



Identificación de la presencia de oídio (*Erysiphe necator*) en racimos de uva mediante imágenes hiperespectrales

C. Pérez-Roncal¹, A. López-Maestresalas¹, C. López-Molina³, D. Marín², J. Urrestarazu², S. Arazuri¹, L.G. Santesteban² y C. Jarén¹

¹ Dpto. Ingeniería, Universidad Pública de Navarra. Campus Arrosadia, 31006 Pamplona, España; claudia.perez@unavarra.es

² Dpto. Agronomía, Biotecnología y Alimentación, Universidad Pública de Navarra. Campus Arrosadia, 31006 Pamplona, España

³ Dpto. Estadística, Informática y Matemáticas, Universidad Pública de Navarra. Campus Arrosadia, 31006 Pamplona, España

Resumen: El oídio es una de las enfermedades fúngicas más importantes en la vid, que afecta negativamente al rendimiento del cultivo y la calidad del producto. La infección inicial, apenas perceptible visualmente, dificulta la detección de la enfermedad en fases tempranas, y no es hasta etapas intermedias cuando se detectan los síntomas visibles. Por ello, el objetivo de este trabajo es evaluar la utilidad de la tecnología de imágenes hiperespectrales (HSI) para detectar la presencia de oídio en racimos de uva. Se recogieron 30 racimos de uva de la variedad Mazuelo, 15 racimos afectados y otros 15 libres de oídio, que se escanearon con un sistema hiperespectral sensible en el rango NIR (900-1700 nm). Las imágenes adquiridas fueron normalizadas y segmentadas, obteniendo información espectral y espacial de cada muestra. Se desarrollaron modelos discriminantes por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), aplicando diferentes pretratamientos espectrales, para conseguir diferenciar píxeles sanos de píxeles con oídio en los racimos. Los mejores resultados se obtuvieron aplicando la combinación de pretratamientos Suavizado, Variable Normalizada Estándar (SNV) y Centrado Medio (MC), con un porcentaje de acierto del 85,3% en la validación cruzada del modelo y una correcta clasificación e identificación de píxeles en la validación. Los resultados preliminares obtenidos sugieren la posibilidad de utilizar la tecnología HSI para la detección de oídio en racimos de uva.

Palabras clave: análisis de imagen, HSI-NIR, quimiometría, enfermedades fúngicas, *Vitis vinifera* L.

1. Introducción

El oídio (*Erysiphe necator*) está considerado mundialmente como una de las enfermedades fúngicas más importantes en la vid, causante de daños significativos sobre el cultivo. Estos incluyen la pérdida de rendimiento y la depreciación de la calidad del vino o de la uva [1].

La propensión de las cepas a sufrir oídio depende de la sensibilidad de la variedad a esta enfermedad y de las condiciones climáticas en las que se desarrolle el cultivo, pudiendo afectar a cualquier órgano verde de la planta (brotes, hojas y racimos) [1]. La infección inicial, en focos aislados y apenas perceptibles visualmente, dificulta la detección de la enfermedad en fases tempranas. Así pues, suelen ser los agricultores los encargados de detectar los síntomas más

evidentes de la enfermedad, que no aparecen hasta etapas intermedias o tardías de la misma. Por tanto, el poder disponer de técnicas que permitan detectar la enfermedad de manera fiable antes de que se manifiesten los síntomas visibles supone un importante avance [2].

En los últimos años, los sensores ópticos han demostrado ser una efectiva herramienta de análisis para la evaluación de la calidad e inocuidad en cultivos y productos agroalimentarios [3]. En concreto, la tecnología de imágenes hiperespectrales (HSI) se presenta como una de las técnicas más prometedoras, ya que no solo es capaz de detectar y cuantificar las enfermedades, sino que permite diferenciar entre éstas y las reacciones de las plantas huésped al ataque de patógenos [4]. Por ello, el objetivo de este trabajo es evaluar la utilidad de la tecnología de imágenes hiperespectrales (HSI) para detectar la presencia de oídio en racimos de uva.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

En este estudio se utilizaron 30 racimos de uva de la variedad Mazuelo (*Vitis vinifera* L.) muestreados en un viñedo de la Ribera del Alto Ebro en Navarra (España) en la campaña de 2017. Los racimos se recogieron en una fase del ciclo próxima a vendimia (22 de agosto, estado fenológico maduración), seleccionando dos clases de muestras en campo: 15 racimos visualmente sanos de cepas libres de oídio (clase sano, S), y 15 racimos con síntomas visibles de oídio de cepas afectadas por esta enfermedad (clase oídio, O). Tras la recogida, los racimos se conservaron congelados a -23 °C hasta la realización de los análisis. Previo a la adquisición de las imágenes hiperespectrales, los racimos se almacenaron durante 24 h en una cámara frigorífica (3 ± 1 °C) para propiciar una descongelación lenta y, una vez descongelados, se identificaron, pesaron y fotografiaron (imagen RGB de referencia) individualmente.

2.2. Adquisición de imágenes hiperespectrales

Las imágenes de los racimos se adquirieron con un sistema hiperespectral de escaneo lineal sensible en el rango NIR de 900-1700 nm compuesto por: una cámara Xeva 1.7-320 (Xenics, Leuven, Belgium) con detector InGaAs de resolución 320x256 píxeles, acoplada a un espectrógrafo ImSpector N17E (Specim, Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finland) y a un objetivo con distancia focal de 16 mm; una plataforma lineal (LEFS25, SMC Corporation, Tokio, Japan) para desplazar las muestras bajo el campo visual de la cámara (línea tras línea); y 4 lámparas halógenas de 46W (Lexman) para iluminar el área de escaneo. Durante la adquisición de imágenes el sistema se cubrió con una tela negra para conseguir una iluminación homogénea y evitar luz ambiental. Un ordenador equipado con los softwares Xeneth 2.5 y ACT Controller permitió establecer los parámetros de funcionamiento de la cámara y la plataforma respectivamente, así como registrar las imágenes.

Se escaneó una cara por racimo, fijando una distancia de separación plataforma-objetivo de 300 mm y ajustando el tiempo de integración en la cámara a 2 ms para evitar la saturación del sensor. Así, cada línea de muestra escaneada (entre 162 y 296 líneas por muestra) tenía una resolución espacial de 0,56 mm/píxel (320 píxeles) y una resolución espectral de 3,125 nm (256 bandas/píxel). Además, se adquirieron las imágenes de las referencias blanca (Spectralon, Reflectance Standard 99%, Labsphere) y negra (colocando la tapa negra opaca al objetivo) necesarias para la corrección de las imágenes de racimo.

2.3. Procesamiento de imágenes

Primero se realizó la construcción del hipercubo de cada racimo, apilando las imágenes de las líneas de muestra escaneadas, tras lo cual se corrigieron para obtener la reflectancia relativa (R) de las imágenes hiperespectrales según la Ecuación (1):

$$R = \frac{I_m - I_n}{I_b - I_n}, \quad (1)$$

donde I_m es la intensidad de radiación adquirida de la muestra, I_n es la intensidad de radiación de la referencia negra, e I_b es la intensidad de radiación de la referencia blanca.

A continuación, las imágenes se segmentaron para separar la región de interés, es decir, el racimo, de las zonas saturadas y el fondo, siguiendo el algoritmo presentado en [5]. Este método utiliza métricas de Baddeley para medidas de contraste local, a partir de las cuales se definen superpíxeles en la imagen que serán finalmente umbralizados utilizando el algoritmo de Otsu [6]. En este caso, se consideraron saturados todos los píxeles con más de un 2% del rango espectral saturado. Además, se eliminaron los valores de reflectancia en el rango 900-1050 nm debido al ruido presente en esa región del espectro.

Posteriormente, se extrajo la información relevante contenida en los hipercubos pasando de una matriz 3D (hipercubo) a una matriz de 2 dimensiones con los valores de reflectancia de los píxeles de racimo en las longitudes de onda seleccionadas (206, entre 1050 y 1700 nm). En las 10 primeras imágenes de cada clase (2/3 de las muestras por clase), este proceso se realizó con la herramienta HYPER-Tools [7] seleccionando manualmente 15 píxeles de baya por muestra y utilizando las imágenes RGB de cada racimo como referencia. En el caso de las muestras sanas se seleccionaron 15 píxeles sanos, mientras que en las muestras enfermas los 15 píxeles se seleccionaron de zonas con síntomas visibles de oídio. La matriz resultante (300 filas x 206 columnas) se utilizó como grupo de calibración para desarrollar el modelo discriminante. En el resto de imágenes de cada clase (5 de S y 5 de O), el proceso se ejecutó de forma automática obteniendo para cada muestra una matriz con todos los píxeles de racimo incluidos en la máscara segmentada. Estas últimas se utilizaron para validar externamente el modelo.

El procesamiento de imágenes se realizó en MATLAB R2017b (The Mathworks, Natick, MA).

2.4. Análisis multivariante de datos

Una vez obtenidas las matrices con los espectros de los píxeles de racimo, se utilizó PLS-Toolbox (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA) en MATLAB® para llevar a cabo el tratamiento y análisis discriminante de los datos.

Se utilizó el método de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para diferenciar dos clases de píxeles en los racimos según el grado de síntomas (sano y oídio). El PLS-DA es una técnica de clasificación supervisada donde la pertenencia a una clase se predice a partir de los espectros de la muestra por medio de la regresión PLS [8]. En este estudio, 2/3 de las muestras (20 racimos) se utilizaron para la calibración y validación cruzada (CV; método de persianas venecianas con 10 divisiones) del modelo, y el 1/3 restante (10 racimos) se empleó para la validación externa. Se desarrollaron modelos PLS-DA aplicando diferentes pretratamientos espectrales, que incluían técnicas de corrección de la dispersión y derivadas [9].

Un hecho relevante del proceso de aprendizaje fue que, si bien las muestras estaban etiquetadas a nivel de racimo, la clasificación (calibración y validación cruzada) se hizo por espectros de píxeles. Esto tuvo un doble impacto en el proceso. Primero, al no ser capaces de etiquetar cada uno de los píxeles de cada una de las muestras, era probable que hubiese clases severamente solapadas (tener espectros sanos en las muestras enfermas, y suceder también lo contrario). Segundo, la caracterización de cada muestra en la fase de validación (validación externa) se dio por voto mayoritario entre la clasificación individual de espectros en cada uno de los píxeles. En este sentido, la fase de clasificación de muestras tuvo dos sub-fases: etiquetado individual de píxeles y selección de clase por voto mayoritario.

La precisión de los modelos desarrollados se evaluó considerando el porcentaje de píxeles clasificados correctamente (%CC) y los valores de sensibilidad y especificidad para cada clase obtenidos en la CV [10], y el porcentaje de píxeles por clase obtenidos para cada muestra en la validación externa.

3. Resultados y discusión

La Figura 1 muestra los espectros de reflectancia medios (normalizados) de los píxeles seleccionados para cada clase (sano y oídio) en el grupo de calibración, una vez eliminados los valores en el rango 900-1050 nm por ruido espectral. Se observaron diferencias en la magnitud de reflectancia de ambas clases a lo largo de todo el espectro, presentando valores más altos el espectro medio de la clase oídio.

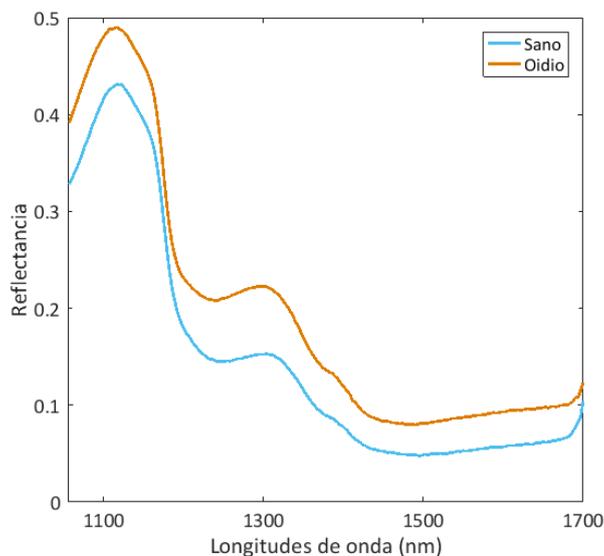


Figura 1. Espectros de reflectancia medios normalizados de los píxeles de racimo seleccionados para las clases sano y oídio en el grupo de calibración, medidos en el rango 1050-1700 nm.

En la Tabla 1 se muestran los resultados del modelo PLS-DA desarrollado para la combinación de pretratamientos que mejor clasificación de píxeles obtuvo. De las diferentes técnicas probadas, los mejores resultados se obtuvieron al aplicar suavizado por el método de Savitzky-Golay utilizando un polinomio de orden 0 y una ventana de 15 puntos, seguido de variable normalizada estándar (SNV, Standard Normal Variate) y centrado medio (MC, Mean Center), consiguiendo un porcentaje total de acierto en CV de 85,3%. El número de variables latentes (LVs) para la construcción del modelo se seleccionó como aquel que minimiza el error medio en la calibración y CV, empleando en este caso 5 LVs con un 97% de la varianza espectral explicada.

Como se puede observar en la Tabla 1, tanto el %CC (88,67%) como la sensibilidad (0,880) fue mayor en los píxeles de la clase oídio, obteniendo en general buenos resultados de clasificación en ambas clases.

Tabla 1. Resultados de clasificación en la validación cruzada (CV) del modelo PLS-DA desarrollado con la combinación de pretratamientos Suavizado+SNV+MC.

Clase	Pretratamiento	LVs	n	Sensibilidad	Especificidad	%CC
Sano	Suavizado + SNV	5	300	0,827	0,880	83,33
Oídio	+ MC			0,880	0,827	88,67

En la Figura 2 se muestran los resultados de clasificación obtenidos en la validación externa del modelo realizada para cada muestra (5 de S y 5 de O) de manera independiente. En esta figura aparece representado el porcentaje de píxeles clasificados como sanos en cada muestra validada,

obtenido a partir de la probabilidad de pertenencia de cada uno de los píxeles a las dos clases consideradas.

Como se aprecia en la Figura 2, más del 75% de los píxeles en las muestras sanas se clasificaron como sanos, siendo el porcentaje de píxeles de la clase oídio de entre un 13-25%. Al contrario que en las muestras enfermas, en las que el porcentaje de píxeles sanos fue inferior al 35%. Estos porcentajes tienen sentido, en la medida en que una muestra enferma puede tener zonas cuyo nivel de afección sea nulo o insignificante. Dicho de otra forma, una muestra enferma no tiene por qué estar completamente afectada.

La Figura 2, además, ilustra las características del proceso ya comentadas en la Sección 2.4. La dificultad en la validación, debida a la imposibilidad de etiquetado de píxeles individuales, hace que las muestras sanas tengan ciertos píxeles clasificados como clase oídio, y *vice versa*. Sin embargo, al clasificar las muestras de manera global, y no los píxeles de manera individual, el sistema puede separar cómodamente las muestras enfermas de las sanas.

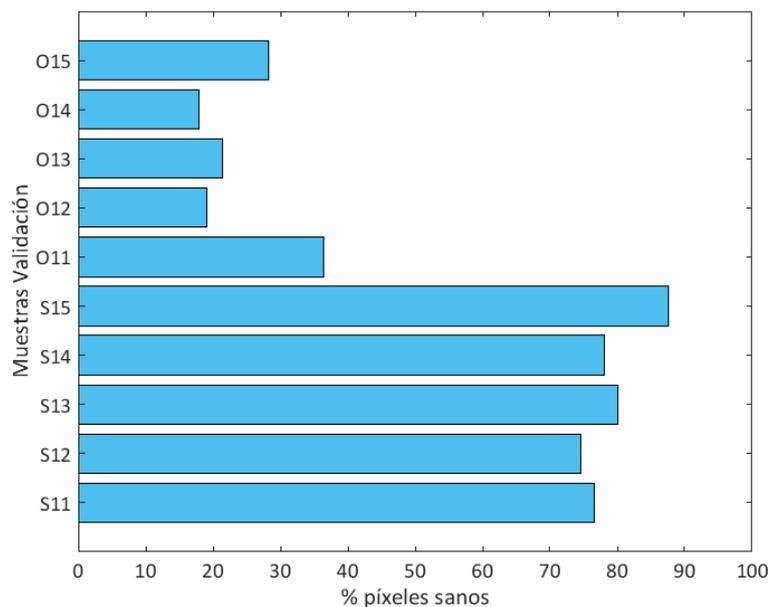


Figura 2. Porcentaje de píxeles clasificados como sanos en las muestras de las clases sano (S11 a S15) y oídio (O11 a O15) empleadas en la validación externa del modelo PLS-DA.

Estos porcentajes de clasificación concuerdan con la información obtenida en las visualizaciones, ya que en las muestras sanas los píxeles naranjas (oídio) se concentran principalmente en las zonas del raspón y en menor medida en las bayas (Figura 3(a)), y en las muestras enfermas la mayoría de los píxeles aparecen en color naranja (Figura 3(b)). Es importante señalar la coherencia espacial de la clasificación de los píxeles en la imagen. En la Figura 3(a) se observa cómo los píxeles mal clasificados (afectados por oídio) se localizan en zonas determinadas de la imagen (superficies inclinadas en bayas, o pedúnculo). Al mismo tiempo, las bayas iluminadas de manera normal, con superficie visible perpendicular a la dirección de la cámara, rara vez se confunden con zonas enfermas. Esto sugiere que, efectivamente, la existencia de oídio en el racimo produce un efecto detectable en el espectro adquirido en las bayas que, si bien confundible con otros hechos físicos (iluminación, inclinación, etc.), lo hace claramente distinguible de las bayas no enfermas.

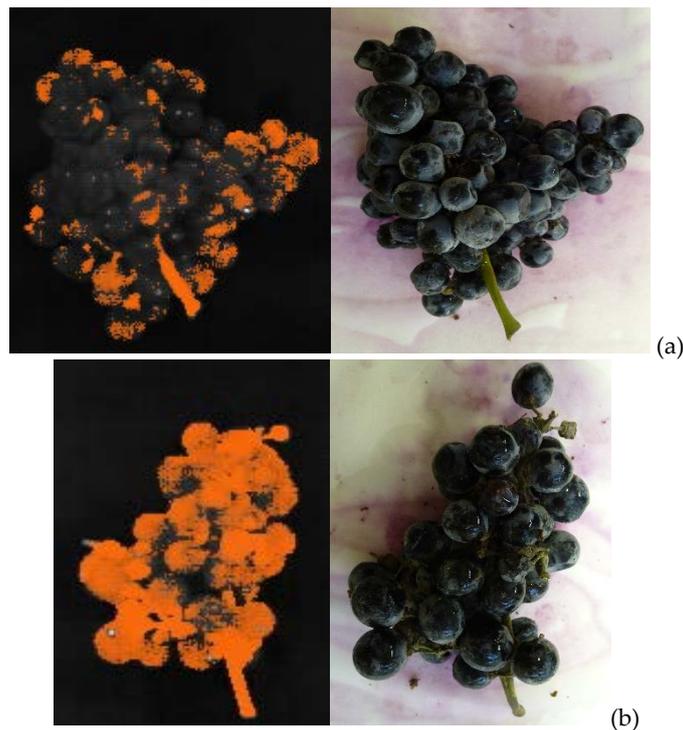


Figura 3. Visualización de la clasificación de píxeles en validación (gris: sano; naranja: oidio) e imagen RGB del racimo en las muestras S14 (a) y O14 (b).

4. Conclusiones

Este estudio sugiere que la utilización combinada de imágenes hiperespectrales NIR con análisis discriminantes PLS-DA permite la clasificación de racimos de uva en función de la presencia de oidio. El modelo PLS-DA desarrollado aplicando la combinación de pretratamientos Suavizado+SNV+MC obtuvo los mejores resultados, consiguiendo un porcentaje de acierto en CV del 85,3% y una correcta clasificación e identificación de píxeles en la validación (>65%).

Teniendo en cuenta que se trata de un estudio preliminar, que debería haber sido validado en un mayor número de muestras y probado diferentes métodos quimiométricos, la tecnología HSI en el rango NIR presenta un gran potencial para ser utilizada en la detección de otras enfermedades y fisiopatías de la vid.

En estudios futuros se pretende continuar con esta línea de investigación, trabajando con muestras frescas e incrementando el tamaño muestral, por un lado, y mejorando los algoritmos de segmentación y seleccionando un número óptimo de longitudes de onda que permitan reducir el tiempo de procesamiento y análisis de los datos, por otro, para poder realizar una detección real en campo.

5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado gracias al Proyecto DECIVID (2017-2019) correspondiente a la convocatoria de Ayudas a Proyectos de I+D de la Consejería de Desarrollo Económico del Gobierno de Navarra, el Proyecto TIN2016-77356-P (AEI, Feder/UE), y la Universidad Pública de Navarra a través de la concesión de dos ayudas para la Formación de Personal Investigador predoctoral 2017.

Referencias

1. Oberti R., Marchi M., Tirelli P., Calcante A., Iriti M., Borghese A. N. Automatic detection of powdery mildew on grapevine leaves by image analysis: Optimal view-angle range to increase the sensitivity. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2014, 104, 1-8.
2. Mahlein A.K. Plant disease detection by imaging sensors—parallels and specific demands for precision agriculture and plant phenotyping. *Plant Disease*. 2016, 100(2), 241-251.
3. Wu D., Sun D-W. Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review — Part I: Fundamentals. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2013, 19, 1-14.
4. Oerke E.C., Herzog K., Toepfer R. Hyperspectral phenotyping of the reaction of grapevine genotypes to *Plasmopara viticola*. *Journal of Experimental Botany*. 2016, 67(18), 5529-5543.
5. Lopez-Molina C., Ayala-Martini D., Lopez-Maestresalas A., Bustince H. Baddeley's Delta metric for local contrast computation in hyperspectral imagery. *Progress in Artificial Intelligence*. 2017, 6(2), 121-132.
6. Otsu N. A threshold selection method for gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*. 1979, 9(1), 62-66.
7. Mobaraki N., Amigo J.M. HYPER-Tools. A graphical user-friendly interface for hyperspectral image analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2018, 172, 174-187.
8. Barker M., Rayens W. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*. 2003, 17(3), 166-173.
9. Vidal M., Amigo J.M. Pre-processing of hyperspectral images. Essential steps before image analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2012, 117, 138-148.
10. Ballabio D., Consonni V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Analytical Methods*. 2013, 5(16), 3790-3798.