehdenpaloista, kuusen ja männyn käyrät 10-20 neulasen nipuista ja muiden lajien käyrät yksittäisistä lehdistä. Koivun, kurpitsan ja herneen käyrät mitattiin kahdelta puolen lehteä, koska lehden eri puolten käyrät ovat erilaiset. Voikukasta mitattiin vain yläpinnan käyrä, koska voikukanlehti on maastossa aina adaksiaalipuoli ylöspäin.

Fluoresenssimittarina käytettiin amplitudimoduloidulla virittävällä valolla varustettua, klorofylli a:n suhteellisen fluoresenssisaaliin vaihteluiden mittaamiseen tarkoitettua laitetta (PAM-101, valmistaja Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Saksa). Fluorometriä ohjattiin QA-Data Oy:n (Turku) tuottamalla FIP-fluoresenssiohjelmalla ja ADC-12BN4-tietokonekortilla, joka myös digitalisoi fluorometrin analogisen signaalin. Kukin mittaus alkoi siten, että mittaaaja toi hämärässä huoneessa lehden tai lehdenpalan fluorometrin anturille, joka valaisi näytettä himmeällä amplitudimoduloidulla valolla. Lehdenpala aiheutti suhteellisen fluoresenssisaaliin nousun fluorometrin signaalin kohinatason yläpuolelle, jolloin ohjausohjelma käynnisti valokäsittelyjen sarjan.

Valokäsittelyjen sarja oli seuraava. Kuvion 1 numerot viittaavat kunkin vaiheen alkamishetkeen: ensin 0.8 sekunnin vaihe, jolloin mitattiin pelkästään 1.6 kilohertsin taajuudella välkkyvän virittävän valon aiheuttamaa fluoresenssia (1). Toisena vaiheena oli herätevalon välkkymisfrekvenssin nostaminen 100 kilohertsiin (2). Puolen sekunnin kuluttua toisen vaiheen käynnistymisestä sytytettiin punainen LED-valaisin (aallonpituus 660 nm; fotonivuon tiheys 60 omol m⁻²s⁻¹) (3) ja viiden sekunnin kuluttua tästä sytytettiin vielä kahdeksi sekunniksi niin kirkas valkoisen

valon halogeenilamppu (fotonivuon tiheys $5500 \text{ omol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), että suhteellinen fluoresenssisaalis nousi kaikilla lajeilla maksimitasolle (4).

- 5 Valokäsittelyjen aiheuttamat suhteellisen fluoresenssisaaliin muutokset normalisoitiin siten, että maksimifluoresenssin arvo kussakin signaalissa oli yksi. Määräkohtiin kuhunkin käyrään sovitettiin kahdeksan erimittaista regressiosuoraa, ja näiden suorien kuuttatoista parametria käytettiin
- 10 hahmontunnistusalgoritmin syöttöarvoina. Kustakin mittausarjasta 100 käyrän parametreja käytettiin hahmontunnistusalgoritmin opetusaineistona ja menetelmää testattiin 100 käyrällä. Taulukko 1 esittää tunnistustulokset, jotka saatiin käytettäessä hahmontunnistuksessa R.J. Schalkoffin teoksessaan Pattern Recognition:
- 15 Statistical, Structural and Neural Approaches (John Wiley & Sons, Singapore, 1992) kuvaamaa hermoverkkoalgoritmia.

Taulukko 1. Laboratorio-oloissa tehty tunnistustarkkuuskoe. Kasvilajit tunnistettiin yllä kuvatulla menetelmän käyttömuodolla. Koivun, kurpitsan ja herneen lehtien adaksiaali- eli yläpinta (y) ja abaksiaalipinta (a) luokiteltiin omiksi luokikseen. Oikein tunnistettujen tapausten osuus on 96.6 %.

Laji		Tunnistettu lajiksi									
		Koivu		Kurpitsa		Kuusi	Herne		Mänty	Ruis	Voikukka
		(y)	(a)	(y)	(a)		(y)	(a)			
10	Koivu (y)	96	3	0	0	0	0	0	0	1	0
	Koivu (a)	0	97	0	1	0	0	0	0	0	3
	Kurpitsa (y)	1	0	98	0	0	0	1	0	0	0
	Kurpitsa (a)	0	1	0	97	0	0	0	0	1	1
15	Kuusi	0	1	0	0	98	0	1	0	0	0
	Herne (y)	0	0	0	0	0	93	7	0	0	0
	Herne (a)	0	0	0	3	0	1	95	0	1	0
	Mänty	0	0	0	0	1	0	0	99	0	0
	Ruis	0	0	0	0	1	0	2	0	97	0
20	Voikukka	0	4	0	0	0	0	0	0	0	96

Pelto-olosuhteissa keksintöä käytetään esimerkiksi seuraavasti.

Tunnistusmenetelmää käytetään kasvikartoituslaitteistolla, joka käsittää valaisus- ja detektoriyksikön, varjostimen sekä GPS-satelliittipaikannuslaitteen, jotka on asennettu liikkuvalla lavetille. Valaisulaite lähettää jatkuvasti amplitudimoduloitua herätevaloa ja pystyy lähettämään tarvittaessa jatkuvaa valoa. Detektoriyksikkö on kytketty mittaamaan vain amplitudimoduloidun herätevalon virittämää fluoresenssia. Jatkuvan valon valolähteen tarkoituksena on tuottaa patenttivaatimuksen 3 mukainen valaistusjaksojen sarja. Jatkuvan valon valolähteitä voi olla useita. Lavetti liikkuu pellolla automaattisesti ennalta suunniteltua rataa suunnistaen esimerkiksi GPS-järjestelmän avulla. Paikannus- ja tunnistuslaite käy pellon läpi kahdesti. Ensimmäisellä kierroksella kasvien esiintyminen pellolla

kartoitetaan mittaamalla klorofylli a:n suhteellisen fluoresenssisaaliin alueellinen jakauma. Mittaustulokset siirretään paikkatietokantaan. Toisella kierroksella kasvikartoituslaite siirtyy havaittujen kasviyksilöiden kohdalle, pysähtyy ja tunnistaa kasvin, mikä tieto lisätään paikkatietokantaan. Paikkatietokantaa käytetään syöttöinformaationa esimerkiksi herbisidiruiskulle.

Ennen kasvikartoituslaitteiston lähettämistä peltokierrokselle kerätään kustakin alueella esiintyvistä kasvilajista tai muusta kohteena olevasta fylogeneettisestä luokasta edustava otos (noin 100 näytettä), annetaan kullekin näistä valokäsittelysarja, talletetaan valokäsittelysarjan aikana mitattujen fluoresenssi-
kayrien parametrit ja opetetaan hahmontunnistusalgoritmi luokittelemaan tämä aineisto oikein. Mikäli käytetään hermoverkkotyypistä hahmontunnistusalgoritmia, tapahtuu opettaminen ns. backpropagation-algoritmin avulla.

Kasvikartoituslaite voi myös liikkua niin hitaasti, että sekä kasvien paikantaminen että luokittelu tehdään samalla peltokierroksella. Tällöin lavetin liike pysäytetään laitteen havaittua suhteellisen fluoresenssisaaliin nousun kohinatason yläpuolelle, ja laite siirtyy välittömästi kasvin tunnistamiseen patenttivaatimuksen 3 mukaisin valokäsittelyin.

Paikannuslaite voidaan myös erottaa tunnistuslaitteesta, jolloin paikannuslaite voi olla rakenteeltaan yksinkertaisempi ja käyttää auringonvaloa fluoresenssin herätevalona.

Kasvien paikannus- ja tunnistusjärjestelmä voidaan myös pakata osaksi herbisidiruiskua siten, että jokaista herbisidisuutinta vastaa fluoresenssidetektor, jonka näkökenttä on saman kokoinen kuin suuttimesta purkautuvan herbisidisuihkun säde kasvien tasolla. Laitteistoon on tällöin kuuluttava myös anturi, joka kertoo laitteiston liikenopeuden. Kasvien paikannus- ja tunnistusyksikkö, nopeusanturi ja herbisidiruiskun suuttimet on yhdistetty kontrolliyksikköön. Detektorin havaittua myrkytettävän

kasvin kontrolloivaksikkö antaa vastaavalle suuttimelle oikea-aikaisen avautumiskäskyn.

Edellä on keskitytty kasvien tunnistamiseen keksinnön avulla.

- 5 Klorofylli a:n fluoresenssin avulla voidaan paikantaa ja luokitella korkeampien kasvien lisäksi myös sanikkaisia, sammalia, leviä ja syanobakteereita. Kasvien tai mikro-
- 10 organismien tunnistaminen menetelmän avulla voi tapahtua myös laboratorio-olosuhteissa. Keksinnön kohteena olevaa menetelmää voidaan tällöin käyttää esimerkiksi luonnossa esiintyvien mikro-
- organismien tunnistamiseen laboratorionäytteiden avulla.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä, jonka avulla viljely- tai rikkakasviyksilö voidaan
5 automaattisesti tunnistaa tiettyyn lajiin tai lajia laajempaan
fylogeneettiseen ryhmään kuuluvaksi,

tunnettu siitä, että

- 10 tunnistaminen tapahtuu kohdistamalla kasviin yhden tai useamman
valaistusjakson sarja, mittaamalla kasvista emittoituvan
klorofylli a:n suhteellisen fluoresenssisaaliin vaihtelua ajan
ja valaistuksen funktiona ja vertaamalla näin saatua
15 fluoresenssisaaliin vaihtelua kuvaavaa käyrää tunnettujen
fylogeneettisten ryhmien edustajista vastaavalla tavalla
mitattuihin vastaaviin käyriin hahmontunnistusalgoritmin avulla.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen tunnistamismenetelmä, **tunnettu**
siitä, että klorofylli a:n suhteellisen fluoresenssisaaliin
20 vaihtelua mitataan käyttäen amplitudimoduloitua herätevaloa.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukaiseen tunnistamismenetelmään
perustuva kasvikartan laatimismenetelmä, **tunnettu** siitä, että
tunnistettavat kasvit paikannetaan klorofylli a:n fluoresenssin
25 avulla ennen niiden tunnistamista.

4. Patenttivaatimusten 1 ja 3 mukainen kasvikartan
laatimismenetelmä, **tunnettu** siitä, että paikannusprosessissa
fluoresenssin herätevalona käytetään auringonvaloa, jonka
30 intensiteettivaihtelujen vaikutus korjataan seuraamalla
aurionvalon intensiteettivaihteluita yhtäaikaaisesti
fluoresenssin kanssa ja jakamalla mitattu fluoresenssi-
intensiteetti auringonvalon intensiteetillä.

5. Patenttivaatimusten 1 ja 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä,
että menetelmän avulla kerättyä informaatiota käytetään kasveja
35 käsittelevän laitteen ohjaamiseen.

6. Patenttivaatimusten 1 ja 5 mukaisen menetelmän käyttötapa, **tunnettu** siitä, että tiedot paikannettavista ja tunnistettavista eliöistä kerätään satelliittipaikannusjärjestelmän avulla tietokantaan.

Patentkrav

1. En metod med vars hjälp en odlings- eller ogräsväxtindivid automatiskt kan igenkännas som hörande till en viss art eller
5 till en fylogenetisk grupp som är större än en art,

kännetecknad av att

- igenkänningen sker genom att utsätta växten för en eller flera
10 serier av belysningsperioder, mäta variationen i det relativa fluorescensutbytet av klorofyll a som växten emitterar som en funktion av tid och belysning, och med hjälp av en mönsterigenkänningsalgoritm jämföra den på detta sätt erhållna kurvan, som illustrerar variationen i fluorescensutbytet, med
15 motsvarande kurvor som uppmätts på motsvarande sätt i representanter för kända fylogenetiska grupper.

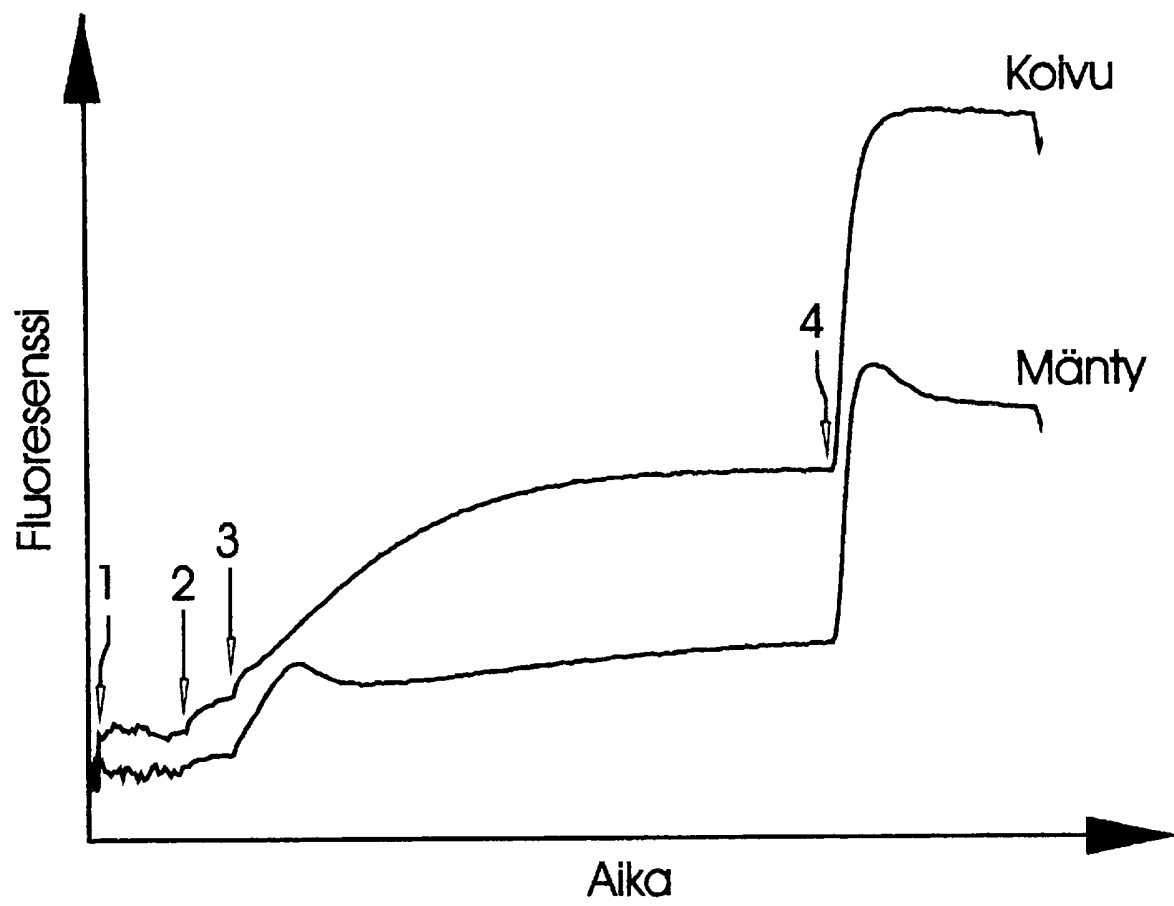
2. En igenkänningsmetod enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att variationen i klorofyll a:s relativa fluorescensutbyte uppmäts genom att använda amplitudmodulerat excitationsljus.
20

3. En metod för uppgörande av en växtartskarta som baserar sig på patentkrav 1, **kännetecknad** av att de växter som skall igenkännas lokaliseras med hjälp av klorofyll a:s fluorescens före igenkänningen.
25

4. En metod för uppgörande av en växtartskarta enligt patentkrav 1 och 3, **kännetecknad** av att i lokaliseringsprocessen som excitationsljus för fluorescensen används solljus, i vilket intensitetsvariationernas påverkan korrigeras genom att följa
30 med solljusets intensitetsvariationer samtidigt med fluorescensen och dividera den uppmätta fluorescensintensiteten med solljusets intensitet.

5. En metod enligt patentkrav 1 och 3, **kännetecknad** av att den information som insamlas med hjälp av metoden används för att styra en apparat som hanterar växter.

5 6. Sättet att använda metoden enligt patentkrav 1 och 5,
;
kännetecknat av att uppgifterna om de organismer som skall
lokaliseras och igenkännas insamlas i en databas med hjälp av
ett satellitlokaliseringssystem.



Kuvlo 1.