



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research  
Green Plant Protection Innovation—Article

## 指纹光谱特征揭示叶斑病时空动态发展以实现显症前诊断

朱逢乐<sup>a,#</sup>, 苏珍珠<sup>b,#</sup>, Alireza Sanaeifar<sup>c</sup>, Anand Babu Perumal<sup>c</sup>, Mostafa Gouda<sup>c,d</sup>, 周瑞清<sup>c</sup>, 李晓丽<sup>c,\*</sup>, 何勇<sup>c</sup>

<sup>a</sup> College of Mechanical Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310023, China

<sup>b</sup> State Key Laboratory for Rice Biology, Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

<sup>c</sup> College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

<sup>d</sup> Department of Nutrition and Food Science, National Research Centre, Cairo 12311, Egypt

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 December 2021

Revised 19 September 2022

Accepted 13 October 2022

Available online 28 November 2022

#### 关键词

高光谱成像

指纹光谱特征

叶斑病

叶片病斑进展

显症前诊断

生化指标

### 摘要

植物病原菌不断危害农业生产和粮食安全。因此,病害发展早期的动态表征对病变监测和显症前诊断至关重要。高光谱成像(HSI)在跟踪病害初始感染部位的动态进程以进行显症前诊断方面具有巨大潜力。然而,目前尚无相关文献提取出早期感染阶段活体叶片病变组织的指纹光谱特征(FSS),也没有探究HSI的检测机制。FSS是指能够表征特定植物病害的独特、有代表性的光谱特征。在本研究中,基于时序HSI数据分析,提取了接种麦根平脐蠕孢菌(*Bipolaris sorokiniana*)的大麦叶片的FSS,以表征叶斑病症状发展,实现显症前诊断。还研究了叶斑病早期发展阶段叶片的光谱和生化响应。本文所提取的全波段FSS能够捕捉病变发展过程中褪绿组织和坏死组织的独特特征,从而原位可视化植物-病原菌像素级的早期互动态进程。进一步,实现了接种后24 h叶斑病的显症前诊断,比传统的聚合酶链式反应(PCR)测定或生化测定提前了12 h。为了揭示HSI显症前诊断的机制,还建立了叶片的平均光谱响应与其生化指标(叶绿素、类胡萝卜素、丙二醛、抗坏血酸和还原型谷胱甘肽)之间的定量关系,回归模型在预测集的决定系数( $R_p^2$ )均高于0.84。总体结果表明,HSI反映了活体植物特性的变化,所提取的FSS可成功跟踪叶斑病发生发展的时空动态进程,实现显症前诊断。在其他植物病害上的试验表明,该方法在植物病害早期控制方面具有较大的推广潜力。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

植物病原菌严重危害作物的产量和质量。真菌病原菌麦根平脐蠕孢菌(*B. sorokiniana*)能够侵入许多宿主植物,包括小麦、大麦、水稻和玉米[1–2]。*B. sorokiniana*广泛分布在亚洲、非洲、美洲和欧洲的温暖潮湿地区[3–4],并引起叶斑病、根腐病和籽粒黑点病[1]等病害。该病害导致南亚的作物产量损失2%~30%,并且最高可达

100%,而在苏格兰、加拿大和巴西的作物产量损失可达10%~20% [5–7]。在这些病害中,叶斑病是小麦和大麦粮食作物最为常见的病害[2–3,8–9],在南亚种植地影响了近 $1.2 \times 10^7$  hm<sup>2</sup>的作物[1]。叶斑病的特征是萎黄的褪绿组织晕轮包围着暗褐色的坏死组织,导致作物光合速率下降、细胞死亡和叶片衰老加速[1–2]。由于叶斑病的传染性高[3],而且易引起谷粒萎缩和胚芽变色[3–4],因此叶斑病的早期诊断,尤其是显症前(症状肉眼不可见)诊断,对

\* Corresponding author.

E-mail address: xiaolili@zju.edu.cn (X. Li).

# These authors contributed equally to this work.

防止大规模叶斑病暴发和确保全球粮食安全至关重要。

对于叶片病害的早期诊断，专家的视觉检测仍然是农作物和园艺作物栽培中最常用的方法[10]。然而，视觉检测费时费力、主观、易出错，因为植物和病原菌的早期互作过程有时是肉眼不可见的[10]。传统的聚合酶链式反应(PCR)检测被认为是最有效的诊断方法，但这种检测方法操作繁琐且对样本有损，在显症前阶段其检测精度会受到采样以及叶片内病原菌分布不均匀的影响[11]。因此，亟需建立一种快速、原位的叶斑病显症前诊断方法。

新型的光学传感技术，如高光谱成像(HSI)[12-13]、叶绿素荧光成像[14]和可见光成像(RGB成像)[15]，有望快速、无损地检测早期叶片病变。HIS技术同时获取数百个连续窄波长的光谱和空间信息，返回信息丰富的高光谱图像[12]。HSI已被证明在表征早期植物-病原菌相互作用引起的细微变化方面是有效的[10,16]。在真菌病原菌*B. sorokinana*侵染和植物早期抗性期间，发生了多个生理变化过程，包括坏死和褪绿组织的不断扩大、真菌菌丝和分生孢子的出现、活性氧基团(ROS)的增加、ROS升高导致的脂质过氧化和丙二醛(MDA)的积累，以及抗氧化防御的增强，涉及抗氧化剂如抗坏血酸(AsA)和还原型谷胱甘肽(GSH)[1,10,17-18]。这些植物的生理生化变化必然会改变显症前染病组织的光学反射特性[10,19-20]。然而，这种细微的光谱变化对准确识别受感染但无症状的叶片样品提出了巨大的挑战[21-22]，所以必须结合先进的分析方法。

近年来，许多研究已经证实了HSI在植物叶片或冠层早期病害诊断中的可行性，涉及显症前到显症后的各个阶段。Shuaibu等[23]使用了一种无监督的波段选择方法来处理高光谱图像，以便在室内和室外环境中区分苹果叶片上从无症状到严重感染阶段的褐斑病感染程度。Arens等[24]根据HSI对接种甜菜尾孢菌4天后(dai)的健康和无症状甜菜叶进行了分类，并开展了植物-病原菌互作中的早期代谢谱分析。Gao等[25]验证了HSI结合波长选择方法在葡萄卷叶病无症状和显症阶段早期检测的潜力。基于HSI和人工智能算法，有研究在不同的病变发展阶段(无症状、早期、中期和晚期)成功地区分了健康和白粉病感染的南瓜叶[26]。Abdulridha等[27]还将番茄叶片的细菌斑点病人工分为不同的发展阶段，并在不同阶段完成了病害检测。虽然上述HSI研究均实现了叶片病害的早期诊断，但是它们并没有明确表征植物-病原体互作位点的时空动态变化，也没有对显症前病变进行精准定位。

为了跟踪初始病原菌感染期间病变区域的时空动态变化，一些研究人员对高光谱图像采用像素级的可视化分析

方法，以充分利用HSI的空间解析能力，这有利于病害早期监测。Thomas等[28]使用HSI和支持向量机(SVM)，在12 dai首次肉眼可见症状时，实现了不同大麦品种白粉病发展的空间分布可视化。然而，由于有监督SVM模型训练时需要人工手动标注病变的像素区域，而人工仅能标注肉眼可见的病变区域，所以该方法无法实现显症前诊断。相比之下，无监督学习可以发现肉眼不可见的病变像素。Thomas等[13]通过反射和透射高光谱图像的主成分分析(PCA)方法，实现了大麦叶片白粉病感染4 dai的早期可视化诊断，比肉眼观测提前2天。然而，PCA是原始光谱波段的线性组合，不能解决像素光谱的混合信号问题。Kuska等[29]采用显微HSI结合单纯形体积最大化(SiVM)方法和似然比(LLR)计算以可视化离体大麦叶片上*Blumeria graminis*接种后的病变过程，在4 dai实现病斑的可视化，此时症状也刚刚肉眼可见。这些研究人员进一步基于SiVM和聚类分析改进了监测结果，在染病2 dai实现病变的可视化，比肉眼观测早3天。然而，在离体叶片上接种病原菌可能并不能代表活体叶片的发病过程[30]。此外，由于SiVM将像素光谱表示为少数极端特征的组合，结合后续的LLR计算[29]或聚类分析[30]解决了点光谱的信号混合问题，但均未提取表征病变的指纹光谱特征(FSS)。FSS指能表征特定植物病害的独特、有代表性的光谱特征。在使用HSI对稻瘟病菌感染的大麦叶片进行早期原位监测的研究中，通过光谱解混分析，实现了接种后24 h(hai)的病变可视化[31]。然而，该研究对0 hai、24 hai、48 hai和72 hai样本的高光谱图像分别进行了光谱解混分析，所提取的端元在所有测量时间内都不同，没有提取出跨时间、稳健、有代表性的FSS。

尽管当前研究在叶片病变早期动态进程表征和显症前病害诊断方面取得了重要进展[13,29-31]，但这些研究均未提取出具有代表性、鲁棒性、可解释性、跨时间的活体叶片病害的FSS，大大降低了HSI检测显症前病害的鲁棒性和适用性。而且，上述文献均未揭示HSI的检测机制。此外，上述研究的早期诊断结果均与肉眼观测相比，而肉眼观测存在不准确性和滞后性。

在本研究中，对活体大麦叶片在接种后的不同时间(0 hai、24 hai、36 hai、48 hai、60 hai和72 hai)分别采集高光谱图像，并提取叶斑病的FSS用于显症前诊断。本研究的具体目标为：①探究活体大麦叶片在叶斑病侵染过程中的早期时序光谱响应，并建立基于HSI的显症前病害的快速、无损、原位诊断方法；②提取有代表性、鲁棒、可解释性的FSS，以捕获早期感染阶段的病变变化，并在像素水平上原位监测早期病变进展的时空动态变化，实现

叶斑病的显症前诊断；③通过建立光谱特征与宿主生化指标之间的数学关系，揭示HSI对叶斑病显症前诊断的机制。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 植物培养和样品制备

选择活体大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 作为实验样本。大麦种子置于光照周期为12 h/12 h (白天/黑夜)、温度为25 °C、相对湿度为60%的温室8 d, 病原菌 *B. sorokiniana* 在25 °C的马铃薯葡萄糖琼脂培养基中培养1周。取分生孢子悬浮液 ( $7.0 \times 10^5$  spores·mL<sup>-1</sup>) 喷洒在活体大麦叶片上 (第8天时长度约为10 cm); 然后, 用透明盖遮盖叶片, 温度为25 °C, 湿度为90%。共制备两组样品。第一组样本由18片受感染的和5片健康的大麦叶片组成, 在整个数据采集过程中保持活体状态。为了跟踪感染进程, 分别在0 hai、24 hai、36 hai、48 hai、60 hai和72 hai采集健康和染病叶片的高光谱图像, 共得到138张图像。另一组样本经过了相同的病原菌接种处理, 不同的是将这些叶片样本切下, 用于叶片生化指标的测定。共采集了250个样本, 平均分为两组: 一组用于色素测定, 包括叶绿素a (Chl-a)、叶绿素b (Chl-b) 和类胡萝卜素 (Car); 另一组用于测定氧化和抗氧化相关化合物 (MDA、AsA和GSH)。所制备样品的详细信息见表1。选择光合色素 (叶绿素和类胡萝卜素) 是因为它们对病原菌感染以及坏死、褪绿病变组织的出现较敏感[11]。MDA被纳入研究是因为它常是病变胁迫下过量ROS引起膜脂过氧化的指标[17–18]。同时也对作物防御反应中重要的抗氧化物AsA和GSH [17]进行了研究。

表1 大麦叶片生化指标测定样品集

Time (hai)	Chl-a, Chl-b, and Car		MDA, AsA, and GSH	
	Infected group	Healthy group	Infected group	Healthy group
0	—	15	—	15
24	16	5	16	5
36	18	5	18	5
48	18	5	18	5
60	17	5	18	5
72	16	5	15	5

### 2.2. 高光谱图像采集

使用线扫描HSI系统 (380–1030 nm), 包括ImSpector V10E成像光谱仪、电荷耦合器件 (CCD) 相机、传送带和两个150 W卤素灯, 获取高光谱图像。将叶片样品放

在反射率低的黑板上, 用胶带固定叶片底部和顶部, 以减少表面不均匀的影响。每次HSI采集参数一致, 扫描后立即将样品放回湿润的接种室。图像分辨率设置为1024 × 472, 曝光时间为0.06 s, 样品与镜头之间的距离为270 mm, 传送带的移动速度为3.0 mm·s<sup>-1</sup>。所有原始高光谱图像均进行黑白校正[32]。

### 2.3. 叶片生化指标测定

分别在0 hai、24 hai、36 hai、48 hai、60 hai和72 hai采集健康和染病大麦叶片样品, 称重并放入液氮中快速冷却, 为后续化学测量做准备。使用微孔板分光光度计测量6种生化指标的含量。在4 °C无光条件下用95%乙醇提取样品, 然后在665 nm、649 nm和470 nm处测定吸光度以计算Chl-a、Chl-b和Car的浓度[33]。由于AsA可以将铁离子 (Fe<sup>3+</sup>) 还原为亚铁离子 (Fe<sup>2+</sup>), 因此在样品中加入Fe<sup>3+</sup>溶液, 并添加联吡啶与生成的Fe<sup>2+</sup>形成红色螯合物。然后在525 nm处测定吸光度以计算AsA浓度[34]。GSH与2-硝基苯甲酸 (DTNB) 反应生成黄色的2-硝基-5-巯基苯甲酸, 并测定在412 nm处的吸光度以计算GSH的浓度[34]。MDA与硫代巴比妥酸 (TBA) 在酸性条件下反应生成红棕色的三甲基络合物, 并测定532 nm处的吸光度以计算MDA的浓度[35]。

### 2.4. 大麦叶片真菌侵染程度的实时PCR定量分析

用真菌/植物DNA比值 (FPDR) 来监测大麦叶片的真菌侵染程度。采用2<sup>-ΔC<sub>t</sub></sup>法[36]来测定, 其中ΔC<sub>t</sub>为 *B. sorokiniana tef-1α* 基因与大麦泛素基因的原始周期阈值 (C<sub>t</sub>) 的差[37–38]。设计了基于 *B. sorokiniana tef-1α* 的特异性引物。用引物EF728和EF986 (见附录A中的表S1) 对该基因进行部分扩增。然后对扩增产物进行测序。采集0 hai、12 hai、24 hai、36 hai、48 hai、60 hai和72 hai的叶片。在液氮中研磨并使用植物DNeasy试剂盒 (Qiagen, 德国) 进行DNA提取和测定。每个测定重复三次。

### 2.5. 数据分析

本研究的系统框架图如图1所示。样品制备并采集高光谱图像后, 测量生化指标和FPDR, 并进行统计分析。然后采用像素级可视化算法, 其中光谱解混分析实现了准确的感染识别并提取了叶斑病的FSS。将提取的FSS应用于时序高光谱图像, 以跟踪活体叶片的病变, 从而实现了叶斑病的显症前诊断。最后, 建立了叶斑病胁迫下叶片的光谱特征与其生化指标之间的定量关系, 以揭示HSI显症前诊断的机制。



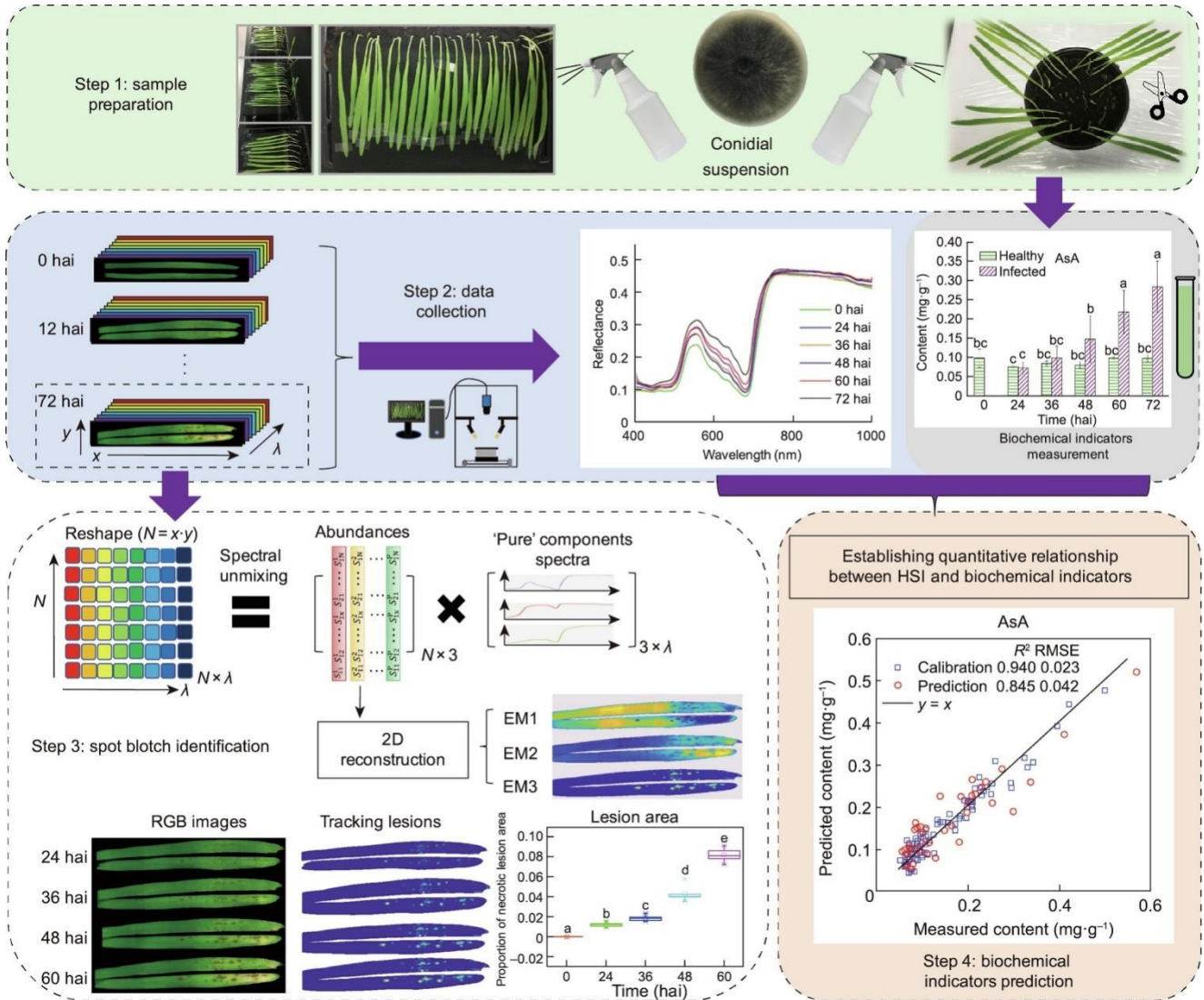


图1. 本研究的系统框架图。2D：二维； $R^2$ ：决定系数；RMSE：均方根误差；EM：端元；S：每个像素光谱的丰度值。

### 2.5.1. 二维(2D)高光谱图像的病变可视化

为了识别叶斑病的病变部位并直观地可视化感染过程，采用了  $k$ -means 聚类、模糊聚类和光谱解混方法等几种像素级分析方法。 $k$ -means 是一种迭代更新的无监督聚类算法[39]，给定的聚类数被设置为4。对于模糊聚类分析，选择了模糊  $c$  均值聚类算法 (FCM)，该算法计算每个像素的权重，表示其相对于不同类别的隶属度[40]。FCM 的分类数也被设置为4。光谱解混方法起源于遥感领域，是光谱信息挖掘的重要方法之一，用于解决从混合光谱中提取特定成分信息的问题。将一个混合光谱分解为多个分量光谱 (端元, EM)，并估计每个 EM 的空间分布 (丰度)。丰度指数表示每个 EM 在单个像素中的占比[41]。顶点成分分析 (VCA) 是一种经典的光谱解混方法，它作为一种无监督的方法，基于凸几何理论提取 EM，并通过非负约束最小二乘法计算每个像素光谱的丰度[42]。

### 2.5.2. 一维(1D)光谱的数据压缩、建模和特征波长选择

提取每个叶片样本的平均光谱以研究大麦叶片的平均光谱响应。为可视化光谱特征的总体分布，使用 PCA 进行数据降维[43]。为建立光谱响应与生化指标之间的数学关系，首先使用偏最小二乘蒙特卡洛算法 (MCPLS) 消除每个指标的异常样本[44]。按照 2 : 1 的比例将样本随机划分为校准和预测集，采用偏最小二乘 (PLS) 对全波段数据进行回归建模。PLS 是一种经典的多变量建模方法，该方法对原始光谱进行线性变换以获得正交潜在变量 (LV)。此外，为了识别最具代表性和可解释的波长，同时减少相邻光谱波段之间的冗余，采用随机蛙跳算法 (RF)、竞争自适应重加权采样 (CARS)、连续投影算法 (SPA) 和逐步回归[45] 4 种变量选择方法选择特征波长。然后基于精简后的光谱构建多元线性回归 (MLR) 模型。

### 2.5.3. 软件和模型评估

使用 ENVI 软件对高光谱图像进行掩膜操作以去除背景。使用 MATLAB 软件进行方差分析 (ANOVA)、光谱平滑、回归分析、特征波长选择和病变可视化分析。通过校准和预测集的决定系数 ( $R^2$ )、均方根误差 (RMSE) 和剩余预测偏差 (RPD) 来评估回归模型的性能。性能良好的模型应具有较高的  $R^2$  和 RPD 值以及较低的 RMSE 值。通过与 RGB 图像的对比以及不同感染时间点之间的相互比较来评估叶片病害诊断的可视化分析效果。

## 3. 结果

### 3.1. 基于实时 PCR 的病害感染程度

FPDR 指数被广泛用于评价植物中真菌病原体的侵染程度。由时序 FPDR 测量结果 (图 2) 可以看出, 在 24 hai 内真菌量保持稳定状态, 在 0 hai、12 hai 和 24 hai 之间无显著性差异。随后, 病原菌生物量在 36 hai 显著增加, 这是感染程度明显增长的第一个时间点。在感染程度平缓增加至 60 hai, 在 72 hai 出现急剧增长。此外, 病原菌呈现了一种无限增殖的趋势, 会加重病害感染程度, 最终导致宿主植物死亡。

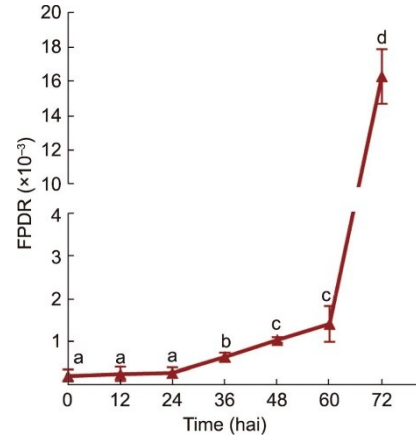


图 2. 利用实时 PCR 对大麦叶片感染程度进行监测。

### 3.2. 叶片生化指标对叶斑病感染的时序响应

生化指标与 PCR 数据之间的相关性分析 (图 3) 显示, Chl-a、Chl-b、Car、GSH、MDA 与 PCR 数据显著相关, 说明真菌感染导致大麦叶片的生化指标发生了巨大变化。为显示这些指标的详细变化, 进行了 ANOVA, 如图 4 以及附录 A 中的表 S2 所示。真菌感染后染病叶片的各项指标均发生显著变化, 并且随着感染时间的推移, 这些变化越来越显著。最敏感的指标是 Chl-a 和 Chl-b, 在 36 hai 时健康与感染样本之间开始出现显著差异。而 Car、

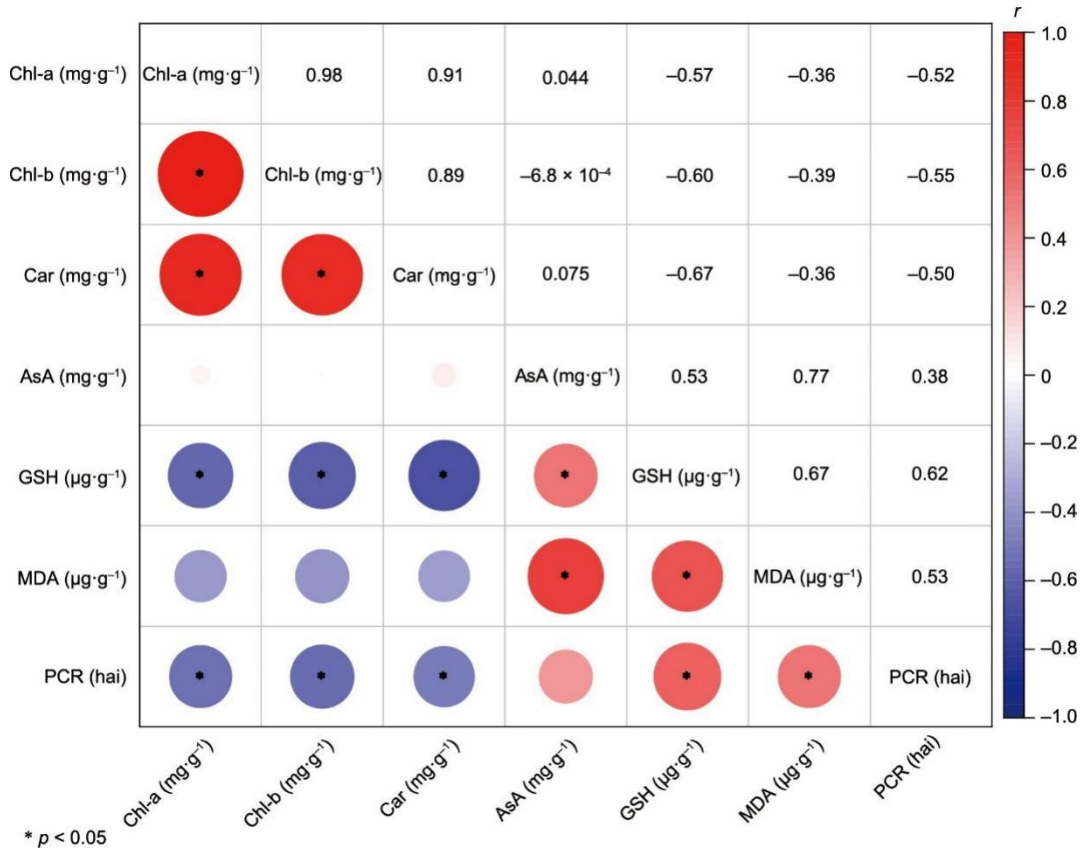


图 3. 叶斑病胁迫下大麦叶片生化指标与 PCR 数据的相关性分析,  $r$  为相关系数。



AsA、GSH和MDA分别在60 hai、60 hai、48 hai、48 hai时才出现显著差异。

### 3.3. 叶片光谱特性对叶斑病感染的时序响应

大麦叶片光谱特性对叶斑病感染的时序响应如图5所示。感染区域在0 hai、24 hai、36 hai、48 hai、60 hai和72 hai的光谱曲线如图5(b)所示。感染组和健康组在不同时间点(24 hai、36 hai、48 hai、60 hai、72 hai)的平均光谱曲线如图5(d)所示。健康组与感染组在不同时间点的ANOVA[图5(d)]显示,两者间的第一个光谱显著性差异出现在36 hai的545~680 nm光谱区间,此时真

菌生物量也显著增加(图2)。染病叶片在此光谱范围内的反射率较高,主要是由于在叶斑病胁迫下大麦叶片中的叶绿素含量降低,对红光的吸收减弱。同时,与此对应的是在36 hai时受感染叶片中Chl-a和Chl-b含量的降低(图4)。随着感染时间的推移,健康组与感染组叶片的生化指标显著性差异逐渐增加,两组之间的光谱差异也在逐渐增大[图5(b)、(d)]。光谱显著性差异在72 hai时更加明显,跨越455~735 nm的波长范围。而且,随着病害的发展,感染样本平均光谱的标准差呈现了增大的趋势,说明伴随着菌丝在叶片细胞间隙的穿透,叶片内部结构和组

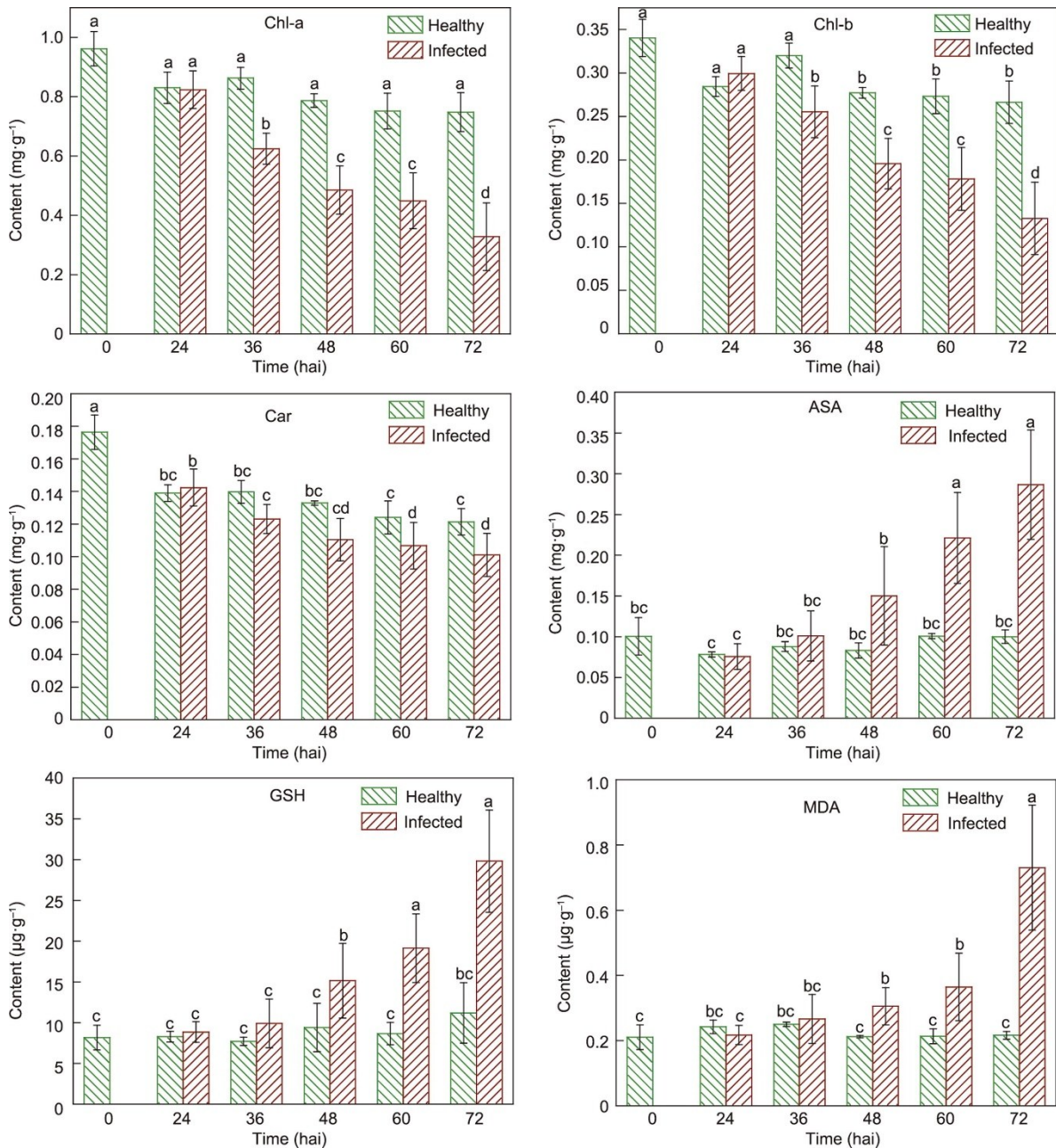


图4. 大麦叶片生化指标对叶斑病感染的时序响应。

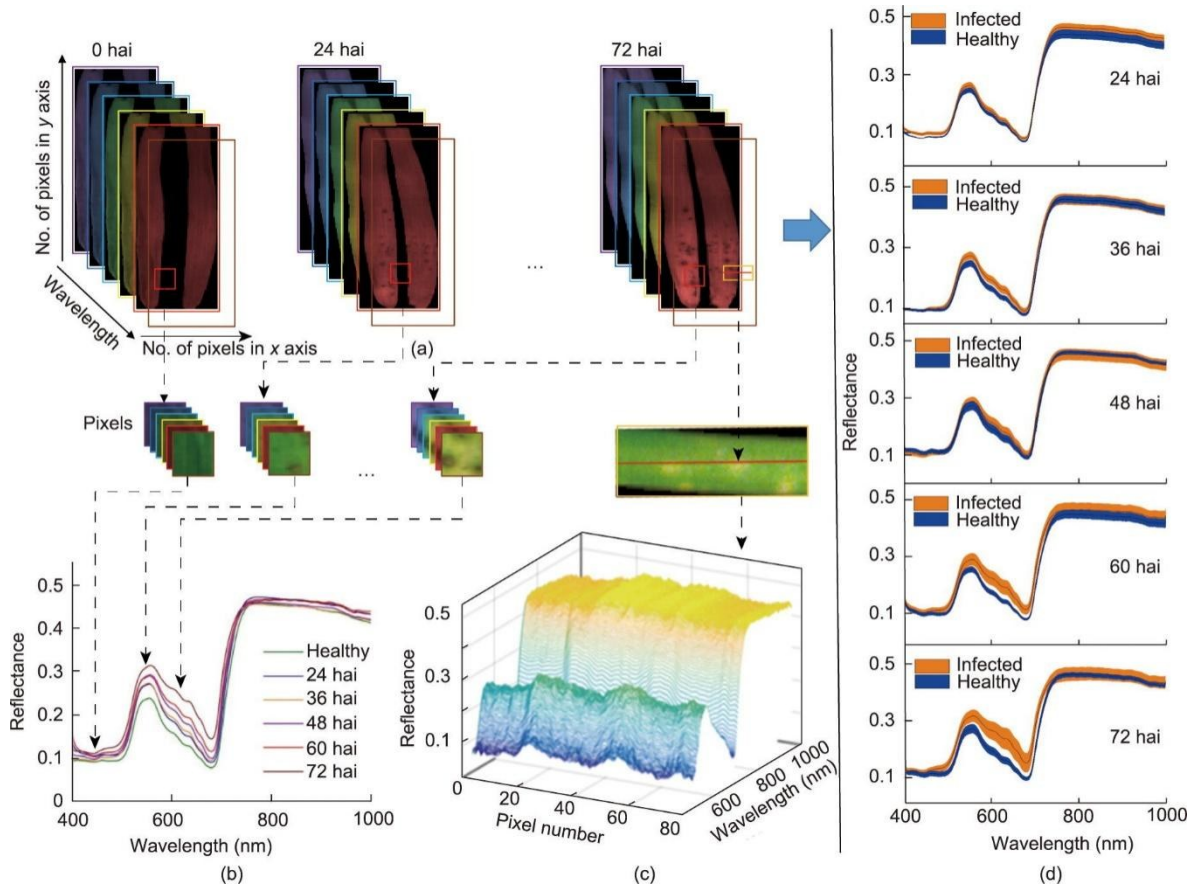


图5. 大麦叶片光谱特性对叶斑病感染的时序响应。

分的异质性有所增加[46]。感染组织的这种空间异质性如图5(c)中72 hai时染病区域的光谱曲线所示。

上述光谱观测结果证实了HSI的平均谱线可反映植物发病过程中生理生化的变化[10,16,20]。但光谱成像技术的优势没有得到充分发挥[13,21]。初始病变反应在叶片上通常呈现小而分散的感染区域。因此，有必要结合HSI的图像信息，以考虑受感染叶片的空间异质性。

### 3.4. 基于k-means和FCM的病变可视化

染病大麦叶片的聚类分析结果如图6所示。选取60 hai的叶片高光谱图像来比较不同像素级可视化分析方法的性能。聚类算法可以从高维数据中识别出感染信息[47]。k-means聚类的结果如图6(b)所示。k-means聚类能够识别叶尖附近褪绿区域，但无法识别暗棕色的坏死区域。而且，叶片的边缘被划分为一个新的类别（用蓝色标记），这与叶片光谱的实际空间分布特征并不相符。由于k-means聚类是一种无监督的硬聚类算法，一个像素只能被划分为一个类别，因此无法很好地分析植物与病原互作位点的复杂、混合光谱信号。

由FCM分析计算得到的4个类别的谱线及对应的分

布图分别如图6(c)和(d)所示。类别1(C1)的谱线表示褪绿区域，其隶属度分布图展示了叶片上褪绿区域的分布。类别4(C4)代表叶缘，呈现较低的反射率。在C2和C3的隶属度图中，虽然检测到了一些感染区域，但还是有些健康组织被错误地划分为感染区。因此，FCM也无法识别坏死组织，这可能是由于它无法考虑空间上下文信息且对图像噪声较敏感[48]。

### 3.5. 基于VCA的病变可视化和FSS提取

由于上述聚类方法无法有效识别叶斑病，因此本文采用VCA光谱解混方法(图7)。从高光谱图像中提取三个代表性光谱(EM)并生成对应的丰度图，分别如图7(b)和(c)所示。值得注意的是，所提取的EM能够利用先验知识与不同的类别相对应。在图7(b)中，EM1的光谱曲线在450~650 nm尤其是可见绿光区域出现明显的反射峰，在680~750 nm的红边效应区域反射率急剧增加，并且在近红外光区域反射率较高，说明叶肉组织中叶绿素吸收较强并且内部结构的光散射正常[20,29,49]。图7(c)中EM1的丰度图与图7(a)RGB图像中叶片健康组织的分布一致，证实了EM1代表叶片健康组织的FSS。



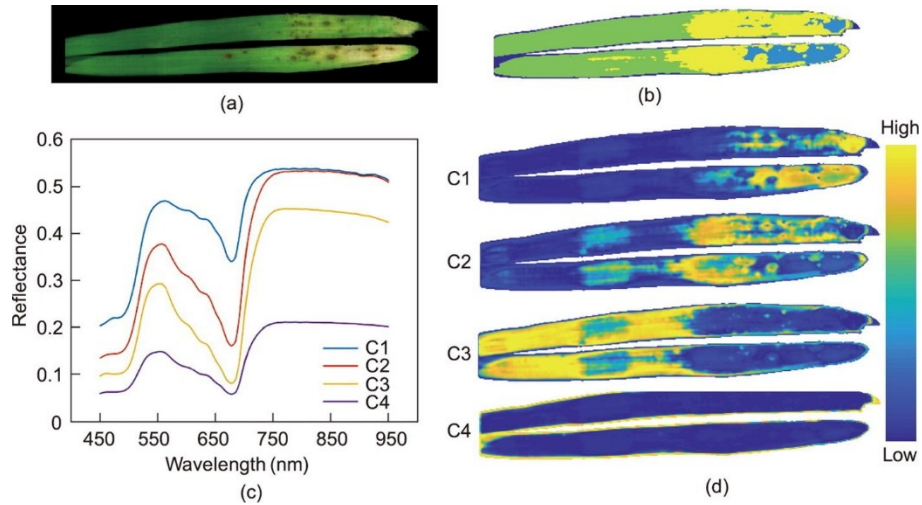


图6. 基于聚类分析的大麦叶片叶斑病可视化。(a) RGB 图像；(b)  $k$ -means 聚类结果；FCM 计算得到的4个类别的光谱特征 (c) 及它们对应的隶属度分布图 (d)。C1~C4表示1~4类。

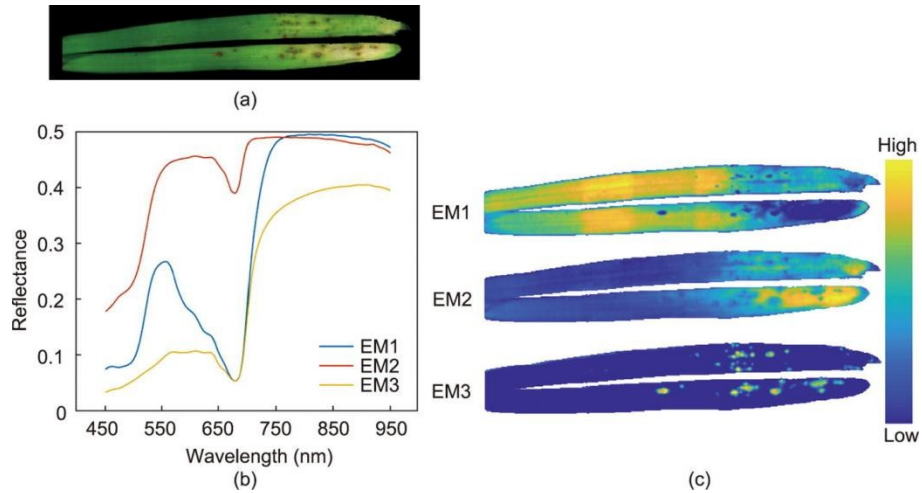


图7. 基于VCA的大麦叶斑病可视化。(a) RGB 图像；(b) EM1~EM3 光谱曲线，分别代表健康、褪绿和坏死组织的FSS；(c) EM1~EM3 的丰度图。

图7 (c) 中EM2的丰度图突出显示了染病叶片的褪绿区域。在可见绿光区域，EM2光谱曲线[图7 (b)]的反射峰消失，取而代之的是一段反射率较高(吸光度低)但相对平坦的弧线。红边效应也明显减弱，表明叶肉中的叶绿素遭到了较大的破坏。EM2光谱曲线在近红外区域的反射强度较EM1有所下降，说明褪绿组织的内部结构受到了一定程度的破坏[20,49]。因此，EM2可代表轻度感染并有褪绿迹象组织的FSS。与图6 (d) 中FCM方法得到的隶属度分布图1相比，基于VCA方法的褪绿区域的识别更加精准。

EM3的丰度图准确地捕捉到了深棕色坏死病变的位置，如图7 (c) 所示；即使是细小的颗粒状病变也清晰可见。EM3光谱曲线[图7 (b)]为坏死组织的FSS。相比于健康(EM1)和褪绿(EM2)组织的FSS，坏死组织的FSS在450~550 nm缓慢上升。值得注意的是在550~

650 nm 范围内，叶片的典型反射峰几乎被切平，且反射率极低，这是由坏死组织色素降解严重、对光的吸收较强所致。在680~950 nm 区间，叶片的典型红边光谱特征被弧形反射线所取代，并且EM3光谱线的曲率明显减小[图7 (b)]，这是坏死病变的典型特征。在780~950 nm 的近红外范围内，反射率大幅降低，表明坏死组织的内部结构被完全破坏[20,49]。为进一步验证FSS在近红外区间内反映的三种叶肉组织(健康、褪绿、坏死)的结构特性，这些叶片组织的横切面显微图像如图8所示。

图8 (a) 中的健康组织呈现了大麦叶片的典型结构，具有排列紧密的表皮层、栅栏组织和海绵组织。图8 (b) 中轻度感染的褪绿组织的结构整体保持完整，表皮层和气孔细胞均完好。然而，由于菌丝入侵并穿透细胞壁而在细胞间扩散，叶肉内部的局部结构坍塌。大麦叶片褪绿组织内部结构的部分破坏与EM2光谱曲线在近红外区反射率



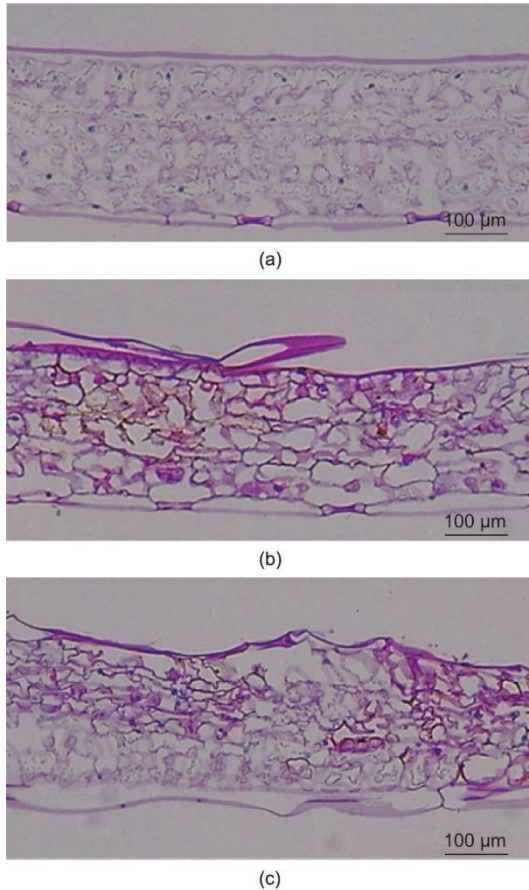


图8. 叶斑病胁迫下大麦叶片的染色切片显微图。(a) 健康组织；(b) 褪绿组织；(c) 坏死组织。

的适度下降[图7(b)]相呼应。在图8(c)所示的严重感染的坏死组织中，叶片所有层的细胞都发生坍塌或变形。上表皮层被完全破坏且形成一个空洞；下表皮层松弛，气孔受损；栅栏和海绵组织被穿透的菌丝所占据，且伴随着电解质的泄漏和真菌毒素的渗透[1]。大麦叶片坏死病变组织完全的结构破坏与图7(b)中EM3光谱曲线在近红外区域反射率的大幅降低相呼应。上述三种叶肉组织的微观结构特征与FSS在近红外区间所反应的结构特征高度一致。因此，VCA光谱解混分析提取的FSS具有一定的可解释性。此外，从显微图像中观察到，由于真菌的侵染，叶片结构的空质异性增加，这也验证了平均光谱方差随感染时间增大的现象。

### 3.6. 基于FSS的病变时空动态可视化以实现显症前诊断

通过计算24 hai、36 hai、48 hai、60 hai高光谱图像上FSS的丰度图，对病变的空间分布进行可视化，如图9所示。大麦叶片叶斑病的发生和发展状况可通过丰度图实现跟踪，同时将健康、褪绿、坏死区域明确区分。从图9可以看出，随着感染时间从24 hai延长到60 hai，可以明

显看到病害症状在发生持续而微妙的变化，健康区域逐渐减小，褪绿和坏死区域逐渐增大。显然，最早在24 hai，FSS就能够捕捉到一些微小病变，如图9(d)所示。

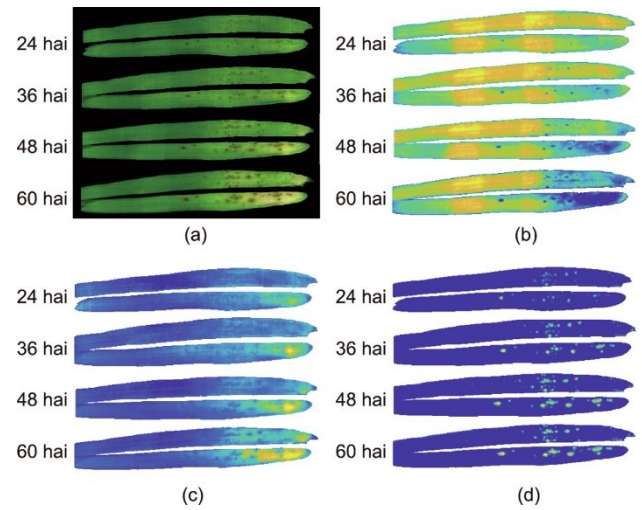


图9. 基于FSS的病变时空动态可视化以实现大麦叶片叶斑病的显症前诊断。(a) RGB；(b) 健康区域；(c) 褪绿区域；(d) 坏死区域。

计算坏死病变区域的面积占比，其时序变化如图10所示。可见，在24 hai开始出现坏死病斑，且随着感染时间延长呈指数扩展。而且，0 hai与24 hai的坏死病变面积具有显著性差异 ( $p = 0.008$ )。然而，传统PCR(图2)和生化分析(图4)在24 hai时均未发现显著差异，说明本文方法实现了叶斑病的超早期诊断和定位。

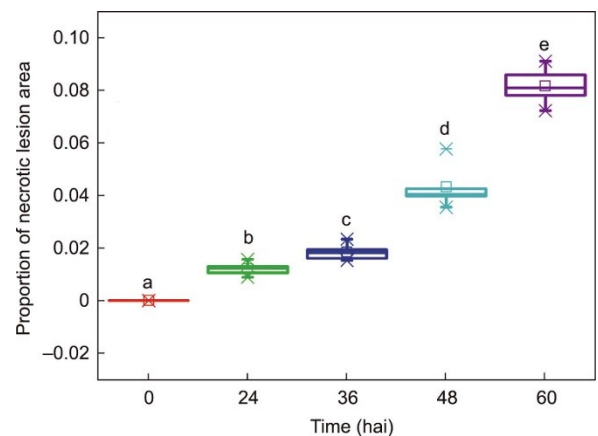


图10. 大麦叶片坏死区域占比随感染时间变化的箱线图。

### 3.7. 叶斑病胁迫下光谱响应与生化指标之间的关系

为了揭示HSI对叶斑病显症前诊断的机理，探讨了平均光谱响应与相应生化指标间的定量关系。全波段PLS回归模型的性能如表2所示。模型预测结果普遍较好 ( $R_p^2 > 0.720$ )，尤其是叶绿素和类胡萝卜素的  $R_p^2 > 0.870$ ，说明HSI的光谱特征可以定量表征病害胁迫叶片的生化特性。

基于CARS或RF选择特征波长并构建MLR模型,其结果得到改进,如附录A中的表S3所示。对最终确定的最佳特征波长(见附录A中的图S2)进行了光谱指认分析(见附录A中的表S4)[32,49–51],最终构建的6个MLR模型的 $R_p^2$ 均高于0.84(散点图见附录A中的图S3)。

表2 叶斑病胁迫下大麦叶片生化指标全波段PLS模型定量分析结果

Biochemical indicator	LV	$R_c^2$	RMSEC	RPD <sub>c</sub>	$R_p^2$	RMSEP	RPD <sub>p</sub>
Chl-a ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	6	0.939	0.054	3.568	0.879	0.077	2.972
Chl-b ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	12	0.947	0.016	3.677	0.883	0.024	3.173
Car ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	13	0.918	0.008	3.320	0.874	0.010	2.904
AsA ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	10	0.863	0.034	2.782	0.729	0.055	1.889
GSH ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	9	0.847	3.769	2.653	0.841	4.098	2.635
MDA ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	11	0.888	0.068	3.179	0.754	0.101	2.001

LV: latent variable;  $R_c^2$ : determination coefficient of the calibration set; RMSEC: root mean square error of the calibration set; RPD<sub>c</sub>: residual predictive deviation of the calibration set;  $R_p^2$ : determination coefficient of the prediction set; RMSEP: root mean square error of the prediction set; RPD<sub>p</sub>: residual predictive deviation of the prediction set.

### 3.8. VCA在其他植物病害的试验

为了验证VCA方法在其他植物-病原系统中的泛化性能,以早疫病感染的茄子叶片和角斑病感染的黄瓜叶片为例进行了分析。病变可视化结果分别如图11和图12所示。可以看出,茄子叶片上的病变处于早期感染阶段,而黄瓜叶片上的病变则处于中期感染阶段。通过VCA光谱解混分析,茄子叶片上的每个像素光谱可分解为三个EM,分别代表叶脉、健康组织和坏死组织的FSS;黄瓜叶片上的每个像素光谱分解为三个EM,分别代表健康组织、淡黄色褪绿组织和黄棕色病变组织的FSS。茄子叶片EM3的丰度图与黄瓜叶片EM2和EM3的丰度图中的染病区域相较于其对应的RGB图像更为清晰明显。若将这些FSS用于茄子和黄瓜早期感染显症前的高光谱图像,可预期达到与小麦叶斑病显症前诊断类似的结果。

## 4. 讨论

### 4.1. 大麦叶片叶斑病真菌侵染及其生化响应

真菌病原菌*B. sorokiniana*侵染大麦叶片后,随着侵染时间延长,FPDR呈上升趋势(图2)。在真菌侵染4 hai内,分生孢子开始在叶片上萌发;侵染8 hai,附着胞形成;在侵染12 hai,菌丝侵入叶片角质层;在侵染24 hai,菌丝从最初感染细胞蔓延到相邻细胞[2–4]。真菌初始定殖过程对应图中FPDR在0~24 hai的缓慢上升阶段。随后,在24~48 hai,FPDR适度上升,这是由于真菌通过侵染菌丝的快速分裂侵入植物组织,沿着叶肉组织的细胞间

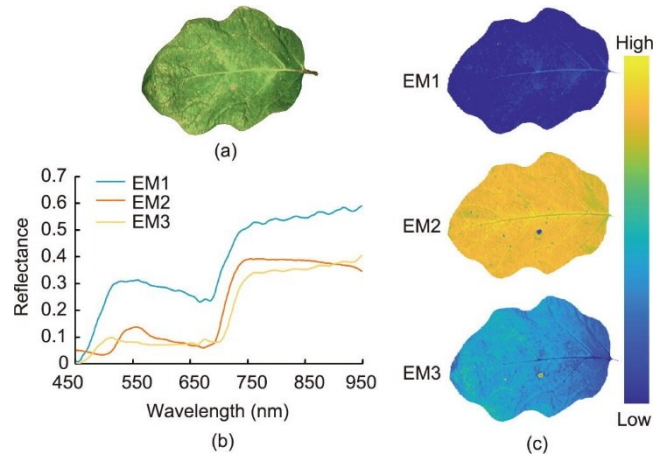


图11. 基于VCA方法的茄子叶片早疫病可视化。(a) RGB图像;(b) EM1~EM3光谱曲线分别表示叶脉、健康组织和坏死组织的FSS;(c) EM1~EM3的丰度图。

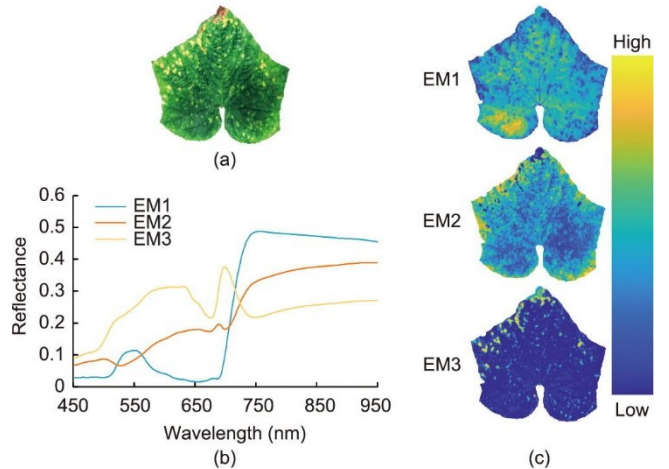


图12. 基于VCA方法的黄瓜叶片角斑病可视化。(a) RGB图像;(b) EM1~EM3光谱曲线分别表示健康组织、淡黄色褪绿组织和黄棕色病变组织的FSS;(c) EM1~EM3的丰度图。

隙分枝并产生分生孢子梗[3]。在适宜的条件下,分生孢子梗从叶片气孔向外伸出,并在48 hai内产生新一代分生孢子[2]。因此,真菌在叶片组织的强烈侵入和定殖大致出现在60 hai,解释了在60 hai FPDR的快速上升。

在真菌侵染胁迫下,染病大麦叶片早期的生化指标的时序变化如图4所示。*B. sorokiniana*侵染后,菌丝扩散导致叶肉结构破坏,真菌毒素分泌导致叶肉细胞坍塌[1]。在病害胁迫下,叶片的细胞内氧化代谢增强,产生大量ROS,进而在细胞水平上诱导出一系列生化变化[18,52]。ROS的增加和真菌毒素的渗透导致光合器官受到破坏,光合作用受到抑制[1,17],表现为光合色素,包括Chl-a、Chl-b、Car随着感染时间变化持续降解(图4)。这与之前的研究发现[11,46]一致。在染病叶片中,相较于叶绿素含量的快速下降,Car含量下降则更加迟缓(显著性差异分别出现在36 hai和60 hai),这可能是由Car的光保护作用



[17]所致。

细胞内 ROS 过度累积会引起膜脂的过氧化, 进而导致 MDA 浓度升高[17–18], 如图 4 所示。MDA 含量是脂质过氧化和胁迫诱导的细胞损伤的重要指标, 与小麦叶斑病的严重程度和病斑大小呈正相关[53]。在 60 hai 前, 染病叶片中 MDA 含量稳步增加, 而在 60 hai, 染病叶片中的 MDA 含量急剧增加, 这与 PCR 测定的 FPDR 的增加趋势相吻合, 再次表明在 60 hai 真菌侵染程度较高。为了抵御大量 ROS 造成的损害, 大麦叶片中的一系列抗氧化循环被增强, 表现为感染组中作为非酶抗氧化剂的 AsA 和 GSH 的合成量平稳上升[17] (图 4)。大麦叶片生化指标的显著性差异最早出现在 36 hai, 这与 PCR 检测结果一致, 说明了探究早期生化响应的重要性。

#### 4.2. 基于 FSS 的病变时空动态可视化和显症前诊断

为了充分利用高分辨率的光谱和空间信息, 对高光谱图像进行像素级的分析, 以可视化早期感染阶段植物和病原菌之间的互动过程。本文采用了三种不同的分析方法, 分别是 *k*-means 聚类、FCM 和 VCA。*k*-means 无法很好地区分健康和染病组织, FCM 虽然提高了褪绿组织的可视化结果, 但不能准确识别坏死组织。只有 VCA 能够准确识别染病区域, 并成功区分轻度感染褪绿区域和重度感染坏死区域。将 VCA 提取的 FSS 应用于时序高光谱图像 (图 9 和图 10), 以原位可视化叶斑病的发生与发展过程, 在 24 hai 实现活体大麦叶斑病的显症前诊断。该方法明显早于传统 PCR 检测方法 (图 2) 和生化指标检测方法 (图 4), 后两者的显著性差异均出现在 36 hai。这是由于传统的生理生化检测方法是一种湿化学分析方法, 该方法是基于整块叶片组织的平均响应, 无法捕捉染病初期叶片组织结构和生化特性的细微、分散的空间异质性[46]。有研究指出, PCR 方法虽然灵敏、准确, 但在显症前阶段不一定可靠, 原因是此时植物内部病原菌少量且分布不均[11]。相比之下, HSI 的光谱特征反映了染病叶片组织生化信息和结构特性的细微变化[10,16,20], 高分辨率的图像能够动态反映像素级的异质性空间形态, 尤其当像素光谱的信息混合问题被很好地解决。这一发现也强调了近端 HSI 的空间分辨率在叶片病害检测和识别方面的重要性。在之前甜菜病害的研究中, HSI 的空间分辨率会对传感器灵敏度产生影响[21]。

HSI 除了能够可视化植物-病原体互作位点的异质性分布, 与传统测量方法相比, 其另一个优势在于能够在时间维度上表征病害发病机制[10]。这是由于 HSI 能够进行时序的无损监测, 如图 9 所示。前人也基于 HSI 可视化了

大麦叶片与病原菌互作的时空异质性, 分别在 4 dai [13]、4 dai [29]、2 dai [30]和 24 hai [31]实现了显症前诊断。然而, 这些诊断结果仅仅与人眼观测的时间进行比较, 没有采用 PCR 方法进行验证。而本研究的叶斑病显症前诊断通过 PCR 方法进行了确认。前人在对病害高光谱图像的分析中, 也采用了光谱解混分析方法[31], 但并没有提取跨时间的病变 FSS。在本研究中提取的 FSS 有三重优势: 第一, 提取的 FSS 能够捕捉活体大麦叶斑病的独特特征, 并适用于病害早期感染阶段的时序高光谱图像。第二, 相对于选择几个离散特征波长进行早期病害诊断[23,25], 本文提取的 FSS 跨越了连续的全波长范围。由于病原菌引起的生化和结构变化较为复杂, 只有全波段 FSS 才能完全反映叶片组织对病害的光谱响应。而且, 与少数的单波段特征波长相比, 全波段 FSS 具有更强的鲁棒性。第三, FSS 对褪绿和坏死组织的生化和结构变化具有明确的物理解释, 并通过对染病叶片组织的显微观察验证了 FSS 对结构特性的解释性 (图 8)。因此, 本研究提取的全波段 FSS 具有代表性、鲁棒性和可解释性, 它们的时序应用可原位跟踪植物-病原菌互作的时空动态变化, 实现显症前诊断。此外, Mahlein 等[10]呼吁将获取的高光谱图像与植物-病原菌互作中的生物变化相关联, 因此需进一步探究 HSI 的诊断机制。

#### 4.3. HSI 显症前诊断机制

全波段和特征波长构建的回归模型均取得了良好的性能。它们与 6 种生化成分中化学官能团吸收的相关性分析验证了这些生化指标的光谱定量机制。前人也对植物胁迫下的生化指标进行定量。例如, Yendrek 等[54]利用高光谱反射率建立了叶片叶绿素、氮素和蔗糖含量的偏最小二乘预测模型, 以评估不同玉米品系对臭氧浓度升高的生化响应差异。还有学者利用光谱技术对含铅气溶胶颗粒胁迫下茶叶幼苗的色素、水分和 AsA 等多项生化指标进行定量表征[34]。

光谱响应和宿主生化指标之间存在较强数学关联, 表明全波段 FSS 可以反映早期染病组织生化和结构信息的复杂时空动态变化[46], 解释了 FSS 在表征病变时序变化上的有效性。同时, 考虑 HSI 的高空间分辨率, 光谱特征所反映的生化信息和结构特性是像素级的[20,49]。FSS 检测机制的揭示使得 HSI 显症前诊断更有依据。此外, VCA 方法在另外两种植物病害上的试验表明, HSI 技术与 VCA 方法相结合对植物叶部病害的早期诊断具有显著的推广潜力。在未来的工作中, 将在不同的尺度 (如微观尺度、冠层尺度) 对本研究结果进行评估, 将加入更多的光学传感



器（如叶绿素荧光），以加强对病变特征的捕捉。本研究对植物病害诊断和植物抗性筛选提供理论和技术支撑。

## 5. 结论

本研究通过采集叶斑病胁迫下活体大麦叶片的时序高光谱图像，在像素水平上表征病害的发生和发展过程，实现快速、原位、显症前诊断。采用传统的PCR分析和生化指标测定探究了病害胁迫下大麦叶片的早期生理生化响应。这两种方法在36 hai时健康和染病样本之间均出现显著性差异。对于植物-病原菌互作的原位可视化分析，光谱分解VCA方法表现最好，提取了具有代表性的FSS，其丰度图对应于健康组织、轻度感染褪绿组织和严重感染坏死组织的空间分布。将FSS应用于时序测量的活体叶片样本高光谱图像，可以在像素水平上直观地监测植物-病原菌早期互作位点的时空动态异质性，证明了FSS的适用性和鲁棒性。该方法实现了在24 hai的叶斑病显症前诊断，比传统的PCR或生化检测方法提前了12 h。最后，通过回归模型的构建和最佳特征波长的识别，建立了光谱响应与生化指标之间的数学关系。这些指标的量化取得了良好的效果， $R_p^2$ 大于0.84（见附录A中的图S3），揭示了HSI和FSS的显症前诊断机制。总体结果表明，基于HSI和活体植物性状变化之间的关联，提取的FSS可以表征叶斑病的发展动态，实现显症前诊断。此外，该方法在其他植物病害的检测试验表明其在病害早期控制方面具有显著的推广潜力。

## 致谢

本研究的支撑项目包括：浙江省重点研发计划项目（2022C02044）、国家自然科学基金（32171889、32071895）、浙江省自然科学基金（LQ22C130004）、国家重点研发计划项目（2018YFD0700501）。

## Authors' contribution

Fengle Zhu, Zhenzhu Su, Xiaoli Li, and Yong He conceived the study. Xiaoli Li acquired the funding. Zhenzhu Su, Ruiqing Zhou, Anand Babu Perumal, and Mostafa Gouda collected the experimental data. Alireza Sanaeifar, Ruiqing Zhou, Fengle Zhu, and Anand Babu Perumal contributed to the algorithm development and data analysis.

Fengle Zhu, Zhenzhu Su, Alireza Sanaeifar, and Ruiqing Zhou contributed to the result interpretation. Fengle Zhu and Zhenzhu Su wrote the manuscript. Fengle Zhu, Alireza Sanaeifar, and Xiaoli Li contributed to the editing of the manuscript.

## Compliance with ethics guidelines

Fengle Zhu, Zhenzhu Su, Alireza Sanaeifar, Anand Babu Perumal, Mostafa Gouda, Ruiqing Zhou, Xiaoli Li, and Yong He declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.10.006>.

## References

- [1] Kumar J, Schäfer P, Hückelhoven R, Langen G, Baltruschat H, Stein E, et al. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control double dagger. *Mol Plant Pathol* 2002;3(4):185–95.
- [2] Novakazi F, Afanasenko O, Lashina N, Platz GJ, Snowdon R, Loskutov I, et al. Genome-wide association studies in a barley (*Hordeum vulgare*) diversity set reveal a limited number of loci for resistance to spot blotch (*Bipolaris sorokiniana*). *Plant Breed* 2020;139(3):521–35.
- [3] Acharya K, Duta AK, Pradhan P. *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.: the most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas. *Aust J Crop Sci* 2011;5(9):1064–71.
- [4] Gupta PK, Chand R, Vasistha NK, Pandey SP, Kumar U, Mishra VK, et al. Spot blotch disease of wheat: the current status of research on genetics and breeding. *Plant Pathol* 2018;67(3):508–31.
- [5] Murray TD, Parry DW, Cattlin ND. A color handbook of diseases of small grain cereal crops. Ames: Iowa State University Press; 1998.
- [6] Pandey SP, Kumar S, Kumar U, Chand R, Joshi AK. Sources of inoculum and reappearance of spot blotch of wheat in rice–wheat cropping systems in eastern India. *Eur J Plant Pathol* 2005;111(1):47–55.
- [7] Sharma RC, Duveiller E. Advancement toward new spot blotch resistant wheats in South Asia. *Crop Sci* 2007;47(3):961–8.
- [8] Kumar D, Chand R, Prasad LC, Joshi AK. A new technique for monoconidial culture of the most aggressive isolate in a given population of *Bipolaris sorokiniana*, cause of foliar spot blotch in wheat and barley. *World J Microbiol Biotechnol* 2007;23(11):1647–51.
- [9] Al-Sadi AM. *Bipolaris sorokiniana*-induced black point, common root rot, and spot blotch diseases of wheat: a review. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11:584899.
- [10] Mahlein AK, Kuska MT, Behmann J, Polder G, Walter A. Hyperspectral sensors and imaging technologies in phytopathology: state of the art. *Annu Rev Phytopathol* 2018;56(1):535–58.
- [11] Martinelli F, Scalenghe R, Davino S, Panno S, Scuderi G, Ruisi P, et al. Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agron Sustain Dev* 2015;35(1):1–25.
- [12] Lowe A, Harrison N, French AP. Hyperspectral image analysis techniques for the detection and classification of the early onset of plant disease and stress. *Plant Methods* 2017;13(1):80.

- [13] Thomas S, Wahabzada M, Kuska MT, Rascher U, Mahlein AK. Observation of plant–pathogen interaction by simultaneous hyperspectral imaging reflection and transmission measurements. *Funct Plant Biol* 2016;44(1):23–34.
- [14] Cen H, Weng H, Yao J, He M, Lv J, Hua S, et al. Chlorophyll fluorescence imaging uncovers photosynthetic fingerprint of citrus Huanglongbing. *Front Plant Sci* 2017;8:1509.
- [15] Ghosal S, Blystone D, Singh AK, Ganapathysubramanian B, Singh A, Sarkar S. An explainable deep machine vision framework for plant stress phenotyping. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;115(18):4613–8.
- [16] Abdulridha J, Ampatzidis Y, Qureshi J, Roberts P. Laboratory and UAV-based identification and classification of tomato yellow leaf curl, bacterial spot, and target spot diseases in tomato utilizing hyperspectral imaging and machine learning. *Remote Sens* 2020;12(17):2732.
- [17] Das K, Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci* 2014;2:53.
- [18] Kaur S, Bhardwaj RD, Kaur J, Kaur S. Induction of defense-related enzymes and pathogenesis-related proteins imparts resistance to barley genotypes against spot blotch disease. *J Plant Growth Regul* 2021;41(2):682–96.
- [19] Zarco-Tejada PJ, Camino C, Beck PSA, Calderon R, Hornero A, Hernández-Clemente R, et al. Previsual symptoms of *Xylella fastidiosa* infection revealed in spectral plant-trait alterations. *Nat Plants* 2018;4(7):432–9.
- [20] Zhang N, Yang G, Pan Y, Yang X, Chen L, Zhao C. A review of advanced technologies and development for hyperspectral-based plant disease detection in the past three decades. *Remote Sens* 2020;12(19):3188.
- [21] Mahlein AK, Steiner U, Hillnhütter C, Dehne HW, Oerke EC. Hyperspectral imaging for small-scale analysis of symptoms caused by different sugar beet diseases. *Plant Methods* 2012;8(1):3.
- [22] Bendel N, Backhaus A, Kicherer A, Köckerling J, Maixner M, Jarausch B, et al. Detection of two different grapevine yellows in *Vitis vinifera* using hyperspectral imaging. *Remote Sens* 2020;12(24):4151.
- [23] Shuaibu M, Lee WS, Schueller J, Gader P, Hong YK, Kim S. Unsupervised hyperspectral band selection for apple Marssonina blotch detection. *Comput Electron Agric* 2018;148:45–53.
- [24] Arens N, Backhaus A, Döll S, Fischer S, Seiffert U, Mock HP. Non-invasive presymptomatic detection of *Cercospora beticola* infection and identification of early metabolic responses in sugar beet. *Front Plant Sci* 2016;7:1377.
- [25] Gao Z, Khot LR, Naidu RA, Zhang Q. Early detection of grapevine leafroll disease in a red-berried wine grape cultivar using hyperspectral imaging. *Comput Electron Agric* 2020;179:105807.
- [26] Abdulridha J, Ampatzidis Y, Roberts P, Kakarla SC. Detecting powdery mildew disease in squash at different stages using UAV-based hyperspectral imaging and artificial intelligence. *Biosyst Eng* 2020;197:135–48.
- [27] Abdulridha J, Ampatzidis Y, Kakarla SC, Roberts P. Detection of target spot and bacterial spot diseases in tomato using UAV-based and benchtop-based hyperspectral imaging techniques. *Precis Agric* 2020;21(5):955–78.
- [28] Thomas S, Behmann J, Steier A, Kraska T, Müller O, Rascher U, et al. Quantitative assessment of disease severity and rating of barley cultivars based on hyperspectral imaging in a non-invasive, automated phenotyping platform. *Plant Methods* 2018;14(1):45.
- [29] Kuska M, Wahabzada M, Leucker M, Dehne HW, Kersting K, Oerke EC, et al. Hyperspectral phenotyping on the microscopic scale: towards automated characterization of plant–pathogen interactions. *Plant Methods* 2015;11(1):28.
- [30] Kuska MT, Brugger A, Thomas S, Wahabzada M, Kersting K, Oerke EC, et al. Spectral patterns reveal early resistance reactions of barley against *Blumeria graminis* f. sp. hordei. *Phytopathology* 2017;107(11):1388–98.
- [31] Zhou RQ, Jin JJ, Li QM, Su ZZ, Yu XJ, Tang Y, et al. Early detection of *Magnaporthe oryzae*-infected barley leaves and lesion visualization based on hyperspectral imaging. *Front Plant Sci* 2019;9:1962.
- [32] Zhu F, Zhang D, He Y, Liu F, Sun DW. Application of visible and near infrared hyperspectral imaging to differentiate between fresh and frozen–thawed fish fillets. *Food Bioprocess Technol* 2013;6(10):2931–7.
- [33] Wellburn AR, Lichtenthaler H. Formulae and program to determine total carotenoids and chlorophylls A and B of leaf extracts in different solvents. In: *Proceedings of the VIth International Congress on Photosynthesis*; 1983 Aug 1–6; Brussels, Belgium. Netherlands: Springer; 1984. p. 9–12.
- [34] Sanaeifar A, Zhu F, Sha J, Li X, He Y, Zhan Z. Rapid quantitative characterization of tea seedlings under lead-containing aerosol particles stress using Vis-NIR spectra. *Sci Total Environ* 2022;802:149824.
- [35] Chen HZ, Zhang M, Guo Z. Discrimination of fresh-cut broccoli freshness by volatiles using electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry. *Postharvest Biol Technol* 2019;148:168–75.
- [36] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
- [37] Deshmukh S, Hüchelhoven R, Schäfer P, Imani J, Sharma M, Weiss M, et al. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(49):18450–7.
- [38] Deshmukh SD, Kogel KH. *Piriformospora indica* protects barley from root rot caused by *Fusarium graminearum*. *J Plant Dis Prot* 2007;114(6):263–8.
- [39] Macqueen J. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. *Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*, 1967; Oakland, CA, USA. Cambridge: Cell Press; 1969.
- [40] Bezdek JC, Ehrlich R, Full W. FCM: the fuzzy *c*-means clustering algorithm. *Comput Geosci* 1984;10(2–3):191–203.
- [41] Keshava N, Mustard JF. Spectral unmixing. *IEEE Signal Process Mag* 2002; 19(1):44–57.
- [42] Nascimento JMP, Dias JMB. Vertex component analysis: a fast algorithm to unmix hyperspectral data. *IEEE Trans Geosci Remote Sens* 2005; 43(4): 898–910.
- [43] Huang Y, Dong W, Sanaeifar A, Wang X, Luo W, Zhan B, et al. Development of simple identification models for four main catechins and caffeine in fresh green tea leaf based on visible and near-infrared spectroscopy. *Comput Electron Agric* 2020;173:105388.
- [44] Liu Z, Cai W, Shao X. Outlier detection in near-infrared spectroscopic analysis by using Monte Carlo cross-validation. *Sci China B Chem* 2008;51(8):751–9.
- [45] Maldonado AIL, Rodríguez-Fuentes H, Contreras JAV. *Hyperspectral imaging in agriculture, food and environment*. London: IntechOpen; 2018.
- [46] Tian L, Xue B, Wang Z, Li D, Yao X, Cao Q, et al. Spectroscopic detection of rice leaf blast infection from asymptomatic to mild stages with integrated machine learning and feature selection. *Remote Sens Environ* 2021;257:112350.
- [47] Leucker M, Wahabzada M, Kersting K, Peter M, Beyer W, Steiner U, et al. Hyperspectral imaging reveals the effect of sugar beet quantitative trait loci on *Cercospora* leaf spot resistance. *Funct Plant Biol* 2017;44(1):1.
- [48] Krinidis S, Chatzis V. A robust fuzzy local information *c*-means clustering algorithm. *IEEE Trans Image Process* 2010;19(5):1328–37.
- [49] Ollinger SV. Sources of variability in canopy reflectance and the convergent properties of plants. *New Phytol* 2011;189(2):375–94.
- [50] Cen H, He Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends Food Sci Technol* 2007;18(2):72–83.
- [51] Walsh KB, Blasco J, Zude-Sasse M, Sun X. Visible-NIR ‘point’ spectroscopy in postharvest fruit and vegetable assessment: the science behind three decades of commercial use. *Postharvest Biol Technol* 2020;168:111246.
- [52] Able AJ. Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma* 2003;221(1–2):137–43.
- [53] Yusuf CS, Chand R, Mishra VK, Joshi AK. The association between leaf malondialdehyde and lignin content and resistance to spot blotch in wheat. *J Phytopathol* 2016;164(11–12):896–903.
- [54] Yendrek CR, Tomaz T, Montes CM, Cao Y, Morse AM, Brown PJ, et al. High-throughput phenotyping of maize leaf physiological and biochemical traits using hyperspectral reflectance. *Plant Physiol* 2017;173(1):614–26.