

叶绿素荧光成像技术的葡萄霜霉病早期检测

张 昭^{1, 2, 3, 4}, 姚志凤^{1, 3, 4}, 王 鹏^{1, 3, 4}, 苏宝峰^{1, 3, 4}, 刘 斌^{3, 4, 5},
宋怀波^{1, 3, 4}, 何东健^{1, 3, 4*}, 徐 炎^{5, 6, 7}, 胡静波²

1. 西北农林科技大学机械与电子工程学院, 陕西 杨凌 712100
2. 宝鸡文理学院电子电气工程学院, 陕西 宝鸡 721016
3. 农业农村部农业物联网重点实验室, 陕西 杨凌 712100
4. 陕西省农业信息感知与智能服务重点实验室, 陕西 杨凌 712100
5. 西北农林科技大学信息工程学院, 陕西 杨凌 712100
6. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西 杨凌 712100
7. 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100

摘 要 葡萄霜霉病对葡萄生产构成严重威胁, 尽早防治是治理霜霉病的关键。为了对该病进行早期检测, 以 PCR 检测获取的霜霉病相对生物量作为霜霉病侵染的依据, 从暗适应—光适应—暗弛豫 3 个光合生理状态连续变化过程中, 采集 80 个人工接种霜霉菌叶片和 80 个健康对照叶片连续 6 d 的叶绿素荧光图像。对比健康和接种叶片叶绿素荧光动力学曲线、参数图像和参数值的差异, 使用单因素方差分析评估叶绿素荧光参数对霜霉病侵染的敏感性, 筛选叶绿素荧光参数最优特征子集, 使用机器学习分类器构建霜霉病早期检测模型。结果表明, 随着接种后天数(day post inoculation, DPI)的增加, 霜霉病侵染程度不断加深, 健康和接种叶片叶绿素荧光动力学曲线、参数图像和参数值从 2DPI 开始有显著差异($p < 0.05$), 霜霉病侵染导致叶片光化学猝灭速率减小(Rfd 变小), 光合效率降低(F_v/F_m 变小), 叶片活力和光保护能力衰退(NPQ 和 qN 变小), 叶片吸收的光能更多以荧光的形式释放出来(F_i 和 F_m 变大)。基于序列前向浮动算法优选的叶绿素荧光参数特征子集($qN-L3$, $Rfd-L2$, $NPQ-L1$ 和 F_v/F_m-D1)和 BP 神经网络分类器的 SFFS-BP 模型对 3DPI 健康和接种叶片识别准确率为 83.75%, 全实验周期连续 6 d 平均准确率达到 85.94%。可为葡萄霜霉病光合表型分析和早期检测提供一种快速、准确的手段。

关键词 叶绿素荧光成像; 葡萄霜霉病; 病害检测; 特征选择

中图分类号: O433 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)04-1028-08

引 言

葡萄霜霉病是葡萄霜霉菌(plasmopara viticola, PV)引起的真菌病害, 该病侵染能力强, 扩展速度快, 尽早防治是关键。若能在潜伏期实现霜霉病侵染的早期检测, 就能及早制定防治方案, 阻断霜霉病的蔓延和流行, 保证葡萄的品质和产量。然而在没有病症的霜霉病潜伏期, 田间观察无法判断霜霉病侵染, 近年来兴起的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术可通过 DNA 定量扩增技术准确

定病原菌, 并通过检测病原菌相对生物量判断侵染程度, 但 PCR 技术制备样本耗时费力, 必须在实验室完成, 无法在田间实现霜霉病症前快速无损检测。作为一种无损检测的新技术, 脉冲调制叶绿素荧光(pulse amplitude-modulated chlorophyll fluorescence, PAM-ChlF)成像技术在植物病害早期检测方面应用广泛^[1-2]。Cen 等^[3]用 PAM-ChlF 成像技术揭示了柑橘黄龙病的光合指纹, 综合荧光图像和参数特征的 SVM 模型对健康、黄龙病侵染和营养缺乏叶片检测准确率为 97.00%。Tung 等^[4]利用 PAM-ChlF 成像技术对接种炭疽病菌的本氏烟叶片侵染程度进行了量化分析, 发现在接种 96

收稿日期: 2021-07-15, 修订日期: 2021-10-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672115), 国家重点研发计划项目(2018YDF1000307), 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2019BBF02013), 陕西省重点研发计划项目(2021NY-041)和广西重点研发计划项目课题(桂科 21076001)资助

作者简介: 张 昭, 1979 年生, 西北农林科技大学机械与电子工程学院博士研究生 e-mail: gotoxn@nwsuaf.edu.cn

* 通讯作者 e-mail: hdj168@nwsuaf.edu.cn

用 F_v/F_m 图像量化的病变面积与显症后的病斑数量存在显著的线性关系。上述研究表明，PAM-ChlF 成像技术能够对多种植物病害进行有效检测，但现有研究多用单一参数和图像进行分析，缺乏从霜霉菌侵入到显症连续多天的叶绿素荧光数据，尚未建立综合各个叶绿素荧光参数，能准确进行霜霉病早期检测的方法和模型。

为了提供一种葡萄霜霉病前早期检测的方法和技术，采用 PAM-ChlF 成像技术，从暗适应—光适应—暗弛豫 3 个光合生理状态连续变化过程中，研究霜霉菌感染对叶片光合作用的影响，分析接种和健康叶片正面的叶绿素荧光动力学曲线和图像特征，考察从接种到显症连续 6 d 叶绿素荧光参数的动态变化规律，寻找对霜霉菌感染敏感的叶绿素荧光参数，探索有效识别健康与感染霜霉病叶片的模型与方法，以期能为葡萄霜霉病病光合表型分析和早期检测提供一种快速、

准确的手段。

1 实验部分

以葡萄叶片为研究对象进行叶绿素荧光成像技术检测霜霉病实验。实验分为供试叶片的制备、叶绿素荧光成像和 PCR 检测、数据分析与建模 3 个阶段(图 1)。首先制备供试叶片，将休眠期葡萄幼苗移植于花盆中，并在温室中培养，待霜霉病在田间发病后，进行霜霉菌离体接种和培养实验；之后连续 6 d 每天进行叶片正面叶绿素荧光图像采集和霜霉病 PCR 检测；最后对获取的接种和健康叶片数据进行叶绿素荧光动力学曲线、图像和参数变化分析，应用特征选择算法筛选出叶绿素荧光参数最优特征子集，输入分类器建立霜霉病早期检测模型并验证模型的识别效果。

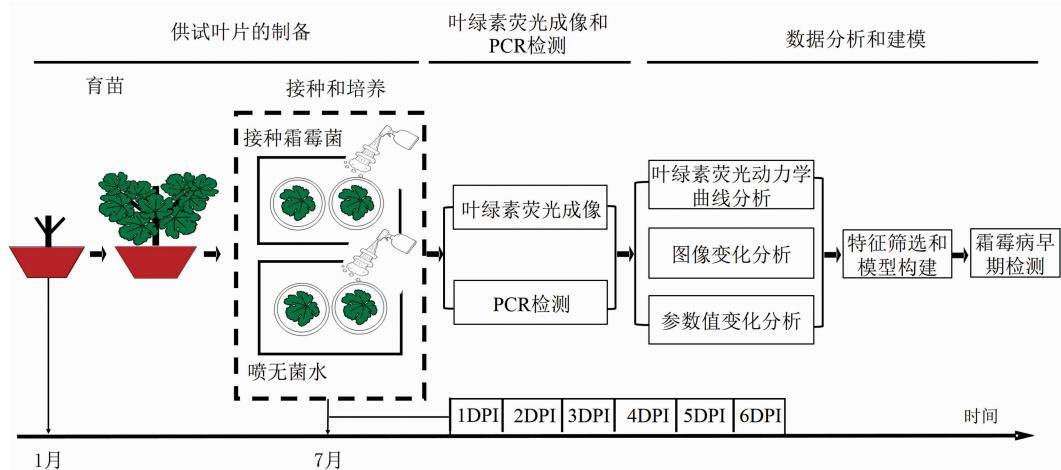


图 1 实验流程图

Fig. 1 Flow chart of the experiment

1.1 供试叶片的制备

2020 年 1 月，将全球种植面积最大的葡萄品种“赤霞珠”一年生幼苗移植于花盆中，在温室中培养。7 月摘取新发枝条 6~8 节上完全展开的健康叶片，清洗消毒后置于用滤纸保湿的培养皿中；按照霜霉菌离体接种方法，接种前一天将田间发病的霜霉病叶片采下带回实验室清洗后保湿 24 h，用洁净毛笔刷下叶片背面重新长出的新鲜霉层于无菌水中，离心富集后，使用血球计数板计数，配制成 10^5 个孢子囊 \cdot mL^{-1} 的孢子囊悬浮液；将配制好的孢子悬浮液均匀喷施于需要接种的健康叶片背面，相同数量的健康叶片喷等量无菌水作为对照。将盛有叶片的培养皿封口后放入温度 18°C 、相对湿度 84%、照度为 12 000 lux 的光照培养箱(RXZ 型，宁波江南仪器厂)中，进行 16 h 光照、8 h 黑暗光照控制培养。

接种后叶片发病情况如图 2 所示，健康叶片在实验周期内保持鲜绿[图 2(a)]。1~5 DPI 叶片上无任何症状，直到 6 DPI 接种叶片背面均出现不同程度的白色霜霉层，部分叶片背面区域有病斑[图 2(b)]，部分叶片背面布满了霜霉层[图 2(c)]。

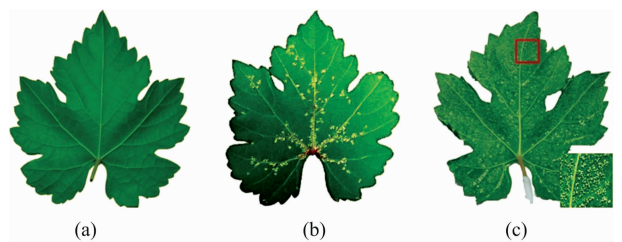


图 2 接种后第 6 天的健康叶片和接种叶片
(a): 健康叶片; (b): 区域发病; (c): 全叶片发病

Fig. 2 Healthy leaves and inoculated leaves with disease spots at 6 DPI

(a): Heathy leaf; (b): Leaf with scattered lesions; (c): Leaf covered with lesions

1.2 叶绿素荧光图像采集和 PCR 检测

1.2.1 叶绿素荧光图像采集

叶绿素荧光数据采集从接种后第 1 天(1 DPI)开始，用图 3 所示 FluorCam FC 800 开放式荧光成像系统，连续 6 d 每天获取葡萄叶片的叶绿素荧光参数图像和动力学曲线。FluorCam FC 800 系统主要由 CCD 相机(分辨率 $696 \text{ px} \times 520$

px)、镜头(SV-0614H, VS Technology)、4 个 LED 光源板(2 个红色(620 nm)和 2 个蓝色(450 nm)LED 面板, 对称布置, 分别与载物台成 45°)、控制器、计算机、载物台和软件系统

(Fluocam7.0)等组成, 成像面积为 20 cm×20 cm。为消除外部光线干扰, 成像背景用黑布遮盖。

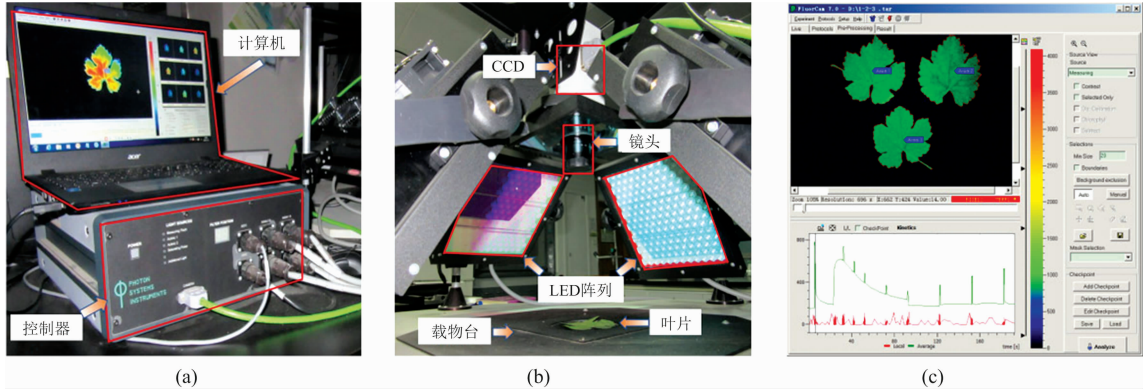


图 3 叶绿素荧光成像系统
Fig. 3 Chlorophyll fluorescence imaging system

叶绿素荧光成像系统的光源包括测量光、光化光和饱和光(图 4)。测量光是为测量叶片荧光强度而经过频率调制的光脉冲, 本研究采用波长 620 nm, 强度 $0.02 \mu\text{Einstein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 脉冲宽度 $10 \mu\text{s}$ 橙红色光脉冲为测量光, 系统获取与测量光同频的荧光。光化光是叶片进行光化学反应的光源, 选用波长 620 nm, 强度 $206 \mu\text{Einstein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的稳定光源作为光化光, 持续照射 70 s。饱和光使用波长 450 nm, 脉宽 800 ms, 强度为 $2806 \mu\text{Einstein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的蓝色光脉, 暂时抑制叶片光合作用, 使叶绿素荧光强度达到最大。

测量程序控制激发光源照射叶片产生叶绿素荧光, 在叶绿素荧光强度动态变化的不同时刻, 利用高灵敏度的 CCD 快速进行图像采集。图像采集前, 首先对叶片进行 20 min 暗适应, 以使光合器官回到初始状态。采集时, 调节升降台使镜头和叶片间的距离保持在 22 cm, 用吸水纸吸去叶片表面水分, 依次将健康和接种叶片放在载物台上, 每次 3 个叶片同时采集[图 2(c)]。叶绿素荧光图像采集耗时 192 s, 包括暗适应(约 0~22 s)、光适应(23~92 s)和暗弛豫(93~192 s)三个连续的光合生理状态(图 4)。

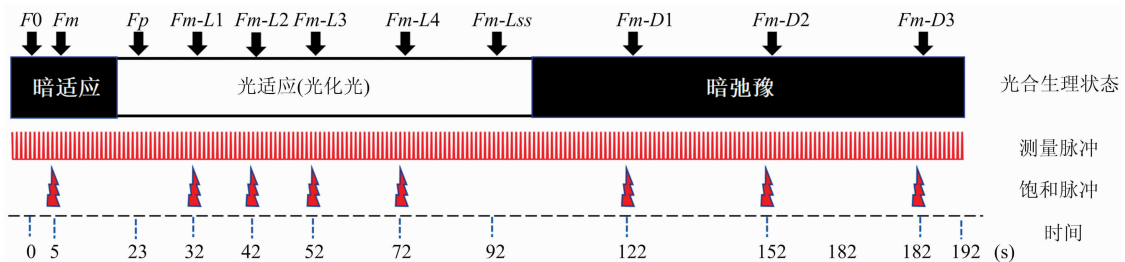


图 4 叶绿素荧光测量步骤
Fig. 4 Chlorophyll fluorescence measurement procedure

每天采集叶绿素荧光数据, 观察并用手机拍摄记录叶片发病状况, 之后将叶片放回培养皿, 喷无菌水保湿, 封口胶缠绕后继续培养, 直到 6 DPI 叶片背面出现霜霉层。

1.2.2 葡萄霜霉菌 PCR 检测

采用实时荧光定量 PCR 仪(LightCycler 96 System, Roche)测定叶片是否受到葡萄霜霉菌的侵染及侵染程度, 研究参考 Lei 等^[5]方法, 以葡萄霜霉菌的相对生物量为指标进行实验。分别在 1~6 DPI 每天对健康和接种叶片取样, 液氮速冻后存放于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱备用。根据文献^[6]设计引物如表 1 所示, 由杨凌天润奥科生物科技有限公司合成。用植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP305, 北京天根生化科技)提取样品的总 DNA 并将浓度调整至 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分别以

葡萄霜霉菌 PvActin 及葡萄 VvActin 为内参基因进行实时荧光定量 PCR, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算葡萄霜霉菌的相对生物量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

引物名称	引物基因序列
VvActin-qRT-F	AGACAGGATGAGCAAGGAAATC
VvActin-qRT-R	GCCTCCAATCCATACGCTATAC
PvActin-qRT-F	CGATCTCGTATCTGAATA
PvActin-qRT-R	CTACATCATCTCATCCAT

1.3 数据分析与建模

1.3.1 数据分析方法

实验共获取 160 个供试叶片 (健康和接种各 80 个) 连续 6 d (1DPI~6DPI) 的叶绿素荧光数据, 包括叶绿素荧光动力学曲线、98 个叶绿素荧光参数图像和参数值。98 个参数中有 19 个参数是叶绿素荧光成像系统直接采集获得的基础荧光参数, 其余 79 个参数是 2~5 个基础荧光参数通过相应公式运算得到的, 其中植物胁迫检测常用叶绿素荧光参数如表 2 所示。

表 2 植物胁迫检测常用荧光参数

Table 2 Fluorescence parameters commonly used in detection of plant stress

符号	公式	名称
F_v/F_m	$(F_m - F_0)/F_m$	最大光化学量子产量 (光合效率)
NPQ	$(F_m - F'_m)/F'_m$	非光化荧光猝灭
qN	$1 - (F'_m - F'_0)/(F_m - F_0)$	非光化荧光猝灭系数
Rfd	$(F_p - F_t - L_n)/F_t - L_n$	荧光衰减率 (植物活力指数)

注: F'_m 代表在光适应和暗弛豫状态下不同时刻测得的参数值
 Note: F'_m represents the parameter values measured at different times in the light adaptation and dark relaxation states

首先通过 PCR 检测数据和霜霉病显症后的叶片 RGB 图像, 对霜霉病的侵染程度和接种效果进行判断。之后对比健康和接种叶片叶绿素荧光动力学曲线和图像, 探明出现差异

的时间和大小。为揭示从接种到显症叶绿素荧光参数连续 6 d 的动态变化规律, 对每个叶绿素荧光参数, 分别计算健康和接种叶片在不同 DPI 的均值和方差, 并通过单因素方差分析计算健康和接种叶片在各个荧光参数下的差异显著水平, 探究各个荧光参数对霜霉病侵染的敏感性。

1.3.2 霜霉病早期检测模型的构建与验证

在数据分析的基础上建立霜霉病早期检测模型。获取的 98 个叶绿素荧光参数, 采用序列浮动前项选择 (sequential floating forward selection, SFFS) 算法^[7] 作为特征选择策略进行特征子集优选, 并以 Relief 算法为对照, 其中 SFFS 算法分为 4 个步骤 (图 5):

第 1 步: 输入全体特征数据, 并初始化变量。

第 2 步: 添加特征 h^+ 。

第 3 步: 删除特征 h^- 。

第 4 步: 输出。重复进行添加和删除特征操作, 当达到最大搜索次数 ($m=M$) 时, 输出评估函数 (Bayes) 交叉验证平均准确率最高时的最优特征子集 Z_{m^*} 。

如图 5 所示, 筛选出的最优特征子集分别输入逻辑回归 (logic regression, LR)、线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA) 和 BP 神经网络分类器进行霜霉病检测机器学习模型的训练, 10 折交叉验证的平均准确率作为特征子集和分类器选择的依据。将筛选的最优特征子集数据输入到训练后的霜霉病早期检测模型进行不同 DPI 的健康和接种叶片的识别, 对模型识别效果进行验证。

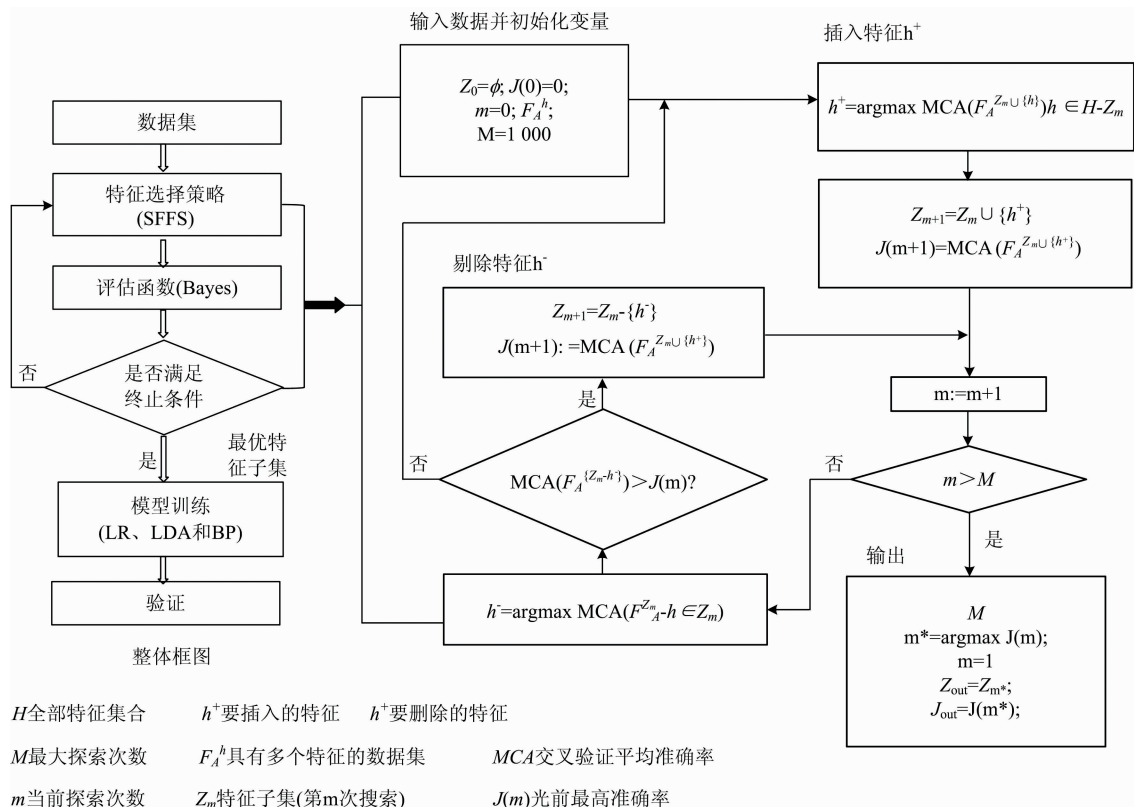


图 5 特征选择 (SFFS) 和模型构建流程图

Fig. 5 Flow chart of feature selection algorithm (SFFS) and model construction

以上数据分析、特征选取算法和模型的实现均在 MATLAB R2017b 环境下完成。

2 结果与讨论

2.1 葡萄霜霉病 PCR 检测结果分析

为了对叶片内部霜霉病感染状况进行评估,对接种后健康和接种叶片连续 6 d 的样本进行 PCR 检测。如图 6 所示,健康叶片的霜霉菌相对生物量从 1~6DPI 始终为 0,证明供试健康叶片未受到霜霉菌的感染。接种霜霉菌叶片其相对生物量 1~3DPI 缓慢增加,4~6DPI 快速升高,1DPI 为 1.00,6DPI 达到 6.70,表明在肉眼不可见的潜育期霜霉病的感染在持续加剧。霜霉菌孢子接种到叶片表面,在水的作用下通过气孔侵入,并逐渐在叶肉组织内生长,感染初期霜霉菌感染产生的核酸物质累积较少,相对生物量增长缓慢(1~3DPI),随着霜霉菌在叶片内部扩展定殖,感染程度不断加深,孢囊梗从气孔伸出,迅速繁殖,引起相对生物量急剧升高(4~6DPI)。样本方差从 1DPI 的 0.10 增加到 6DPI 的 0.87,表明不同叶片及叶片上不同位置的感染程度差异大。

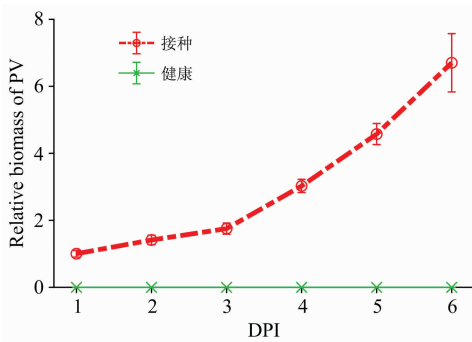


图 6 健康和接种样本连续 6 d PCR 检测结果

Fig. 6 PCR values of healthy and inoculated samples measured 6 consecutive days after inoculation

2.2 叶绿素荧光动力学曲线对霜霉病感染的响应分析

叶绿素荧光动力学曲线是在测量程序控制下叶绿素荧光强度随时间的变化,是直接测量获得的基础荧光数据,可以用来检测胁迫。典型的健康和接种叶片叶绿素荧光动力学曲线如图 7 所示,绿色线表示健康叶片,红色线表示接种叶片。1 DPI[图 7(a)]健康和接种样本曲线基本重合,从 2 DPI 开始在光适应阶段(23~92 s)接种叶片荧光强度高于健康叶片[图 7(b)],6 DPI 差异继续变大[图 7(c)]。接种叶片健康和接种叶片光适应状态下叶绿素荧光强度的显著差异表明叶片光合作用因为霜霉病的感染变化明显,接种叶片的荧光淬灭速率大于健康叶片。

2.3 叶绿素荧光图像对霜霉病感染的响应分析

对比 1DPI, 2DPI 和 6DPI(显症当天)的叶正面叶绿素荧光图像和叶片背面的 RGB 图像,为方便观察,将叶正面叶绿素荧光图像以中间主叶脉为轴进行了左右镜像,如图 8 所示。1~2DPI 叶片 RGB 图像上没有任何病症,1DPI 叶绿素荧光参数图像均匀一致,2DPI 该叶片叶绿素荧光参数图像空间

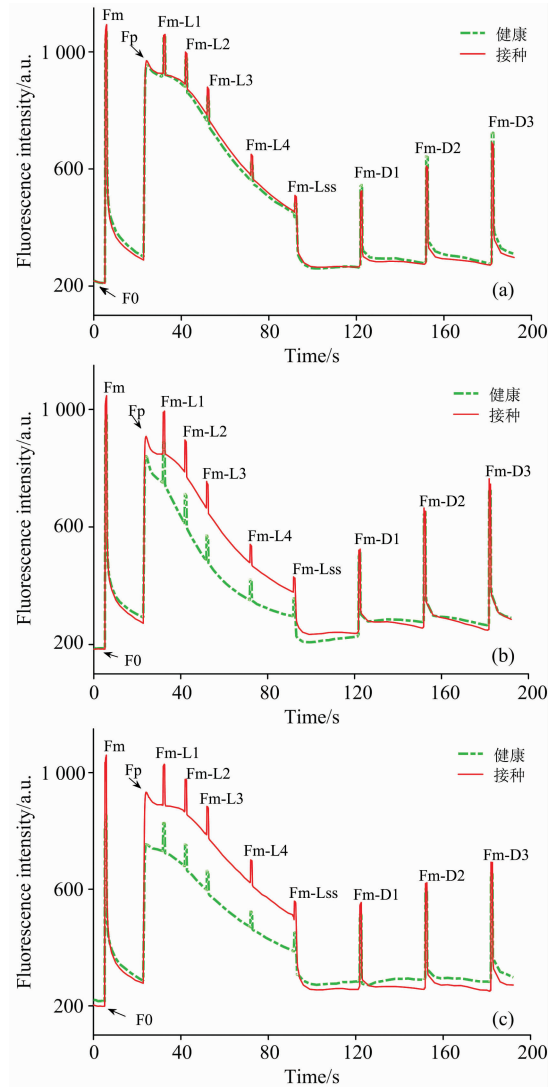


图 7 健康和接种叶片的叶绿素荧光动力学曲线
(a): 1 DPI; (b): 2 DPI; (c): 6 DPI

Fig. 7 Representative kinetic chlorophyll fluorescence curves of healthy and inoculated leaves

(a): 1 DPI; (b): 2 DPI; (c): 6 DPI

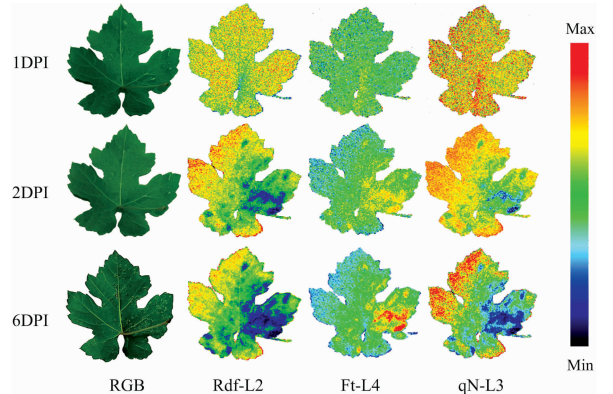


图 8 接种霜霉病叶片 RGB 图像和叶绿素荧光参数图像

Fig. 8 RGB and chlorophyll fluorescence parameter images of leaves inoculated with *Plasmopara viticola*

异质明显,橙黄色高亮区域(F_t-L4 图像)和深蓝色低暗区域($qN-L3$ 和 $Rfd-L2$ 图像)与 6DPI 的 RGB 图像中病斑(白色霜霉层)的数量、位置、大小和形状高度一致,荧光参数图像中病斑位置颜色深浅与 RGB 图像中发病部位霜霉层的密集程度与十分匹配,表明叶片叶绿素荧光参数图像时空异质是霜霉病侵染引起的, $qN-L3$ 、 $Rfd-L2$ 、 F_t-L4 对霜霉病早期侵染敏感,在接种后 2 d(显症前 4 d)能从叶片正面检测到霜霉病的侵染,比文献[8]用高光谱成像技术在显症前 1~2 d 发现光谱显著差异提前了 2~3 d。同样 NPQ 、 F_m 、 F_v/F_m 等参数图像也因霜霉病侵染体现出随时空变化的异质性。但 F_0 和 F_p 等参数图像接种前后没有显著变化,对霜霉病早期侵染不敏感。

2.4 叶绿素荧光参数对霜霉病侵染的响应分析

为了研究不同叶绿素荧光参数对霜霉病侵染的响应,在图像分析基础上,以叶片为感兴趣区域,计算各个荧光参数的均值和标准差,对比健康和接种叶片叶绿素荧光参数均值

随 DPI 的变化,并对叶绿素荧光参数逐一进行单因素方差分析。如图 9 所示,健康叶片叶绿素荧光参数随 DPI 变化较小,而接种叶片叶绿素荧光参数随 DPI 变化较大,其中 qN 、 NPQ 、 Rfd 、 F_v/F_m 等参数值随着 DPI 增加而逐渐下降,从 2DPI 开始显著低于健康叶片; F_i 和 F_m 等参数值随着 DPI 增加不断升高,从 2DPI 开始显著高于健康叶片。如图 9(a) 所示接种叶片 $qN-L3$ 在 2DPI 较健康叶片显著下降($p < 0.01$),为 (0.38 ± 0.13) ,6DPI 继续下降到 (0.31 ± 0.15) ,与健康叶片差距持续变大($p < 0.001$)。与 $qN-L3$ 变化趋势相反,接种叶片 F_t-L4 从 1DPI 的 (400 ± 67) 持续增加到 6DPI 的 (603 ± 116) ,从 2DPI 开始显著高于健康叶片($p < 0.01$) [图 9(b)]。 $Rfd-L2$ 与 $qN-L3$ 有着相同变化趋势 [图 9(c)], F_0 数值在整个实验周期波动很小,在 1DPI~5DPI 健康和接种叶片无显著差异 [图 9(d)],直到 6DPI 健康叶片 F_0 数值显著高于接种叶片 ($p < 0.05$)。

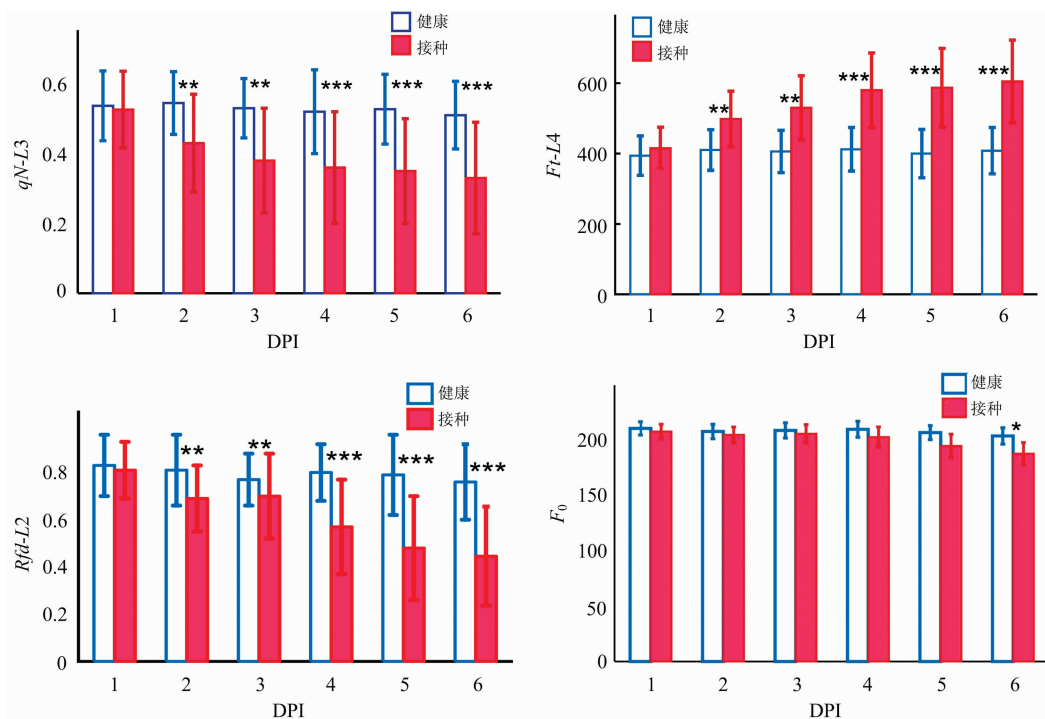


图 9 接种和健康叶片连续 6 d 的叶绿素荧光参数变化

显著性: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Fig. 9 Means and standard deviations of chlorophyll fluorescence parameters of grape leaves healthy and inoculated with downy mildew for 6 consecutive days (statistically significant differences are indicated)

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

叶绿素荧光参数的上述变化是因为霜霉菌的侵染阻碍了葡萄叶片光合器官功能的正常发挥,随着 DPI 增加,叶片光合作用减弱,光化学猝灭速率减小(Rfd 变小),光合效率不断降低(F_v/F_m 变小),叶片活力和光保护能力持续衰退(NPQ 和 qN 变小),叶片吸收的光能更多以荧光的形式释放出来(F_i 和 F_m 变大)。不同荧光参数值随时间的变化从光能的吸收、传递、耗散和分配等不同方面反映了霜霉病对光合作用的影响,表明霜霉病侵染程度随 DPI 增加在不断加深。

2.5 霜霉病早期检测模型的建立与验证

上述分析表明, F_0 和 F_p 等参数对霜霉病侵染不敏感,同时 $NPQ-L3$ 、 $Rfd-L3$ 和 $qN-L3$ ($r > 0.85$, $p < 0.01$) 等参数对霜霉病检测的贡献相似,因此,分别用 SFFS 和 Relief 算法作为特征选择策略获取最优特征子集,并输入 LR, LDA 和 BP 神经网络分类器建立霜霉病早期检测模型。数据集为 160 个葡萄叶片(80 片接种,80 片健康对照)连续 6 d 的 98 个叶绿素荧光参数值,分类器参数选择准确率最高的参数组

合,使用交叉验证的分类器平均准确率进行模型评估。其中 BP 网络为单隐层结构,采用 L-M 训练算法,传输函数输入层到隐层选用 Tansig 函数,隐层到输出层为 Sigmoid 函数。结果如表 3 所示, SFFS 最优特征子集在 3 种分类模型中的准确率均高于 Relief 特征子集, Relief 算法虽然运行效率高,搜索速度快,但算法稳定性差,容易陷入局部最优。SFFS 算法稳定性好,多次运行最优特征子集均为 $qN-L3$, $Rfd-L2$, $NPQ-L1$ 和 F_v/F_m-D1 , 此 4 个特征属于表 2 中的胁迫检测常用叶绿素荧光参数,也是叶绿素荧光参数图像分析和参数方差分析中均对霜霉菌感染敏感的参数。对比不同分类器的

表 3 基于 SFFS 和 Relief 叶绿素荧光最优特征子集的三个分类器识别结果

Table 3 Classification results of healthy and inoculated leaf by LR, SVM and RF using SFFS and Relief optimal features

特征选择策略	最优特征子集	特征数量	分类器	准确率/%
Relief	$QY-L4$, $NPQ-Lss$, $qN-L3$, $qL-D3$, $Fq-L2$, F_v/F_m-L2 , $Fq-L2$, F_r-L4 , F_0 , F_m-L3 , F_p	11	LR	75.43
			LDA	78.22
			BP	81.40
SFFS	$qN-L3$, $Rfd-L2$, $NPQ-L1$, F_v/F_m-D1	4	LR	80.95
			LDA	83.57
			BP	85.94

表 4 基于 SFFS-BP 模型不同 DPI 健康和接种叶片识别结果
Table 4 Reorganization results of healthy (CK) and diseased leaves at different DPI based on SFFS-BP

接种天数	真实样本		识别结果		识别率/%
	类别	数量	健康	接种	
1DPI	健康	80	58	22	69.38
	接种	80	27	53	
2DPI	健康	80	68	12	80.00
	接种	80	20	60	
3DPI	健康	80	70	10	83.75
	接种	80	16	64	
4DPI	健康	80	74	6	88.75
	接种	80	12	68	
5DPI	健康	80	78	2	95.00
	接种	80	6	74	
6DPI	健康	80	80	0	98.75
	接种	80	2	78	
全周期	健康	480	428	52	85.94
	接种	480	83	397	

References

- [1] Pérez-Bueno M L, Pineda M, Barón M. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10(9): 1.
- [2] Mahlein, Anne-Katrin. *Plant Disease*, 2016, 100(2): 1.
- [3] Cen Haiyan, Weng Haiyong, Yao Jieni, et al. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8(8): 1.
- [4] Tung J, Goodwin P, Hsiang T. *European Journal of Plant Pathology*, 2013, 136(2): 301.
- [5] Lei Xuejiao, Lan Xia, Ye Wenxiu, et al. *J. Plant Signal Behav.*, 2019, 14(12): 1682220.
- [6] Chen Tingting, Liu Ruiqi, Dou Mengru, et al. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 4(11): 1.

识别效果, BP 分类器在 SFFS、Relief 最优特征子集的准确率分别为 85.94% 和 81.40%, 均高于 LDA (83.57%, 78.22%) 和 LR (80.95%, 75.43%)。在特征选择策略与分类器组合中, 基于 SFFS 最优特征子集和 BP 神经网络分类器的 SFFS-BP 模型具有最高的识别准确率。

训练后的 SFFS-BP 模型对 1~6DPI 的健康和接种叶片进行识别, 结果如表 4 所示。随着接种天数增加, 分类准确率逐渐升高, 从 1DPI 的 69.38%, 增加到 3DPI 的 83.75%, 6DPI 时达到 98.75%, 全实验周期连续 6 d 的准确率为 85.94%, 成功实现了霜霉病的早期检测。本方法比文献[9]使用多光谱荧光技术从叶片背面检测葡萄霜霉病方法 1DPI、3DPI 和全实验周期的准确率分别提高了 3.78%, 3.30% 和 1.34%, 而且采用叶绿素荧光成像技术从叶片正面检测霜霉病感染比从叶片背面检测更方便实用。通过识别结果可以看出, 识别错误的样本中, 将接种叶片误识别为健康样本的数量远大于将健康样本误识别为接种样本, 这是由于在霜霉病培养过程中, 叶片侵染程度不同, 其中有的接种叶片发病轻微, 叶绿素荧光参数图像和参数值与健康叶片没有显著差异, 容易造成识别错误。

3 结论

以接种和健康对照葡萄叶片为研究对象, 以实现葡萄霜霉病早期检测为目标, PCR 检测数据作为霜霉病侵染的依据, 验证了 PAM-ChlF 成像技术进行霜霉病早期检测的可行性。从暗适应到光适应再到暗豫驰 3 个光合生理状态连续变化过程中, 得到健康和接种葡萄叶片连续 6 d 的 98 个荧光参数图像, 通过数据分析和研究发现:

(1) PCR 检测结果表明, 接叶片侵染程度在不断加深, 在 2DPI, 叶绿素荧光图像能从叶片正面检测到侵染, 病斑区域出现时空异质, 健康和接种叶片参数均值差异显著 ($p < 0.05$)。

(2) 随着接种天数增加, 霜霉病侵染导致接种叶片光化学淬灭速率减小 (Rfd 变小), 光合效率降低 (F_v/F_m 变小), 叶片活力和光保护能力衰退 (NPQ 和 qN 变小), 叶片吸收的光能更多以荧光的形式释放出来 (F_r 和 F_m 变大)。

(3) 基于特征选择算法 (SFFS 和 Relief) 和机器学习分类器 (LR, LDA 和 BP) 的叶绿素荧光参数早期检测模型成功实现了霜霉病的早期检测, 其中基于 SFFS 算法优选的特征子集 ($qN-L3$, $Rfd-L2$, $NPQ-L1$ 和 F_v/F_m-D1) 和 BP 神经网络分类器的 SFFS-BP 模型对 3DPI 健康和接种叶片识别准确率为 83.75%, 全实验周期连续 6 d 平均准确率达到 85.94%。

- [7] Ververidis Dimitrios, Constantine Kotropoulos. *Signal Processing*, 2008, 88(12): 2956.
- [8] Oerke Erich-Christian, Herzog Katja, Toepfer Reinhard, et al. *J. Exp. Bot.*, 2016, 67(18): 5529.
- [9] ZHANG Zhao, WANG Peng, YAO Zhi-feng, et al(张 昭, 王 鹏, 姚志凤, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2021, 41(3): 828.

Early Detection of Plasmopara Viticola Infection in Grapevine Leaves Using Chlorophyll Fluorescence Imaging

ZHANG Zhao^{1, 2, 3, 4}, YAO Zhi-feng^{1, 3, 4}, WANG Peng^{1, 3, 4}, SU Bao-feng^{1, 3, 4}, LIU Bin^{3, 4, 5}, SONG Huai-bo^{1, 3, 4}, HE Dong-jian^{1, 3, 4*}, XU Yan^{5, 6, 7}, HU Jing-bo²

1. College of Mechanical and Electronic Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China
2. College of Electronic and Electrical Engineering, Baoji University of Arts and Sciences, Baoji 721016, China
3. Key Laboratory of Agricultural Internet of Things, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangling 712100, China
4. Shaanxi Key Laboratory of Agricultural Information Perception and Intelligent Service, Yangling 712100, China
5. College of Information Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China
6. College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China
7. State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, Yangling 712100, China

Abstract *Plasmopara viticola* (*P. viticola*) infection poses a serious threat to grape production. Early prevention and treatment is essential to the control of *P. viticola* infection. In order to detect this disease early, the relative biomass of *P. viticola* detected by PCR as the basis of *P. viticola* infection, the chlorophyll fluorescence images of 80 grape leaves inoculated with *P. viticola* and 80 healthy control leaves were collected for 6 consecutive days from the three continuous changes of photosynthetic physiological state, namely dark adaptation, light adaptation and dark relaxation, using the relative biomass of downy fungus as the basis of *P. viticola* infection. The sensitivity of chlorophyll fluorescence parameters to downy mildew infection was evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA). The optimal feature subset of chlorophyll fluorescence parameters extracted by feature selection strategies was input to machine learning classifiers to establish the early detection model of *P. viticola* infection. The results showed that with the increase of DPI, the degree of downy mildew infection was deepened, and the chlorophyll fluorescence dynamics curves and parameters of healthy and inoculated leaves were significantly different from 2DPI ($p < 0.01$). Due to the infection, the photochemical quenching rate of inoculated leaves decreased (Rfd decreased), and the photosynthetic efficiency decreased (F_v/F_m decreased). Leaf vitality and photoprotection ability continued to decline (NPQ and qN decreased), and the light energy absorbed by leaves was more released in the form of fluorescence (F_i and F_m increased). BP neural network model using the feature subset ($qN-L3$, $RFD-L2$, $NPQ-L1$ and F_v/F_m-D1) optimized by the SFFS algorithm had the best detection accuracy, and the detection accuracy of healthy, and inoculated leaves at 3DPI was 83.75%. The average accuracy of the whole experiment period for 6 consecutive days reached 85.94%. These results provide a fast and accurate method for photosynthetic phenotype analysis and early detection of grape downy mildew.

Keywords Chlorophyll fluorescence imaging; *Plasmopara Viticola* infection; Disease detection; Feature selection

(Received Jul. 15, 2021; accepted Oct. 6, 2021)

* Corresponding author