

利用稻米垩白度分析软件测量叶片相对病斑面积

郑燕¹, 吴为人^{1,2}

(¹浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029; ²福建农林大学生命科学学院, 福州 350002)

摘要: 【目的】提出一种利用稻米垩白度分析软件 Chalkiness 1.0 测量衡量植物叶片病害综合指标之一叶片相对病斑面积 (RLA) 的方法。【方法】通过扫描或拍照获得病害叶片的数字图像; 然后利用图像处理软件 (如 Photoshop) 对图像进行处理, 最重要的是用肉眼识别病斑并用“画笔工具”涂黑, 使叶片中的病斑明晰化; 最后利用 Chalkiness 1.0 计算出图像中的 RLA。【结果】用本方法对稻瘟病叶上病斑的相对面积进行测量。比较 5 次重复测量的结果, 发现该方法重复性好, 误差小。【结论】该方法简单、快速、准确, 具有广阔的应用前景。

关键词: 稻米垩白度; Chalkiness 1.0; 叶片相对病斑面积; 测量方法

A Method for Measuring Relative Lesion Area on Leaves Using a Rice Chalkiness Ratio Analysis Software

ZHENG Yan¹, WU Wei-ren^{1,2}

(¹College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029; ²College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: 【Objective】Relative lesion area (RLA) is a comprehensive index for leaf diseases, but is difficult to be measured. In this paper, a method for measuring RLA using a rice chalkiness ratio analysis software Chalkiness 1.0 was proposed. 【Method】First, a digital image of diseased leaves is obtained with scanner or digital camera. Then, the image is treated with a professional image treatment software (e.g. Photoshop). The most important operation in this step is to identify lesions by human eyes and black the lesions with the paintbrush tool, making them look plain. Lastly, the RLA in the image is calculated with Chalkiness 1.0. 【Result】This method was adopted to measure the RLA of rice blast. By comparing the results of five replicated measurements, it was found that the measurement was highly repeatable with small errors. 【Conclusion】This method is simple, quick and precise and would be widely applicable.

Key words: Rice chalkiness ratio; Chalkiness 1.0; Relative lesion area; Measuring method

0 引言

【研究意义】植物的病虫害是制约农业高产、优质、高效的重大障碍^[1]。准确评价植物病害的严重程度对病害防治、抗源鉴定、抗病育种和抗病性遗传研究都是十分必要的。植物病症是一个复杂的性状, 如何对其进行科学的测量, 还没有统一的标准。常用的方法是根据叶片或其它部位上病斑的大小、面积或数

目对病害发生的程度进行定级。目前有很多病害采用病斑分级的方法进行病害严重程度分析, 如稻瘟病^[2]、苜蓿褐斑病^[3]、玉米锈病^[4]、番茄灰霉病^[5]、大豆根腐病^[6]、大豆灰斑病^[7]、玉米弯孢菌叶斑病^[8]、水稻白叶枯病^[9]、水稻细条病^[10]、黄瓜白粉病^[11]、烟草赤星病^[12]等。这种方法操作简便, 对病害防治、抗源鉴定和抗病育种一般都是可行的。但是, 这种方法比较粗糙, 带有较大的主观性, 误差较大, 对遗传研究来说,

收稿日期: 2007-04-02; 接受日期: 2007-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助 (30671123)

作者简介: 郑燕 (1981-), 女, 福建仙游人, 博士研究生, 研究方向为植物与病原菌互作。E-mail: swallow1318@yahoo.com.cn。通讯作者吴为人 (1960-), 福建福州人, 教授, 研究方向为植物遗传学与植物分子育种。Tel: 0571-86971910; E-mail: wuwr@zju.edu.cn

除了鉴定效应较大的主效抗病基因可以使用之外,对于效应较小的抗病基因或数量性状基因座(QTL)的检测不太适合。对于症状主要表现在叶片上的病害,单位叶面积上的病斑面积(即相对病斑面积,relative lesion area,RLA)是衡量病害严重程度的一个客观指标^[13],它综合反映了病原菌对植物叶片的侵染能力和病斑的扩展能力。因此,用这样的指标进行抗病性遗传研究是比较理想的。【前人研究进展】前人已经提出了多种测量叶病斑面积的方法。一种方法是用电子测径器测量病斑的最大长度 L 和最大宽度 W (两者成直角),然后用公式近似计算病斑面积^[14,15]或利用十字交叉法测量病斑直径并计算病斑面积^[16,17]。另一种方法是用每格面积已知的纱网^[18,19]或有机玻璃制成的标准尺^[20]测量病斑面积。这种方法测量较准确,但十分费工费时,当要测量的样品较多时,由于操作者的疲劳,很容易出错。此外,有一些专门测量叶病斑面积的仪器,如便携式叶面图像分析仪CI-420、叶面积测定仪AM300等。但这些仪器价格昂贵,而且由于不同病斑的大小、颜色都会差异很大,仪器对病斑的自动识别往往并不准确,会造成较大的误差。【本研究切入点】叶片病斑面积的测量还是一个难题,目前尚未找到很好的解决方法。Chalkiness 1.0(垩白分析系统)是由湖南省教育厅植物激素重点实验室用Visual C++ 6.0开发的一个基于微软Windows 98平台的稻米垩白度分析软件^[8]。该软件能够读入稻米样品的扫描图像文件,自动识别图像中米粒的轮廓和垩白区域的边界,计算出图像中所有米粒的总投影面积和所有垩白的总面积,从而计算出垩白度,即垩白面积占米粒面积的百分比。不难看出,若将叶片比作米粒,病斑比作垩白,则测量RLA与测量垩白度颇为相似。因此,利用Chalkiness 1.0软件的功能,也能够测量RLA。【拟解决的关键问题】因此,很有必要建立一种方便实用的能够客观测量叶片病斑面积的方法。本文提出一种利用稻米垩白度分析软件Chalkiness 1.0结合常用的图像处理软件测量RLA的方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为水稻苗期稻瘟病叶片。

1.2 方 法

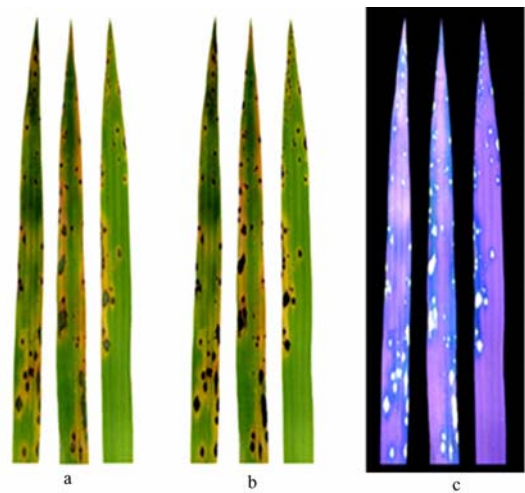
将水稻稻瘟病叶片经扫描仪扫描后,用图像处理软件Photoshop对叶片图片进行预处理,再用垩白分析软件Chalkiness1.0测量叶片相对病斑面积。

2 结果与分析

2.1 稻瘟病叶片图像的获得与预处理

第1步:将病叶用双面胶粘在白纸上,用扫描仪扫描或数码相机拍照转化成数字图像文件(图1-a)。

第2步:将图像读入图像处理软件(如常用的Photoshop)中,用画笔工具将叶片上所有病斑都涂成黑色(图1-b)。这样做的目的是为了Chalkiness 1.0软件能够准确地识别出所有病斑并准确计算出病斑的大小。一般而言,各个病斑的颜色存在较大的差异,而且每个病斑中的颜色也往往是不均匀的。因此,如果直接用扫描得到的图像来测量病斑面积,则Chalkiness 1.0软件将无法有效地识别病斑。



a: 稻瘟病害叶片原图; b: 将病斑人工描黑; c: 反相处理
a: Original image of rice leaves; b: Lesions are blacked artificially; c: Antiphase of the treated image of rice leaves

图1 稻瘟病害叶片图像的预处理

Fig. 1 Rice leaves with blast lesions

第3步:在图像处理软件中将图像转换为反相(图1-c)。这样做的原因是,Chalkiness 1.0要求的图像必须以黑色为背景,而被测量的前景(米粒)必须是浅色的,其中垩白是白色的。将病叶图像反相后,原来白色的背景就变成黑色,而涂成黑色的病斑则变成白色,正好符合软件的要求。

第4步:在图像处理软件中将图像调整到适合的大小。Chalkiness 1.0要求图像高度 ≤ 400 像素,宽度 ≤ 660 像素。若超出此范围,Chalkiness 1.0将只能识别一部分图像。另外,图像中前景(叶片)的四周必须是黑色的背景(图1-c),亦即前景不能碰到图像的

边缘, 这样 Chalkiness 1.0 才能识别出前景的轮廓。

2.2 用 Chalkiness 1.0 测量 RLA

启动 Chalkiness 1.0, 点击“打开图片”按钮, 读入图像(图 2-a)。注意, 免费使用的 Chalkiness 1.0 测试版只能识别 BMP 格式文件, 所以在图像处理软件中处理过的图像必须保存成 BMP 格式。图像读入后, Chalkiness 1.0 会自动画出叶片和病斑的轮廓。用肉眼观察软件画出的病斑轮廓是否准确。一般而言, 采用软件默认的设置即可很好地画出病斑的轮廓。如

果感觉病斑轮廓画得不理想, 可以通过改变设置来调整。点击“垩白设置”按钮, 再将鼠标指针点到某个病斑上, 则病斑轮廓会发生相应的改变。这个操作可以重复多次, 直至效果满意为止。病斑轮廓设置好后, 点击“开始统计”按钮, 即可算出 RLA (软件中显示为垩白度)。

笔者也用其它植物的病叶对该方法进行了检验, 结果表明都是可行的。图 2-b 显示对花生褐斑病的 RLA 测量情况。

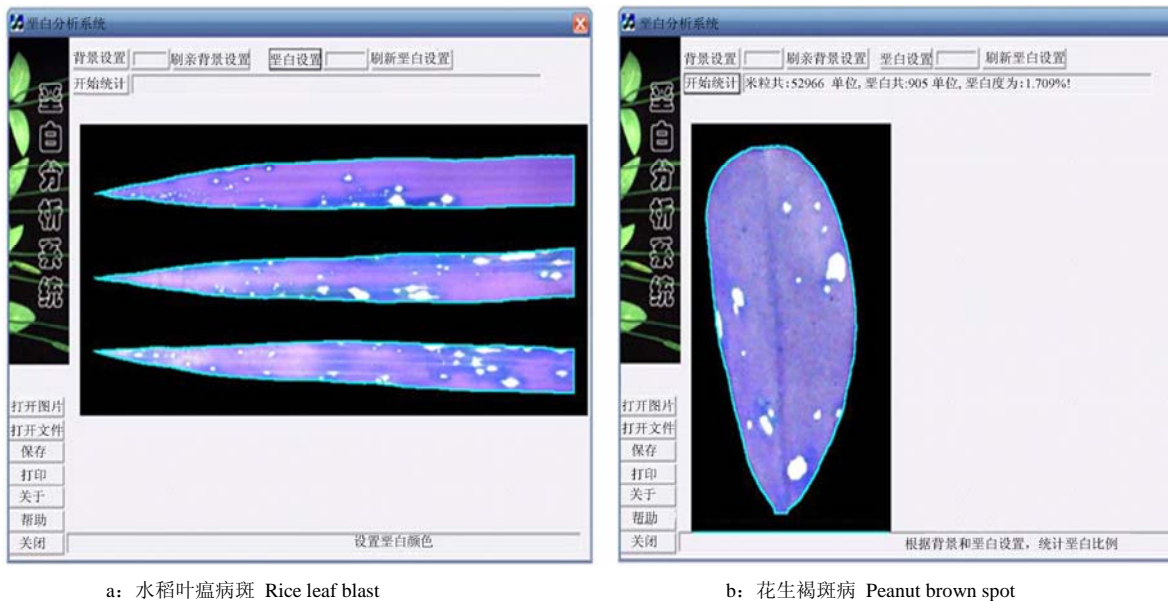


图 2 用软件 Chalkiness 1.0 测定的叶片病斑相对面积

Fig. 2 Measure of relative lesion area using Chalkiness 1.0

3 讨论

本文根据垩白度与 RLA 之间的可类比性, 提出了利用垩白分析软件 Chalkiness 1.0 测量 RLA 的方法。与前人提出的使用网格^[18,19]或标尺^[20]测量的方法相比, 本文提出的方法不仅简单、快捷, 而且精确度高。在前面所述的稻瘟病例子中, 笔者用该方法对病叶图像重复测量了 5 次, 结果估得 RLA(%) 变化在 1.596~1.924, 均值±标准差为 1.707±0.2, 可见重复性很好, 重复测量值之间存在的微小差异只是来自人工涂黑病斑时的随机误差。因此, 在实际应用中, 一般测量 1 次就可以了。如果重复测量 2~3 次, 取其平均值, 则结果将更加准确。另外, 该方法采用扫描或拍照技术采样, 不受病叶大小、形状、厚薄等因素的影响, 因

此适用性广, 可用于大多数叶片病害的测量。

利用计算机估计 RLA 的准确性关键取决于 Chalkiness 1.0 软件对图像中病斑与健康叶片之间的边界的识别能力。由于叶片的颜色和病斑的颜色都是不均匀的, 因此它们之间的边界情况复杂, 多种多样, 需要进行模糊识别。计算机的精确计算能力远远高于人脑, 但模糊识别能力却远远低于人脑。根据这个特点, 本方法采取了用人在模糊识别上的优势来弥补计算机劣势的策略, 即先利用人的视觉来识别病斑, 人为地将病斑涂黑, 使病斑颜色均匀化, 使病斑与健康叶片之间的边界明晰化, 从而易于计算机的识别。这种做法虽然增加了一点工作量, 但无疑大大提高了对 RLA 测量的准确度, 并使得利用 Chalkiness 1.0 软件测量 RLA 的方法具有广泛的适用性。

4 结 论

本文提出了一种测量叶片相对病斑面积的新方法,即通过对病叶图像进行人工识别与图像处理,用茭白分析软件Chalkiness 1.0 直接测量叶片相对病斑面积。该方法准确、简单、快速,克服了由完全人工识别所带来的误差,也避免了计算机无法模糊识别的不足,能够广泛应用于各种叶片病害的相对病斑面积的测量。

References

- [1] 冯登超, 乔晓军, 杜小鸿, 田宏武, 文俊峰. 基于最优基小波包的植物病害图像压缩算法. 沈阳农业大学学报, 2006, 37: 274-277.
Feng D C, Qiao X J, Du X H, Tian H W, Wen J F. Compression algorithm for plant disease image based on best basis of wavelet packets. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2006, 37: 274-277. (in Chinese)
- [2] Valent B, Farrall L, Chumley F G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. *Genetics*, 1991, 127(1): 87-101.
- [3] 南志标, 李春杰, 王赞文, 王彦荣. 苜蓿褐斑病对牧草质量光合速率的影响及田间抗病性. 草业学报, 2001, 10(1): 26-34.
Nan Z B, Li C J, Wang Y W, Wang Y R. Lucerne common leaf spot: forage quality, photosynthesis rate and field resistance. *Acta Prataculturae Sinica*, 2001, 10(1): 26-34. (in Chinese)
- [4] 陈翠霞, 赵延兵, 刘保申, 叶金才, 王 斌, 王振林. 不同玉米自交系南方锈病的抗性评价. 作物学报, 2004, 30: 1053-1055
Chen C X, Zhao Y B, Liu B S, Ye J C, Wang B, Wang Z L. Identification of disease resistance in different maize inbred lines to *Puccinia polysora* Underw. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 30: 1053-1055. (in Chinese)
- [5] 童蕴慧, 徐敬友, 陈夕军, 纪兆林, 郁 伟. 番茄灰霉菌拮抗菌的筛选和应用. 江苏农业研究, 2001, 22(4): 25-28.
Tong Y H, Xu J Y, Chen X J, Ji Z L, Yu W. Screening and application of antagonistic microorganisms against *Botrytis cinerea*. *Jiangsu Agricultural Research*, 2001, 22(4): 25-28. (in Chinese)
- [6] 李宝英, 马淑梅, 张举梅. 聚氨基葡萄糖防治大豆根腐病的初步研究. 大豆科学, 1997, 16: 269-273.
Li B Y, Ma S M, Zhang J M. Preliminary study on the prevention and control of soybean root rot disease by using chitisan. *Soybean Science*, 1997, 16: 269-273. (in Chinese)
- [7] 曹越平, 杨庆凯. 大豆灰斑病抗感标准划分的研究. 大豆科学, 2002, 21: 113-116.
Cao Y P, Yang Q K. Study on resistance standard of soybean plants to *Cerospora Sojina* Hara. *Soybean Science*, 2002, 21: 113-116. (in Chinese)
- [8] 傅俊范, 白元俊, 薛敏菊, 车连晓. 玉米弯孢菌叶斑病流行动态及产量损失测定. 沈阳农业大学学报, 1999, 30: 204-207.
Fu J F, Bai Y J, Xue M J, Che L Y. The epidemiology of maize leaf blight and its yield loss. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 1996, 30: 204-207. (in Chinese)
- [9] 方中达, 许志刚, 过崇俭, 殷尚智, 伍尚忠, 徐美明, 章 琦. 中国水稻白叶枯病菌致病型的研究. 植物病理学报, 1990, 20(2): 81-88.
Fang Z D, Xu Z G, Guo C J, Yin S Z, Wu S Z, Xu X M, Zhang Q. Studies on pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae* in China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1990, 20(2): 81-88. (in Chinese)
- [10] 谢德龄, 蒋细良, 倪楚芳, 朱昌雄, 肖一龙. 中生菌素对水稻细菌性条斑病的防治试验. 中国生物防治, 1995, 11(2): 91-92.
Xie D L, Jiang X L, Ni C F, Zhu C X, Xiao Y L. Biological control of rice bacterial leaf streak *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* with zhongsheng mycin. *Chinese Journal of Biological Control*, 1995, 11(2): 91-92. (in Chinese)
- [11] 陈喜文, 郝友进, 陈德富. 几种化学诱导物对黄瓜白粉病抗性的诱导作用. 华北农学报, 2000, 15(4): 103-107.
Chen X W, Hao Y J, Chen D F. Effect of several chemicals on induction of resistance to *Sphaerthecha fuliginea* (Schlecht). *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2000, 15(4): 103-107. (in Chinese)
- [12] 孔凡玉, 石金开, 王兰珍, 朱贤朝, 郭振业, 郭永峰, 王 年. 烟草品种资源对烟草赤星病抗病性鉴定初报. 中国烟草, 1996, (4): 39-41.
Kong F Y, Shi J K, Wang L Z, Zhu X C, Guo Z Y, Guo Y F, Wang N. Evaluation on resistance of tobacco germplasm to brown spot disease. *Chinese Tobacco Science*, 1996, (4): 39-41. (in Chinese)
- [13] James W C. Assessment of plant disease and losses. *Annual Review of Phytopathology*, 1974, 12: 27-48
- [14] 李汝刚, 范云六. 表达 Harpin 蛋白的转基因马铃薯降低马铃薯晚疫病斑生长率. 中国科学(C辑), 1999, 29(1): 56-61.
Li R G, Fang Y L. Reduction of potato growth ratio in transgenic potato expressing Harpin protein. *Science in China (Series C)*, 1999, 29(1): 56-61. (in Chinese)
- [15] 李海春, 傅俊范, 王新一, 王 帅, 贾晓辉, 薛 腾, 白 静. 玉米大斑病病情发展及病斑扩展时间动态模型的研究. 南京农业大学学报, 2005, 28(4): 50-54.
Li H C, Fu J F, Wang X Y, Wang S, Jia X H, Xue T, Bai J. Studies on moldels of northern leaf blighly lesion expansion with time in maize. *Journal of Nanjing Agricultural Universty*, 2005, 28(4): 50-54. (in

- Chinese)
- [16] 曹建康, 毕 阳, 李永才, 赵 劫. 水杨酸处理对苹果梨采后黑斑病及贮藏品质的影响. 甘肃农业大学学报, 2001, 36: 438-442.
Cao J K, Bi Y, Li Y C, Zhao J. Effects of salicylic acid treatment on the postharvest black spot disease and quality of Pinguoli Pear during storage. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2001, 36: 438-442. (in Chinese)
- [17] 刁春英, 毕 阳. 采后壳聚糖涂膜处理对损伤接种杏黑斑病的影响. 甘肃农业大学学报, 2000, 35: 445-449.
Diao C Y, Bi Y. Effect of postharvest chitosan coating on alternaria rot of wound-inoculated apricot. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2000, 35: 445-449. (in Chinese)
- [18] 李立军, 伊春生, 王国良, 马艳玲. 温度和保湿时间对烟草赤星病叶斑扩展的影响. 东北农业大学学报, 2004, 35: 293-296.
Li L J, Yin C S, Wang G L, Ma Y L. Influence of temperature and moisture time on lesion area expansion of tobacco brown spot caused by *Alternaria alternata*. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2004, 35: 293-296. (in Chinese)
- [19] 肖长林, 肖悦岩. 番茄晚疫病病斑扩展模式的初步研究. 北京农业大学学报, 1991, 17: 79-82.
Xiao C L, Xiao Y Y. Preliminary study on the lesion expansion model of tomato late blight (*Phytophthora infestans*). *Acta Agricultural Universitatis Pekinensis*, 1991, 17: 79-82. (in Chinese)
- [20] 刘学敏, 李长友, 张明厚. 大豆灰斑病叶不病斑严重度的分级标准. 大豆科学, 1991, (10): 330-334.
Liu X M, Li C Y, Zhang M Y. The grading standard of disease severity on leafspot of frog-eye leaf spot of soybean. *Soybean Science*, 1991, (10): 330-334. (in Chinese)
- [21] 萧浪涛, 李东晖, 藺万煌, 洪 彬, 洪亚辉. 一种测定稻米垩白性状的客观方法. 中国水稻科学, 2001, 15: 206-208.
Xiao L T, Li D H, Lin W H, Hong B, Hong Y H. An objective method to measure chalkiness of rice grain. *Chinese Journal of Rice Science*, 2001, 15: 206-208. (in Chinese)

(责任编辑 赵利辉, 毕京翠)