مروری بر روش‌های پیشرفته برای تشخیص بیماری در گیاهان

حسام عمرانی فرد[۱*]، محمدحسین آق‌خانی[۲]

۱- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی بیوسیستم، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- عضو هئیت علمی گروه مهندسی بیوسیستم، دانشگاه فردوسی مشهد

* ایمیل نویسنده مسئول: hesam.omranifard@stu.um.ac.ir

چکیده

بیماری‌های گیاهی باعث کاهش میزان تولید و میزان درآمد در صنعت کشاورزی جهان می‌شود. نظارت بر سلامت و تشخیص بیماری گیاهان و درختان یکی از مسائل مهم در کشاورزی پایدار است. در حال حاضر سنسوری به صورت تجاری برای تشخیص لحظه‌ای بیماری در گیاهان وجود ندارد و معمولاً برای تشخیص بیماری، روش جستجو و داده‌برداری پراکنده استفاده می‌شود که روشی پرهزینه، پر زحمت و زمان‌بر است. روش‌های مولکولی نظیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) نیز که برای مشخص کردن بیماری گیاهان استفاده می‌شود نیازمند جزئیات نمونه‌برداری و روش اجرا است. اطلاعات اولیه در مورد سلامتی گیاه و تشخیص بیماری‌ها می‌تواند کنترل بیماری‌ها را در طول یک فرآیند مدیریتی آسان کند. به عنوان مثال کنترل جهت پاشش در استفاده از آفت‌کش‌ها، قارچ‌کش‌ها و کاربرد مواد شیمیایی برای دفع بیماری‌ها می‌تواند باعث بهبود عملکرد مدیریتی شود.

در این پژوهش روش‌های مورد استفاده برای بهبود نظارت بر سلامت گیاهان و تشخیص بیماری‌ها در شرایط مزرعه‌ای مورد بررسی قرار گرفته است. این روش‌ها شامل روش طیف‌سنجی، روش‌های تصویربرداری و بینی الکترونیکی است که مزیت‌ها و محدودیت‌های موجود در هریک از این روش‌ها با هم مقایسه شده است. در نهایت برخی مواردی از کاربرد تلفیقی آن‌ها به صورت سیستم‌های خبره که برای افراد غیر متخصص شاغل در بخش کشاورزی نیز قابل استفاده باشد، آورده شده است.

واژه‌های کلیدی: بینی الکترونیکی، تشخیص بیماری، روش‌های تصویربرداری، روش طیف‌سنجی، سیستم‌های خبره.

مقدمه

بیماری‌های گیاهی منشأ اصلی کاهش تولید و زیان‌های اقتصادی در بخش کشاورزی و جنگلداری است. به عنوان مثال زنگ‌زدگی سویا (یک بیماری قارچی در سویا) باعث زیان اقتصادی قابل توجهی شده است که با حذف تنها ۲۰٪ از منطقه آلودگی، کشاورز ممکن است تا حدود ۱۱ میلیون دلار سود ببرد (Roberts *et al.*, 2006). عوامل باکتریایی، قارچی و ویروسی به همراه هجوم حشرات منجر به بیماری و آسیب به گیاه می‌شوند. در حال حاضر در حدود پنجاه هزار بیماری انگلی و غیر انگلی در گیاهان شناسایی شده است (Pimentel *et al.*, 2005). پس از آلودگی گیاه به بیماری، به تدریج نشانه‌هایی در قسمت‌های مختلف گیاه ظاهر می‌شود (Lopez *et al.*, 2003). بسیاری از این بیماری‌ها با گذشت زمان به صورت تصادفی و یا از طریق مواد آلوده در سطح مزرعه گسترش می‌یابند. راه دیگر گسترش بیماری‌ها، انتقال از طریق گیاهان زینتی است که در نقاط مختلف نگهداری می‌شوند. این گیاهان معمولاً قبل از تشخیص هر نوع بیماری به صورت فله فروخته می‌شوند. یک سیستم ابتدایی که قادر باشد نشانه‌های اولیه بیماری را تشخیص دهد؛ می‌تواند از گسترش بیماری در داخل مزرعه جلوگیری کرده و منجر به کم شدن خسارات شود. در حال حاضر موارد متعددی از بیماری در گیاهان استراتژیک کشور نظیر خرما، پسته، گندم، ذرت، سیب، مرکبات و غیره گزارش شده است که لزوم توجه بیش از پیش به مقوله تشخیص بیماری در مراحل اولیه را آشکار می‌کند.

در اقدام اولیه پس از بروز علائم بیماری، وجود بیماری در گیاه مورد بررسی قرار می‌گیرد. روش‌های شناسایی بیماری که در حال حاضر در دسترس هستند عبارتند از روش سنجش آنزیمی (ELISA[1]) که بر اساس سنجش میزان پروتئین تولید شده به وسیله‌ی عوامل بیماری‌زا است و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR[2]) که بر اساس توالی‌های DNA[3] منحصر بفرد می‌باشد (Saponari *et al.*, 2008; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009; Yvon *et al.*, 2009). با وجود این روش‌ها، هنوز نیاز به یک روش سریع، دقیق و مناسب برای شناسایی بیماری‌های گیاهی احساس می‌شود. روش‌های شناسایی عوامل بیماری‌زا بطور کلی به دو گروه روش‌های مستقیم و روش‌های غیرمستقیم تقسیم می‌شوند. یک روش پیشرفته می‌تواند راه‌کاری مناسب برای تشخیص سریع، دقیق و واقعی از بیماری‌های گیاهی در مراحل اولیه رشد بیماری ارائه دهد که باعث کاهش هزینه‌ها، افزایش تولید و سود در صنعت کشاورزی شود.

در این مقاله چند روش پیشرفته برای شناسایی زمینی بیماری‌ها بیان شده است که تجهیزات آن می‌تواند به ماشین‌های خودگردان کشاورزی ضمیمه گردد. در مطالعات مربوط به تشخیص بیماری، هم آزمون‌های مزرعه‌ای و هم آزمون‌های آزمایشگاهی مورد بحث قرار می‌گیرد. مطالعات مزرعه‌ای به مطالعاتی اشاره دارد که به جمع‌آوری میدانی اطلاعات تحت شرایط مزرعه‌ای می‌پردازد. در مطالعات آزمایشگاهی جمع‌آوری اطلاعات تحت شرایط آزمایشگاهی انجام می‌شود. مطالعات آزمایشگاهی باعث ایجاد یک

1- Enzyme-linked immunosorbent assay
2- Polymerase chain reaction
3- Deoxyribose nucleic acid

پشتوانه علمی قدرتمند (به عنوان مثال قراردادهای آزمایشی و یا الگوریتم‌های آماری برای دسته‌بندی) برای کاربرد مزرعه‌ای می‌شود.

در این مطالعه دو روش برای تشخیص بیماری گیاهی شرح داده خواهد شد. روش اول استفاده از روش‌های طیف‌سنجی و تکنیک‌های تصویری برای تشخیص بیماری است؛ در حالی‌که در روش دوم از متابولیک‌های آلی فرار به عنوان یک سری نشانگرهای زیستی برای تشخیص بیماری استفاده می‌شود. این دو روش می‌توانند به صورت وسایلی به تجهیزات خودگردان کشاورزی ضمیمه شوند. با تلفیق این روش‌ها از طریق سیستم‌های خبره و در نهایت کاربرد انفرادی یا تلفیقی این روش‌ها در تجهیزات کشاورزی، می‌توان به یک روش سریع، واقعی و برخط برای وارسی و مدیریت بیماری‌های گیاهی دست یافت. تشخیص زودهنگام بیماری‌ها (قبل از بروز علائم بیماری) می‌تواند منبع اطلاعات ارزشمندی برای مدیریت و کنترل آفات جهت جلوگیری از گسترش بیماری‌ها را فراهم کند.

روش‌های مولکولی تشخیص بیماری‌های گیاهی

در سال‌های گذشته از یک سری روش‌های مولکولی برای تشخیص بیماری‌ها استفاده شده است. حساسیت روش‌های مولکولی به حداقل میزان میکروارگانیسم‌هایی که در یک نمونه قابل شناسایی هستند اشاره دارد. لوپز و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که حساسیت روش‌های مولکولی برای تشخیص باکتری‌ها، رنجی بین ۱۰ تا $۱۰^{۶}$ واحد کلونی بر میلی‌لیتر می‌باشد. روش‌های ELISA و PCR دو روش معمول مولکولی برای تشخیص بیماری هستند. سایر روش‌های مولکولی که استفاده می‌شود می‌توان به ایمونوفلورسنس(IF)[1]، فلوسایتومتری[2]، فلورسنس اینسایتو هیبریدیزیشن[3] (FISH) و میکرو آرایه‌های DNA[4] اشاره کرد (Lopez *et al.*, 2003).

در روش تشخیص ELISA، پروتئین‌های میکروبی (آنتی ژن) مرتبط با بیماری به اندام مورد مشکوک به بیماری تزریق می‌شود تا آنتی‌بادی لازم بر علیه آنتی‌ژن تولید شود. این آنتی‌بادی سپس از اندام استخراج می‌شود و با استفاده از آنزیم‌ها و فلورسانس (ماده حاجب رنگی) برای تشخیص آنتی‌ژن مربوطه استفاده می‌شود. زمانی که نشانه‌های حضور یک میکروارگانیسم وجود داشته باشد (آنتی ژن) این نشانگرها واکنش داده و وجود بیماری را تأیید می‌کند. در روش تشخیص PCR، مواد ژنتیکی (DNA) ایجاد شده از بیماری استخراج شده و قبل از تولید ژل الکتروفورز، خالص‌سازی و تغلیظ می‌شود. وجود یک باند به‌خصوص متناسب با بیماری در ژل الکتروفورز، حضور بیماری را تأیید می‌کند. مطالعات متعددی در زمینه تشخیص بیماری به روش مولکولی وجود دارد و در حال حاضر نیز تلاش‌های زیادی برای بهبود این روش‌ها در حال انجام است.

1- Immunoflourescence
2- Flow cytometry
3- Fluorescence in situ hydridization
4- DNA microarrays

از محدودیت‌های روش مولکولی می‌توان به وقت‌گیر بودن، سختی کار و لزوم استفاده از یک روش صحیح و منحصربه‌فرد در مرحله آماده‌سازی نمونه‌ها (جمع‌آوری و استخراج) برای دستیابی به نتایج واقعی و دقیق اشاره کرد. به علاوه این روش‌ها نیاز به معرف‌هایی دارد که باید برای تشخیص یک پاتوژن منحصربه‌فرد مناسب باشد. روش‌های مولکولی می‌توانند به عنوان ابزاری نیرومند برای اطمینان از وجود بیماری مورد استفاده قرار گیرند؛ اما در شرایطی که تعداد نمونه‌های گیاهی زیاد است، به دلیل وقت‌گیر بودن نمی‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین روش‌های طیف‌سنجی می‌توانند به عنوان یک روش بالقوه برای تشخیص سریع بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرند. در این پژوهش، از توضیح تفضیلی روش‌های مولکولی به دلیل وجود مقاله‌های متعدد صرف نظر شده است.

روش‌های طیف‌سنجی و تصویری برای تشخیص بیماری

با پیشرفت‌های اخیر در صنعت کشاورزی، مطالعاتی برای دستیابی به روشی خودکار و غیر مخرب برای تشخیص بیماری‌ها انجام شده است. حالت مطلوب برای تشخیص بیماری این است که ابزارهای تشخیص بیماری سریع بوده و نسبت به تشخیص بیماری در مراحل اولیه ظهور علائم بیماری حساس باشند. روش‌های طیف‌سنجی و تصویری، تکنیک‌های منحصربه‌فرد وارسی بیماری هستند که برای تشخیص بیماری یا تنش‌های ناشی از فاکتورهای مختلف در گیاهان و درختان مورد استفاده قرار می‌گیرند. پژوهش‌های اخیر در زمینه توسعه و بهبود این روش‌ها برای استفاده از این ابزار در تشخیص آنی یک بیماری در مقیاس وسیع و سطح مزرعه بوده است.

در حال حاضر فناوری‌های مختلف طیف‌سنجی و تصویربرداری برای تشخیص بیماری‌های دارای علائم و بدون علائم مورد مطالعه قرار گرفته است. برخی از این روش‌ها عبارتند از: تصویربرداری فلورسنس (Bravo *et al.*, 2004; Moshou *et al.*, 2005; Chaerle *et al.*, 2007)، تصویربرداری چندطیفی و فراطیفی (Shafri and Hamdan,2009; Qin *et al.*, 2009) طیف‌سنجی مادون قرمز (Spinelli *et al.*, 2006; Purcell *et al.*, 2009)، طیف‌سنجی فلورسنس (Marcassa *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Delalieux *et al.*, 2007; Belasque *et al.*, 2008; Lins *et al.*, 2009)، طیف‌سنجی چندباندی قابل رؤیت (Chen *et al.*, 2008) و طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR) (Choi *et al.*, 2004).

روش‌های طیف‌سنجی و تصویری برای تشخیص بیماری می‌تواند به ماشین‌های خودگردان کشاورزی سوار شده و اطلاعات ارزشمندی را در زمینه علائم بیماری در مراحل اولیه انتشار آن جمع‌آوری کند. این اطلاعات می‌تواند برای کنترل و مدیریت بیماری‌ها در سطح مزرعه مفید بوده و برای مشخص کردن سطوح تنش‌های گیاهی و یا کمبود مواد غذایی در گیاهان نیز استفاده شوند. نتایج استفاده از روش‌های طیف‌سنجی برای تشخیص تنش‌های آبی و تنش‌های مواد غذایی در گیاهان موفقیت‌آمیز بوده است. به علاوه از این روش‌ها به صورت گسترده برای بررسی کیفیت میوه‌ها و سبزی‌جات پس از برداشت، استفاده می‌شود.

طیف سنجی فلورسنس

در این طیف‌سنجی، فلورسنس بازتاب شده از یک جسم دلخواه پس از تحریک با یک شعاع نوری اندازه‌گیری می‌شود (معمولاً طیف فرابنفش). در اواخر قرن بیستم از لیزرهای مولد فلورسنس برای مطالعات گیاهی نظیر بررسی سطوح تنش و وضعیت فیزیولوژی در گیاهان استفاده شد (Belasque *et al.*, 2008). دو نوع فلورسنس عبارتند از: ۱- فلورسنس آبی- سبز با طول موج بین ۶۰۰nm- ۴۰۰ و ۲- فلورسنس کلروفیل با طول موج بین ۸۰۰nm- ۶۵۰ که با سطوح مختلف سبز تولید می‌شوند. از طیف سنجی فلورسنس می‌توان برای بررسی کمبود مواد غذایی، سطوح مختلف تنش‌های محیطی و بیماری‌های گیاهی نیز استفاده نمود (Cerovic *et al.*, 1999; Belasque *et al.*, 2008).

بلاسکو و همکاران (۲۰۰۸) از طیف‌سنجی فلورسنس برای تشخیص تنش‌های ناشی از بیماری مرکبات و صدمه‌های مکانیکی استفاده کردند. در این مطالعه، یک سیستم طیف‌سنجی فلورسنس قابل حمل، در داخل گلخانه‌ای قرار داده شد و واحد حسگر در ۲mm بالای برگ نصب شد تا داده‌ها را برای نمونه‌های مختلف در طول دوره مطالعه ۶۰ روزه جمع‌آوری کند. داده‌های طیف‌سنجی سپس در آزمایشگاه مورد پردازش و تحلیل قرار گرفت. یک پرتو لیزر با توان ۱۰mW و طول موج ۵۳۲nm نیز برای بررسی تنش‌های ناشی از آلودگی باکتری‌ها بر اساس تغییرات طول موج برای نسبت‌های مختلف فلورسنس، استفاده شد. نمونه‌هایی از برگ‌های گیاهان مزرعه و گلخانه جمع‌آوری شد و با استفاده از این سیستم مورد تحلیل قرار گرفت. در این مطالعه از سه نسبت فلورسنس استفاده شد که عبارت بودند از: ۱- نسبت فلورسنس بین ۴۵۲ تا ۶۸۵nm، ۲- نسبت فلورسنس بین ۴۵۲ تا ۷۳۵nm و ۳- نسبت فلورسنس بین ۶۸۵ تا ۷۳۵nm. فلورسنس برگ مرکبات به مدت ۶۰ روز تحت ۴ وضعیت مختلف مورد بررسی قرار گرفت. این وضعیت‌ها عبارت بودند از: برگ‌های بدون تنش، برگ‌های با تنش مکانیکی، برگ‌های بیمار و برگ‌های با تنش مکانیکی و بیمار. این مطالعات نشان داد از طیف سنجی فلورسنس می‌توان برای تشخیص بیماری و تنش‌های مکانیکی استفاده کرد؛ ضمن اینکه گیاهان تحت تنش و بیمار هم قابل تمایز بودند. مطالعه‌ی مشابهی نیز برای مطالعه تنش‌های آبی و زردی برگ‌ها بر اثر بیماری در مرکبات انجام شده است (Marcassa *et al.*, 2006). نتایج نشان داد که با استفاده از طیف سنجی فلورسنس می‌توان برگ‌های بیمار را از برگ‌های سالم تشخیص داد اما نمی‌توان تشخیص داد که بیماری برگ‌ها به دلیل تنش‌های آبی است یا عوامل بیماری‌زا. نویسندگان مقالات هنوز یک تحلیل آماری برای ارزیابی قابلیت این روش برای تشخیص یا طبقه‌بندی شرایط گیاهی ارائه نداده‌اند.

لینز و همکاران (۲۰۰۹) یک سری آزمایشات مزرعه‌ای را به منظور تشخیص برگ‌های بیمار و برگ‌های سالم در مرکبات انجام دادند. در این مطالعه از شاخص‌های تصویری برای سنجش تفاوت بین برگ‌های سالم و برگ‌های آلوده به بیماری استفاده شد. با وجود تفاوت‌های واضح بین برگ‌های سالم و برگ‌های بیمار، اما با این حال برگ‌های بیمار در مقایسه با برگ‌هایی که تحت شرایط مزرعه‌ای زرد شده بودند یک طیف فلورسنس را از خود نشان دادند. این مطالعه نشان داد که برای دستیابی به نتایج واقعی

از وضعیت بیماری، لازم است علاوه بر طیف‌سنجی فلورسنس، از یک سری داده‌های میدانی نیز استفاده شود. بنابراین برای دسته‌بندی شرایط مختلف گیاهی هنوز نیاز به مطالعات بیشتری است که بایستی با مطالعات آماری نیز همراه باشد.

روش‌هایی نظیر تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA)[1]، و الگوریتم‌های دسته‌بندی بر پایه‌ی شبکه‌های عصبی می‌تواند برای تحلیل نتایج به دست آمده از طیف‌سنجی فلورسنس استفاده شود. روش‌هایی نظیر PCA، تحلیل فاکتورهای موازی، تحلیل خوشه‌ای، رگرسیون حداقل نسبی مربعات (PLS)[2] و تحلیل خطی فیشر[3] (LDA) می‌تواند برای دسته‌بندی داده‌های طیف سنجی فلورسنس استفاده شود (Guimet, 2005).

طیف سنجی مرئی و مادون قرمز

روش‌های طیف‌سنجی مرئی و مادون قرمز نیز همانند طیف‌سنجی فلورسنس، به عنوان روش‌های سریع، غیر مخرب و اقتصادی برای تشخیص بیماری‌های گیاهی استفاده شده است. این فناوری‌ها به سرعت در حال پیشرفت بوده و در مطالعات مختلفی استفاده شده است (Zhang *et al.*, 2008a,b; Guo *et al.*, 2009; Sundaram *et al.*, 2009). از این فناوری‌ها برای تشخیص تنش، صدمه‌های مکانیکی و بیماری‌ها در گیاهان مختلف استفاده شده است (Spinelli *et al.*, 2006; Naidu *et al.*, 2009). ناحیه‌ی مرئی و مادون قرمز در طیف امواج الکترومغناطیسی، به عنوان گستره‌ای از امواج با بیشترین اطلاعات در زمینه‌ی سطوح مختلف تنش‌های فیزیولوژی در گیاهان شناخته شده است (Muhammed, 2002, 2005; Xu *et al.*, 2007). بنابراین برخی از طول موج‌های مربوط به یک بیماری را می‌توان به عنوان باندهای موجی برای شناسایی بیماری حتی قبل از ظاهر شدن نشانه‌های بیماری، استفاده کرد (West *et al.*, 2003). به صورت عمومی در حالتی که برای تشخیص بیماری از طیف سنجی مرئی استفاده می‌شود، معمولاً از طیف‌سنجی مادون قرمز نیز به صورت ترکیبی استفاده می‌شود (Larsolle and Muhammed, 2007).

اسپینلی و همکاران (۲۰۰۶) تحت شرایط گلخانه‌ای از طیف نزدیک به مادون قرمز (NIR) برای تشخیص بیماری سوختگی در گلابی پیش از ظهور علائم استفاده کردند (Spinelli *et al.*, 2006). نتایج نشان داد که روش NIR برای دسته‌بندی گیاهان بیمار از سالم، پتانسیل بالایی ندارد؛ در حالی که سیستم بینی الکترونیکی دارای پتانسیل بالاتری است. آن‌ها گزارش دادند که دلیل عدم پتانسیل روش NIR در تشخیص بیماری‌ها این است که در این روش سطح نسبتاً کمی از برگ‌ها اسکن می‌شود (در این مطالعه ۲mm^2). برای غلبه بر این مشکل آن‌ها تصویربرداری چند بعدی را برای مطالعه پیشنهاد دادند که می‌تواند اطلاعات به نسبت بیشتری را در مقایسه با یک سطح کوچک فراهم کند. این مطالعه نشان داد که برای تشخیص بیماری، استفاده از چندین روش طیف‌سنجی بسیار جامع‌تر و دقیق‌تر از استفاده از یک روش طیف‌سنجی به تنهایی می‌باشد.

1- Principal component analysis
2- Partial least square regression
3- Fischer's linear discriminant analysis

پورسل و همکاران (۲۰۰۹) از روش‌های طیف سنجی NIR برای تشخیص و رتبه بندی مقاومت گیاه نیشکر استرالیا در برابر عوامل بیماری‌زا استفاده کردند. نمونه‌های برگ جدا شده از ساقه‌ی نیشکر برای زمان‌های مختلف جدا شدن (۴- ۲ روز) با استفاده از تبدیل فوریه دستگاه NIR مورد تحلیل قرار گرفت و سیگنالی در محدوده‌ی طیفی cm^{-1} ۱۱۰۰۰ -۴۰۰۰ ایجاد شد. برای آنالیز داده‌ها از تحلیل مؤلفه‌های اصلی و روش‌های آماری مبتنی بر PLS استفاده شد. برای تحلیل بیشتر، مشتق دوم سیگنال نیز در محدوده‌ی طیفی تعیین شد تا مشخص شود که سیگنال برای تشخیص بیماری چه تناسبی دارد. آن‌ها گزارش دادند که روش مبتنی بر PLS برای تشخیص میزان بیماری در نیشکر مؤثرتر است.

نیدو و همکاران (۲۰۰۹) از طیف انعکاسی برگ انگور برای مشخص کردن وضعیت آلودگی ویروسی درخت انگور تحت شرایط مزرعه‌ای استفاده کردند و در آن از یک طیف‌سنج قابل حمل برای جمع‌آوری داده‌های انعکاسی از هر برگ گیاه استفاده شد. به علاوه غیر از طیف مرئی نور سبز از طیف نزدیک مادون قرمز و ناحیه میانی مادون قرمز به عنوان شاخص‌هایی برای کمک به تشخیص بیماری با استفاده از طیف انعکاسی استفاده شد. نتایج نشان داد که دقت تشخیص بیماری در این پژوهش حداکثر ۷۵٪ است.

هوآنگ و آپان (۲۰۰۶) برای تشخیص بیماری در گیاه کرفس، با استفاده از یک طیف سنج قابل حمل، داده‌های فراطیفی را از سطح مزرعه جمع‌آوری کردند. در این پژوهش برای تحلیل داده‌های طیف انعکاسی از آنالیز رگرسیون PLS استفاده شد و در هنگام اعتبار سنجی مدل بهبود یافته، از مشتق اول و دوم نیز استفاده شد تا تأثیر آن در کاهش میانگین ریشه‌ی مربعات خطاها (RMS) مورد سنجش قرار گیرد. نتایج نشان داد که داده‌های خام، RMS کمتری نسبت به مشتق‌های اول و دوم ایجاد می‌کنند. آن‌ها همچنین گزارش دادند که امواج انعکاسی در طیف مرئی و مادون قرمز از بازه‌ی ۴۰۰ تا ۱۳۰۰nm در مقایسه با کل طیف مورد مطالعه (۴۰۰-۲۵۰۰nm) برای دستیابی به نتایج مشابه کافی است. مرحله اعتبارسنجی نتایج نشان داد که استفاده از داده‌های خام، مشتق اول و دوم دارای خطای ۱۳٪-۱۱ در تخمین بیماری‌ها می‌باشد.

چن و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از طیف‌سنجی فراطیفی، سطح آلوده به قارچ را در یک مزرعه‌ی پنبه مورد مطالعه قرار دادند. داده‌های انعکاسی با استفاده از یک طیف‌سنج قابل حمل از سطح مزرعه جمع‌آوری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه مورد تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین طیف مرئی و مادون قرمز، مشتق اول طیف مادون قرمز در محدوده‌ی طول موجی بین ۷۳۱ تا ۱۳۱۷nm در تخمین سطح آلوده به قارچ مؤثرتر است. سایر نواحی حساس دیگر برای تخمین سطوح مختلف آلودگی بین رنج ۷۸۰ تا ۱۳۰۰nm و مشتق اول طیف از طول موج ۶۸۰ تا ۷۶۰nm بود.

دیلالیکس و همکاران (۲۰۰۷) از مطالعات فراطیفی در بازه طول موجی ۳۵۰-۲۵۰۰nm برای تشخیص بیماری در درخت سیب استفاده کردند. این مطالعه با هدف مشخص کردن درخت‌های آلوده و انتخاب بهترین بازه‌ی طول موج برای دسته‌بندی گیاهان

آلوده از سالم انجام شد. داده‌ها با استفاده از روش‌هایی مثل LDA، رگرسیون منطقی[1]، آنالیز حداقل مربعات جزئی تفکیک منطقی (PLS-LDA)[2] و مدل درختی مورد تحلیل قرار گرفتند. نتایج نشان داد که خصوصیات طیفی از ۱۳۵۰ تا ۱۷۵۰nm و ۲۲۰۰ تا ۲۵۰۰nm برای دسته‌بندی برگ‌های سالم از بیمار در مراحل اولیه مؤثر است در حالی که برای تشخیص در مراحل پیشرفته‌تر بازه‌ی طول موجی بین ۵۸۰–۶۶۰nm و ۶۸۸–۷۱۵nm مؤثرتر است. از بین روش‌های آماری مورد مطالعه روش رگرسیون منطقی، PLS-LDA و مدل درختی برای دسته‌بندی پیشنهاد شد. اما روش PLS-LDA و مدل درختی که روش‌هایی ساده‌تر بوده و وقت و محاسبات کمتری لازم دارد را توصیه کردند. کوبایاشی و همکاران (۲۰۰۱) از یک رادیومتر چندطیفی و یک اسکنر چندطیفی هوابرد برای بررسی ورس خوشه‌ی برنج استفاده کردند. بازه‌ی طیفی اسکن چند طیفی هوابرد متناسب با آزمایشات زمینی انتخاب شد. چهار باند طیفی از ۴۰۰–۴۶۰nm، ۴۹۰–۵۳۰nm، ۵۳۰–۵۷۰nm، ۶۵۰–۷۰۰nm و ۹۵۰–۱۱۰۰nm برای اسکن انتخاب شد (میدان دید آنی ۲/۵ mrad، تفکیک پذیری مکانی ۰/۹۴ متر در ارتفاع ۳۰۰ متری). با افزایش میزان ورس، میزان نسبت انعکاس کاهش می‌یابد. ونگ و همکاران (۲۰۰۲) از مدل‌های PLS و شبکه عصبی برای تشخیص صدمه در دانه لوبیا استفاده کردند. در این پژوهش تشخیص صدمه‌دیدگی با استفاده از داده‌های انعکاسی حاصل از طیف مرئی و مادون قرمز انجام شد. نتایج نشان داد که استفاده از شبکه‌های عصبی دقت بیشتری نسبت به مدل PLS دارد.

در مطالعات مختلف، از روش‌ها و مدل‌های متنوعی برای دسته‌بندی وضعیت بیماری با استفاده از داده‌های طیفی انجام شده است. به عنوان مثال راگو و همکاران (۲۰۰۳) از هشت مدل دسته‌بندی (آنالیز تفکیک خطی، نزدیکترین همسایه‌های k، مدل مستقل نرم برای دسته‌بندی قیاسی (SIMCA)، روش تفکیک جزئی حداقل مربعات (DPLS)، آنالیز تفکیک پوسته‌ای (PDA)، درخت رگرسیون و دسته‌بندی، شبکه‌های عصبی احتمالاتی، بردار یادگیری تدریجی بر اساس شبکه‌های عصبی) استفاده کردند. نتایج نشان داد که روش‌های SIMCA، DPLS و PDA نسبت به روش‌های دیگر دقت بالاتری دارند.

وو و همکاران (۲۰۰۸) از روش دسته‌بندی PCA تقویت شده با شبکه عصبی (BPNN) و PLA تقویت شده با شبکه عصبی برای تشخیص قارچ در برگ‌های بادمجان قبل از بروز علائم استفاده کردند. این مطالعات در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. نتایج نشان داد که تقویت با شبکه عصبی باعث افزایش دقت دسته‌بندی تا ۸۵٪ می‌شود. علاوه بر مدل‌های آماری، در مطالعات دسته‌بندی گیاهان بیمار از سالم بر اساس طیف سنجی، از شاخص‌های متنوع گیاهی برای اندازه‌گیری تغییرات طیف انعکاسی استفاده شده است. برخی از این شاخص‌های گیاهی در جدول ۴ به صورت خلاصه آورده شده است.

تصویربرداری فلورسنس

تغییر در فلورسنس آبی- سبز و فلورسنس کلروفیل از سطح برگ‌هایی که تحت تابش امواج فرابنفش قرار گرفته‌اند می‌تواند شرایط فیزیکی و وضعیت گیاه را نشان دهد (Belasque *et al.*, 2008). تصویربرداری فلورسنس یک حالت پیشرفته از طیف‌سنجی

1- Logistic regression
2- Partial least squares logistic discriminant analysis

فلورسنس است که در آن به جای یک طیف فلورسنس، چندین تصویر فلورسنس با استفاده از دوربین به دست می‌آید. یک لامپ زنون یا هالوژن به عنوان منبع تابش امواج UV استفاده می‌شود. در این روش طول موج‌های منحصر به فرد با استفاده از وسیله‌ای که به دوربین سیستم سوار شده ثبت می‌شود (Lenk *et al.*, 2007).

نواحی طیف الکترومغناطیسی که به طور معمول برای تصویربرداری فلورسنس استفاده می‌شود می‌توان به آبی (۴۴۰nm)، سبز (۵۲۰–۵۵۰nm)، قرمز (۶۹۰nm)، دور قرمز (۷۴۰nm) و نزدیک مادون قرمز (۸۰۰nm) اشاره کرد (Chaerle *et al.*, 2007). لینک و همکاران (۲۰۰۷) روش فلورسنس چند طیفی را توضیح داده و از کاربردهای آن به کنترل کیفیت میوه، فعالیت‌های فتوسنتزی، مطالعات بافتی و علائم بیماری در گیاهان اشاره کردند که برای هریک وسایل و تجهیزاتی نیاز است.

تصویربرداری فلورسنس کلروفیل می‌تواند ابزار بسیار مؤثری در تشخیص بیماری برگ‌ها باشد (Scharte *et al.* 2005; Lenk *et al.*, 2007). چارلی و همکاران (۲۰۰۷) از فلورسنس آبی– سبز در بررسی آلودگی به ویروس موزائیک (TMV)[1] در گیاه توتون استفاده کردند. در تصاویر فلورسنس بدست آمده از گیاهان آلوده یک سری اثراتی از آلودگی مشاهده شد. در این پژوهش تصاویر بازتاب شده در طول موج ۵۵۰ تا ۸۰۰nm به عنوان تصاویر مرجع در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که برای گیاهان آلوده، پس از گذشت ۴۰ تا ۵۵ ساعت، در فلورسنس آبی، سبز و کلروفیل یک افزایش اتفاق می‌افتد. بنابراین با تصویربرداری فلورسنس می‌توان پس از گذشت زمان کوتاه (۵۰ ساعت)، برگ‌های آلوده را از برگ‌های سالم با مقایسه‌ی تصاویر مرجع، تشخیص داد در حالی که برای بروز علائم قابل رؤیت بیماری حداقل ۱۴ روز زمان لازم است.

براوو و همکاران (۲۰۰۴) از تصویربرداری فلورسنس برای تشخیص بیماری زنگ‌زدگی در گندم زمستانه استفاده کردند. برای این کار دو نوع تصویر فلورسنس حین آزمایش‌ها تهیه شد: تصویر زمینه بدون لامپ زنون و تصویر فلورسنس با لامپ زنون. تصاویر فلورسنس استفاده شده برای تشخیص بیماری با تفریق تصویر فلورسنس از تصویر زمینه بدست آمد. میزان فلورسنس در طول موج‌های ۴۵۰، ۵۵۰، ۶۹۰ و ۷۴۰nm اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تفاوت بین فلورسنس در ۵۵۰ و ۶۹۰nm در قسمت‌های آلوده‌ی برگ‌ها در مقایسه با نواحی سالم بسیار بالاتر بود. از آنالیز تفکیک درجه دوم (QDA)[2] برای تفکیک گیاهان سالم از گیاهان آلوده استفاده شد. نتایج نشان داد با وجود ناکارآمدی روش‌های بکار برده در تشخیص گیاهان سالم از نیمه سالم، با استفاده از روش QDA می‌توان گیاهان سالم و گیاهان بیمار را به ترتیب با دقت ۷۱٪ و ۹۶٪، دسته‌بندی کرد.

موشو و همکاران (۲۰۰۵) از تصویربرداری فراطیفی در ترکیب با تصویربرداری فلورسنس چند طیفی برای تشخیص بیماری زنگ زدگی گندم[3] زمستانه استفاده کردند. تصویربرداری فراطیفی تحت شرایط محیطی انجام شد درحالی که تصاویر فلورسنس تحت تابش لامپ‌های UV انجام شد. نتایج نشان داد ترکیب تصاویر فراطیفی با تصاویر فلورسنس چند طیفی به همراه آنالیز QDA،

1- Tobacco mosaic virus
2- Quadratic discriminant analysis
3- *Puccinia striiformis*

باعث بهبود دقت دسته‌بندی گیاهان سالم از ۹۰-۷۱٪ به ۹۷٪ می‌شود. با بکارگیری روش شبکه‌ی عصبی در دسته‌بندی گیاهان، دقت تشخیص گیاهان بیمار و سالم حتی بیشتر بوده و به ترتیب ۹۸/۷٪ و ۹۹/۴٪ بهبود خواهد یافت.

موارد فوق کاربردهایی از روش تصویربرداری در تشخیص بیماری‌های گیاهی بودند. روش‌های تصویربرداری نسبت به روش‌های طیف‌سنجی قادر خواهند بود اطلاعات طیفی را از سطح وسیعی جمع‌آوری کرده و اطلاعات طیفی را در سه بعد به صورت تصاویری نمایش دهد.

تصویربرداری فراطیفی[1]

در سال‌های اخیر تصویربرداری فراطیفی به دلیل کاربرد گسترده‌ی آن در مبحث کشاورزی دقیق، مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است (Okamoto *et al.*, 2009). در تصویربرداری فراطیفی، بازتاب طیفی هر پیکسل برای یک ناحیه از طول موج‌های طیف الکترومغناطیس جمع‌آوری می‌شود. این طول موج‌ها ممکن است شامل نواحی مرئی و مادون قرمز از طیف الکترومغناطیس باشند. در تصویربرداری فراطیفی مانند تصویربرداری چند طیفی، هر پیکسل از تصویر نماینده تغییرات رنج وسیعی از طول موج‌هایی است که اسکن شده است. در این مطالعات نتایج به صورت مجموعه‌ای از ارزش‌های پیکسلی (شدت بازتابش) برای هر طول موج طیفی است که به صورت یک تصویر نمایش داده می‌شود. تصاویر فراطیفی به طور معمول برای کنترل کیفیت میوه‌ها و مواد غذایی استفاده می‌شود.

از مهمترین چالش‌های موجود در تشخیص بیماری‌های گیاهی با استفاده از تصویربرداری فراطیفی، انتخاب باند طیفی مشخصه‌ی بیماری و روش آماری مناسب برای کلاس‌بندی داده‌های بدست آمده است که بستگی به نحوه‌ی جمع‌آوری اطلاعات در شرایط مزرعه‌ای دارد. محققان مختلفی از تصویربرداری فراطیفی برای تشخیص لهیدگی سیب استفاده کرده‌اند و به نتایج متفاوتی رسیده‌اند. به عنوان مثال لو (۲۰۰۳) گزارش داد که بهترین باند طیفی برای تشخیص لهیدگی سیب بین ۱۳۴۰nm- ۱۰۰۰ است در حالیکه ژنگ و همکاران (۲۰۰۵) و المصری و همکاران (۲۰۰۸) گزارش دادند که باند طیفی بین ۹۶۰nm- ۵۵۸ برای تشخیص لهیدگی سیب مناسب است.

بلاسکو و همکاران (۲۰۰۷) از یک بینایی کامپیوتری چندطیفی شامل طیف نامرئی (فرابنفش، مادون قرمز و فلورسنس) و طیف مرئی برای دسته‌بندی مرکبات استفاده کردند. نتایج نشان داد تشخیص سیاه‌شدگی[2] با تصویربرداری NIR دقت بالاتری دارد (۸۶٪) درحالی‌که تصویربرداری فلورسنس برای تشخیص کپک سبز، دقت بیشتری دارد (۹۴٪). در این پژوهش صدمه‌های ناحیه انتهایی میوه که به ساقه متصل می‌شود با دقت ۱۰۰٪ با استفاده از طیف فرابنفش تشخیص داده شد. این مطالعه نشان داد که استفاده از باندهای فراطیفی می‌تواند جنبه‌های مختلف یک مسئله را مشخص کند. بطور مشابه تصویربرداری فراطیفی می‌تواند برای تعیین مشخصه‌های مختلف در تشخیص بیماری گیاهی استفاده شود.

1- Hyperspectral
2- Anthracnose

هر ناحیه‌ی طیفی اطلاعات منحصربه‌فردی را در مورد گیاه فراهم می‌کند. به عنوان مثال بازتابش در طول موج‌های مرئی، اطلاعاتی را در مورد تجمع رنگدانه‌ها در بافت‌ها بیان می‌کند درحالی‌که بازتابش در طول موج‌های مادون قرمز، وضعیت فیزیولوژیکی گیاه را مشخص می‌کند (Huang *et al.*, 2007).

شَفری و حمدان (۲۰۰۹) برای تشخیص بیماری پوسیدگی انتهای ساقه در یک مزرعه‌ی نخل روغنی، از تصویربرداری هوایی استفاده کردند. در این پژوهش از شاخص‌های مختلفی برای طبقه‌بندی گیاهان بیمار از گیاهان سالم استفاده شد. نتایج نشان داد به کمک روش‌های مختلف، دقت طبقه‌بندی بین ۷۳ تا ۸۴٪ تغییر می‌کند. نتایج نشان داد که می‌توان برای تشخیص بیماری و مدیریت مزرعه از تصویربرداری هوایی استفاده کرد. کین و همکاران (۲۰۰۹) برای تشخیص بیماری در مرکبات و گریپ‌فروت از تصاویر فراطیفی با طول موج بین ۹۳۰nm– ۴۵۰ استفاده کردند. برای دسته‌بندی داده‌های فراطیفی جهت تشخیص گیاهان بیمار از روش SID[1] (واگرایی اطلاعات طیفی) استفاده کردند که دقت طبقه‌بندی گیاهان سالم، آسیب دیده و بیمار در این روش در حدود ۹۶٪ گزارش شد. به طور مشابه لی و همکاران (۲۰۰۸) از روش تصویربرداری فراطیفی برای تشخیص میوه‌های نارس مرکبات برروی درخت استفاده کردند. در این پژوهش طبقه‌بندی داده‌های استخراج شده به روش نقشه‌ی زاویه‌ی طیفی (SAM[2]) و جفت‌سازی مشخصه‌های طیفی (SFF[3]) که در نرم‌افزار ENVI وجود دارد انجام شد. نتایج این محققین نتوانست طبقه‌بندی مناسبی با دقت بالا ایجاد کند زیرا حجم اطلاعات استخراج شده بسیار زیاد بود.

سایر روش‌های تصویربرداری

سایر روش‌های تصویربرداری که می‌تواند برای تشخیص بیماری‌های گیاهی استفاده شود عبارت است از: گرمانگاری مادون قرمز، طیف‌نمایی تراهرتز[4]، طیف‌نمایی NMR و تصویربرداری با اشعه‌ی ایکس. از آنجا که این روش‌ها از لحاظ هزینه مقرون به صرفه نیست در این پژوهش تنها به معرفی این روش‌ها اکتفا شده و از بحث درباره‌ی جزئیات آن‌ها خودداری می‌شود.

روش گرمانگاری مادون قرمز، یک روش تصویربرداری است که در آن از انرژی باند مادون قرمز استفاده شده و اطلاعات بدست آمده را به تصاویر قابل رؤیت تبدیل می‌کنند. این روش مانند سایر روش‌های تصویربرداری، غیرمخرب بوده و قادر است وضعیت فیزیولوژیکی گیاه را نشان دهد (Chaerle *et al.*, 2001). لنس و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از روش گرمانگاری مادون قرمز امکان تشخیص بیماری‌های قارچی را از روی سطح برگ‌های گیاه گندم مورد بررسی قرار دادند. با وجود اینکه با این روش می‌توان به وضعیت برگ‌ها پی برد اما نمی‌توان از آن برای تشخیص مستقیم بیماری استفاده کرد. چارلی و همکاران (۲۰۰۳) گزارش دادند که می‌توان از روی تغییر روزنه‌ی برگ‌ها با استفاده از گرمانگاری مادون قرمز، از وجود بیماری اطلاع پیدا کرد. در واقع به دلیل ترشح پراکسیدهیدروژن ناشی از عوامل بیماری‌زا، روزنه‌ی برگ‌ها بسته‌تر می‌شود. به طور مشابه می‌توان از تغییر

1- Spectral information divergence
2- Spectral angle mapping
3- Spectral feature fitting
4- Terahetz spectroscopy

دمای محلی گیاه به دلیل مکانیسم مقابله با عوامل بیماری‌زا، می‌توان به تشخیص بیماری کمک کرد. برگ‌های تنباکو تولید اسید سالسیلیک می‌کنند که باعث تغییر گرما و اندازه‌ی روزنه‌های برگ می‌شود.

در سال‌های اخیر فرکانس‌های تراهرتز (۰/۱ –۱۰THz) برای اندازه‌گیری محتوای رطوبتی برگ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. تنش‌های آبی وارد بر گیاهان می‌تواند از طریق این روش ارزیابی شود (Hadjiloucas *et al.*, 2009).

تشدید مغناطیسی مواد هسته‌ای و روش‌های تصویربرداری با اشعه‌ی ایکس هم می‌تواند به عنوان روشی برای تشخیص بیماری در گیاهان و میوه‌ها مورد استفاده قرار گیرد (Pearson and Wicklow, 2006). گودمن و همکاران (۱۹۹۲)، از روش NMR میکروسکوپی برای شناسایی یک بیماری قارچی در تمشک استفاده کردند. ناروانکر و همکاران (۲۰۰۹)، با استفاده از اشعه‌ی ایکس هجوم قارچ را در گندم شناسایی کردند.

استفاده از ترکیبات فرار آلیِ گیاه برای تشخیص بیماری

ترکیبات آلی فراری (VOC[1]) که به وسیله‌ی گیاهان و درختان متصاعد می‌شود، یک سوم تا نیمی از کل مواد فرار موجود در اتمسفر را به خود اختصاص می‌دهد (Guenther, 1997). پارامترهای متعددی وجود دارد که بر انتشار مواد فرار گیاهان تأثیر می‌گذارد. برخی از این فاکتورها فیزیکوشیمیایی هستند؛ مانند رطوبت، درجه حرارت، میزان نور، شرایط خاک و برخی دیگر مربوط به فاکتورهای زیست‌شناختی هستند مانند مرحله‌ی رشد گیاه، حشرات و وجود سایر علف‌های هرز (Vallat *et al.*, 2005; Vuorinen *et al.*, 2007). پارامترهای فیزیکوشیمیایی به صورت مستقیم و غیرمستقیم بر شرایط فیزیولوژیکی گیاه تأثیر گذاشته و بنابراین بر میزان مواد آلی فرار گیاه تأثیر می‌گذارد. از طرف دیگر این مواد متصاعد شده از ارتباط گیاه با سایر گیاهان و یا میکروارگانیسم‌ها از جمله عوامل بیماری‌زا نیز تأثیر می‌پذیرد. به عنوان مثال استالدئیدی که به وسیله‌ی برگ‌های جوان درخت صنوبر متصاعد می‌شود به وسیله‌ی انتقال اتانول به برگ‌ها در حین تعرق کنترل می‌شود (Kreuzwieser *et al.*, 2001).

دوداروا و همکاران (۲۰۰۶) مجموعه‌ای از مواد فراری که به وسیله‌ی گیاه در حین ارتباط با عوامل زنده و غیر زنده متصاعد می شود را معرفی کرده‌اند.

سیستم بینی الکترونیکی

یک سیستم بینی الکترونیکی تشکیل شده از سنسورهایی که هرکدام به گروهی از ترکیبات آلی حساس هستند. از آنجا که هر سنسور حساسیت خاص خودش را دارد، بنابراین بسته به میزان این حساسیت می‌توان از آن برای تشخیص عناصر موجود در یک محیط استفاده کرد. در حال حاضر از بینی الکترونیکی در مطالعات مختلف استفاده شده است. برخی از محققین از آن برای کنترل کیفیت در صنایع غذایی و یا تشخیص میکروارگانیسم‌ها در محصولات غذایی استفاده کرده‌اند (Evans *et al.*, 2000; Zhang *et*

1- Volatile organic compounds

al. 2008; Falasconi *et al.*, 2005). استفاده از بینی الکترونیکی به منظور تشخیص بیماری در گیاهان، حوزه‌ی نوینی از کاربرد این فناوری در علم کشاورزی است.

لی و همکاران (۲۰۰۹b) از یک بینی الکترونیکی با نام تجاری Cyranose 320 متشکل از ۳۲ سنسور پلیمری برای تشخیص بیماری قارچ در میوه‌ی ذغال‌اخته استفاده کردند. در پژوهشی از خواص بویی مشخصه‌ی هر گیاه استفاده شد و امکان تشخیص بیماری و آفات در خیار، فلفل و گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت (Laothawornkitkul *et al.*, 2008). ژنگ و ونگ (۲۰۰۷) از سیستم بینی الکترونیکی متشکل از ۱۰ سنسور اکسید فلزی برای مشخص نمودن وضعیت آلودگی به سن و حشرات در گندم استفاده کردند. این کار با اندازه‌گیری مشخصات گیاهی از گازهای فرار آزاد شده از گیاه انجام شد.

اسپینلی و همکاران (۲۰۰۶) از ترکیبی از سیستم بینی الکترونیکی به همراه طیف مادون قرمز برای مشخص نمودن بیماری در گیاه گلابی استفاده کردند. نتایج نشان داد سیستم بینی الکترونیکی می‌تواند امضای بویایی مناسب برای تشخیص بیماری را فراهم آورد.

تکنیک *GC-MS*

تکنیک *GC-MS* روشی برای آنالیز کیفی و کمی مواد فرار آزاد شده ناشی از فعالیت‌های سوخت‌وساز زیستی در گیاهان می‌باشد. در این تکنیک، تغییرات مواد فرار آزاد شده از گیاهان بیمار و سالم، مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

پریسی‌ویراج و همکاران (۲۰۰۴) تغییرات مواد فرار آزاد شده از پیاز مبتلا به بیماری‌های باکتریایی و قارچی را مورد ارزیابی قرار دادند. مطالعات نشان داد که ۲۵ ترکیب فرار از پیاز متصاعد می‌شود که می‌توان از آن به عنوان امضای بویایی در تشخیص بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرد. کوشالاپا و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه‌ای مشابه نشان دادند که با افزایش شدت بیماری میزان مواد فرار آزاد شده مشخصه‌ی بیماری نیز بیشتر می‌شود.

سیستم‌های خبره

تشخیص بیماری‌های گیاهی کار نسبتاً دشواری است و نیازمند متخصصین مجرب در این حوزه است. از آنجا که بسیاری از بیماری‌ها دارای نشانه‌های مشابهی در گیاه هستند یک راه برای تشخیص نوع بیماری، مقایسه‌ی تمام علائم بروز کرده در یک گیاه با یک بیماری شناخته شده است. این راه حل به افراد غیر خبره کمک می‌کند تا بتوانند نوع بیماری مزرعه‌ی خود را تشخیص دهند. اما اغلب برای اطمینان کافی از وجود بیماری لازم است که مجموعه‌ای از علائم برای بیماری‌های مختلف بررسی شود. یک سیستم خبره از مجموعه‌ی قابل توجهی از حلقه‌های شرطی ساده تشکیل شده است که ممکن است با استخراج از داده‌های یک عکس از سطح مزرعه پاسخ داده شود یا به صورت پرسش‌های کلیدی محدود از کاربر گرفته شود. این سیستم‌ها به کاربر این امکان را می‌دهد که هر نوع بیماری را تشخیص داده و تیمار مناسب را برای درمان آن بگیرد. در این سیستم‌ها تصاویر دیجیتال با کیفیت بالا شامل عکس‌ها و کلیپ‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است (هلمز ۲۰۰۰). با مقایسه‌ی عکس گیاهان سالم و بیمار

می‌توان ابتدا وجود بیماری را مشخص کرد و سپس با بررسی علائم مختلف بیماری بخصوص بیماری‌های شناخته شده در منطقه نوع بیماری را مشخص کرد. متأسفانه در حال حاضر تکنیک تشخیص نوع بیماری در اختیار متخصیصین مختلف است و افراد عادی اطلاع کمی در این موضوع دارند. دانش افراد خبره در زمینه تشخیص بیماری‌ها گاهی با هم همپوشانی داشته و گاهی مکمل هم هستند. بنابراین تهیه یک سیستم متشکل از شبکه‌ای از اطلاعات کلیدی که بیماری‌های مختلف را از لحاظ علائم بررسی می‌کند بسیار مفید بوده و افراد عادی را نیز قادر می‌سازد تصمیم صحیح را در زمان کوتاه بگیرد. ویژگی این سیستم‌ها این است که مجموعه‌ای جامع از سیستم‌های تشخیص دهنده و تصمیم‌گیر به صورت شبکه‌ای از اطلاعات مفید در قالب نرم‌افزارهای ساده در اختیار کاربران قرار داده می‌شود.

جون- چن و همکاران (۲۰۱۰) یک سیستم خبره متشکل از اطلاعات ۲۳ بیماری مختلف را در گیاه ذرت تهیه کردند (شکل ۱). در این سیستم ۱۰۵ تصویر رنگی با کیفیت بالا از علائم این ۲۳ بیماری فراهم شد و در اختیار کاربر قرار داده شد. ویژگی این سیستم این بود که کاربران عادی به راحتی با آن ارتباط برقرار می‌کردند.

شکل ۱- تصویری از فضای نرم‌افزار

یالوریس و سایدریدیس (۱۹۹۶) یک سیستم خبره را برای تشخیص بیماری‌های مختلف در گیاه گوجه فرنگی تهیه کردند. این سیستم وضعیت گیاه را برای ۸ نوع بیماری قارچی، ۴ نوع بیماری باکتریایی، ۳ نوع بیماری ویروسی و ۴ نوع کمبود مواد مغذی مورد بررسی قرار می‌داد.

پتروت و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از یک سیستم خبره به صورت نرم افزار سبک قابل اجرا برروی گوش‌های تلفن همراه و کامپیوتر، وجود ۳۵ نوع بیماری را در گیاه توت فرنگی مورد بررسی قرار دادند (شکل ۲). در این سیستم ابتدا به کمک دوربین موبایل تصویرهایی از نمای نزدیک قسمت‌های مختلف گیاه گرفته می‌شد و سپس این تصاویر بر اساس کدهای نوشته شده با تصاویر مرجع مقایسه می‌شد و در نهایت نوع بیماری به کاربر اطلاع داده می‌شد. نتایج نشان داد که این سیستم با دقت خوبی قادر به تشخیص بیماری می‌باشد.

شکل ۲- اجرای نرم‌افزار تشخیص دهنده بیماری بر روی گوشی تلفن همراه

نتیجه‌گیری

نتایج بررسی روش‌های مختلف بیماری از لحاظ دقت، هزینه، توانایی استفاده در شرایط مزرعه‌ای و سرعت تشخیص، به صورت جدول آورده شده است:

مشخصات	روش‌های مولکولی	روش‌های تصویربرداری و طیف‌سنجی	روش‌های بویایی
دقت روش	در حال حاضر روش‌های مولکولی دقیق‌ترین روش برای تشخیص بیماری هستند. تلاش‌ها برای ساده و منطقی کردن روش‌های مولکولی در حال انجام است تا بسته‌هایی برای استفاده در شرایط مزرعه‌ای به دست آید. اما تولید بسته‌های تشخیص برای بیماری‌های مختلف بسیار دشوار است. بنابراین بیشتر بر روی بیماری‌های شایع و مهم این کارها انجام می‌شود.	دقت روش‌های تصویربرداری و طیف‌سنجی برای تشخیص بیماری‌های گیاهی به عوامل مختلفی بستگی دارد. هرچه نشانه‌های دیداری یک بیماری مشخص‌تر باشد، دقت این روش بیشتر است. هرچند ممکن است برخی از نشانه‌های بیماری در طیف غیر مرئی برای افزایش دقت در تشخیص استفاده شود.	دقت این روش هنوز بطور کامل مشخص نیست زیرا این روش بیشتر در سال‌های اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است. مشخص نمودن علامت‌های اصلی یک بیماری در حوزه‌ی بویایی که اصلی‌ترین بخش در این روش است می‌تواند دقت این روش را افزایش دهد.
هزینه	این روش تا حدودی پرهزینه است و اغلب نیاز به کار سخت و تجهیزات خاص این روش می‌باشد.	این روش پرهزینه است بخصوص اگر از روش‌های طیف‌سنجی فراطیفی استفاده شود. به طور کلی باند طیفی مورد استفاده برای تشخیص بیماری تا حدودی میزان هزینه را مشخصمی‌کند. در این روش نیاز به یک کامپیوتر یا یک لپتاب برای پردازش داده‌ها می‌باشد.	هزینه در این روش بستگی به سطح دقت مورد انتظار از مواد فرار آزاد شده دارد. هزینه‌ها تا حدودی به قیمت تمام شده برای تشخیص امضای بویایی مشخص کننده‌ی بیماری بستگی دارد.
توانایی استفاده در شرایط مزرعه‌ای	بسته‌هایی برای تشخیص بیماری در شرایط مزرعه‌ای فراهم شده اما به هر حال تولید بسته‌های مختلف برای تمام بیماری‌ها کار دشواری است. بسته‌های تولید شده برای کار در شرایط مزرعه‌ای هنوز احتیاج به تحقیقاتی برای منطقی کردن و دقت در نتایج دارد.	توانایی این روش برای استفاده در شرایط مزرعه‌ای در حد متوسط است.	این روش بسته به تشخیص دهنده‌ی مورد استفاده روش نیرومندی است.
سرعت تشخیص	معمولا بین ۲۴ تا ۴۸ ساعت لازم است تا به نتایج قابل قبولی برسیم. بسته‌های تهیه شده دارای سرعت بیشتری هستند.	در هنگام استفاده از این روش بعد از چند دقیقه بیماری قابل تشخیص است. سرعت این روش بستگی به سرعت سیستم‌های کامپیوتری و واحد اسکنر دارد.	این روش برای تشخیص بیماری‌ها نسبتاً سریع است. بخصوص برای برخی از بیماری‌ها سرعت بسیار بالایی دارد. سرعت این روش نیز بستگی به واحد تشخیص دهنده و سیستم کامپیوتری دارد.
جنبه‌های دیگر	به دلیل محدودیت‌های این روش،	این روش به راحتی می‌تواند خودکار شده و	بخش انتخاب علامت زیستی در این

استفاده از آن برای تشخیص‌های اتوماتیک و سریع دشوار است. در این روش برای تشخیص درست بیماری به پرسنل انسانی نیاز است.	در عملیات از راه دور مورد استفاده قرار گیرد. این روش می‌تواند به عنوان بررسی اولیه مورد استفاده قرار گیرد تا تعداد نمونه‌گیری در روش مولکولی کاهش یابد.	روش گامی بسیار مهم محسوب می‌شود که پس از انتخاب درست قادر است بر روی سیستم‌های خودکار نیز نصب گردد.

منابع

Belasque, L., Gasparoto, M.C.G., Marcassa, L.G., 2008. Detection of mechanical and disease stresses in citrus plants by fluorescence spectroscopy. Applied Optics 47 (11), 1922–1926.

Blasco, J., Alexios, N., Gómez, J., Moltó, E., 2007. Citrus sorting by identification of the most common defects using multispectral computer vision. Journal of Food Engineering 83 (3), 384–393.

Bravo, C., Moshou, D., Oberti, R.,West, J., McCartney, A., Bodria, L., Ramon, H., 2004. Foliar disease detection in the field using optical sensor fusion.Agricultural Engineering International: the CIGR Journal of Scientific Research and Development, Manuscript FP 04 008, Vol. VI. December 2004.

Cerovic, Z.G., Samson, G., Morales, F., Tremblay, N., Moya, I., 1999. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. Agronomie 19, 543–578.

Chaerle, L., De Boever, F., Van Montagu, M., Van Der Straeten, D., 2001. Thermographic visualization of cell death in tobacco and Arabidopsis. Plant, Cell and Environment 24 (1), 15–25.

Chaerle, L., Hulsen, K., Hermans, C., Strasser, R.J., Valcke, R., Höfte, M., Van Der Straeten, D., 2003. Robotized time-lapse imaging to assess in-plant uptake of phenylurea herbicides and their microbial degradation. Physiologia Plantarium 118, 613–619.

Chaerle, L., Lenk, S., Hagenbeek, D., Buschmann, C., Van Der Straeten, D., 2007. Multicolor fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. Journal of Plant Physiology 164 (3), 253–262.

Chen, B.,Wang, K., Li, S.,Wang, J., Bai, J., Xiao, C., Lai, J., 2008. Spectrumcharacteristics of cotton canopy infectedwith verticilliumwilt and inversion of severity level. In IFIP International Federation for Information Processing,Volume 259;

Computer and Computing Technologies in Agriculture, vol. 2, Daoliang Li, Springer, Boston, pp. 1169–1180.

Choi, Y.H., Tapias, E.C.,Kim,H.K., Lefeber,A.W.M., Erkelens, C.,Verhoeven, J.T.J., Brzin, J., Zel, J., Verpoorte, R., 2004. Metabolic discrimination of Catharanthus roseus leaves infected by phytoplasma using 1H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. Plant Physiology 135, 2398–2410.

Delalieux, S., van Aardt, J., Keulemans,W., Schrevens, E., Coppin, P., 2007. Detection of biotic stress (Venturia inaequalis) in apple trees using hyperspectral data: Non-parametric statistical approaches and physiological implications. European Journal of Agronomy 27 (1), 130–143.

Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D.A., Orlova, I., 2006. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. Critical Reviews in Plant Sciences 25, 417–440.

ElMasry, G., Wang, N., Vigneault, C., Qiao, J., ElSayed, A., 2008. Early detection of apple bruises on different background colors using hyperspectral imaging. LWT Food Science and Technology 41 (2), 337–345.

Evans, P., Persaud, K.C., McNeish, A.S., Sneath, R.W., Hobson, N., Magan, N., 2000. Evaluation of a radial basis function neural network for the determination of wheat quality from electronic nose data. Sensors and Actuators B: Chemical 69 (3), 348–358.

Falasconi, M., Gobbi, E., Pardo, M., Della Torre, M., Bresciani, A., Sberveglieri, G., 2005. Detection of toxigenic strains of Fusarium verticillioides in corn by electronic olfactory system. Sensors and Actuators B: Chemical 108 (1–2), 250–257.

Goodman, B.A., Williamson, B., Chudek, A., 1992. Non-invasive observation of the development of fungal infection in fruit. Protoplasma 166, 107–109.

Guenther, A., 1997. Seasonal and spatial variations in natural volatile organic compound emissions. Ecological Applications 7 (1), 34–45.

Guimet, F., 2005. Olive oil characterization using excitation-emission fluorescence spectroscopy and three-way methods of analysis. Ph.D. thesis, Rovira i Virgili University, Spain.

Guo, T.T., Guo, L.,Wang, X.H., Li,M., 2009. Application of NIR spectroscopy in classification of plant species. In: International Workshop on Education Technology and Computer Science,Wuhan, Hubei, China, vol. 3, pp. 879–883.

Hadjiloucas, S., Walker, G.C., Bowen, J.W., Zafiropoulos, A., 2009. Propagation of errors from a null balance terahertz reflectometer to a sample's relative water content. Journal of Physics: Conference Series, Sensors & their Applications XV 178, 012012, 1–5.

Holmes, G.J., Brown, E.A., Ruhl, G., 2000. What's a picture worth: The use of modern telecommunications in diagnosing plant diseases. Plant Disease, 84, 1256-1265.

Huang, J.F., Apan, A., 2006. Detection of Sclerotinia rot disease on celery using hyperspectral data and partial least squares regression. Journal of Spatial Science 51 (2), 129–142.

Jun-chen, L., Bo, M., Shao-kun, L., Keru W., Rui-zhi, X., Shi-ju, G., 2010. An image-based diagnostic expert system for corn diseases, Agricultural Sciences in China, 9(8):1221- 1229.

Kobayashi, T., Kanda, E., Kitada, K., Ishiguro, K., Torigoe, Y., 2001. Detection of rice panicle blast with multispectral radiometer and the potential of using airborne multispectral scanners. Phytopathology 91 (3), 316–323.

Kreuzwieser, J.,Harren, F.J.M., Laarhoven, L.J.J.,Boamfa, I., Lintel-Hekkertb, S., Scheerera, U., Hüglina, C., Rennenberga, H., 2001. Acetaldehyde emission by the leaves of trees–correlation with physiological and environmental parameters. Physiologia Plantarum 113, 41–49.

Kushalappa, A.C., Lui, L.H., Chen, C.R., Lee, B., 2002. Volatile fingerprinting (SPMEGC-FID) to detect and discriminate diseases of potato tubers. Plant Disease 86, 131–137.

Laothawornkitkul, J., Moore, J.P., Taylor, J.E., Possell, M., Gibson, T.D., Hewitt, C.N., Paul, N.D., 2008. Discrimination of plant volatile signatures by an electronic nose: a potential technology for plant pest and disease monitoring. Environmental Science and Technology 42, 8433–8439.

Larsolle, A.,Muhammed, H.H., 2007.Measuring crop status usingmultivariate analysis of hyperspectral field reflectance with application to disease severity and plant density. Precision Agriculture 8 (1–2), 37–47.

Lee, W.S., Ehsani, R., Albrigo, L.G., 2008. Citrus greening disease (Huanglongbing) detection using aerial hyperspectral imaging. In: The Proceedings of the 9th International Conference on Precision Agriculture, July 20–23, 2008, Denver,CO.

Lenk, S., Chaerle, L., Pfündel, E.E., Langsdorf, G., Hagenbeek, D., Lichtenthaler, H.K., Van Der Straeten, D., Buschmann, C., 2007. Multispectral fluorescence and reflectance imaging at the leaf level and its possible applications. Journal of Experimental Botany 58 (4), 807–814.

Lenthe, J.H., Oerke, E.C., Dehne, H.W., 2007. Digital infrared thermography for monitoring canopy health of wheat. Precision Agriculture 8 (1–2), 15–26.

Li, C., Krewer, G., Kays, S. J., 2009b. Blueberry postharvest disease detection using an electronic nose. ASABE Paper No. 096783, ASABE Annual InternationalMeeting, Reno, NV, June 21–June 24, 2009

Lins, E.C., Belasque Junior, J.,Marcassa, L.G., 2009. Detection of citrus canker in citrus plants using laser induced fluorescence spectroscopy. Precision Agriculture 10, 319–330.

Lopez, M.M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Gorris, M.T., Llop, P., Penyalver, R., Cambra,M., 2003. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. International Microbiology 6, 233–243.

Lu, R., 2003. Detection of bruises on apples using near-infrared hyperspectral imaging. Transactions of the ASAE 46 (2), 523–530.

Marcassa, L.G., Gasparoto, M.C.G., Belasque Junior, J., Lins, E.C., Dias Nunes, F., Bag-nato,V.S., 2006. Fluorescence spectroscopy applied to orange trees. Laser Physics 16 (5), 884–888.

Moshou, D., Bravo, C., Oberti, R.,West, J., Bodria, L., McCartney, A., Ramon, H., 2005. Plantdiseasedetectionbasedondata fusionofhyper-spectral andmulti-spectral fluorescence imaging using Kohonen maps. Real-Time Imaging 11 (2), 75–83.

Muhammed, H.H., 2002. Using hyperspectral reflectance data for discrimination between healthy and diseased plants, and determination of damage-level in diseased plants. In: IEEE: Proceedings of the 31stApplied Imagery Pattern Recognition Workshop, pp. 49–54.

Naidu, R.A., Perry, E.M., Pierce, F.J., Mekuria, T., 2009. The potential of spectral reflectance technique for the detection of Grapevine leafroll-associated virus-3 in two red-berried wine grape cultivars. Computers and Electronics in Agriculture 66, 38–45.

Narvankar, D.S., Singh, C.B., Jayas, D.S.,White, N.D.G., 2009. Assessment of soft X-ray imaging for detection of fungal infection in wheat. Biosystems Engineering 103 (1), 49–56.

Okamoto, H., Suzuki, Y., Kataoka, T., Sakai, K., 2009. Unified hyperspectral imaging methodology for agricultural sensing using software framework. Acta Horticulturae 824, 49–56.

Pearson, T.C., Wicklow, D.T., 2006. Detection of kernels infected by fungi. Transactions of the ASABE 49 (4), 1235–1245.

Pertot, I., Kuflik, T., Gordon, I., Freeman, S., Elad, Y., 2012. Identificator: A web-based tool for visual plant disease identification, a proof of concept with a case study on strawberry. Computers and Electronics in Agriculture, 84, 144–154.

Pimentel, D., Zuniga, R., Morrison, D., 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. Ecological Economics 52 (3), 273–288.

Prithiviraj, B., Vikram, A., Kushalappa, A.C., Yaylayam, V., 2004. Volatile metabolite profiling for the discrimination of onion bulbs infected by Erwinia carotovora ssp. carotovora, Fusarium oxysporum and Botrytis allii. European Journal of Plant Physiology 110, 371–377.

Purcell, D.E., O'Shea,M.G., Johnson, R.A., Kokot, S., 2009. Near-infrared spectroscopy for the prediction of disease rating for Fiji leaf gall in sugarcane clones. Applied Spectroscopy 63 (4), 450–457.

Qin, J., Burks, T.F., Ritenour,M.A., Bonn,W.G., 2009. Detection of citrus canker using hyperspectral reflectance imagingwith spectral information divergence. Journal of Food Engineering 93 (2), 183–191.

Roberts, M.J., Schimmelpfennig, D., Ashley, E., Livingston, M., Ash, M., Vasavada, U., 2006. The value of plant disease early-warning systems. Economic Research Service No. 18, United States Department of Agriculture.

Roggo, Y., Duponchel, L., Huvenne, J.P., 2003. Comparison of supervised pattern recognition methods with McNemar's statistical test: application to qualitative analysis of sugar beet by near-infrared spectroscopy. Analytica Chimica Acta 477 (2), 187–200.

Ruiz-Ruiz, S., Ambrós, S., Carmen Vives, M., Navarro, L., Moreno, P., Guerri, J., 2009. Detection and quantification of Citrus leaf blotch virus by TaqMan real-time RT-PCR. Journal of Virological Methods 160 (1–2), 57–62.

Saponari,M.,Manjunath, K., Yokomi, R.K., 2008. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR(TaqMan®).Journal of Virological Methods 147 (1), 43–53.

Scharte, J., Schön,H.,Weis, E., 2005. Photosynthesis and carbohydratemetabolismin tobacco leaves during an incompatible interactionwith Phytophthora nicotianae. Plant, Cell and Environment 28, 1421–1435.

Shafri, H.Z.M., Hamdan, N., 2009. Hyperspectral imagery formapping disease infection in oil palm plantation using vegetation indices and red edge techniques.American Journal of Applied Sciences 6 (6), 1031–1035.

Spinelli, F., Noferini,M., Costa, G., 2006. Near infrared spectroscopy (NIRs): Perspective of fire blight detection in asymptomatic plant material. Proceeding of 10th InternationalWorkshop on Fire Blight. Acta Horticulturae 704, 87–90.

Sundaram, J., Kandala, C.V., Butts, C.L., 2009. Application of near infrared (NIR) spectroscopy to peanut grading and quality analysis: Overview. Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety 3 (3), 156–164.

Vallat, A., Gu, H., Dorn, S., 2005. How rainfall, relative humidity and temperature influence volatile emissions from apple trees in situ. Phytochemistry 66, 1540–1550.

Vuorinen, T., Nerg, A.M., Syrjälä, L., Peltonen, P., Holopainen, J.K., 2007. Epirrita autumnata induced VOC emission of silver birch differ from emission induced by leaf fungal pathogen. Arthropod–Plant Interactions 1, 159–165.

West, J.S., Bravo, C., Oberti, R., Lemaire, D., Moshou, D., McCartney, H.A., 2003. The potential of optical canopy measurement for targeted control of field crop disease. Annual Review of Phytopathology 41, 593–614.

Wu, D., Feng, L., Zhang, C., He, Y., 2008. Early detection of Botrytis cinerea on eggplant leaves based on visible and near-infrared spectroscopy. Transactions of the ASABE 51 (3), 1133–1139.

Xu, H.R., Ying, Y.B., Fu, X.P., Zhu, S.P., 2007. Near-infrared spectroscopy in detecting leaf miner damage on tomato leaf. Biosystems Engineering 96 (4), 447–454.

Yang, C.M., Cheng, C.H., Chen, R.K., 2007. Changes in spectral characteristics of rice canopy infested with brown planthopper and leaffolder. Crop Science 47, 329–335.

Yialouris, C.F., Sideridis, A.B., 1996. An expert system for tomato disease. Computers and Electronics in Agriculture, 14, 61-76.

Yvon, M., Thébaud, G., Alary, R., Labonne, G., 2009. Specific detection and quantification of the phytopathogenic agent ‘Candidatus Phytoplasma prunorum. Molecular and Cellular Probes 23 (5), 227–234.

Zhang, C., Shen, Y., Chen, J., Xiao, P., Bao, J., 2008a. Nondestructive prediction of total phenolics, flavonoid contents, and antioxidant capacity of rice grain using near-infrared spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (18), 8268–8272.

Zhang, H., Chang, M., Wang, J., Ye, S., 2008b. Evaluation of peach quality indices using an electronic nose by MLR, QPST and BP network. Sensors and Actuators B: Chemical 134 (1), 332–338.

Zhang, H., Wang, J., 2007. Detection of age and insect damage incurred by wheat, with an electronic nose. Journal of Stored Products Research 43, 489–495.

Zhang,M., Qin, Z., Liu, X., 2005. Remote sensed spectral imagery to detect late blight in field tomatoes. Precision Agriculture 6 (6), 489–508.