



邓小玲, 林亮生, 兰玉彬. 基于调制荧光检测技术的柑橘黄龙病诊断[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(2): 113-116.

# 基于调制荧光检测技术的柑橘黄龙病诊断

邓小玲<sup>1,2</sup>, 林亮生<sup>1</sup>, 兰玉彬<sup>2,3</sup>

(1 华南农业大学 电子工程学院, 广东 广州 510642; 2 广东省农业航空应用工程技术研究中心, 广东 广州 510642; 3 华南农业大学 工程学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**【目的】实现柑橘黄龙病的及时诊断,防止病情扩散、保障柑橘生产。【方法】运用基于调制荧光检测技术的超便携式调制叶绿素荧光仪 MINI-PAM 获取柑橘 *Citrus reticulata* 叶片荧光参数,通过概率神经网络对荧光数据进行建模及分类处理,以鉴定并区分健康的、非黄龙病黄化的以及黄龙病的柑橘植株。【结果】该方法对所有类别的诊断准确率均高于 76.93%,有些类别分类准确率甚至可达 100%。【结论】基于概率神经网络的柑橘黄龙病调制荧光检测技术用于鉴别柑橘黄龙病病情具有一定的可行性和推广性。

**关键词:** 柑橘黄龙病; 荧光检测; 概率神经网络; 调制叶绿素荧光

中图分类号: S33

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2016)02-0113-04

## Citrus Huanglongbing detection based on modulation chlorophyll fluorescence measurement

DENG Xiaoling<sup>1,2</sup>, LIN Liangsheng<sup>1</sup>, LAN Yubin<sup>2,3</sup>

(1 College of Electronic Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Engineering Research Center for Agricultural Aviation Application, Guangzhou 510642, China;

3 College of Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:**【Objective】To diagnose citrus Huanglongbing (HLB) timely to prevent citrus production from the spread of the disease. 【Method】A detection method of citrus HLB based on modulation chlorophyll fluorescence measurements was investigated. Fluorescence parameters were extracted from MINI-PAM, and analyzed by probability neural network (PNN) model and classification to distinguish among healthy citrus, HLB-infected citrus and etiolated citrus due to non-HLB problems. 【Result】The average detection accuracy for different classes of citrus symptoms was above 76.93%, and that for some classes even reached 100%. 【Conclusion】It is feasible to use the modulation chlorophyll fluorescence measurement combined with PNN model to detect citrus HLB.

**Key words:** citrus Huanglongbing; fluorescence detection; PNN; modulation chlorophyll fluorescence

柑橘黄龙病 (Huanglongbing, HLB) 是柑橘生产中的一种国际毁灭性病害,其危害大、蔓延速度快。柑橘感染 HLB 后,轻者严重影响其产量和品质,重者造成柑橘树的枯死,迄今鲜见有效的治疗方法<sup>[1]</sup>。为了防止 HLB 病菌扩散,目前柑橘生产采用的首要措施是连根挖除病株。因此,准确可靠地鉴别出

收稿日期:2015-06-10 优先出版时间:2016-01-18

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20160118.1651.032.html>

作者简介: 邓小玲 (1978—), 女, 副教授, 博士, Email: dengxl@scau.edu.cn; 通信作者: 兰玉彬 (1961—), 男, 教授, 博士, E-mail: ylan@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31201129); 广东省科技计划项目(2015B050501009); 江苏省现代农业装备与技术协同创新项目(NZXT01201403); 华南农业大学人才引进项目(K14018)

HLB,及早挖除病株,对于 HLB 的防治具有重大意义。

HLB 诊断方法有田间诊断、嫁接诊断、电镜观察、血清学诊断、DNA 探针杂交以及 PCR 扩增等<sup>[2-6]</sup>。目前 PCR 是较为可靠的检测方法,但其检测过程繁琐、复杂、周期长、费用高,难以推广普及<sup>[7]</sup>。因此,寻找一种便捷高效的检测方法,对 HLB 的及时防治具有重大意义。近几年基于光谱学的 HLB 检测方法陆续有报道。Sankaran 等<sup>[8]</sup>基于 HLB 病叶对淀粉的大量累积效应,采用中程红外光谱检测 HLB,该方法对 HLB 病叶、健康叶片、缺素症病叶的分类精确度达到 90% 以上。在光谱检测的基础上,国外一些学者利用衰减全反射傅里叶红外光谱法检测 HLB,也取得了较好的效果<sup>[9]</sup>。华南农业大学柑橘黄龙病鉴定研究课题组基于高光谱技术对 HLB 诊断进行了深入的研究,也获得了较好的研究成果<sup>[10-12]</sup>。尽管高光谱技术对 HLB 有较高的诊断精度,但由于高光谱数据获取的过程较复杂,多数是在实验室环境下采用昂贵的高光谱成像仪完成的,其高光谱或多光谱传感器价格不菲,应用于田间作业不太现实。

超便携式调制叶绿素荧光仪 MINI-PAM 是一款外观迷你但功能非常强大的调制荧光仪,特别适合于生态学研究。该仪器采用了独特的调制技术和饱和脉冲技术,可通过选择性的原位测量叶绿素荧光,从而检测植物光合作用的变化。该仪器具有很强的灵敏度和选择性,即使在很强的、未经滤光片处理的环境下,也能测定荧光产量且不受干扰,是野外光合作用研究的强大工具。MINI-PAM 主要应用于研究光合作用机理、各种环境因子(光、温、营养等)对植物生理生态的影响、植物抗逆性和植物的长期生态学变化等<sup>[13-17]</sup>。

本文以柑橘叶片为研究对象,通过超便携式调制叶绿素荧光仪 MINI-PAM 获取柑橘叶片的荧光参数,采用概率神经网络(Probability neural network, PNN)对不同病状叶片的荧光参数数据进行训练处理并建模,探索基于概率神经网络的 HLB 调制荧光检测方法的可行性和有效性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本试验采用超便携式调制叶绿素荧光仪 MINI-PAM 采集柑橘叶片的荧光参数。柑橘叶片的试验样本主要来自于清远市市级柑橘黄龙病综合防控示范果园,部分叶片采集于广东省惠州市博罗县杨村镇新天地果场。试验地点为华南农业大学生命科学学

院。

### 1.2 调制荧光数据的采集

将采集到的柑橘叶片样本先存放于纸箱中避光处理约 30 min,以充分地进行暗适应,随后取出叶片夹于叶片夹中,启动超便携式调制叶绿素荧光仪,获取样本的各种荧光参数: $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F$ ,  $F_t$ ,  $F_{m'}$ ,  $F_v/F_m$ ,  $qP$ ,  $qN$ ,  $NPQ$ ,  $ETR$ ,  $PTR$  和  $Yield$  参数等。其中  $F_0$  和  $F_m$  为最小和最大荧光参数; $F$  表示饱和脉冲前的荧光值; $F_t$  代表任一给定时间测量得到的荧光产量,它反映了样品的还原状态和能态。 $F_{m'}$  代表光适应的样品打开饱和脉冲时得到的最大荧光产量; $F_v/F_m$  反映了(在最适条件下经过暗适应后的)光系统 II (PS II) 的最大量子产量; $qP$  和  $qN$  分别被定义为光化学和非光化学荧光淬灭系数; $NPQ$  是非光化学淬灭的另一种表达方式; $ETR$  代表相对光合电子传递速率; $PTR$  代表入射到样品的光合有效辐射强度; $Yield$  是利用饱和脉冲法进行荧光淬灭分析的根本,最常用于野外测量稳态光照下的量子产量,此时 PS II 的有效量子产量最接近光合作用的实际量子产量。在众多参数中, $F_v/F_m$  和  $Yield$  都是比值,不依赖于测量的灵敏度,与样品叶绿素浓度的高低和样品形状无关,选取这 2 个参数较能反映柑橘叶片病症。因此经过数据分析之后,决定采用  $F_v/F_m$  和  $Yield$  这 2 个数据作为神经网络的输入特征参量。 $F_v/F_m$  的计算公式如下:

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

调制荧光仪  $Yield$  的参数,即稳态光照下的量子产量,是 MINI-PAM 荧光仪提供的最重要的信息,可通过超便携式调制叶绿素荧光仪直接读取。其计算公式如下:

$$Yield = (F_{m'} - F_t) / F_m$$

## 2 数据分析

### 2.1 概率神经网络

概率神经网络 PNN 是由径向基网络发展而来的一种前馈性神经网络。它是基于 Bayes 最小风险准则与 Parzen 窗的概率密度函数估计方法发展而来的一种并行算法,具有训练时间短、结构固定、应用广泛、能产生贝叶斯后验概率输出等优点。在解决分类问题时,PNN 可以用线性学习算法来完成非线性算法所完成的工作,同时又可以保持非线性算法的高精度。这种网络对应的权值就是模式样本的分布,网络不要训练而不作任何修改,只需对高斯函数的平滑因子进行经验式统计的估计,因而能够满足

训练上实时处理的要求。

PNN 网络由输入层、模式层、求和层、输出层构成。求和层是将某类的概率进行累计,每一类只有一个求和层,求和层单元与只属于自己类的模式层单元相连接,而与其他模式层单元无连接。求和层单元的输出与各类基于内核的概率密度的估计成比例,通过输出层的归一化处理,就能得到各类的概率估计。

概率神经网络的输出层由简单的阈值辨别器组成,具有最大后验概率密度的神经元将作为整个系统的输出。输出层神经元是一种竞争型神经元,每个神经元分别对应于一种数据类型,输出层神经元的个数等于训练样本数据的种类的个数,从求和层输出的各类概率密度函数中,最大概率密度函数的那个神经元输出为 1,作为待识别的样本模式类别,其他神经元的输出全为 0。

### 2.2 数据处理

对于调制荧光参数,  $F_v/F_m$  和 Yield 都是比值,不依赖于测量的灵敏度,与样品叶绿素浓度的高低和样品形状无关,选取这 2 个参数较能反映柑橘叶片病症,因此选择了这 2 个参数特征量作为网络的输入,网络的输入节点数为 2。

柑橘叶片的分类和采集环节由华南农业大学资源环境学院黄龙病研究室提供技术支持,主要由专家经验判断以及 PCR 技术联合检测的方法实现柑橘叶片的分类,其分类结果用于检测本文方法的有效性。

根据已分好类的柑橘叶片,选取了健康、缺锰、缺镁、缺镁兼黄龙病、黄化、斑驳和缺锌共 7 种类型,

对应的网络的期望输出可分别用 1、2、3、4、5、6、7 来表示。这 7 种类型中,缺镁兼黄龙病(缺镁 HLB)、黄化、斑驳属于黄龙病,缺锰、缺镁、缺锌属于缺素症。

将 MINI-PAM 获得的各类病情叶片的  $F_v/F_m$  和 Yield 参数输入 PNN 网络,用于网络的训练,部分样本输入向量数据如表 1 所示。用上述柑橘叶片调制荧光参数构建概率神经网络,对柑橘黄龙病症状进行分类,SPREAD 扩展系数设置为 0.01。输入 50 组待检验样本的数据进行检测,得到检测结果。其步骤总结如下:

选取 7 种类型样本,收集它们的  $F_v/F_m$  和 Yield 荧光数据;运用收集的荧光参数训练 PNN 网络;将需要识别的未知样本的荧光参数输入网络实现分类。

运用收集的荧光参数训练 PNN 网络在 MATLAB 实现过程中,选择合适的径向基函数的扩展速度 SPREAD 值来训练网络显得尤为重要。SPREAD 值对网络精度的影响非常明显。SPREAD 值越小,对函数的逼近就越精确,但是逼近的过程就越不平滑;SPREAD 值越大,逼近误差比较大,但逼近过程就比较平滑。SPREAD 值过大或过小都会造成网络精度的偏差。试验过程中,通过设置不同的 SPREAD 值得到不同的分类结果,并建立混淆矩阵,得到总精度,进行对比后最终选定 SPREAD 值为 0.01。

在 MATLAB 中创建一个概率神经网络的函数为: `newpnn(P, T, SPREAD)`。其中  $P$  为输入样本,  $T$  为目标分类向量,其由函数 `ind2vec` 将类别向量转换而成。

表 1 部分样本输入向量数据

Tab. 1 Input vectors of samples with different symptoms

健康叶片		缺锰叶片		缺镁叶片		缺镁 HLB 叶片		黄化叶片		斑驳叶片		缺锌叶片	
Yield	$F_v/F_m$	Yield	$F_v/F_m$	Yield	$F_v/F_m$	Yield	$F_v/F_m$	Yield	$F_v/F_m$	Yield	$F_v/F_m$	Yield	$F_v/F_m$
0.669	0.195	0.389	0.075	0.685	0.171	0.498	0.115	0.148	0.016	0.281	0.042	0.534	0.157
0.713	0.217	0.289	0.055	0.561	0.121	0.436	0.076	0.195	0.006	0.333	0.076	0.505	0.160
0.681	0.250	0.228	0.066	0.500	0.058	0.559	0.108	0.140	0.008	0.130	0.020	0.408	0.086
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

### 3 结果与分析

在华南农业大学资源环境学院黄龙病研究实验室的技术支持下,所有待检测的叶片均通过了专家判断以及 PCR 检测,确定了其病状类别。基于概率神经网络的柑橘调制荧光检测结果与以上结果进行匹配,每一类别共采用 50 组叶片数据进行验证,得到如表 2 所示的分类准确率。从表 2 可以看出,基于概率神经网络的调制荧光检测方法,可 100% 检测

出健康和缺锌症状的柑橘叶片。黄化和缺锰症状的识别度也高于 90%。缺镁和缺镁 HLB(即缺镁又具黄龙病)的识别度较好,达 76.93% 以上。本文所述方法为柑橘黄龙病检测提供了较为可行的新途径。识别度不是特别理想的主要原因在于部分类别之间存在病情交叉,因此荧光参数具有较大的相似性。此外,黄龙病症状多样,与其他缺素症状类似,在外观上普遍呈现黄化现象,肉眼难以分辨,部分荧光系数也存在一定的相似性,导致分类精度不甚完美。

后期将进一步研究更适合的数据处理方法以及采集更多叶片进行数据分析,提高分类精度地及有效性。

表2 概率神经网络分类结果

Tab.2 Disease classification based on probability neural network(PNN) model

识别度/%

指标	健康	缺锰	缺镁	缺镁 HLB	黄化	斑驳	缺锌
健康	100	0	0	0	0	0	0
缺锰	7.69	92.31	0	0	0	0	0
缺镁	15.38	0	76.93	0	0	7.69	0
缺镁 HLB	0	7.69	0	76.93	0	15.38	0
黄化	7.69	0	0	0	92.31	0	0
斑驳	0	7.69	0	7.69	0	84.62	0
缺锌	0	0	0	0	0	0	100

## 4 结论

为了有效地检测柑橘黄龙病,本研究采用了调制荧光技术,运用了概率神经网络模型对采集数据进行了处理与分析,研究表明:该方法可以较好地检测出柑橘黄龙病,能够100%检测出柑橘的健康叶片和缺锌叶片,对于其他症状也有较好的分类,最低分类准确率为76.93%。

基于概率神经网络的柑橘黄龙病调制荧光检测技术在柑橘黄龙病的无损检测方面有一定的可行性。

### 参考文献:

- [1] BOVE J M. HuangLongBing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus [J]. J Plant Pathol, 2006, 88(1): 7-37.
- [2] 王爱民, 邓晓玲. 柑橘黄龙病诊断技术研究进展[J]. 广东农业科学, 2008, 35(6): 101-103.
- [3] 蒋自珍, 袁亦文, 孟幼青, 等. 不同柑橘品种对柑橘黄龙病抗性试验[J]. 中国植保导刊, 2006, 26(9): 23-24.
- [4] 邓崇岭, 娄兵海, 白先进, 等. 广西黄皮、不同柑桔品种黄龙病检测及16S rDNA序列分析[J]. 中国农业通报, 2010, 26(20): 283-286.
- [5] 罗志达, 叶自行, 许建楷, 等. 柑橘黄龙病的田间诊断方法[J]. 广东农业科学, 2009, 36(3): 91-93.
- [6] 邓晓玲, 梁志慧, 唐伟文. 快速检测柑橘黄龙病病原的研究[J]. 华南农业大学学报, 1999, 20(1): 1-4.
- [7] 邹敏, 周常用. 柑桔黄龙病病原和检测方法研究进展[J]. 植物保护, 2005, 31(3): 10-14.
- [8] SANKARAN S, EHSANI R, ETXEBERRIA E. Mid-infrared spectroscopy for detection of Huanglongbing (greening) in citrus leaves[J]. Talanta, 2010, 83(2): 574-581.
- [9] HAWKINS S A, PARK B, POOLE G H, et al. Detection of citrus huanglongbing by fourier transform infrared-at-

tenuated total reflection spectroscopy[J]. Appl Spectrosc, 2010, 64(1): 100-103.

- [10] 梅慧兰, 邓小玲, 洪添胜, 等. 柑橘黄龙病高光谱早期鉴别及病情分级[J]. 农业工程学报, 2014, 30(9): 140-147.
- [11] 邓小玲, 孔晨, 吴伟斌, 等. 基于主成分分析和BP神经网络的柑橘黄龙病诊断技术[J]. 光子学报, 2014, 43(4): 0430002-1-0430002-7. doi:10.3788/gzxb20144304.0430002.
- [12] 邓小玲, 郑建宝, 梅慧兰, 等. 基于高光谱成像技术的柑橘黄龙病病情诊断及分类[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(7): 99-105.
- [13] GAO Y, LI D. Detecting salinity stress in tall fescue based on single leaf spectrum[J]. Sci Hortic-Amsterdam, 2012, 138: 159-164.
- [14] KANG E X, LUO J J, QIU H Z, et al. Effects of low temperature and light stress on gas exchange and chlorophyll fluorescence of pumpkin seedlings[J]. Adv Mater Res, 2012, 450/451: 537-542.
- [15] HUANG J, SILVA E N, SHEN Z, et al. Effects of glyphosate on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and physicochemical properties of cogongrass (*Imperata cylindrical* L.) [J]. Plant Omics J, 2012, 5(2): 177-183.
- [16] BECKMANN M, HOCK M, BRUELHEIDEH, et al. The role of UV-B radiation in the invasion of *Hieracium pilosella*: A comparison of German and New Zealand plants[J]. Environ Exp Bot, 2012, 75: 173-180.
- [17] DINI-PAPANASTASI O, KOSTOPOULOU P, RADOGLOU K. Effects of seed origin, growing medium and mini-plug density on early growth and quality of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) seedlings [J]. J For Sci 2012, 58(1): 8-20.

【责任编辑 霍欢】