

基于近红外技术柑橘黄龙病田间快速检测方法研究

饶 敏¹, 桂家祥¹, 卢占军², 肖青青³, 张 岑¹

(1. 江西省赣州出入境检验检疫局, 赣州 341000; 2. 国家脐橙工程技术研究中心, 赣州 341000;

3. 广东讯动网络科技有限公司, 广州 510000)

摘要 柑橘黄龙病在感病植株和健康植株之间传播速度快, 因此快速检测柑橘黄龙病对其防治十分关键。本文研究了近红外技术快速检测柑橘黄龙病的方法。采用 PLS-LDA 建立的模型对未参与建模的样品进行了检测, 结果表明, 该模型检测的准确率与普通 PCR 检测的结果符合率达到 100%, 假阳性率小于 1%。该技术具有检测周期短、无污染等优点, 可用于田间黄龙病的快速检测。

关键词 近红外光谱技术; 柑橘黄龙病; 田间快速检测; PLS-LDA

中图分类号: S 436.66 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.06.022

Fast determination of Huanglongbing disease in the field by near infrared spectroscopy

Rao Min¹, Gui Jiexiang¹, Lu Zhanjun², Xiao Qingqing³, Zhang Cen¹

(1. Ganzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Jiangxi 341000, China; 2. National Navel Orange Engineering Research Center, Ganzhou 341000, China; 3. Guangdong Xundong Science and Technology Ltd., Guangzhou 510000, China)

Abstract It is very important to develop rapid detection method for Huanglongbing (HLB) disease, because of the rapid spread of the disease. In this paper, the near infrared technique was applied for rapid detection of HLB. The model of PLS-LDA was used to detect the samples which did not participate in the modeling. The accurate rate of this technique was 100% same with that of PCR, and the false positive rate was less than 1%. Field detection showed that the near infrared technique for HLB rapid detection is feasible and practical, and can be used in the field detection of HLB disease, with the advantages of short detection cycle, no pollution, etc.

Key words near infrared spectroscopy; citrus Huanglongbing disease; rapid detection in the field; PLS-LDA

黄龙病是柑橘生产上最具毁灭性的病害, 其防治的有效措施是清除病源, 切断传播媒介^[1]。简便、准确的田间快速检测技术是目前柑橘黄龙病防控亟须解决的问题。柑橘黄龙病的诊断方法主要有田间症状诊断、指示植物鉴定、PCR 生物技术检测(即 DNA 检测)^[2]等。田间症状鉴别简便、直接, 一旦柑橘树叶片出现斑驳状黄化, 挂果期出现“红鼻子果”, 即可断定是黄龙病树; 但未表现典型发病症状的植株易与生理黄化相混淆, 导致错误诊断。指示植物鉴定周期长, 难以用于实际生产; DNA 检测虽然准确, 但需要在实验室完成, 无法满足现场、快速的检测需求。

近红外光是最早发现的不可见光, 20 世纪 90

年代以来, 以近红外光为基础的光谱分析技术得到较快发展, 并广泛应用于农业、石油化工、食品工业、制药工业及临床医学等领域。将近红外光谱(near infrared, NIR)应用于柑橘黄龙病检测也有了一些初步研究^[3-9]。最早开展柑橘黄龙病红外光谱检测研究的是美国佛罗里达大学, 研究者分别对感染黄龙病的柑橘植株和缺锌、缺锰植株的叶片进行近红外和中红外区光谱扫描分析, 发现感染黄龙病的叶片在近红外区具有一定的特征, 可用于柑橘黄龙病快速检测^[4]。目前对处于潜伏期的黄龙病样品的快速检测方法还没有相关的研究, 同时在仪器上缺乏规模化、便携式的近红外光谱仪器。近红外技术在检测黄龙病上具有快速、无损、可重复等优点^[10-13],

收稿日期: 2017-02-23

修订日期: 2017-05-23

基金项目: 江西省科技计划项目(20152ACF60003, 20151BBG70067, 20141BBF60053); 江西省科研院所基础设施项目(20151BBA13045); 国家自然科学基金(31560602)

联系方式 E-mail: gzrm@qq.com

可在实际中为种植户提供指导,具有良好的效果和广阔的应用前景。

本研究在已有研究成果的基础上,就 NIR 应用于柑橘黄龙病田间快速检测方法进行了深入的算法优化,对黄龙病潜伏期样品进行了近红外检测,同时对开发规模化和便携化的近红外黄龙病专用检测仪进行了研究,并对研究成果进行了验证。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用叶片材料均采自于国家脐橙工程技术研究中心。所采叶片类型包括:有症状,经 PCR 检测鉴定为感染黄龙病的叶片;经 PCR 检测感病,但田间未显症的叶片;田间表现缺素症状叶片(主要为缺锌、氮、镁元素),共计 1 800 个样品。

1.2 仪器设备

光谱仪器采用广州讯动网络有限公司开发的 NGD-U1 模块,该模块采用最新的 MEMS 微镜技术原理,波长范围 900~1 700 nm,仪器轻便,适宜田间现场检测。

1.3 试验方法

采集叶片近红外光谱:擦干样品叶片,使其干净无污渍,不采集叶脉位置。在同一叶片,通过上述光谱仪正反两面各采集 3 个点,得到该叶片的反射率。通过化学计量学软件,建立鉴别模型。

2 结果与分析

2.1 光谱信息

感染黄龙病叶片、潜伏期黄龙病叶片以及未感染叶片原始光谱图及二阶导数光谱图如图 1、图 2。

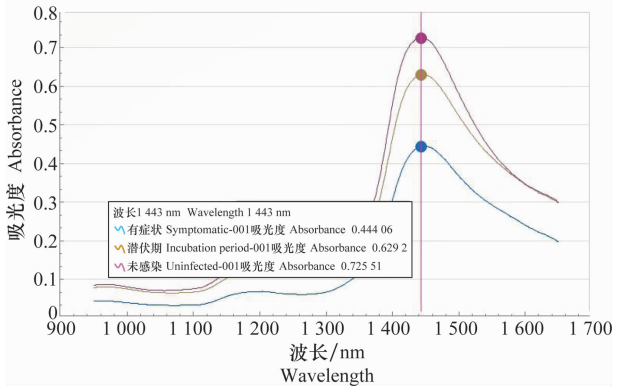


图 1 不同样品叶片原始光谱图

Fig. 1 Original spectra of different leaves

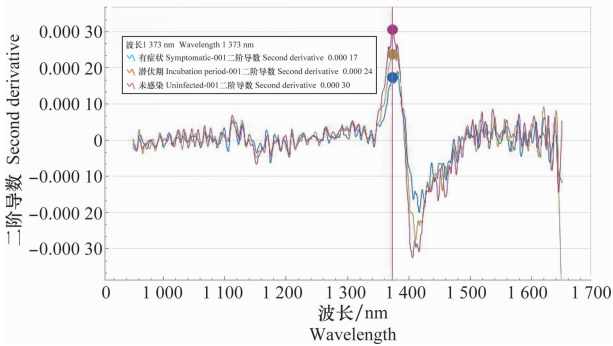


图 2 不同样品叶片二阶导数光谱图

Fig. 2 Second derivative spectra of different leaves

从图 1、图 2 上可看出,感染与未感染叶片的光谱特征区域主要分布在 1 300 ~ 1 500 nm 范围内,潜伏期与已显症叶片光谱图均有明显特征,易于识别。通过采用化学计量学方法^[14-16],对近红外数据进行多元散射校正(MSC 法),消除叶面散射以及光程变化对 NIR 漫反射光谱的影响,可以提炼出感染黄龙病的特征信息,进而识别出是否感染。

2.2 方法筛选

NIR 应用于柑橘黄龙病快速检测依据 NIR 在定性分析中“相似相聚”的原理,通过不同的模式识别方法将同类样品聚在一起,对不同的样品进行分离,从而对样品的类别进行判定^[18-19]。通过化学计量学软件,对样品光谱数据进行主成分聚类分析,得到如下聚类图,如图 3。从图 3 中可以看出,黄龙病样品与未感染样品有明显界线,说明近红外方法检测黄龙病是可行的。

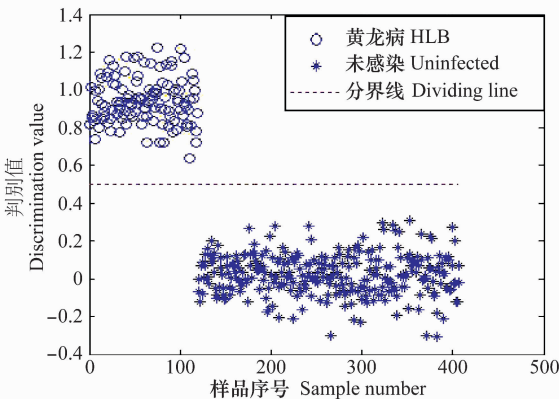


图 3 不同样品叶片聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of different leaves

近红外光谱分析技术的定量定性分析都需建立在化学计量学基础上,为了更好地建立黄龙病判别分析模型,需进行相应的算法优选,本试验挑选目前较常用的集中判别分析算法,K-最近邻域(KNN)、

随机森林(random forests)、朴素贝叶斯、集成学习方法和偏最小二乘法-线性判别分析(PLS-LDA)分别建立模型,按 6 次随机样品分类,识别率结果见表 1。将收集到的样品划分为建模集和检验样品集。建模集用于确定近红外定量模型的参数,然后采用

不参与建模过程的检验样品集对优选的模型进行检验。根据模型的可用性来评价模型预测未知样品的能力,本研究采用的评价指标为识别率(recognition rate)。识别率(%)=预测准确的样品个数/总样品数×100,识别率越大,说明模型的性能越好。

表 1 不同分析方法的识别率
Table 1 Recognition rate of different analytical methods

随机次数 Random times	识别率/% Accuracy				
	K 邻近算法 KNN	随机森林法 Random forests	朴素贝叶斯 Naive bayes	集成学习方法 Ensemble learning methods	偏最小二乘线性判别分析 PLS-LDA
1	98.42	93.16	64.74	92.11	100.00
2	99.47	93.16	61.05	92.11	99.47
3	98.42	97.89	70.53	93.16	99.47
4	97.89	94.21	66.84	91.58	99.47
5	97.89	90.00	69.47	85.79	100.00
6	100.00	92.11	65.79	86.84	99.47

表 1 显示,5 个定性分析算法中 PLS-LDA 的准确率和稳定性最好,所以本研究选择该方法作为柑橘黄龙病检测的建模方法,并以此为基础进行模型优化、完善和验证。

不同的预处理方法对光谱信息的提取会有不同,本研究对比了归一化、标准化、标准正态分布(SNV)、多元散射校正(MSC)、SG 一阶导数、SG 二阶导数等六种方法预处理后的建模差异,其识别率结果见下表 2。

表 2 不同预处理方法的识别率
Table 2 Recognition rate of different pretreatment methods

预处理方法 Pretreatment method	项目 Item	主因子数 Principal factor	黄龙病识别率/% Recognition rate of HLB	未感染叶片识别率/% Recognition rate of uninfected leaves	总识别率/% Total recognition rate
原始光谱 Original spectrum	模型 Model	20	99.8	99.7	99.7
	检验 Test		99.0	80.0	89.5
归一化 Normalization	模型 Model	19	99.8	99.6	99.7
	检验 Test		100.0	84.0	92.0
标准化 Standardization	模型 Model	19	99.8	99.7	99.7
	检验 Test		83.0	79.0	81.0
标准正态分布 SNV	模型 Model	20	99.9	99.5	99.7
	检验 Test		99.0	87.0	93.0
多元散射校正 MSC	模型 Model	20	99.8	99.6	99.7
	检验 Test		99.0	91.0	95.0
SG 一阶导数 First derivative	模型 Model	20	99.9	99.7	99.8
	检验 Test		87.0	63.0	75.0
SG 二阶导数 Second derivative	模型 Model	20	99.3	99.2	99.2
	检验 Test		81.0	63.0	72.0

表 2 显示,6 个预处理方法中 MSC 法的识别率最好,MSC 具有消除叶面散射以及光程变化对 NIR 漫反射光谱的影响,所以本研究选择该预处理方法,并以此为基础进行模型优化、完善和验证。

2.3 模型应用

为提高 PLS-LDA 模型的准确率,对建模的预处理方法和建模波段进行了优化,采用优化后的模型对 720 个未参与建模的样品(包括传统 PCR 检测方法判定为黄龙病的样品 340 个,未感染黄龙病样

品 380 个)进行判定,结果(表 3,图 4)表明,经近红外方法预测判定黄龙病结果准确识别率达到 100%,假阳性率小于 1%。通过上述方法建立的柑橘黄龙病检测模型在黄龙病快速检测系统中只需 10 s 就能得到检测结果,并且该方法对潜伏期黄龙病检测有效,大大减少了人为误判的可能性。试验验证了近红外光谱法与经典检测方法结果无显著差异,并初步通过实践应用证明其在田间快速检测上的可行性和实用性。

表 3 PLS-LDA 模型预测黄龙病识别率

Table 3 Recognition rates of Huanglong disease by PLS-DLA model

样品类别 Type	PCR 鉴定结果/个 Result of PCR	PLS-LDA 鉴定结果/个 Result of PLS-LDA	识别率/% Recognition rate
感染黄龙病叶片 Leave infected by Huanglong disease	340	340	100
未感染叶片 Uninfected leave	380	379	99.738 8

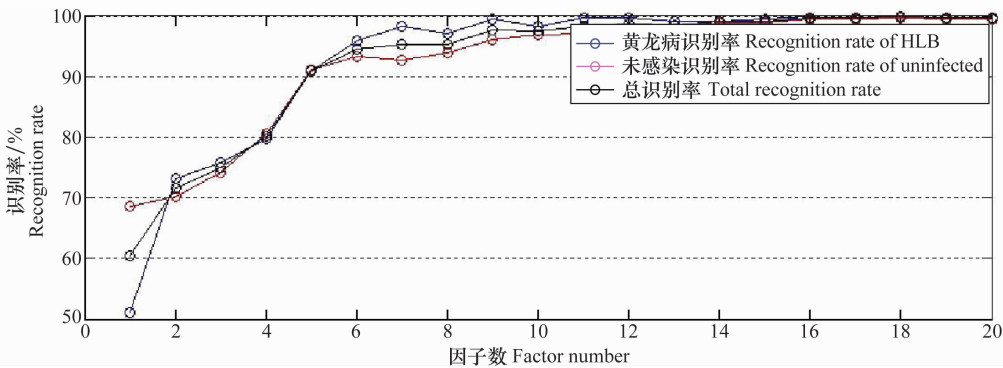


图 4 优化模型对样品的判定结果

Fig. 4 Results of the optimization model for the samples

3 结论与讨论

NIR 技术是一种快速、无污染的新型快速检测技术,本研究表明,通过优选预处理、建模算法能将黄龙病快速检测模型判定柑橘黄龙病阳性与普通 PCR 阳性的符合率提升至 100%,近红外预测值与传统 PCR 检测技术方法的检测结果无显著差异。便携式近红外光谱仪结合化学计量学 PLS-LDA 算法,能够逐步地应用于柑橘黄龙病田间快速检测,从而对柑橘黄龙病的整个生产过程进行全程检测和监控,该技术具有很大的发展空间和推广前景。

参考文献

[1] 苏树发. 探讨柑橘黄龙病及其防治措施[J]. 科技风, 2010(20): 292-293.

[2] 罗志达, 叶自行, 许建楷, 等. 柑桔黄龙病的田间诊断方法[J]. 广东农业科学, 2009(3): 91-93.

[3] 刘思国. 柑桔黄龙病 PCR 检测试剂盒的制备及其应用的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2003.

[4] Hawkins S A, Park B, Poole G H, et al. Detection of citrus Huanglongbing by Fourier transform infrared-attenuated total reflection spectroscopy [J]. Applied Spectroscopy, 2010, 64(1): 100.

[5] Chao W L, Su H H, Chien S Y, et al. Visible-near infrared spectroscopy for detection of Huanglongbing in citrus orchards[J].

Computers & Electronics in Agriculture, 2011, 77(2): 127-134.

[6] Sankaran S, Ehsani R. Visible-near infrared spectroscopy based citrus greening detection: Evaluation of spectral feature extraction techniques [J]. Crop Protection, 2011, 30(11): 1508-1513.

[7] 李修华, 李民赞, Won Suk Lee, 等. 柑桔黄龙病的可见-近红外光谱特征[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(6): 1553-1559.

[8] 刘燕德, 肖怀春, 邓清, 等. 柑桔黄龙病近红外光谱无损检测[J]. 农业工程学报, 2016, 32(14): 202-208.

[9] 王爱民, 邓晓玲. 柑桔黄龙病诊断技术研究进展[J]. 广东农业科学, 2008(6): 101-103.

[10] 严衍禄. 近红外光谱分析基础与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.

[11] 徐广通, 袁洪福. 现代近红外光谱技术及应用进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(2): 134-142.

[12] 严衍禄, 赵龙莲. 现代近红外光谱分析的信息处理技术[J]. 光谱学与光谱分析, 2000, 20(6): 777-780.

[13] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国石化出版社, 2007.

[14] 何勇, 李晓丽. 用近红外光谱鉴别杨梅品种的研究[J]. 红外与毫米波学报, 2006, 25(3): 192-194.

[15] 褚小立, 袁洪福, 陆婉珍. 近年来我国近红外光谱分析技术的研究与应用进展[J]. 分析仪器, 2006(2): 1-10.

[16] 孙通, 徐惠荣, 应义斌. 近红外光谱分析技术在农产品/食品品质在线无损检测中的应用研究进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(1): 122-126.

(责任编辑: 杨明丽)