

荧光成像技术在植物病害检测的应用研究进展*

卢劲竹 蒋焕煜 崔 笛

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310058)

摘要: 植物病害阻碍植物正常生长,对蔬菜产品品质安全造成威胁,病害检测可以有效控制植物病害发展,是提高果蔬品质安全和可持续生产能力的一个重要途径。所有的绿色植物在受到紫外光或可见光激发时,都会发出可见光波段的荧光。基于植物荧光的成像技术,是利用计算机模拟人眼的视觉功能,在不破坏植株外观且不影响其生长的情况下,获取植物的荧光图像,并通过图像处理算法,对植物的健康状况做出判断。本文对荧光成像技术及其在植物病害检测中的研究进行了综述,介绍了荧光成像的原理,分别从叶绿素荧光和其他色素荧光两方面总结了国内外研究现状。与可见光成像、高光谱成像、多光谱成像以及热成像技术相比,该技术具有可获取植物内部信息、受温湿度影响小、不局限于晴天采集、价格合理等优点。

关键词: 植物病害 荧光 成像技术 无损检测

中图分类号: S432 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2014)04-0244-09

引言

植物在生长和发育过程中,会受到各种不利因素的影响,导致植物发生病害。植物病害是指植物在生物或非生物因子影响下,发生形态、生理和生化上的病理变化,阻碍正常生长、发育进程,从而影响人类经济效益的现象^[1]。近年来,各类病害对蔬菜的危害日益加重,严重威胁我国蔬菜产业的产品质量安全^[2]。2006—2012年,仅在广东省新推广大豆品种上共发现病害12种^[3]。

由于诊断技术落后以及植保专家不足等原因,造成了病害误诊或错过最佳防治时期。同时,盲目、不适当地施用农药不仅不能有效地控制病害的发生,还会造成农业用地和附近水源污染、蔬菜农残超标等一系列环境和健康问题,极大威胁着作物产品的质量和安全问题^[4]。因此,病害检测是有效控制植物病害的关键,也是保证果蔬高产及果蔬产品安全的一项重要措施,对提高果蔬品质安全和可持续生产能力具有重大的实际意义。

近年来,成像技术在农业中得到了广泛应用。其中,荧光成像技术在植物病害检测方面显示出巨大的潜力。该技术能用计算机模拟人的视觉功能,不破坏也不影响植株生长^[5],从植物的荧光图像中

提取颜色、纹理、荧光强度等信息进行处理并加以分析,最终用于实际检测,是植物病害检测的重要手段。

1 荧光成像技术介绍

1.1 原理

荧光是一种光致发光的冷发光现象。当某种常温物质经特定波长的入射光照射,其分子吸收光能后从基态进入激发态,并且立即退激发并发出出射光^[6],原理如图1所示。通常出射光的波长比入射光的波长更长,且多处于可见光波段。

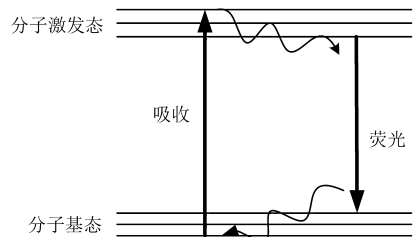


图1 荧光机理

Fig. 1 Principle of fluorescence

1.2 植物荧光

植物受激发后发出的荧光主要有:蓝绿荧光(Blue-green fluorescence, BGF)、红荧光(Red fluorescence, RF)和远红荧光(Far-red fluorescence,

收稿日期: 2013-06-14 修回日期: 2013-08-28

* 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2012AA10A504)、国家自然科学基金资助项目(51275457)、农业部引进国际先进农业科学技术资助项目(2011-G32)和浙江省教育厅科研资助项目(Y201017233)

作者简介: 卢劲竹, 博士生, 主要从事基于机器视觉的植物生长信息获取研究, E-mail: lujingzhu1103@163.com

通讯作者: 蒋焕煜, 教授, 博士生导师, 主要从事机器视觉自动导航、设施农业装备及自动化研究, E-mail: hyjiang@zju.edu.cn

FRF), 如图 2 所示^[7]。蓝绿荧光, 也称为短波荧光, 与植物细胞中的苯乙酸(主要是阿魏酸)相关^[8]; 红荧光与植物光合系统 II (Photosystem II) 中的叶绿素相关, 远红荧光与光合系统 I (Photosystem I) 和光合系统 II 中的叶绿素都相关^[9], 因此, 红荧光和远红荧光也统称为叶绿素荧光。

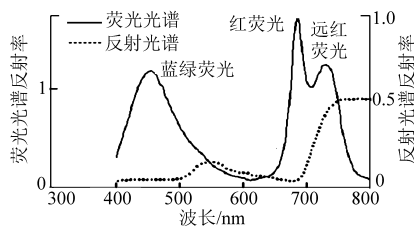


图 2 波长 355 nm 激光激发的荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence spectrum excited by 355 nm wavelength

1.3 激发光

经光照射后, 植物的不同组织会吸收不同波段的光, 因此植物能在不同波段发射出荧光, 如图 3 所示。激发光主要有以下 4 个波段: 蓝光(波长 435 ~ 480 nm), 被类胡萝卜素和叶绿素吸收, 并释放出较高量子效率, 可以激发叶片表皮及更深处组织的叶绿素荧光^[10-11]; 红光(波长 640 ~ 780 nm), 只能被叶绿素吸收, 因而相比蓝光还能被类胡萝卜素吸收, 该波段光的吸收范围较窄, 能激发远红波段的叶绿素荧光; 绿光(波长 500 ~ 560 nm), 被叶绿素吸收, 但是吸收量很小, 因而相比蓝、红光, 绿光可以到达叶片的深度最大, 能激发叶绿素荧光; 紫外光(280 ~ 315 nm)既能激发叶绿素荧光, 还能激发短波荧光。

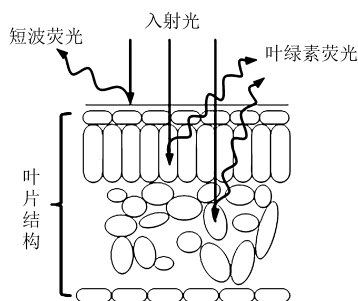


图 3 叶片截面图

Fig. 3 A scheme of a leaf cross section

1.4 荧光成像系统

荧光成像系统一般由相机、激发光源、滤光片和计算机 4 个部分组成。由于荧光比普通光微弱, 需要敏感度高的相机才能捕捉光信号, 所以彩色相机不适合, 通常选用的是波段连续且灵敏度较高的单色相机。有时也采用制冷 CCD 相机^[12]来采集十分微弱的荧光信号, 但由于该情况下相机曝光时间较长, 并且需要将样本放置于黑暗环境中^[13-14], 因此制冷 CCD 相机又多用于显微荧光成像。除以上两类相机之外, 也可以选用像增强相机。它具有高灵

敏度、高分辨率、短时积分、外部触发等特点, 可以在外界光可变的条件下捕获荧光信号^[15]。

在荧光成像系统中, 常用的激发光源有氙气灯、卤素灯、激光以及 LED 灯。氙气灯和卤素灯具有密集照明、能量高、波段连续等特点, 可以激发出相对密集的荧光信号。根据所需的荧光信号, 可在氙气灯或卤素灯前安装滤光片来获取特定波长的激发光, 如采用蓝光滤光片来获取叶绿素荧光。

激光的波段可选, 既可以激发叶片叶绿素荧光, 也可以激发其他色素的蓝绿荧光, 从叶细胞角度成像^[16]来获取植物叶片的内部信息。连续激光价格昂贵, 且提供均匀光照时会带来光束扩展的问题。因此目前常用脉冲激光代替连续激光。此外, 因其短而密集的脉冲信号触发, 还可以在户外环境激发出荧光。图 4 是一个基于激光诱导的荧光成像系统, 主要包括光源和图像采集装置两个部分。图像采集装置由相机、激光发射器、透镜、滤光片和一个样品放置台组成。为了保证样本采集条件一致, 且抑制外界光的影响, 整个装置被安装在一个光照箱中。

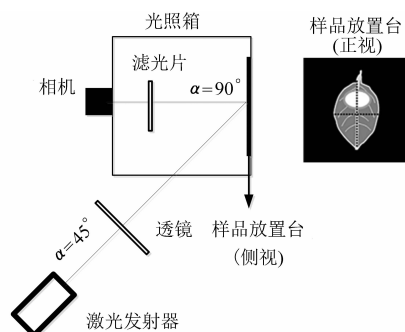


图 4 基于激光诱导的荧光成像装置

Fig. 4 A laser-induced fluorescence imaging system

近年来, LED 灯以其体积小、寿命长、光效高、光谱可控、功耗低等一系列优点, 逐步成为植物生长和植物病害检测的主要光源。图 5 是常见的基于 LED 灯的荧光成像装置, 包括单色相机、镜头、滤光片和 LED 光源。该装置可通过更换滤光片和光源实现不同波段的荧光成像。

2 国外研究现状

2.1 叶绿素荧光

植物荧光最初是指叶绿素荧光现象。1834 年, Brewster 发现了植物体内的叶绿素荧光现象: 当一束强太阳光穿过月桂叶的乙醇提取液时, 溶液的颜色变成了绿色的互补色——红色, 而且颜色随溶液的深度而变化, 这也是历史上对叶绿素荧光及其重吸收现象的首次记载。1874 年, Müller 发现叶绿素溶液稀释后的荧光强度比活体叶子的荧光强度大得

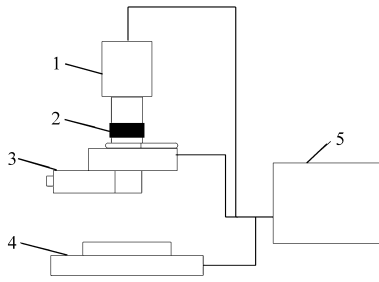


图5 基于LED光源激发的荧光成像装置

Fig. 5 A fluorescence imaging system with LED sources

1. 单色相机 2. 镜头 3. 滤光片 4. LED光源 5. 图像采集系统

多。

1931年, Kautsky 和 Hirsch 用肉眼观察并记录了叶绿素荧光诱导现象^[17], 还发现若在荧光诱导结束后撤去光源, 植物的荧光水平的恢复需要很长时间。该发现对植物光合作用和植物叶片中叶绿素荧光的研究提供了理论基础。由于 Kautsky 的杰出贡献, 叶绿素荧光诱导现象也被称为 Kautsky 效应 (Kautsky effect)。Kautsky 也因此被公认为是叶绿素荧光诱导现象的发现者。

自20世纪90年代起, Lichtenthaler 的团队在植物细胞研究中发现: 在高等植物体内叶绿素包括叶绿素 a 和叶绿素 b, 而叶绿素分子吸收的光能绝大部分进行光化学反应, 剩余部分约 15% ~ 20% 用于热耗散, 而仅 1% ~ 3% 用于发射荧光耗能^[18], 如图6所示; 在叶绿体内, 叶绿素 b 向叶绿素 a 的能量传递效率几乎达 100%; 光化学作用的发生场所是光合系统 I 和光合系统 II, 在常温下, 光合系统 I 色素系统基本不发荧光^[19], 因此叶绿素荧光主要由与光合系统 II 相关的叶绿素 a 产生。

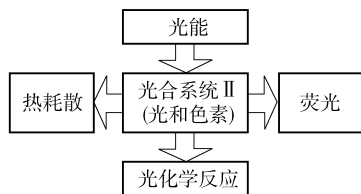


图6 光能转换过程

Fig. 6 Transformation of light energy

利用叶绿素荧光可以对植物的生长状况和各类营养元素缺乏症状进行鉴别。Subhash 等^[20]利用波长 355 nm 的氙气灯作为激发光源, 采集了烟草叶片 4 个波段 (中心波长分别为 440、520、690 和 740 nm) 的荧光, 分析了各波段的荧光比率对烟草叶片衰老情况的鉴别能力。结果发现, 随着叶片的衰老, 在各荧光比率中, 叶绿素荧光比率 (F_{690}/F_{740}) 有明显上升, 说明叶绿素荧光可以作为检测植物光合作用强弱的一项指标。Langsdorf 等^[21]采用最大波长为 340 nm 的氙气灯激发甜菜叶片, 获取相同 4 个波段

的荧光图像及荧光比率图像, 经伪彩色处理后, 通过观察图像发现, 短波荧光 (F_{440} 和 F_{520}) 在叶脉部位强度较高, 叶绿素荧光 (F_{690} 和 F_{740}) 在叶脉间隔部位强度较高, 使用 F_{440}/F_{690} 和 F_{440}/F_{740} 这两个荧光比率能区分叶片含氮量的高低。Cadet 等^[22]对向日葵正常叶片和分别缺乏氮、磷、钾的叶片进行实验后发现, 缺磷叶片的红荧光和远红荧光强度比值 (F_{RF}/F_{RRF}) 有明显下降; 缺钾叶片的蓝绿荧光强度有明显上升, 并且从蓝绿荧光图像中可知: 叶片的缺钾症状局限在叶尖和叶边缘部位。

叶绿素荧光同样适用于植物病害的检测。Moshou 等^[23]使用迭代直方图法对柑橘叶片的荧光图像进行处理后, 采用去噪、填充空洞等算法获得图像中的叶片区域, 再基于 550 nm 和 690 nm 两个波长的荧光强度构建相对强度的计算公式, 用于计算图像叶片区域的每个像素点的相对强度, 其中相对强度在 0.65 以上被定义为疑似受损区域 (Suspect lesion area, SLA), 把该区域与图像总像素的比率作为鉴别病害的标准。该研究者采用自组织特征映射网 (Self-organizing map, SOM) 算法将荧光图像和荧光光谱结合分析。结果发现, 该方法检测植物病害的误判率在 1% 以内。Benediktyová 等^[24]发现大量的紫外光子都被叶片表皮吸收, 难以到达叶细胞更深处, 激发的叶绿素荧光十分微弱。因此采用最大波长为 455 nm 的蓝色 LED 灯激发烟草健康叶片和病害叶片的叶绿素荧光, 通过叶绿素荧光的三维重建图, 将叶片结构可视化, 对不同深度的叶细胞进行伪彩色处理, 通过观察图像发现, 受病害侵染的细胞深度位于健康细胞下方约 25 μm 处。Pereira 等^[25]采用波长 473 nm 的激光激发柑橘黄龙病叶片, 提取荧光图像的 10 个颜色描述符对叶片感染黄龙病的过程进行跟踪。结果发现, 绿色描述符的范围、均值和标准差等值在染病到发病的整个阶段都有明显变化。Pereira 等认为该方法可实现植物病害的无损检测, 检测过程无需样品预处理, 具有检测早期 (染病后 1 个月) 患黄龙病柑橘叶片的潜力。Sankaran 等^[26]选取两个品种的柑橘叶片, 分别在实验室条件和自然环境进行实验, 用 4 种 LED 灯 (紫外、红、绿、蓝) 照射叶片, 每个 LED 灯能激发 3 个波段荧光 (黄、红、远红), 总共提取了病害叶片的 12 个荧光特征和 10 个荧光比率特征, 基于这 22 个特征分别用两种分类方法对病害叶片和健康叶片进行了鉴别。结果表明, 贝叶斯分类法 (Naïve-Bayes classifier) 在实验室条件下的分类准确率高于 85%, 而采用决策树分类器 (Bagged decision tree classifier) 的计算时间是前者的 10 多倍, 但是后者在实验室条件和自然

环境都具有更好的识别能力,分类准确率高于94%。此外,在22个特征中,由紫外激发的黄色荧光(YF_UV)和由绿光激发的荧光比率(SFR_G)能区分柑橘黄龙病叶片和缺氮叶片。

2.2 其他色素荧光

生物体中能发射荧光的物质除了叶绿素外,还有类胡萝卜素、花青素、黄酮醇和多酚类等。Wulf等^[27]使用波长为337 nm的激光激发,获得苹果和胡萝卜在远红外、红、绿、蓝波段的荧光光谱,分析了苹果和胡萝卜在储藏过程中新鲜度的变化。结果发现,苹果在蓝绿波段产生的荧光受叶绿素和其他多酚物质影响,在远红、红波段产生的荧光仅受叶绿素影响。而胡萝卜的蓝波段荧光受类胡萝卜素影响,并且基于偏最小二乘回归法(Partial least squares, PLS)的荧光特征与色素含量模型的相关系数达到0.99。该研究说明了基于果蔬色素含量的荧光成像技术作为一种快速无损的检测方法,可用于监测果蔬储藏过程中的品质变化。Cerovic等^[28]选用2种光学传感器Dualux和Multiple实现了葡萄的成熟程度的检测。分别用传感器中的3种LED灯(紫外、绿、红)照射葡萄粒后发现,葡萄表皮中的黄酮醇(Flavonol)和花青素(Anthocyanin)能发射出蓝绿、红和远红荧光,且其含量影响荧光强度。Kondo等^[29-30]基于荧光成像技术实现了腐烂脐橙的检测。选取两个品种的腐烂脐橙,在紫外和白色LED灯的照射后,采集其彩色图像和荧光图像。通过比较两幅图像采集的脐橙腐烂部位,排除了紫外灯造成的光晕影响,提取出真实的脐橙腐烂部位。再分别比较了荧光图像的R、G、B3个分量图中脐橙腐烂部位和正常部位的灰度。结果发现,在荧光图像的G分量图中,腐烂部分的灰度是正常部分的3~5倍,并且该差异与脐橙的品种有关。在之后的研究中,该研究团队又分别将腐烂橙皮和正常的橙皮捣碎,腐烂橘皮中提炼的荧光活性物质溶于己烷,作为腐烂组,正常橙皮作为对照组。使用核磁共振(Nuclear magnetic resonance, NMR)技术和质谱法(Mass spectrometry, MS)分析腐烂组和正常组溶液,在将两组溶液的吸收光谱、荧光光谱和激发光谱进行对比后发现,脐橙腐烂物质的激发光谱和荧光光谱分别在波长360~375 nm和波长530~550 nm范围内出现峰值,该现象与用化学方法提取的病菌物质的光谱变化相吻合。然后又用波长365 nm的UV灯照射完整的腐烂脐橙,采集其在530~550 nm波段的荧光图像,通过图像分析验证了之前的结论。Lichtenthaler等^[31]研究了苹果在储藏过程中,叶绿素和类胡萝卜素含量与蓝、绿、红和远红4个波段荧

光比率的影响关系。由苹果的荧光图像可知,随着储藏时间的增加,苹果的蓝、绿荧光强度的均值持续上升,且逐渐均匀地扩展到整个苹果表面。蓝荧光和绿荧光的变化响应相同但是前者的总量更大,其原因是苹果表皮的叶绿素大量减少,而类胡萝卜素仅部分减少;红荧光强度(F_{690})变化不规律,在储藏前3个月出现明显增长,后又下降;苹果的远红荧光强度(F_{740})由于叶绿素的大量丢失,持续下降。

基于多个颜色的荧光分析比对单一波段的荧光分析更能提升检测的稳定性。Belasque等^[32]利用波长为532 nm的激光激发患有黄龙病的柑橘叶片荧光,并采集荧光光谱。通过橙黄光(波段680~712 nm)和红光(波段712~750 nm)的荧光强度积分表达式为

$$F_{M1} = \frac{\int_{680}^{712} I(\lambda) d\lambda}{\int_{712}^{750} I(\lambda) d\lambda} \quad (1)$$

$$F_{M2} = \frac{\int_{680}^{800} I(\lambda) d\lambda}{\int_{547}^{620} I(\lambda) d\lambda} \quad (2)$$

式中 λ ——波长

$I(\lambda)$ ——波长 λ 处的荧光强度

F_{M1} ——波长680~712 nm和712~750 nm的荧光强度积分比值

F_{M2} ——波长680~800 nm和547~620 nm的荧光强度积分比值

可以计算叶片的荧光强度,从而区分受机械损伤和病害胁迫的叶片。Lins等^[33]又基于这2个波段的荧光强度表达式,在田间使用波长为532 nm,强度为10 nW的激光激发了受机械损伤和病害胁迫的柑橘叶片荧光。结果表明,该方法可以区分机械损伤和病害胁迫的叶片,并且式(2)中的 F_{M2} 可以作为衡量叶片与植株分离时间的指标,但不适用于检测新的机械损伤。该研究表明激光激发叶片荧光的方法在植物病害检测方面虽存在一定局限性,但具有在田间使用的潜力。

Wetterich等^[34]在室内用4个LED灯(中心波长分别为365、445、470和530 nm)作为激发光源,采集患黄龙病的柑橘叶片在4个波长(570、610、690和740 nm)下的荧光图像,通过图像分割、纹理特征提取,并基于支持向量机(Support vector machine, SVM)聚类等步骤,能实现巴西和美国两个地区该病害叶片和正常叶片的区分,区分准确率分别达到61%和90%。Wetterich等认为该荧光成像装置具有检测植物的营养元素缺乏症状或是其他病害的潜

力,若将该技术用于户外检测,还需做进一步的探索。

表1分别列举了国外荧光光谱和荧光成像技术在植物叶片和果实病害检测中的应用研究,总结了响应激发光源、波段和荧光发射波段。从这些研究可以发现:在叶片检测方面,同一个装置中,基于卤素灯、氙气灯和LED灯的激发波段可以有多种选

择,虽然也使用了绿光和红光,但常集中分布于紫外和蓝光范围,而同一装置中基于激光的激发波长固定,且集中分布于蓝光和绿光范围。但无论使用哪种光源,叶片的荧光发射波长均集中在红光波段,即叶绿素荧光;在果实检测方面,激发波段或激发波长集中分布在紫外范围,而荧光发射波段的分布并没有集中在某一波段范围。

表1 荧光成像技术检测的响应激发光源、波段和荧光发射波段

Tab.1 Light source, excitation bands and emission bands of detection by fluorescence imaging technology

分类	检测对象	光源	激发波段、波长/nm	发射波段、波长/nm	参考文献
叶片	烟草叶片	氙气灯	355	440、520、690、740	[17]
	甜菜叶片	氙气灯	340	440、520、690、740	[18]
	苹果叶片	卤素灯	520、550	650	[35]
	向日葵叶片	卤素灯	紫外、蓝光	610、685、735	[21]
	烟草叶片	LED	455	505 ~ 560、690	[23]
	柑橘叶片	LED	紫外、蓝光	550、690	[22]
	柑橘叶片	LED	紫外、红、绿、蓝	黄、红、远红	[25]
	烟草叶片	LED	470	650	[36]
	柑橘叶片	LED	365、445、470、530	570、610、690、740	[33]
	苹果叶片	LED	455	618	[37]
	柑橘叶片	激光	532	680 ~ 712、712 ~ 750	[31]
	柑橘叶片	激光	532	680 ~ 712、712 ~ 750	[31]
	柑橘叶片	激光	473		[24]
	小麦叶片	激光	337	370 ~ 800	[38]
	果实	苹果	闪光灯	紫外(≤340)	440、520、690、740
苹果		LED	蓝光	红、远红	[20]
葡萄		LED	紫外、红、绿	蓝绿、红、远红	[27]
脐橙		LED	紫外	绿	[28]
脐橙		LED	365	530 ~ 550	[29]
苹果	激光	337	350 ~ 820	[26]	

3 国内研究现状

在国内,荧光成像技术大多应用于对水果、谷物和肉类品质的研究。喻晓强等^[39]采用波长632 nm的激光激发两个品种的柑橘荧光,后用高光谱成像系统采集荧光散射图像,选取荧光区域作为感兴趣区域(Region of interest, ROI),并提取700 ~ 1 000 nm波段的光谱值作为荧光图像数据。实验结果表明,基于线性回归法建立的柑橘糖度预测模型,其相关系数达到0.96以上。吴彦红等^[40]用波长405 nm激光照射猕猴桃样品,用高光谱成像系统对诱导出的荧光散射成像,提取出12个感兴趣区域在波长400 ~ 1 000 nm范围的特征变量,建立了猕猴桃糖度多元线性回归模型。汪希伟等^[41]用紫外灯照射猪肉,获取其彩色图像和荧光图像,从图像中,分割出猪肉的肌肉部分和背膘、肉皮部分的荧光区域,把背膘和肉皮部分的荧光区域面积占总图像面积的百分比作为新鲜度的预测指标,分析了猪肉的包装时间

和腐败程度的关系。李江波等^[42]采用波长365 nm的紫外灯激发脐橙荧光,在450 ~ 700 nm波段范围内,采用最佳指数(Optimum index factor, OIF)理论法,选取两个最优波段组合(489.6和591.4 nm)。研究表明,基于最优波长比的图像和双阈值分割法可以区分脐橙的梗伤和腐烂两种损伤,其识别正确率达到100%,该方法避免了梗伤缺陷的荧光效应带来的检测影响,降低了算法和系统成本。

在病害检测方面,国内学者大多基于叶片的荧光光谱和叶绿素荧光参数展开研究。杨昊谕等^[43]用中心波长为473 nm和660 nm的激光,分别在4种激光强度下激发黄瓜活体叶片荧光。通过对比实验,确定最佳激发光源为强度7.5 W、波长473 nm,并在此激发条件下,建立叶片荧光参数 F_{732}/F_{685} 与叶片叶绿素含量的线性回归模型。杨昊谕等^[44]又获取黄瓜叶片在504.080 ~ 899.872 nm波段范围内的荧光光谱,结合主成分分析(Principal component analysis, PCA)数据降维方法,对光谱数据进行特征

信息提取,再基于支持向量机建立检测分析模型。结果表明,该方法对黄瓜霜霉病和蚜虫病的鉴别准确率能达到98.3%。陈兵等^[45]研究了黄萎病对棉花叶片的叶绿素荧光特性的影响,通过对荧光参数的分析可以发现,随着病害程度增加,棉花叶片的叶绿素a、叶绿素b和叶绿素总含量均减少,而类胡萝卜素含量先降后增。结果表明,病害程度与叶绿素荧光参数的相关性较好。隋媛媛等^[46]采集健康、染病3d和6d的黄瓜霜霉病叶片的荧光光谱,用一阶导数、主成分分析处理光谱数据后,基于最小二乘支持向量机(Partial least squares support vector machine, PLS-SVM)对前10个主成分进行分类和预测,结果表明,使用径向基核函数的支持向量机方法对黄瓜霜霉病害的分类预测能力达到了97.73%。

此外,隋媛媛等^[47]还采用波长为473 nm的激光激发杨树活体叶片,分别采集510~514、640~715、715~840 nm 3个波段的荧光强度峰值 F_{512} 、 F_{685} 、 F_{734} ,建立叶片水分利用效率与荧光光谱的多元线性回归模型,该模型的复相关系数达到0.975。张石锐等^[48]以水稻叶片为研究对象,采集了水稻叶片在波长450 nm的LED灯照射条件下的叶绿素荧光光谱,同时测量了水稻生长区土壤的湿度,建立了

基于Lorentzian方程的土壤含水量和叶绿素荧光强度的回归模型,结果表明,该模型的决定系数达到0.99,该方法可以用于土壤水分的检测。

还有学者基于叶绿素荧光诱导动力学研究植物的叶绿素荧光特性。王春萍等^[49]研究了不同稻龄的水稻叶片在低温胁迫下的叶绿素荧光,发现受低温胁迫的叶片,其自身生理差异是导致水稻幼苗不同叶龄叶片受伤害程度不同的主要因素。朱琳等^[50]比较了3种草原植物在12 h,叶绿素荧光特性的连续变化情况。结果发现,夜晚的长时间暗适应导致植物的最大荧光产量在清晨出现峰值,光捕获和传递效率越高的植物对高光越敏感,受到光抑制的损伤越小。表2列举了国内荧光光谱和荧光成像技术在果实品质检测和植物叶片健康检测中的应用研究,总结和归纳了相关算法和分析方法,从这些研究可以发现:成像方式的检测对象主要是植物果实,而非成像方式的检测对象主要是植物叶片;品质检测的指标主要有糖度、叶绿素含量和水分含量,病害检测主要集中于霜霉病、黄萎病等常见病害;而无论是成像还是非成像方式,其分析方法都主要有主成分分析、支持向量机以及线性回归法等。

表2 荧光光谱和荧光成像技术检测的相关算法和分析方法

Tab. 2 Correlation algorithms and methodologies of fluorescence spectrum and fluorescence imaging

方式	检测对象	检测目标	分析方法	参考文献
成像	柑橘	糖度	线性回归	[39]
	猕猴桃	糖度	多元线性回归	[40]
	猪肉	新鲜度	图像掩码	[41]
	脐橙	腐烂度	最佳指数、波段比	[42]
非成像	黄瓜叶片	叶绿素含量	线性回归	[43]
	黄瓜叶片	霜霉病、蚜虫病	主成分分析、支持向量机	[44]
	棉花叶片	黄萎病	叶绿素荧光动力学	[45]
	黄瓜叶片	霜霉病	主成分分析、最小二乘支持向量机	[46]
	黄瓜叶片	水分利用效率	多元线性回归	[47]
	水稻叶片	水分	Lorentzian 方程	[48]

4 结束语

目前基于成像技术的植物病害的无损检测方法还有:可见光成像、高光谱成像、多光谱成像和热红外成像。与上述方法相比,荧光成像技术具有以下优势:①可见光成像常用于获取植物的外观信息,而荧光成像技术还能检测植物的内部健康状况,能检测出肉眼不可见的植物病害和植物的营养元素缺乏症状。②高光谱成像设备数据量大,价格昂贵,而荧光成像技术数据量小,只需用单色相机和滤光片的组合,获取2~3个光谱波段图像即可实现检测,价

格合理,具有在线检测的潜力。③多光谱图像的采集受太阳角影响,一般在晴天正午时分采集,否则需要光照补偿器进行算法校正,而荧光成像技术不局限于此,还可在阴天条件下检测。④热红外成像技术与温湿度等环境因素有关,当病害部位和健康部位的温度差较小时,需要采取变温实验增大温度差才能实现检测,而荧光成像技术不需要样品前处理更适用于田间检测。⑤荧光成像技术具有可获取植物内部信息、受温湿度影响小、图像采集不受光照限制、价格合理等特点,是一种植物病害的有效检测手段,具有广阔的应用前景。国外基于荧光成像技术

检测植物病害的研究起步早,而我国在该方向的研究尚处于发展阶段。但荧光成像也有其局限性,它仅适用于检测会导致植物的叶绿素或相关色素减少的病害,因而该技术主要应用于检测柑橘叶片黄龙病、烟草叶片花叶病、黄瓜叶片霜霉病等病害。基于该技术的植物病害静态检测的研究目前已经比较成熟,在现有研究的基础上,更加深入的研究可以从以

下两个方面开展:从病害部位的荧光强度、面积、颜色、纹理等特征入手,建立病害等级,研究病害等级与施药量的关系,为后期施药的研究提供依据;将荧光成像技术应用到实际生产中,与植保机械系统结合,开发出可靠、高效、精准的植物病害自动检测与农药喷洒系统。

参 考 文 献

- 1 谢联辉. 植物病害[M]. 北京:科学出版社,2009.
- 2 张友军,朱国仁,褚栋,等. 我国蔬菜作物重大入侵害虫发生、危害与控制[J]. 植物保护,2011,37(4):1-6,22.
Zhang Youjun, Zhu Guoren, Chu Dong, et al. Occurrence, damage and control of important invasive insect pests on the vegetable crops in China[J]. Plant Protection, 2011, 37(4): 1-6, 22. (in Chinese)
- 3 高翔,陈晓兰,潘汝谦,等. 广东省新推广大豆品种病害的初步调查[J]. 植物保护,2012,38(2):147-151,174.
Gao Xiang, Chen Xiaolan, Pan Ruqian, et al. Preliminary investigation of disease on new extensive soybean varieties in Guangdong Province[J]. Plant Protection, 2012, 38(2): 147-151, 174. (in Chinese)
- 4 柴阿丽. 基于计算机视觉和光谱分析技术的蔬菜叶部病害诊断研究[D]. 北京:中国农业科学院,2011.
- 5 Krause G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1991, 42: 313-349.
- 6 Rehm D, Weller A. Fluorescence quenching by electron transfer[J]. Israel Journal of Chemistry, 1970, 8(2):259-271.
- 7 张永江,刘良云,侯名语,等. 植物叶绿素荧光遥感研究进展[J]. 遥感学报,2009,13(5):971-978.
Zhang Yongjiang, Liu Liangyun, Hou Mingyu, et al. Progress in remote sensing of vegetation chlorophyll fluorescence[J]. Journal of Remote Sensing, 2009, 13(5): 971-978. (in Chinese)
- 8 杨昊瑜. 基于叶绿素荧光光谱分析的植物生理信息检测技术研究[D]. 长春:吉林大学,2010.
- 9 Buschmann C, Langsdorf G, Lichtenthaler H K. Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: an overview[J]. Photosynthetica, 2000, 38(4):483-491.
- 10 Valeke R. Chlorophyll fluorescence imaging for predicting shelf-life and quality of fruits[J]. Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology, 2006, 143(4):141-153.
- 11 Marcellis L F M, Dieleman J A, Boulard T, et al. Closys: closed system for water and nutrient management in horticulture[J]. Acta Horticulturae, 2006, 718: 375-382.
- 12 Glenn D M. Infrared and chlorophyll fluorescence imaging methods for stress evaluation[J]. Hortscience, 2012, 47(6): 697-698.
- 13 Oxborough K. Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(400): 1195-1205.
- 14 Omasa K, Takayama K. Simultaneous measurement of stomatal conductance, non-photochemical quenching, and photochemical yield of photosystem ii in intact leaves by thermal and chlorophyll fluorescence imaging[J]. Plant and Cell Physiology, 2003, 44(12):1290-1300.
- 15 Kim M S, Lefcourt A M, Chen Y R. Multispectral laser-induced fluorescence imaging system for large biological samples[J]. Applied Optics, 2003, 42(19): 3927-3934.
- 16 Hideg É, Juhász M, Bornman J F, et al. The distribution and possible origin of blue-green fluorescence in control and stressed barley leaves[J]. Photochemical and Photobiological Sciences, 2002, 1(12): 934-941.
- 17 Schmuck G, Moya I, Pedrini A, et al. Chlorophyll fluorescence lifetime determination of waterstressed C3- and C4-plants[J]. Radiation and Environmental Biophysics, 1992, 31(2):141-151.
- 18 Lichtenthaler H K, Stober F, Lang M. The nature of the different laser-induced fluorescence signatures of plants[J]. Advances in Remote Sensing, 1992, 1(2): 20-32.
- 19 Chow W S, Fan D Y, Oguchi R, et al. Quantifying and monitoring functional photosystem II and the stoichiometry of the two photosystems in leaf segments: approaches and approximations[J]. Photosynthesis Research, 2012, 113(1-3): 63-74.
- 20 Subhash N, Wenzel O, Lichtenthaler H K. Changes in blue-green and chlorophyll fluorescence emission and fluorescence ratios during senescence of tobacco plants[J]. Remote Sensing of Environment, 1999, 69(3): 215-223.
- 21 Langsdorf G, Buschmann C, Sowinska M, et al. Multicolour fluorescence imaging of sugar beet leaves with different nitrogen status by flash lamp UV-excitation[J]. Photosynthetica, 2000, 38(4): 539-551.
- 22 Cadet É, Samson G. Detection and discrimination of nutrient deficiencies in sunflower by blue-green and chlorophyll-a fluorescence imaging[J]. Journal of Plant Nutrition, 2011, 34(14): 2114-2126.
- 23 Moshou D, Bravo C, Oberti R, et al. Plant disease detection based on data fusion of hyper-spectral and multi-spectral fluorescence imaging using Kohonen maps[J]. Real-time Imaging, 2005, 11(2): 75-83.

- 24 Benediktyová Z, Nedbal L. Imaging of multi-color fluorescence emission from leaf tissues[J]. *Photosynthesis Research*, 2009, 102(2):169 – 175.
- 25 Pereira F, Milori D, Pereira E R, et al. Laser-induced fluorescence imaging method to monitor citrus greening disease[J]. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2011, 79(1):90 – 93.
- 26 Sankaran S, Ehsani R. Detection of huanglongbing disease in citrus using fluorescence spectroscopy[J]. *Transactions of the ASABE*, 2012, 55(1):313 – 320.
- 27 Wulf J S, Geyer M, Nicolaï B, et al. Non-destructive assessment of pigments in apple fruit and carrot by laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS) measured at different time-gate positions[J]. *Acta Horticulturae*, 2005, 682:1387 – 1394.
- 28 Cerovic Z G, Moise N, Agati G, et al. New portable optical sensors for the assessment of winegrape phenolic maturity based on berry fluorescence[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*: *Nutrients, Bioactive Non-Nutrients and More*, 2008, 21(8):650 – 654.
- 29 Kondo N, Kuramoto M, Shimizu H, et al. Identification of fluorescent substance in mandarin orange skin for machine vision system to detect rotten citrus fruits[J]. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 2009, 2(2):54 – 59.
- 30 Kurita M, Kondo N, Shimizu H, et al. A double image acquisition system with visible and UV LEDs for citrus fruit[J]. *Journal of Robotics and Mechatronics*, 2009, 21(4):533 – 540.
- 31 Lichtenthaler H K, Langsdorf G, Buschmann C. Multicolor fluorescence images and fluorescence ratio images of green apples at harvest and during storage[J]. *Israel Journal of Plant Sciences*, 2012, 60(1 – 2):97 – 106.
- 32 Belasque J, Gasparoto M, Marcassa L G. Detection of mechanical and disease stresses in citrus plants by fluorescence spectroscopy[J]. *Applied Optics*, 2008, 47(11):1922 – 1926.
- 33 Lins E C, Belasque J J, Marcassa L G. Detection of citrus canker in citrus plants using laser induced fluorescence spectroscopy [J]. *Precision Agriculture*, 2009, 10(4):319 – 330.
- 34 Wetterich C B, Kumar R, Sankaran S, et al. A comparative study on application of computer vision and fluorescence imaging spectroscopy for detection of huanglongbing citrus disease in the USA and Brazil [J]. *Journal of Spectroscopy*, 2013, DOI: 10.1155/2013/841738.
- 35 Delalieux S, Auwerkerken A, Verstraeten W W, et al. Hyperspectral reflectance and fluorescence imaging to detect scab induced stress in apple leaves[J]. *Remote Sensing*, 2009, 1(4):858 – 874.
- 36 Iqbal M J, Goodwin P H, Leonardos E D, et al. Spatial and temporal changes in chlorophyll fluorescence images of nicotiana benthamiana leaves following inoculation with pseudomonas syringae pv. Tabaci[J]. *Plant Pathology*, 2012, 61(6):1052 – 1062.
- 37 Belin E, Rousseau D, Boureau T, et al. Thermography versus chlorophyll fluorescence imaging for detection and quantification of apple scab[J]. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2013, 90:159 – 163.
- 38 Römer C, Bürling K, Hunsche M, et al. Robust fitting of fluorescence spectra for pre-symptomatic wheat leaf rust detection with support vector machines[J]. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2011, 79:180 – 188.
- 39 喻晓强, 刘木华, 郭恩有, 等. 基于荧光高光谱图像的柑桔糖度无损检测[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(36):11807 – 11808.
Yu Xiaoqiang, Liu Muhua, Guo Enyou, et al. Hyperspectral laser induced fluorescence imaging for nondestructive assessing soluble solids content of orange[J]. *Journal of Anhui Agriculture Sciences*, 2007, 35(36):11807 – 11808. (in Chinese)
- 40 吴彦红, 严霖元, 吴瑞梅, 等. 利用荧光高光谱图像技术无损检测猕猴桃糖度[J]. *江西农业大学学报*, 2010, 32(6):1297 – 1300.
Wu Yanhong, Yan Linyuan, Wu Ruimei, et al. Nondestructive determination of sugar content in kiwifruit using hyperspectral fluorescence imaging technology[J]. *Journal of Jiangxi Agricultural University*, 2010, 32(6):1297 – 1300. (in Chinese)
- 41 汪希伟, 赵茂程, 居荣华, 等. 基于紫外荧光成像对包装鲜猪肉存储时间预测研究[J]. *包装与食品机械*, 2011, 29(6):5 – 8.
Wang Xiwei, Zhao Maocheng, Ju Ronghua, et al. Prediction of storage time of packaged fresh pork by UV fluorescence imagery [J]. *Packaging and Food Machinery*, 2011, 29(6):5 – 8. (in Chinese)
- 42 李江波, 王福杰, 应义斌, 等. 高光谱荧光成像技术在识别早期腐烂脐橙中的应用研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2012, 32(1):142 – 146.
Li Jiangbo, Wang Fujie, Ying Yibin, et al. Application of hyperspectral fluorescence image technology in detection of early rotten oranges[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2012, 32(1):142 – 146. (in Chinese)
- 43 杨昊谕, 于海业, 张蕾, 等. 基于激光诱导荧光光谱分析的黄瓜叶片叶绿素含量检测[J]. *农业机械学报*, 2009, 40(10):169 – 172.
Yang Haoyu, Yu Haiye, Zhang Lei, et al. Detecting of chlorophyll content of cucumber leaves based on laser-induced fluorescence spectrum analysis technique [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2009, 40(10):169 – 172. (in Chinese)
- 44 杨昊谕, 于海业, 刘煦, 等. 叶绿素荧光 PCA-SVM 分析的黄瓜病虫害诊断研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(11):3018 – 3021.
Yang Haoyu, Yu Haiye, Liu Xu, et al. Diagnosis of cucumber diseases and insect pests by fluorescence spectroscopy technology based on PCA-SVM [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2010, 30(11):3018 – 3021. (in Chinese)
- 45 陈兵, 王克如, 李少昆, 等. 病害胁迫对棉叶光谱反射率和叶绿素荧光特性的影响[J]. *农业工程学报*, 2011, 27(9):86 – 93.
Chen Bing, Wang Keru, Li Shaokun, et al. The effects of disease stress on spectra reflectance and chlorophyll fluorescence characteristics of cotton leaves[J]. *Transactions of the CSAE*, 2011, 27(9):86 – 93. (in Chinese)

- 46 隋媛媛,于海业,张蕾,等. 基于叶绿素荧光光谱分析的黄瓜霜霉病害预测模型[J]. 光谱学与光谱分析,2011,31(11): 2987-2990.
Sui Yuanyuan, Yu Haiye, Zhang Lei, et al. Cucumber downy mildew prediction model based on analysis of chlorophyll fluorescence spectrum[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis,2011,31(11):2987-2990. (in Chinese)
- 47 隋媛媛,于海业,杨昊谕,等. 基于激光激发叶绿素荧光分析的叶片水分利用效率模型[J]. 农业机械学报,2011,42(3): 188-191.
Sui Yuanyuan, Yu Haiye, Yang Haoyu, et al. Model of water use efficiency of leaves based on laser induced chlorophyll fluorescence analysis technique[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2011,42(3):188-191. (in Chinese)
- 48 张石锐,董大明,郑文刚,等. 农田土壤水分含量的激光诱导荧光光谱表征[J]. 光谱学与光谱分析,2012,32(10):2623-2627.
Zhang Shirui, Dong Daming, Zheng Wen'gang, et al. Laser-induced fluorescence spectroscopy characterization of farmland soil moisture content[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2012,32(10):2623-2627. (in Chinese)
- 49 王春萍,雷开荣,李正国,等. 低温胁迫对水稻幼苗不同叶龄叶片叶绿素荧光特性的影响[J]. 植物资源与环境学报,2012, 21(3):38-43.
Wang Chunping, Lei Kairong, Li Zhengguo, et al. Effects of chilling stress on chlorophyll fluorescence characteristic of seeding leaves with different leaf ages of *Oryza sativa* [J]. Journal of Plant Resources and Environment,2012,21(3): 38-43. (in Chinese)
- 50 朱琳,潘国富,杜广明,等. 呼伦贝尔草原三种优势植物叶绿素荧光特性的比较[J]. 中国草地学报,2012,34(4):82-86.
Zhu Lin, Pan Guofu, Du Guangming, et al. Comparison of chlorophyll fluorescence characters of three dominant plants in hulunbeier typical steppe[J]. Chinese Journal of Grassland,2012,34(4):82-86. (in Chinese)

Progress of Fluorescence Imaging Technology in Detection of Plant Diseases

Lu Jinzhu Jiang Huanyu Cui Di

(College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Light incident upon a leaf surface will be partially reflected, partially absorbed and partially transmitted. Green plant tissues show an auto-fluorescence in the visible spectral range that is excited by UV or visible light. Key pigments in plants, including chlorophyll, carotenoid and other compounds, such as flavonol and anthocyanin, generally have the property of emitting fluorescence after excitation. Fluorescence imaging is a kind of advance techniques based on computer vision. The health information of plant can be acquired by analyzing its fluorescence image without influencing its growth condition. This paper reviewed the researches of applying fluorescence imaging technology to detect plant diseases and compared this technology with RGB imaging, hyperspectral imaging, multispectral imaging and thermal infrared imaging techniques.

Key words: Plant disease Fluorescence Imaging Non-destructive detection