doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2026.03.032

基于 YOLO v5n 与动态步长搜索的孢子显微成像自动对焦系统设计与试验

雷　雨[1,2]　吴碧丽[1]　田洪凯[1]　李春春[1,2]　黄林生[1,2]　乔红波[3]　赵晋陵[1,2]

(1.安徽大学互联网学院, 合肥 230039;
2.安徽大学农业生态大数据分析与应用技术国家地方联合工程研究中心, 合肥 230601;
3.河南农业大学信息与管理科学学院, 郑州 450002)

摘要: 采用孢子智能捕捉仪一体化监测气传致病孢子已成为当前作物气传病害早期在线预警的重要手段。针对复杂工况下孢子捕捉仪采用固定焦距显微成像时易出现图像离焦模糊、孢子检测精度不高等问题,本研究以小麦条锈菌夏孢子为研究对象,设计了一种融合 YOLO v5n 目标检测与基于孢子形态尺寸的动态步长搜索策略的孢子显微成像自动对焦系统,旨在实现复杂背景下夏孢子显微成像所在焦平面的自适应追踪与计数。首先,基于树莓派微控制器和 CMOS 图像传感器搭建低成本的便携式显微图像采集装置,通过步进电机驱动镜筒垂直上下位移(1/8 步细分模式,步长 0.625 μm),以完成多焦距的夏孢子显微图像序列采集;其次,创新性地将 YOLO v5n 模型与传统平方修正拉普拉斯算子(Squared modified laplacian, SML)梯度评价函数结合,提出改进的夏孢子对焦评价函数,解决背景杂质干扰导致的焦平面误判问题;最后,采用基于孢子形态尺寸的动态步长搜索策略(粗搜索 10 μm/步,精搜索 2.5 μm/步)优化显微成像的自动对焦效率。试验结果表明,改进夏孢子对焦评价函数的孢子计数精度为 97.44%,比采用传统基于梯度的对焦评价函数的计数精度提高了 56.54 个百分点;显微成像对焦系统的自动对焦成功率为 98%,平均自动对焦时间为 116.49 s。本研究提出的高对焦率、强鲁棒性自动对焦算法,配合低成本、快速响应的便携式显微图像采集装置,有效推动了智能孢子捕捉仪的自动化升级,为作物气传病害跨区域防控体系建设提供了关键技术支撑。

关键词: 孢子; 显微成像; 自动对焦; 树莓派; 对焦评价函数; YOLO v5n

中图分类号: S435.121.4+2; TP391.4　**文献标识码**: A　**文章编号**: 1000-1298(2026)03-0332-10　**OSID**:

Design and Experiment of Auto-focus System for Spore Microscopic Imaging Based on YOLO v5n and Dynamic Step Search

LEI Yu[1,2]　WU Bili[1]　TIAN Hongkai[1]　LI Chunchun[1,2]　HUANG Linsheng[1,2]　QIAO Hongbo[3]　ZHAO Jinling[1,2]

(1. *School of Internet*, *Anhui University*, *Hefei* 230039, *China*
2. *National Engineering Research Center for Agro-ecological Big Data Analysis and Application*, *Anhui University*, *Hefei* 230601, *China*
3. *College of Information and Management Science*, *Henan Agricultural University*, *Zhengzhou* 450002, *China*)

Abstract: The integrated monitoring of airborne pathogenic spores using intelligent spore trapping devices has become a crucial approach for early online warning of crop airborne diseases. To address issues such as image defocus blur and low spore detection accuracy caused by fixed-focus microscopic imaging under complex working conditions, focusing on urediospores of wheat stripe rust, an automatic focusing system for spore microscopic imaging was designed. This system integrated YOLO v5n object detection with a spore morphology-adaptive dynamic step search strategy to achieve adaptive tracking and counting of urediospores in complex backgrounds. Firstly, a low-cost portable microscopic image acquisition device was constructed by using a Raspberry Pi microcontroller and CMOS image sensor. A stepper motor drived

收稿日期: 2025-08-01　修回日期: 2025-08-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(32301701)、安徽省高等学校科学研究项目(2022AH050085)、合肥市自然科学基金项目(202309)、河南省重点研发专项项目(241111110800)、安徽省自然科学基金项目(2508085MD080、2108085QA35)和安徽省高校科研计划项目(2024AH052212)

作者简介: 雷雨(1990—),男,讲师,博士,主要从事气传真菌孢子智能检测与应用研究,E-mail: leiyu@ahu.edu.cn

通信作者: 赵晋陵(1981—),男,教授,博士,主要从事农业病虫害及遥感解析研究,E-mail: zhaojl@ahu.edu.cn

the lens barrel vertically (1/8 microstepping mode, step size 0.625 μm) to capture multi-focal urediniospore image sequences. Secondly, an improved spore focusing evaluation function was innovatively proposed by combining the YOLO v5n model with the traditional squared modified Laplacian (SML) gradient evaluation function, effectively solving the misjudgment of focal planes caused by background impurities. Finally, a spore morphology-adaptive dynamic step search strategy (coarse search: 10 micrometers per step; fine search: 2.5 micrometers per step) was implemented to optimize focusing efficiency. Experimental results demonstrated that the proposed evaluation function achieved 97.44% spore counting accuracy, representing a 56.54 percentage-point improvement over that of traditional gradient-based methods. The automatic focusing success rate reached 98% with an average focusing time of 116.49 s. The developed auto-focusing algorithm (high accuracy/robustness) combined with the low-cost, fast-response portable imaging device significantly advanced intelligent spore trap automation, offering key technological solutions for cross-regional management of airborne crop pathogens.

Key words: spore; microscopic imaging; auto-focus; Raspberry Pi; focus evaluation function; YOLO v5n

0　引言

小麦是全球重要的粮食作物之一,其安全生产直接关系到国家粮食安全[1]。由条形柄锈菌引发的条锈病是我国小麦主产区危害最为严重的气传性真菌病害,其病原菌夏孢子作为主要传播媒介,可随气流远距离扩散,形成跨区域循环侵染[2]。近年来,孢子捕捉仪作为监测孢子动态的重要工具,已成为实现气传病害早期预警的关键装备,对精准把握“见锈打药”防治窗口、减少农药使用具有重要意义[3]。然而,目前大多数孢子智能捕捉设备采用固定焦距成像策略,在田间环境中易因载玻片安装偏差、风力干扰、成像焦平面不一致等复杂工况因素导致图像离焦模糊[4]。当离焦程度超出系统景深范围时,孢子边缘形态特征显著退化,严重影响孢子的识别准确率,难以满足在线高精度监测需求[5]。因此,研究复杂环境下孢子显微成像的自动对焦方法,对于提升智能捕捉系统的成像质量和识别精度,实现作物气传病害的高效预警具有重要意义。

近年来,国内外学者在气传孢子检测领域取得了较大进展。早期研究多采用基于人工特征提取的传统图像处理方法[6-9],实现孢子的检测与计数。随着人工智能技术的发展,深度学习方法被逐步应用到条锈菌夏孢子、赤霉病禾谷镰刀菌孢子、稻瘟病菌孢子、黄瓜霜霉病菌和灰霉病菌孢子等的自动检测任务中[10-16],提升了气传孢子的识别精度。但现有研究多基于实验室采集的高质量显微图像,普遍对孢子离焦模糊图像进行了剔除,鲜有针对离焦模糊问题进行孢子显微成像的自动对焦方法研究。在医学领域,基于显微成像的自动对焦技术已积累了较为丰富的研究基础[17-18],这些进展共同推动了医学显微检测从人工操作向智能自动化转型,也为作物气传致病孢子显微图像的自动对焦机制提供了重要技术借鉴。

基于梯度的对焦评价函数因其对图像边缘信息变化敏感,在图像处理自动对焦领域展现出显著优势。其原理是利用像素灰度的局部变化特性进行聚焦判断,在焦点清晰区域,相邻像素间灰度差异显著,导致图像梯度剧烈变化,从而可以有效评估图像清晰度。相比之下,失焦图像中灰度分布更平滑,梯度变化较弱[19-21]。针对显微成像自动对焦存在的精度低、抗噪性差、背景干扰大等问题,国内外学者分别采用梯度类评价函数、曲线拟合与概率模型融合、改进 SMD 函数结合 RBF 神经网络、全局-局部梯度结合、变频梯度绝对值函数加权融合、边缘区域梯度计算优化搜索路径等方法,实现了不同场景下显微图像的精准对焦[22-27]。然而,针对孢子显微图像的自动对焦存在显著差异,由于孢子体积小,在图像中像素占比通常不足 15%;智能孢子捕捉仪易吸附田间的花粉、灰尘等微颗粒杂质形成图像中的复杂背景干扰,传统对焦评价函数(如 SMD、Roberts 等)在图像低孢子密度区域易受复杂背景主导产生伪峰值,导致焦平面误判。因此,亟需开发面向作物气传病害孢子显微成像的专用自动对焦算法,解决复杂背景下的精准对焦难题。

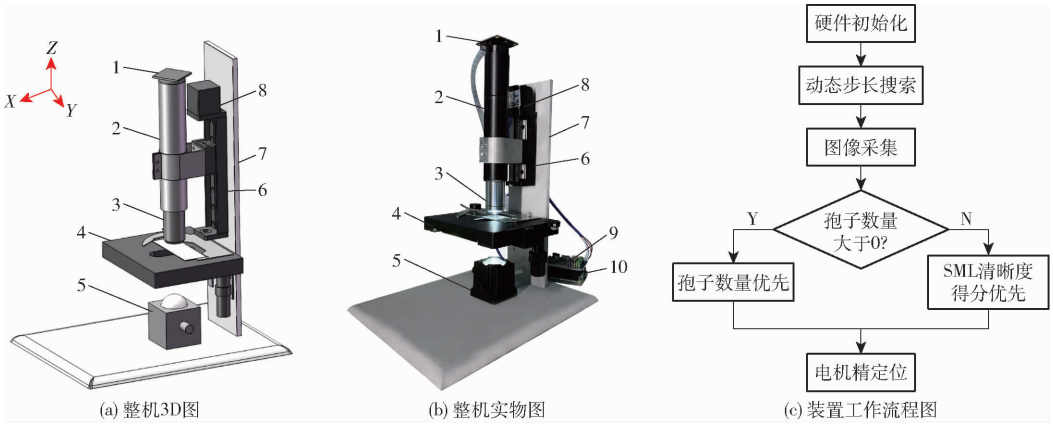
针对上述问题,本文以小麦条锈菌夏孢子为研究对象,基于树莓派搭建低成本便携显微图像采集装置,实现多焦距的孢子显微图像序列采集;提出融合 YOLO v5n 目标检测与 SML 梯度的对焦评价函数,构建优先级对焦决策机制(孢子数量优于清晰度);设计基于孢子形态尺寸的动态步长搜索策略(粗搜索 10 μm/步,精搜索 2.5 μm/步),匹配显微景深约束,实现复杂背景下的动态对焦。在硬件层面实现低成本显微成像模组的精准运动控制,在算

法层面创新性地融合目标检测与清晰度评价的双重判据。以期为智能孢子捕捉仪的自动化升级及小麦条锈病早期预警提供可靠的显微成像解决方案,为作物气传病害跨区域防控提供技术支撑。

1 采集装置结构与工作原理

1.1 便携式夏孢子显微图像采集装置

本文在前期设计的孢子远程监测系统机械结构[4]研究基础上,为了局部优化其固定焦距成像的显微镜装置,设计了低成本的便携式孢子显微图像采集装置。该采集装置主要由 3 个模块组成:处理器模块、数字显微镜模块和自动对焦模块。①处理器模块选取树莓派作为微处理器,负责显微图像的自动采集、识别与对焦控制。②数字显微镜模块由图像传感器、物镜、镜筒、XY 载物台、显微镜支架和光源等组成,负责采集显微图像并传输至微处理器。③自动对焦模块由步进电机驱动器、步进电机和丝杠导轨滑台构成,负责驱动步进电机夹持镜筒完成垂直上下的自动对焦。通过 Solidworks 三维设计和 3D 打印技术打印模具,最后将各个部件通过螺丝连接起来组成待研究的便携式夏孢子显微图像采集装置,如图 1a、1b 所示。



(a) 整机3D图 (b) 整机实物图 (c) 装置工作流程图

图 1 便携式夏孢子显微图像自动对焦装置及工作流程图

Fig. 1 Portable autofocus device for microscopic imaging of urediospores and its workflow diagram

1. 图像传感器 2. 镜筒 3. 物镜 4. XY 载物台 5. 光源 6. 丝杠导轨滑台 7. 显微镜支架 8. 步进电机 9. 步进电机驱动器 10. 树莓派

本采集装置工作原理是采用嵌入式视觉闭环控制系统实现孢子的自动对焦与检测功能,其工作流程为“硬件初始化→图像采集→对焦评价→电机控制→结果输出”的闭环迭代过程。具体运行过程可分为以下 3 个步骤:

(1)系统初始化与硬件准备

采集装置启动后,步进电机执行复位操作,驱动镜筒垂直移动至载玻片上方 3 mm 的预设初始位置(经预实验验证该位置可覆盖孢子可能分布的焦平面范围)。同步开启 CMOS 传感器与光源,经物镜放大后,载玻片上的孢子由 CMOS 捕获图像,并通过 CSI 接口实时传输至树莓派微处理器。

(2)基于孢子形态尺寸的动态步长搜索策略

树莓派微处理器基于改进夏孢子对焦评价函数,执行基于孢子形态尺寸的动态步长搜索策略,动态调节采样步长,确定最优焦平面坐标,并驱动电机精确定位至目标位置。

(3)结果输出与实时监控

对焦完成后,系统自动保存当前视野的清晰夏孢子显微图像,并调用 YOLO v5n 实现孢子识别与计数。树莓派通过 HDMI 接口输出对焦结果(含孢子数量标注图像),同时开启 CMOS 摄像头的实时预览模式,支持用户手动切换载物台视野进行连续检测。整个流程通过“图像评价-电机反馈”闭环控制实现复杂背景下孢子焦平面的动态追踪,其采集装置的工作流程如图 1c 所示。

1.2 装置硬件结构

1.2.1 处理器模块

由于树莓派搭载 ARM 架构处理器,基于 Linux 强大的开源生态系统,计算能力高,能处理大量数据和复杂算法,支持部署深度学习模型从而处理复杂的图像识别任务。多接口且支持连接摄像头和步进电机驱动器,实现驱动步进电机移动、采集图像和实时显示等功能。其搭配官方摄像头模块可以使用树莓派自身的 libcamera 库对摄像头进行操作。故本装置采用集成四核 Cortex - A72 CPU 和 VideoCore VI GPU 的 4 GB 内存的树莓派 4B 作为微控制器(微雪电子有限公司),其 1.8 GHz 主频和 NEON 指令集加速使其具备边缘计算能力,适合运行轻量化深度学习模型。

1.2.2 数字显微镜模块

通常数字显微镜是通过电荷耦合器件传感器(CCD)或金属氧化物半导体传感器(CMOS)图像采集模块将显微镜下的图像信息转换成数字信号,输

入到处理器中，然后图像被显示到 LCD 液晶屏上或者存储到 SD 卡上[28]。CCD 和 CMOS 图像传感器性能对比如表 1 所示，由于 CMOS 的处理速度相较于 CCD 更高且价格更便宜，适用于本研究低成本及实时观察孢子的要求。

表 1　CCD 和 CMOS 图像传感器性能对比

Tab. 1　Performance comparison of CCD and CMOS image sensors

性能对比	CCD	CMOS
图像质量	高	稍低
图像分辨率	高	稍低
处理速度	低	高
成本	高	低

故选取树莓派 IMX477R 型 CMOS 图像传感器（微雪电子有限公司），1 200 万像素[29]，通过镜筒连接光学放大 20 倍的金相物镜镜头（苏州萨迦电子商务有限公司）。CMOS 传感器的对角线长度为 7.9×10^3 μm，若显示器的尺寸为 24 英寸，则采集装置的光学放大倍数为 20 倍，数码放大倍数为 $20\times(24\times25.4/7.9)\approx1\,543$ 倍，显微镜数码放大倍数 X 的计算公式为

$$X=25.4OM/C \tag{1}$$

式中　O——物镜放大倍数

M——显示器尺寸

C——CMOS 对角线尺寸

1.2.3　自动对焦模块

本采集装置使用 DRV8825 型步进电机驱动器（微雪电子有限公司）驱动 50 mm 行程的 28 步进电机（海杰嘉创科技有限公司）夹持镜筒在 Z 轴垂直上下位移的方式实现对焦，DRV8825 驱动器可通过拨码开关选择 6 种不同的步进分辨率：全步、半步、1/4 步、1/8 步、1/16 步和 1/32 步。其板载 5 V 稳压芯片，电流输出为 3 A，可直接为树莓派供电。步进电机的步距角为 1.8°，螺距为 1 mm，当在全步细分模式下步进电机的滑块每一步对应于 Z 轴上移动 5 μm，1/8 步细分模式下滑块每一步对应于 Z 轴上移动 0.625 μm，适用于本研究对定位精度要求高的场景。

载物台使用二维刻度生物显微镜载物台（湖南三文科教仪器有限公司），方便对焦完成之后通过旋钮切换 X、Y 轴的视野，且其高精度的刻度设计满足孢子的视野精确切换需求。

2　自动对焦算法改进

2.1　基于梯度的对焦评价函数

现有 SMD 算子、Roberts 算子、Sobel 算子、Brenner 算子和 SML 算子等均为经典的基于梯度的对焦评价函数的算子[30]，不同梯度算子虽然改进了细节捕捉能力，但仍是通过计算图像梯度方差来量化图像清晰度从而判定对焦状态[19]。理论上，梯度方差越大表明图像边缘细节越显著，但在实际应用中，当图像主体占比不足且背景信息冗余时（如显微图像中孢子目标仅占视野的 5% ~15%），此类方法倾向于选择全局信息丰富且整体清晰度最优的图像，其评价指标易受背景或非目标区域的高频分量干扰，导致目标感兴趣区域（Region of Interest，ROI）的对焦精度受限。

2.2　YOLO v5n 模型

为提高局部目标的成像质量，需引入目标导向的对焦优化策略，如基于深度学习特征提取的目标检测模型，通过生成目标区域的概率掩膜，抑制非目标区域对评价函数的贡献；在自动对焦系统中，可通过其输出的 ROI 信息指导局部清晰度优化，从而弥补传统全局评价函数的不足。

基于上述对焦优化策略的需求，本研究选用 YOLO v5 目标检测模型作为 ROI 定位的核心算法。YOLO v5 作为 YOLO 架构的迭代版本，采用单阶段检测（One-stage detection）范式，通过多尺度特征融合与动态锚框机制，在保证高检测精度与实时推理速度的同时，显著降低模型参数量，满足嵌入式设备（如树莓派）的轻量化部署需求[31]。为验证不同模型对小麦条锈菌夏孢子对焦任务的适应性，构建 800 幅夏孢子显微图像组成的数据集，采用 LabelImg 工具对孢子目标进行边界框标注，标注后的数据集按照比例 8∶1∶1 划分为训练集、验证集和测试集。并在同一训练环境下（PyTorch 1.10，CUDA 11.3）分别对 YOLO v5n/s/m/l/x 等 5 个变体进行端到端训练，如表 2 所示。通过对比各模型的查准率（Precision）、查全率（Recall）、平均精度均值（mAP @ 0.5）和平均推理时间（Mean inference time），考虑到 YOLO v5n 模型的平均精度均值较为接近于 YOLO v5s，但在树莓派上检测每幅图像所用时间最少，运行速度最快，故筛选出最优架构为

表 2　YOLO 系列模型大小适应性

Tab. 2　YOLO series model size adaptability

模型	查准率 P/%	查全率 R/%	平均精度均值（mAP）/%	平均推理时间/ms
YOLO v5n	93.1	93.4	97.3	762
YOLO v5s	93.3	96.8	98.5	1 571
YOLO v5m	91.8	96.9	97.6	3 200
YOLO v5l	91.9	93.4	96.9	6 862
YOLO v5x	90.7	98.4	98.1	10 462

注：平均推理时间表示树莓派上检测每幅图像所用时间。

YOLO v5n。该实验设计旨在平衡模型性能与计算资源消耗,确保自动对焦系统在复杂背景干扰下仍能精准锁定目标区域。

2.3 改进的夏孢子对焦评价函数

由于基于梯度的对焦评价函数易受背景主导产生伪峰值,导致焦平面误判。本研究提出一种改进的夏孢子对焦评价函数,将电机位移过程中采集的图像经过基于梯度的对焦评价函数计算得出清晰度评价值,并用已经完成训练的 YOLO v5n 模型检测出孢子的数量,以孢子数量和对焦评价值分别作为 2 个参数按照优先级计算得出整体的自动对焦评价值。当图像视野中含有孢子时,孢子数量最多且对焦评价值最高的显微图像即为孢子的准焦清晰图像;当图像视野中不含孢子时,则对焦评价值最高的显微图像即为孢子的准焦清晰图像。改进夏孢子对焦评价函数的自动对焦流程如图 2 所示。

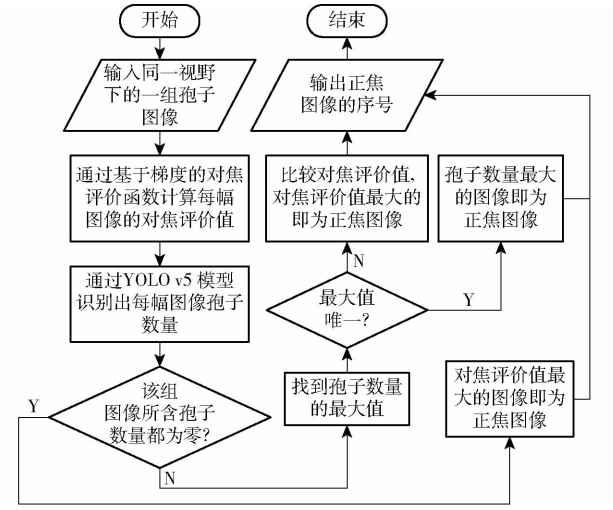


图 2 基于改进夏孢子对焦评价函数的孢子自动对焦流程图

Fig. 2 Improved focus evaluation function-driven autofocus flowchart for urediospores

2.4 基于孢子形态尺寸的动态步长搜索

传统爬山搜索算法在孢子显微对焦中存在恒定步长,难以适配孢子尺寸决定的景深约束以及复杂杂质易造成伪峰值引发误判的局限[26]。针对这些问题,提出一种基于孢子形态尺寸的动态步长搜索策略。该搜索策略基于传统爬山算法框架,通过引入孢子尺寸-景深映射模型与目标检测反馈机制,动态调节图像采样步长,实现显微对焦效率与精度的协同优化。

景深指在物体所在空间区域中,目标物体沿光轴方向能够清晰成像的轴向范围。在自动对焦系统中,图像采样步长(即镜头或传感器采集 2 幅图像的间隔对应的物理距离 Δz)需与景深匹配,以避免对焦遗漏并平衡效率与精度。Δz 需要小于景深,以确保相邻采集图像的景深范围重叠,避免焦点跳跃从而遗漏最佳对焦区域;同时需要保证 Δz 不能过小,否则会增加搜索时间[32]。由于本研究对象夏孢子的尺寸为(32 ~ 40) μm × (22 ~ 29) μm,根据最小孢子直径计算最小采样步长,经预实验得,1/8 步细分模式下每步对应 Z 轴垂直移动 10 μm,即每 10 μm 采集1 次图像,按照孢子尺寸(最小直径 22 μm)可获取 2 幅左右人眼可识别的孢子显微图像,确保焦平面覆盖。进而借助融合了目标检测机制的改进的夏孢子对焦评价函数反馈的对焦评价值,避免陷入局部峰值。基于多尺度优化理论,采用动态步长搜索策略,动态调整采样步长[33]:第 1 阶段进行全局粗搜索,第 2 阶段实现局部精搜索,搜索策略原理如图 3 所示。

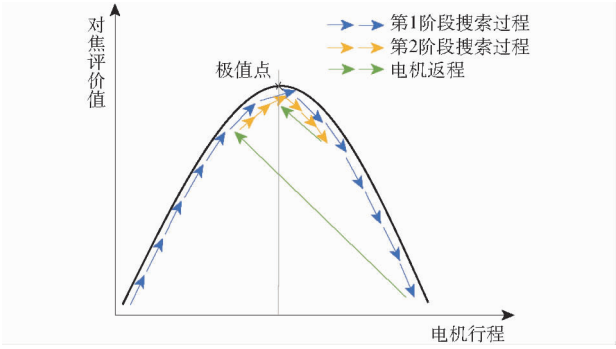


图 3 动态步长搜索策略原理图

Fig. 3 Schematic of dynamic step search strategy

具体执行动态步长搜索策略的过程可分为如下 2 个阶段:

(1)全局粗搜索阶段:基于夏孢子尺寸与景深重叠原则,采用大步长搜索,即电机单向移动每步对应 Z 轴垂直移动 10 μm,采集 1 幅图像并计算融合 YOLO v5n 孢子检测与基于梯度的对焦评价函数的评价值,定位峰值区域。

(2)局部精搜索阶段:回退至粗搜索峰值前一步,切换为小步长搜索,即电机单向移动每步对应 Z 轴垂直移动 2.5 μm,采集 1 幅图像;在 ±20 μm 范围内进行二次精搜索,通过双重评价机制(优先孢子数量,次选清晰度)锁定最优焦平面,动态步长搜索策略过程如图 4 所示。该策略通过多尺度步长与评价融合,规避传统爬山法的局部极值风险,同时确保微米级孢子形态特征的完整提取,经预实验表明其可在 10 μm 内覆盖人眼可识别的显微图像范围,提升对焦鲁棒性。

3 实验

3.1 实验设计与样品制备

本研究供试实验样本为西北农林科技大学提供

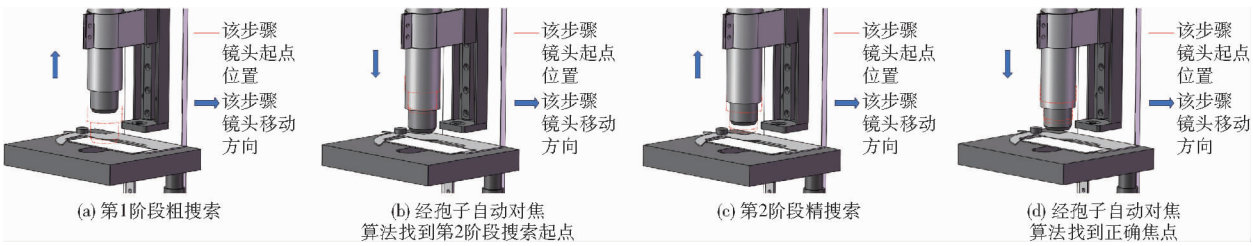


图 4　动态步长搜索策略过程图

Fig. 4　Process flowchart of dynamic step search strategy

的新鲜小麦条锈菌夏孢子，保存于 4℃ 恒温生物安全柜备用。为真实模拟小麦田间夏孢子的自然沉降过程，将 10 片载玻片随机布设于小麦实验田中以粘附田间的粉尘颗粒等杂质背景干扰物，粘附时间为 2024 年 4 月 20 日 08:00 至 21 日 08:00。样本回收后，采用铂金接种环（直径 3 mm，经酒精灯灼烧灭菌）蘸取夏孢子样本在载玻片表面均匀涂布。通过便携式夏孢子显微图像自动对焦装置进行图像采集，共获取 800 幅原始显微图像（包含离焦/准焦状态），图像存储采用 PNG 格式（640 像素 × 480 像素）。典型条锈病夏孢子样本如图 5 所示。

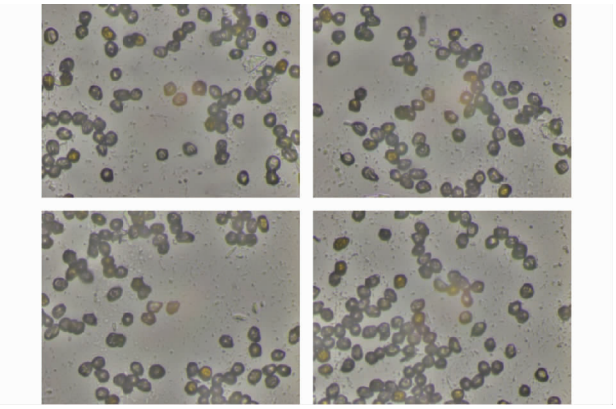


图 5　条锈病孢子数据集示例图

Fig. 5　Example of urediospores dataset

由于不同基于梯度的对焦评价函数的量纲各不同，为了便于比较，将对焦评价函数值做归一化处理[30]，归一化表达式为

$$f_i = \frac{Z_i}{Z_{\max}} \tag{2}$$

式中　Z_i——第 i 幅图像的对焦评价函数值

$Z_{\max}$——所有图像中对焦评价函数的最大值

f_i——第 i 幅图像归一化后的对焦评价函数值（对焦清晰度），表示对焦评价函数值越高的显微图像代表其对焦清晰度越高

3.2　实验结果与讨论

3.2.1　多场景对焦评价函数鲁棒性评估

为系统评估改进夏孢子对焦评价函数的鲁棒性，首先选取 SMD、Roberts、Sobel、Brenner 及 SML 等 5 种经典基于梯度的对焦评价函数作为对照，采用便携式夏孢子显微图像自动对焦装置采集了 3 组夏孢子从模糊到清晰再到模糊的 40 帧连续显微图像序列，构建的 3 组典型工况数据集分别为：高密度孢子图像（孢子占比大于杂质占比，视野有 41 个夏孢子）；中密度孢子图像（孢子占比约等于杂质占比，视野有 18 个夏孢子）；低密度孢子图像（孢子占比小于杂质占比，视野有 5 个夏孢子）。

图 6 展示了 5 种基于梯度的对焦评价函数在 3 种工况下的归一化响应曲线，图中每条不同颜色的对焦评价函数曲线的对焦清晰度最高峰峰值对应的横坐标即由该函数得出的最清晰图像的序号。

3 组序列图像中对焦评价曲线的对焦清晰度最高值相对应的图像帧如图 7 所示。从图 7a、7b 可看出，在高密度孢子图像和中密度孢子图像中对焦性能良好，夏孢子均成像在显微图像中，验证了传统梯度对焦评价函数在目标主导场景的有效性。从图 7c 可看出，在低孢子密度图像中，出现了传统梯度对焦评价函数的伪峰值现象，夏孢子未成像在显微图像中，导致轴向定位偏差进而将杂质成像在图

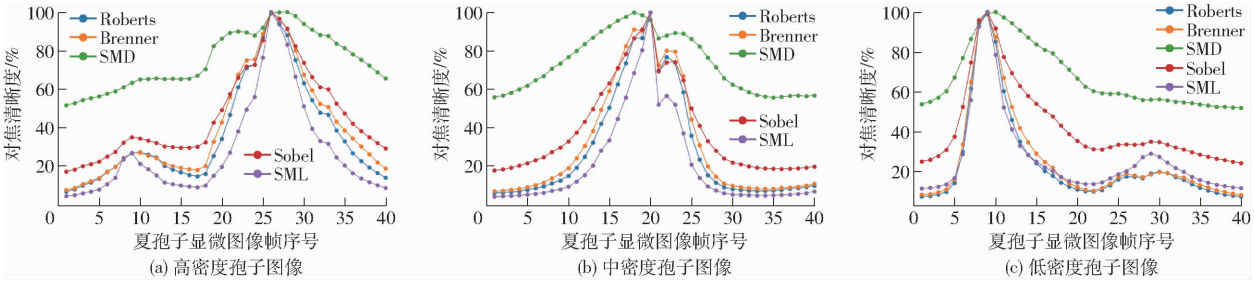
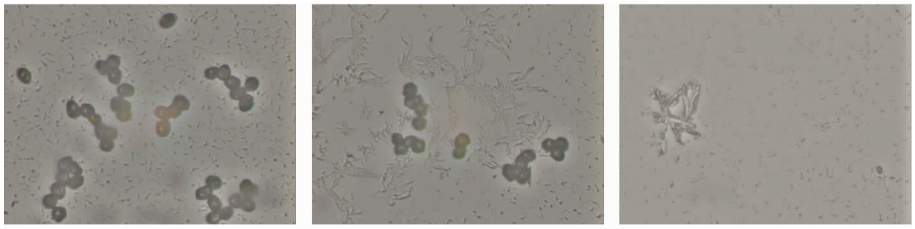


图 6　基于梯度的对焦评价函数在 3 种工况下的对焦评价曲线

Fig. 6　Focus evaluation curves of focus evaluation function based on gradient under three working conditions



(a) 清晰度最高的第26帧图像 (b) 清晰度最高的第20帧图像 (c) 清晰度最高的第9帧图像

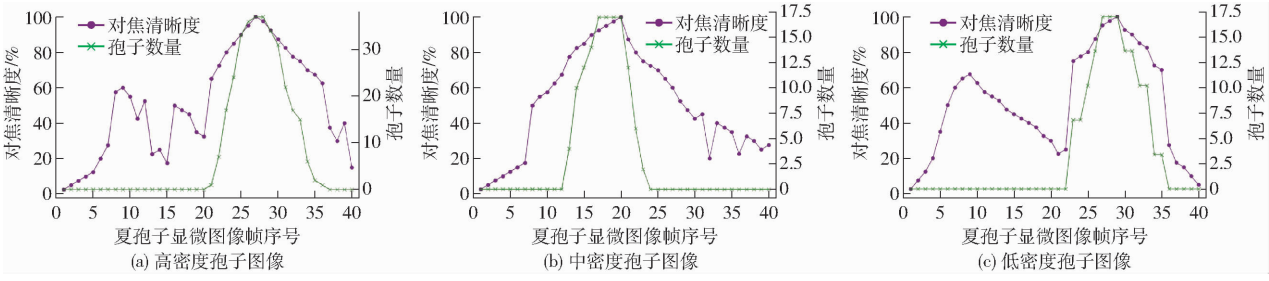
图 7 基于梯度的对焦评价函数在 3 种工况下的对焦结果

Fig. 7 Focusing results of focus evaluation function based on gradient under three working conditions

像中,揭示了全局梯度特征在复杂背景下的显微对焦失效的局限性。

同时从图 6 可看出,相较于其他 4 种算子,SML 算子在焦平面附近表现出最高的灵敏度,其归一化评价值在准焦区域的陡峭程度显著高于其他算子,证实其更适合孢子边缘特征的量化表征,故本研究选取 SML 算子作为基准评价函数进行改进,以进一步解决伪峰值导致的焦平面误判问题。

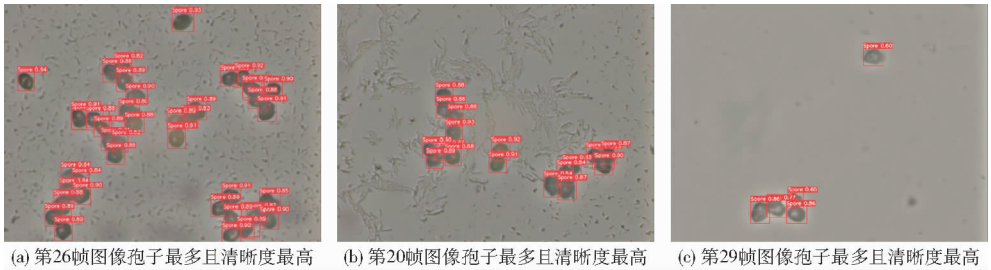
为解决基于梯度的对焦评价函数在低密度孢子图像中易受背景主导产生伪峰值,导致焦平面误判问题。本研究提出一种融合目标检测与图像梯度特征的改进夏孢子对焦评价函数,创新性地构建了基于优先级决策的夏孢子显微对焦优化算法。即对焦评价值由 YOLO v5n 模型识别后的孢子数量及 SML 算子的对焦评价函数的分数这 2 个指标共同决定,其中前者优先级高于后者,综合得出最终的对焦清晰度,使孢子数最多且 SML 函数值最大的图像的对焦评价值最高。采用改进后的自动对焦算法分别对上述 3 组 40 帧图像进行孢子对焦评价,结果如图 8 所示,相对应的图像帧如图 9 所示。



(a) 高密度孢子图像 (b) 中密度孢子图像 (c) 低密度孢子图像

图 8 改进夏孢子对焦评价函数在 3 种工况下的对焦评价曲线

Fig. 8 Improved focus evaluation function of urediospores in focus evaluation curve graphs under three working conditions



(a) 第26帧图像孢子最多且清晰度最高 (b) 第20帧图像孢子最多且清晰度最高 (c) 第29帧图像孢子最多且清晰度最高

图 9 改进夏孢子对焦评价函数在 3 种工况下的对焦结果

Fig. 9 Improved focus evaluation function for urediospore showing focus results in three scenarios

从图 8c 可看出,改进后对焦评价函数的对焦评价曲线通过孢子数量的约束(绿色曲线)有效抑制了复杂背景的干扰,使对焦评价峰值精准地对应孢子焦平面(如图 9c 第 29 帧图像所示)。对比图 9a、9b 和图 7a、7b 可知,在孢子不比杂质少的情况下,传统对焦评价函数的对焦效果和改进夏孢子对焦评价函数的对焦效果差别较小,但在孢子较少杂质较多的情况下(图 9c 和图 7c)改进夏孢子对焦评价函数的对焦效果明显优于传统基于梯度的对焦评价函数。

3.2.2 复杂背景下的对焦效果对比

为量化评估系统在干扰场景下的对焦精度,取夏孢子作为观察的实验对象,分别设置孢子较少且背景信息较多、孢子较多且背景信息较少的 5 组典型视野进行对比实验,不同视野下算法对焦误差如表 3 所示。考虑到孢子的平均尺寸,自动对焦算法的误差须控制在 22 ~ 40 μm,即步进电机误差的步数为 35 ~ 64 步。当对焦误差超出有效焦距范围时会出现成像模糊现象或者对焦错误,无法达到自动成像拍照的目的。

表 3　不同视野下算法对焦误差

Tab. 3　Algorithm focusing error under different fields of view

视野	孢子数量/个	SMD		Roberts		Sobel		Brenner		SML		改进夏孢子对焦评价函数	
		误差/步	相对清晰度	误差/步	相对清晰度	误差/步	相对清晰度	误差/步	相对清晰度	误差/步	相对清晰度	误差/步	相对清晰度
视野 1	24	38	0.399	38	0.399	38	0.399	38	0.399	38	0.399	40	0.377
视野 2	2	288	0.222	304	0.212	248	0.326	304	0.212	304	0.212	16	0.786
视野 3	3	256	0.088	304	0.085	304	0.085	304	0.085	304	0.085	6	0.836
视野 4	5	240	0.184	240	0.184	240	0.184	240	0.184	240	0.184	16	0.772
视野 5	26	50	0.327	50	0.327	50	0.327	50	0.327	50	0.327	40	0.447
平均误差	14	174.4		187.2		176		187.2		187.2		23.6	

注：单位步为电机步长，即 0.625 μm，且表中步数为绝对值；视野 1 和视野 5 的孢子较多、背景信息较少，视野 2 ~ 4 的孢子较少、背景信息较多；表中相对清晰度值域为[0,1]，值越大表示孢子边缘锐度越高。

手动调节镜头至孢子清晰的位置并记为坐标原点，以 Z 轴为坐标轴，用不同算法对焦结果与坐标原点的距离来衡量算法对焦性能的优劣。实验采用绝对步距误差作为评价指标，定义绝对步距误差为实际焦平面步数与算法定位步数差的绝对值，其中单步对应 0.625 μm 轴向位移。从表 3 可知，在孢子稀疏区域（视野 2 ~ 4），传统方法最低绝对步距误差达 240 步（150 μm），超出夏孢子短轴尺寸（22 μm）的 6 倍以上，超出有效误差范围，已造成对焦失败；而本文提出改进对焦评价函数的最大绝对步距误差仅 16 步（10 μm），在有效误差范围内，是肉眼能分辨的程度，满足孢子形态特征的成像需求；且 SMD、Roberts、Sobel、Breenner 和 SML 等 5 种传统对焦算法在孢子稀疏区（视野 2 ~ 4）的相对清晰度为 0.085 ~ 0.326，而改进算法为 0.772 ~ 0.836，进一步证实了改进算法优化了孢子成像的质量。

进一步地，为了对比基于梯度的对焦评价函数和改进夏孢子对焦评价函数的对焦性能，在同一片载有孢子的载玻片上取 100 个不同的视野分别使用 SML 算子的对焦评价函数和改进夏孢子对焦评价函数进行自动对焦实验并计数孢子。并将这 2 种函数的计数结果与人工计数结果对比，计数对比实验结果如表 4 所示。

表 4　计数对比实验结果

Tab. 4　Count and contrast experiment results

行程/mm	实验次数/次	人工计数总和/个	传统对焦评价函数		改进夏孢子对焦评价函数	
			计数总和/个	相对人工计数准确率/%	计数总和/个	相对人工计数准确率/%
2	100	665	272	40.90	648	97.44

相较于传统的对焦评价函数而言，改进夏孢子对焦评价函数的计数结果更准确。从表 4 可看出，基于梯度的对焦评价函数的孢子计数准确率为 40.90%，而改进夏孢子对焦评价函数的孢子计数准确率为 97.44%，比基于梯度的对焦评价函数高 56.54 个百分点，表明本研究提出的改进夏孢子对焦评价函数的自动对焦率更高，鲁棒性更强。但仍然会由于目标检测模型的检测能力不足偶尔造成少数孢子的漏检或误判，导致和人工计数结果也存在一定的误差。但整体而言该误差较小，属于可接受的范围。

3.2.3　复杂背景干扰下的自动对焦性能验证

为验证本文搭建的便携式显微图像采集装置的自动对焦性能，进行复杂背景干扰下的自动对焦性能验证。首先，调节载物台使其沿 X、Y 轴水平移动，随机切换不同的显微视野进行 100 次自动对焦实验，其中涵盖了孢子信息较少的区域、孢子信息较多的区域、没有孢子的区域、杂质信息较多的区域等多种情况，自动对焦实验结果如表 5 所示。

表 5　自动对焦实验结果

Tab. 5　Autofocus test experiment results

行程/mm	实验次数/次	最长对焦时间/s	最短对焦时间/s	平均对焦时间/s	对焦时间标准差/s	自动对焦成功率/%
2	100	132.8	113.03	116.49	3.28	98

从表 5 可看出，本文设计的孢子显微成像自动对焦系统的自动对焦成功率为 98%，平均对焦时间为 116.49 s，表明提出的融合 YOLO v5n 目标检测与基于孢子形态尺寸的动态步长搜索策略的显微成像自动对焦算法对焦率高、鲁棒性强，所设计的便携式显微图像采集装置成本低、响应较快；且对焦时间标准差仅 3.28 s，证明了系统性能的稳定性。其中对焦失败的两次实验是由于孢子重叠造成 YOLO v5n 算法模型的漏检，以及杂质与孢子相似从而导致 YOLO v5n 算法模型的误检情况。

4 结论

(1)针对复杂工况下孢子捕捉仪采用固定焦距显微成像时易出现图像离焦模糊、孢子检测精度不高等问题,设计了一种融合 YOLO v5n 目标检测与基于孢子形态尺寸的动态步长搜索策略的孢子显微成像自动对焦系统,能够实现复杂背景下夏孢子显微成像所在焦平面的自适应精准追踪与计数。首先,基于树莓派微控制器和 CMOS 图像传感器构建了低成本的便携式显微图像采集装置,通过步进电机驱动镜筒垂直上下位移,可以完成多焦距的夏孢子显微图像序列采集;其次,将 YOLO v5n 与 SML 梯度评价函数相结合,提出改进的夏孢子对焦评价函数,解决背景杂质干扰导致的焦平面误判问题;最后,采用基于孢子形态尺寸的动态步长搜索策略优化了夏孢子显微成像的自动对焦效率。

(2)提出的改进夏孢子对焦评价函数的孢子计数精度为 97.44%,比采用传统基于梯度的对焦评价函数的计数精度提高 56.54 个百分点,自动对焦系统的自动对焦成功率为 98%,平均自动对焦时间为 116.49 s,表明提出的自动对焦算法对焦率、鲁棒性强,所设计的显微成像自动对焦系统成本低、响应快。为智能孢子捕捉仪的自动化升级及小麦条锈病早期预警提供了可靠的显微成像解决方案,为作物气传病害跨区域防控提供了技术支撑。

参 考 文 献

[1] SINGH J, CHHABRA B, RAZA A, et al. Important wheat diseases in the US and their management in the 21st century[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 13: 1010191.

[2] ZHAO J, KANG Z S. Fighting wheat rusts in China: a look back and into the future[J]. Phytopathology Research, 2023, 5(1): 6.

[3] 龚国淑, 姚凯凯. 孢子捕捉仪在植物病害监测中的应用[J]. 植物保护学报,2022,49(3):721 - 730.
GONG Guoshu, YAO Kaikai. A review of the application of spore trap in plant disease monitoring[J]. Journal of Plant Protection, 2022, 49(3): 721 - 730. (in Chinese)

[4] 雷雨, 姚志凤, 何东健. 小麦条锈病菌夏孢子显微图像远程采集系统设计与试验[J]. 农业机械学报, 2018, 49(11): 39 - 47.
LEI Yu, YAO Zhifeng, HE Dongjian. Design and experiment of micro-image remote acquisition system of uredinispores of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2018, 49(11): 39 - 47. (in Chinese)

[5] 雷雨, 陈旭, 阮超, 等. 基于改进 DeblurGANv2 模型的小麦条锈菌夏孢子离焦模糊显微图像复原方法[J]. 农业机械学报, 2025, 56(1): 366 - 376.
LEI Yu, CHEN Xu, RUAN Chao, et al. Restoration of defocused blurred microscopic images of urediniospores of wheat stripe rust based on improved DeblurGANv2 model[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2025, 56(1): 366 - 376. (in Chinese)

[6] 李小龙, 马占鸿, 孙振宇, 等. 基于图像处理的小麦条锈病菌夏孢子模拟捕捉的自动计数[J]. 农业工程学报, 2013, 29(2): 199 - 206.
LI Xiaolong, MA Zhanhong, SUN Zhenyu, et al. Automatic counting for trapped urediospores of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* based on image processing[J]. Transactions of the CSAE, 2013, 29(2): 199 - 206. (in Chinese)

[7] 齐龙, 蒋郁, 李泽华, 等. 基于显微图像处理的稻瘟病菌孢子自动检测与计数方法[J]. 农业工程学报, 2015, 31(12): 186 - 193.
QI Long, JIANG Yu, LI Zehua, et al. Automatic detection and counting method for spores of rice blast based on micro image processing[J]. Transactions of the CSAE, 2015, 31(12): 186 - 193. (in Chinese)

[8] YANG N, QIAN Y, EL-MESERY H S, et al. Rapid detection of rice disease using microscopy image identification based on the synergistic judgment of texture and shape features and decision tree-confusion matrix method[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(14): 6589 - 6600.

[9] WANG Y F, DU X X, MA G X, et al. Classification methods for airborne disease spores from greenhouse crops based on multifeature fusion[J]. Applied Sciences, 2020, 10(21): 7850.

[10] 雷雨, 周晋兵, 何东健, 等. 基于改进 CenterNet 的小麦条锈病菌夏孢子自动检测方法[J]. 农业机械学报, 2021, 52(12): 233 - 241.
LEI Yu, ZHOU Jinbing, HE Dongjian, et al. Automatic detection method for urediniospores of wheat stripe rust based on improved CenterNet model[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2021, 52(12): 233 - 241. (in Chinese)

[11] ZHANG D Y, ZHANG W H, CHENG T, et al. Detection of wheat scab fungus spores utilizing the YOLOv5 - ECA - ASFF network structure[J]. Computers and Electronics in Agriculture, 2023, 210: 107953.

[12] ZHANG D, ZHANG W, CHENG T, et al. Segmentation of wheat scab fungus spores based on CRF_ResUNet plus[J]. Computers and Electronics in Agriculture, 2024, 216: 108547.

[13] ZHOU H, LAI Q, HUANG Q, et al. Automatic detection of rice blast fungus spores by deep learning-based object detection: models, benchmarks and quantitative analysis[J]. Agriculture, 2024, 14(2): 290.

[14] 乔琛, 韩梦瑶, 高苇, 等. 基于 Faster - NAM - YOLO 的黄瓜霜霉病菌孢子检测[J]. 农业机械学报, 2023, 54(12):

288 – 299.
QIAO Chen, HAN Mengyao, GAO Wei, et al. Quantitative detection of cucumber downy mildew spores at multi-scale based on Faster – NAM – YOLO[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2023, 54(12): 288 – 299. (in Chinese)
[15] LI K Y, ZHU X Y, QIAO C, et al. The gray mold spore detection of cucumber based on microscopic image and deep learning [J]. Plant Phenomics, 2023, 5: 0011.
[16] ZHU X, CHEN F, QIAO C, et al. Cucumber pathogenic spores' detection using the GCS – YOLOv8 network with microscopic images in natural scenes[J]. Plant Methods, 2024, 20(1): 131.
[17] 郝如茜. 白带显微图像中霉菌自动识别及清洁度判定的研究[D]. 成都:电子科技大学,2017.
HAO Ruqian. Research on automatic identification of fungi and classification of leucorrhea cleanliness under leucorrhea microscopic images[D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China,2017. (in Chinese)
[18] 秦驰. 高精度智能显微镜系统的设计与实现[D]. 成都:电子科技大学,2021.
QIN Chi. Design and implementation of high precision intelligent microscope system[D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China,2021. (in Chinese)
[19] 曾海飞, 韩昌佩, 李凯, 等. 改进的梯度阈值图像清晰度评价算法[J]. 激光与光电子学进展,2021,58(22):285 – 293.
ZENG Haifei, HAN Changpei, LI Kai, et al. Improved gradient threshold image sharpness evaluation algorithm[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2021, 58(22): 285 – 293. (in Chinese)
[20] 文显琼, 赵英然. 小型化智能对焦显微成像系统设计与实现[J]. 自动化与仪器仪表,2023(11):259 – 262.
WEN Xianqiong, ZHAO Yingran. Design and implementation of miniaturized intelligent autofocus microscopic imaging system [J]. Automation & Instrumentation, 2023(11): 259 – 262. (in Chinese)
[21] 张丰收, 李斯文, 胡志刚, 等. 一种改进的 Sobel 梯度函数自动对焦评价算法[J]. 光学技术,2017,43(3):234 – 238.
ZHANG Feishou, LI Siwen, HU Zhigang, et al. An improved auto-focus evaluating algorithm based on Sobel gradient function [J]. Optical Technique, 2017, 43(3): 234 – 238. (in Chinese)
[22] ELEN A, TURAN M K. Design of a low-cost and fully automated digital microscope system[J]. Multimedia Tools and Applications, 2024, 83(15): 46221 – 46247.
[23] HUI L, CHENG Y F. An improved focusing algorithm based on image definition evaluation[C]// 2011 2nd International Conference on Artificial Intelligence, Management Science and Electronic Commerce (AIMSEC), 2011: 3743 – 3746.
[24] DENG Q, WONG C-O, SITHARAN R, et al. Design of image intelligent focusing system based on improved SMD function and RBF algorithm[J]. PloS One, 2024, 19(8): e0307319.
[25] 郑馨, 艾列富, 刘奎, 等. 结合全局和局部灰度变化的显微图像自动聚焦函数[J]. 激光与光电子学进展, 2017, 54(8): 252 – 259.
ZHENG Xin, AI Liefu, LIU Kui, et al. Auto-focusing finction for microscopic images based on global and local gray-scale variation[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2017, 54(8): 252 – 259. (in Chinese)
[26] 王烨茹. 基于数字图像处理的自动对焦方法研究[D]. 杭州:浙江大学,2018.
WANG Yeru. Research on auto-focus methods based on digital imaging processing[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018. (in Chinese)
[27] 轩波, 苗立刚, 彭思龙. 显微镜下两层物体的快速自动对焦算法[J]. 计算机应用,2007(1):143 – 145, 148.
XUAN Bo, MIAO Ligang, PENG Silong. Fast auto-focusing algorithm of two-layer objects in microscopy[J]. Computer Applications, 2007(1): 143 – 145, 148. (in Chinese)
[28] 徐健, 萧泽新. 基于嵌入式的数字显微镜图像采集系统的研究[J]. 光学技术, 2008, 34(增刊 1): 26 – 28,31.
XU Jian, XIAO Zexin. Research of image capture system based on embedded in digital microscope[J]. Optical Technique, 2008, 34(Supp. 1): 26 – 28,31. (in Chinese)
[29] 任胜兰, 郭慧娟, 黄文豪, 等. 基于物联网和改进 YOLO – v4 – tiny 的智能果蝇诱捕方案[J]. 南京理工大学学报, 2022,46(5):586 – 593.
REN Shenglan, GUO Huijuan, HUANG Wenhao, et al. Smart fruit fly trap solution based on IoT and improved YOLO – v4 – tiny[J]. Journal of Nanjing University of Science and Technology, 2022, 46(5): 586 – 593. (in Chinese)
[30] 熊锐, 顾乃庭, 徐洪艳. 一种适应多方向灰度梯度变化的自动对焦评价函数[J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(4): 373 – 380.
XIONG Rui, GU Naiting, XU Hongyan. An auto-focusing evaluation function adapted to multi-directional gray gradient change [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2022, 59(4): 373 – 380. (in Chinese)
[31] 赵德安, 吴任迪, 刘晓洋, 等. 基于 YOLO 深度卷积神经网络的复杂背景下机器人采摘苹果定位[J]. 农业工程学报, 2019,35(3):164 – 173.
ZHAO Dean, WU Rendi, LIU Xiaoyang, et al. Apple positioning based on YOLO deep convolutional neural network for picking robot in complex background[J]. Transactions of the CSAE, 2019, 35(3): 164 – 173. (in Chinese)
[32] 熊锐. 基于数字图像处理的显微自动对焦技术研究[D]. 北京:中国科学院大学,2021.
XIONG Rui. Study on microscopic autofocus technology based ondigital image processing[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences,2021. (in Chinese)
[33] 潘宏亮, 孙金霞, 韩希珍. 图像清晰度评价与变步长融合调焦方法[J]. 红外与激光工程, 2023, 52(1): 248 – 253.
PAN Hongliang, SUN Jinxia, HAN Xizhen. Image sharpness evaluation and variable-step fusion focusing method[J]. Infrared and Laser Engineering, 2023, 52(1): 248 – 253. (in Chinese)