

استفاده از سیستم بینایی ماشین در ارزیابی توانایی کنترل بیولوژیک دو مخمر آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکون علیه کپک آبی میوهی سیب

لیلا فراهانی^۱، حسن رضا اعتباریان^۱، حدیث محسنی تکلو^۲، حشمت‌اله امینیان^۱، نوازاله صاحبانی^۱

۱- گروه گیاه پزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- دانشکده‌ی مهندسی کامپیوتر، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: لیلا فراهانی، Ifarahani@alumni.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۲۵

۳۹-۲۹ (۱)

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۵

چکیده

در حال حاضر اندازه‌گیری شدت بیماری در مراکز پژوهشی با استفاده از وسایل دستی و یا از طریق مقیاس‌دهی چشمی بیان می‌شود. با گسترش چشم‌گیر علوم رایانه‌ای در اندازه‌گیری دقیق و سریع شدت بیماری، پژوهشی به‌منظور ارزیابی پتانسیل کنترل بیولوژیک دو مخمر *Pichia guilliermondii* (A6) و *Candida membranifaciens* (A4) در تلفیق با سیلیکون (Si) در غلظت‌های ۰/۱٪، ۰/۳٪ و ۰/۵٪ و ترکیب آن‌ها در کنترل جدایه‌های P1 و P2 از قارچ *Penicillium expansum* در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس انجام گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که مخمرهای A6 و A4 به‌طور معنی‌داری سبب کنترل کپک آبی میوهی سیب شدند. تلفیق این مخمرها با Si کنترل به‌مراتب بیشتر بیماری را در پی داشت. استخراج خصوصیات آماری از ناحیه‌ی بافت آلوده در کانال‌های قرمز R، سبز G و آبی B تصاویر دیجیتال آن‌ها نشان داد که میانگین آبی $R^2=0/70$ بیشترین اهمیت و انحراف معیار سبز با $R^2=0/43$ کمترین اهمیت را در شناسایی گروه‌های آماری شدت بیماری داشتند. تحلیل تشخیص خطی با استفاده از صفات میانگین آبی، میانگین سبز، انحراف معیار آبی، انحراف معیار قرمز، ضریب کشیدگی سبز، انحراف معیار سبز سبب شناسایی گروه‌های آماری شدت بیماری با دقت ۸۰٪ شد. نتایج کلی این پژوهش نشان می‌دهد که رنگ توصیف‌گر قدرتمندی است که می‌توان از آن برای اندازه‌گیری شدت بیماری و اندازه‌گیری میزان کنترل‌کنندگی بیماری کپک آبی میوهی سیب (در مقایسه با شاهد) بهره‌گرفت.

واژه‌های کلیدی: LDA، *Penicillium expansum*، *Candida membranifaciens*، *Pichia guilliermondii*

مقدمه

سیستم بینایی ماشین با افزودن یک دوربین دیجیتال به رایانه به‌وجود می‌آید. با این اتصال نخست تصاویر اجسام مورد نظر به‌وسیله دوربین گرفته شده و سپس به‌صورت یک ماتریس اعداد در حافظه‌ی کامپیوتر ذخیره می‌شود. این تصاویر حاوی اطلاعات بسیار زیاد و ارزشمندی از خواص مورفولوژیکی، مرتبط با انواع کانال‌های رنگی و نیز طیف بافتی می‌باشند. سپس این تصاویر با استفاده از برنامه‌های مختلف رایانه‌ای پردازش شده و در نهایت اطلاعات کمی و کیفی از آن‌ها به‌دست می‌آید. در واقع سیستم بینایی ماشین از طریق آنالیز تصویر روشی مطمئن برای دستیابی به

در حال حاضر اندازه‌گیری شدت بیماری در مراکز پژوهشی با استفاده از وسایل دستی نظیر خط‌کش و کولیس و یا از طریق مقیاس‌دهی چشمی بیان می‌شود. اندازه‌گیری به این شیوه بسیار وقت‌گیر بوده و زمینه‌ی ذهنی، تجربه، دقت و دیگر محدودیت‌های فیزیکی در تعیین اندازه‌گیری تأثیرگذار است. از طرفی با گسترش چشم‌گیر علوم و فن‌آوری رایانه‌ای، و امکان استفاده از این دستگاه در اندازه‌گیری کمی‌ت‌های فیزیکی، رنگی و بافتی محصولات، استفاده هر چه بیشتر از این فن‌آوری ضروری به‌نظر می‌رسد.

برداشت سیب در انبار می‌باشد (Pierson *et al.*, 1971). در این بیماری مناطق پوسیده، نرم، آبکی و به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره می‌شوند. سطح پوسیدگی‌های قدیمی‌تر توسط یک لایه سفید رنگ پوشیده می‌شود که این لایه اسپور به تدریج به رنگ سبز آبی در می‌آید. لکه‌های بیماری از لحاظ بافت و رنگ از قسمت‌های سالم کاملاً قابل تشخیص و متمایزند. لکه‌ی حاصل از بیماری روی میوه‌ی سیب گاهی دایره‌ی کامل نمی‌باشد و حتی در آلودگی‌های شدید، این ناحیه محدب می‌باشد

کنترل بیولوژیک از طریق کاربرد عوامل باکتریایی، قارچی و مخمری آنتاگونیست یکی از روش‌های موفق در کنترل بیماری‌های پس از برداشت بوده که به‌عنوان روش جایگزین قارچکش‌های سنتزی در انبار مورد بررسی قرار گرفته است (Wilson & Wisniewski, 1989). مخمرها با داشتن ویژگی‌هایی چون عدم تولید مایکوتوکسین‌ها، داشتن نیازهای غذایی ساده، دامنه‌ی تحمل بالا نسبت به تغییرات درجه‌ی حرارت، سرعت رشد بالا در سوبستراهای با ارزش غذایی کم، و هم‌چنین دارابودن مقادیر زیادی ویتامین، عناصر معدنی و هم‌چنین تاثیرات مفید آن‌ها در تغذیه به‌عنوان یکی از عوامل بیوکنترل موفق در کنترل بیماری‌های بعد از برداشت مورد توجه قرار گرفته‌اند (Druvefors, 2004). افزایش عملکرد این میکروارگانیسم‌ها با سایر عوامل کنترلی از دیگر ویژگی‌های مثبت مخمرها در سیستم‌های کنترلی تلفیقی می‌باشد (Lima *et al.*, 1998). به‌منظور بهبود و افزایش کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زا، میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست را با سطوح کمی از مواد شیمیایی ایمن مانند کیتوزان (El-Ghaouth *et al.*, 2000)، قند 2-deoxy-D-glucose (El-Ghaouth *et al.*, 2000)، اسید سالیسیلیک (Farahani & Etebarian, 2012)، سیلیکون (Farahani *et al.*, 2012)، متیل جاسمونات (Yao & Tian 2005)، بیکربنات سدیم (Yao *et al.* 2004) تلفیق کرده‌اند.

در حال حاضر ارزیابی شیوه‌ی کنترل اتخاذ شده و کارایی عوامل آنتاگونیست در کنترل بیماری کپک آبی سیب بر اساس مساحت لکه‌ی آلوده ایجاد شده روی میوه‌ی

اطلاعات زیاد از یک عکس دیجیتال می‌باشد که این اطلاعات به‌صورت دقیق، هدفمند، کمی و با سرعت بالا به‌دست می‌آیند (Nilson, 1995).

تحقیقات زیادی در زمینه‌ی کاربرد بینایی ماشین در دانش بیماری‌شناسی گیاهی موجود است. Suzuki *et al.*, (2006) به بررسی شکل سلول مخمری، نحوه‌ی جوانه‌زنی، شکل هسته و موقعیت هسته در درون سلول و نیز توزیع آکتین در مخمرهای *Saccharomyces cerevisiae* و *Schizosaccharomyces pombe* با استفاده از تکنیک پردازش تصویر و با استفاده از نرم‌افزارهای CalMorph و F-CalMorph پرداختند. Chakraborty & Tucker (1997) از تکنیک پردازش تصویر برای ارزیابی شدت بیماری سوختگی آلترناریایی آفتابگردان و هم‌چنین زنگ برگ جو با عامل *Puccinia caronata* f.sp. *avenae* استفاده کردند. تعداد و اندازه لکه‌های ایجاد شده در اثر بیماری از طریق آنالیز عکس برگ محاسبه و با ارزیابی چشمی مقایسه شد. بر اساس نتایج آن‌ها ارتباط خطی معنی‌داری بین دو روش در تعداد لکه‌های زنگ برگ جو و هم‌چنین شدت بیماری سوختگی آلترناریایی آفتابگردان وجود داشت. Ahmad *et al.*, (1999) از تکنیک پردازش تصویر برای طبقه‌بندی بذور سویای آلوده به عوامل قارچی بر اساس خصوصیات RGB استفاده کردند. در تحقیقات آن‌ها بذور سالم سویا از بذور آلوده به سه بیماری قارچی (*Alternaria* spp., *Cercospora* spp., *Fusarium* spp.) دو بیماری ویروسی (soybean mosaic potyvirus (black) و soybean mosaic potyvirus (brown)) و هم‌چنین بذور نارس سویا با میانگین دقت نسبی ۸۸٪ از یکدیگر تفکیک شدند. Bock *et al.*, (2008) به بررسی ارزیابی شدت بیماری شانکر مرکبات از طریق مشاهده‌ی بصری از طریق کارشناس و ارزیابی دقیق بیماری با استفاده از نرم‌افزار پردازش تصویر پرداختند. آن‌ها گزارش کردند ارزیابی شدت بیماری از طریق کارشناس در تعداد زیادی نمونه‌ی بیماری اغلب به‌سمت برآوردی بیش از مقدار واقعی می‌باشد.

بیماری کپک آبی سیب با عامل *Penicillium expansum* Link یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پس از

میلی‌لیتر آب‌مق‌طر سترون حاوی ۰/۰۵٪ (حجم به حجم) توئین ۲۰ غوطه‌ور گردیدند. سپس سوسپانسیون 1×10^5 کنیدی در هر میلی‌لیتر آب‌مق‌طر تهیه شد.

تهیه‌ی سوسپانسیون آنتاگونیست: در ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط NYDA (Nutrient Yeast Dextrose Agar) استریل یک‌ل‌وپ از سلول‌های مخمر افزوده شد. ارلن‌ها به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس سلول‌های مخمر با سانتریفیوژ $3000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه از محیط مایع جدا شده و دو بار با آب‌مق‌طر استریل شستشو داده شد (El-Ghaouth et al., 1998). پس از آن با استفاده از لام هماسیتومتر سلول‌های مخمری شمارش و سوسپانسیون مخمرها در غلظت 10^8 سلول در میلی‌لیتر تهیه گردید.

سیلیکون (Si) به فرم سیلیکات سدیم از شرکت Sigma خریداری شد. سیلیکون در آب حل شده، با استفاده از فیلتر میکروپور (ساخت شرکت Starius) استریل و سپس با استفاده از آب‌مق‌طر استریل در غلظت‌های ۰/۰۱٪، ۰/۰۳٪ و ۰/۰۵٪ وزن/حجم تهیه گردید.

بررسی تأثیر مخمرهای آنتاگونیست در تلفیق با غلظت‌های مختلف Si در کنترل کپک آبی سیب:

میوه‌ی سیب رقم گلدن دلشز در اندازه‌های یکسان، کاملاً سالم و بدون هیچ‌گونه عارضه‌ی فیزیولوژیک تهیه شد. برای ضدعفونی سطحی، میوه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۰/۱٪ غوطه‌ور شده و سپس دو بار با آب‌مق‌طر استریل شست و شو داده شده و در نهایت به مدت ۵ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند. سپس با استفاده از یک سوزن استریل روی هر میوه سه چاهک به قطر ۲/۵ میلی‌متر و عمق ۳ میلی‌متر ایجاد گردید. هر چاهک با ۲۰ میکرولیتر از (۱) سوسپانسیون مخمر A4 (۲) سوسپانسیون مخمر A6 (۳) Si در غلظت‌های ۰/۰۱٪، ۰/۰۳٪ و ۰/۰۵٪ (۴) سوسپانسیون مخمر A4 در تلفیق با Si در غلظت‌های ۰/۰۱٪، ۰/۰۳٪ و ۰/۰۵٪ (۵) سوسپانسیون مخمر A6 در تلفیق با Si در غلظت‌های ۰/۰۱٪، ۰/۰۳٪ و ۰/۰۵٪ (۶) آب‌مق‌طر استریل تیمار شد. سیب‌های تیمار شده در داخل ظروف پلاستیکی گذاشته و درون کیسه‌ی پلاستیکی قرار

سیب قابل‌سنجش است. از آنجا که اندازه‌گیری تعداد زیادی نمونه‌ی سیب به‌طور دستی و با استفاده از کولیس، کاری وقت‌گیر و خسته‌کننده می‌باشد، بنابراین یافتن راهی به‌منظور خودکار کردن فرآیند ارزیابی شدت بیماری ضروری به‌نظر می‌رسد. این تحقیق اولین گزارش از کاربرد بینایی ماشین و هوش مصنوعی در اندازه‌گیری شدت بیماری می‌باشد. با توجه به کارایی سیستم بینایی ماشین در اندازه‌گیری ویژگی‌های رنگی و نیز مساحت ناحیه‌ی آلوده میوه‌ی سیب اهداف این تحقیق شامل ارزیابی پتانسیل کنترل بیولوژیکی دو مخمر *P. guilliermondii* A6 و *C. membranifaciens* (A4) به تنهایی و در ترکیب با سطوح مختلف سیلیکون در کنترل کپک آبی سیب در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس و نیز تشخیص شدت آلودگی در میوه‌های سیب با توجه به ویژگی‌های رنگی RGB ناحیه‌ی آلوده می‌باشد.

مواد و روش‌های پژوهش

میوه‌ی سیب: جهت انجام آزمایشات، میوه‌های سیب رقم Golden Delicious از میدان‌های میوه و تره‌بار شهرستان پاکدشت تهیه شد. سیب‌های انتخاب شده بدون هرگونه زخم، لهدگی و یا سوراخ بودند.

انتخاب جدایه‌ی قارچ عامل بیماری و مخمر آنتاگونیست: دو جدایه‌ی قارچ *Penicillium expansum* P1, P2 و دو جدایه‌ی مخمر *Pichia guilliermondii* A6 و *Candida membranifaciens* A4 از آزمایشگاه بیماری‌شناسی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران دریافت گردید. قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ی قارچی با استفاده از تست بیماری‌زایی تعیین شد. قابلیت آنتاگونیستی این دو مخمر نیز در کنترل کپک آبی میوه‌ی سیب بررسی و به‌عنوان دو جدایه‌ی کارا و مؤثر گزارش گردید (Gholamnejad, 2009).

تهیه‌ی سوسپانسیون قارچ عامل بیماری: از کشت ۷-۱۰ روزه‌ی قارچ عامل بیماری جهت تهیه‌ی سوسپانسیون استفاده شد. یک‌ل‌وپ از اسپور قارچ عامل بیماری در ۱۰

مقدار خاکستری کمتر از آستانه، ROI را تشکیل داده و بقیه به عنوان پس زمینه در نظر گرفته شدند که نتیجه آن ایجاد یک تصویر باینری (سفید و سیاه) بود (شکل ۱-د). در پایان، خصوصیات آماری میانگین (Average)، انحراف معیار (Standard Deviation)، ضریب چولگی (Skewness) و ضریب کشیدگی (Kurtosis) از ناحیه باینری در تصاویر RGB استخراج شد. در مد رنگی RGB (شکل ۲)، تمام رنگ‌ها از ترکیب سه رنگ پایه‌ی قرمز (R)، سبز (G) و آبی (B) ساخته می‌شوند که به هر رنگ پایه‌ی عددی بین ۰ تا ۲۵۵ اختصاص می‌یابد.

آنالیز آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS ver.9 انجام شد. ابتدا داده‌های به دست آمده مورد تجزیه‌ی واریانس قرار گرفتند. سپس تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه گردیدند. سپس گروه‌های به دست آمده به عنوان گروه‌های بیماری‌زا در نظر گرفته شده و تیمارهای مربوط به هر گروه به عنوان تکرارهای گروه در نظر گرفته شدند. به منظور تشخیص گروه‌های بیماری‌زا با استفاده از آنالیز عکس آن‌ها، از روش آنالیز تشخیص خطی فیشر و با روش گام به گام (stepwise discriminant) استفاده گردید. در این خصوص تعداد نمونه‌های هر گروه به دو دسته داده‌های آموزشی^۱ و داده‌های آزمایشی^۲ تقسیم شدند که از داده‌های دسته اول برای آموزش سیستم و از داده‌های دسته دوم برای آزمون کارایی سیستم استفاده شده است (جدول ۱). در مرحله‌ی اول صفات مهم و تأثیرگذار در کار شناسایی با استفاده از رویه‌ی stepdisc نرم‌افزار SAS و براساس روش Wilks' Lambda شناسایی شدند و صفاتی که تأثیر کمی در شناسایی داشتند حذف شدند. این کاهش خواص ساختاری باعث کم شدن محاسبات و کاهش پیچیدگی روابط در حین تشخیص گونه‌ها گردید. سپس تحلیل تشخیص خطی (LDA) براساس این خصوصیات انجام گرفت.

داده شدند. هر تیمار دارای چهار تکرار بود. با اسپری کردن آب استریل در درون کیسه‌ها رطوبت نسبی داخل آن‌ها در سطح بالایی (حدود ۹۵ درصد) نگه داشته شد (Vero et al., 2002). پس از ۲۴ ساعت به درون هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ عامل بیماری مایه‌زنی شده و سپس سیب‌ها در انکوباتور با دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند.

آنالیز تصویر: در پایان روز پانزدهم از بافت آلوده سیب‌ها با استفاده از دوربین دیجیتال عکسبرداری شد (شکل ۱ الف). به منظور کاهش نویز و اثرات نور محیط از یک جعبه با ابعاد ۳۴×۳۴×۳۴ سانتی متر مکعب با نور تنظیم شده استفاده گردید. نور سیستم توسط یک لامپ فلوروسنت گرد و دو لامپ فلوروسنت موازی تأمین شد. این جعبه دارای دریچه‌ای برای قرار دادن سیب‌ها در محل مخصوص خود بود. فاصله‌ی بین سطح تصویربرداری و دوربین در این جعبه قابل تنظیم بود. از یک دوربین دیجیتال با فاصله‌ی ۲۴ سانتی متر از سطح تصویربرداری استفاده شد. تصاویر تهیه شده با استفاده از جعبه ابزار پردازش تصویر نرم افزار Matlab 2008a آنالیز شدند.

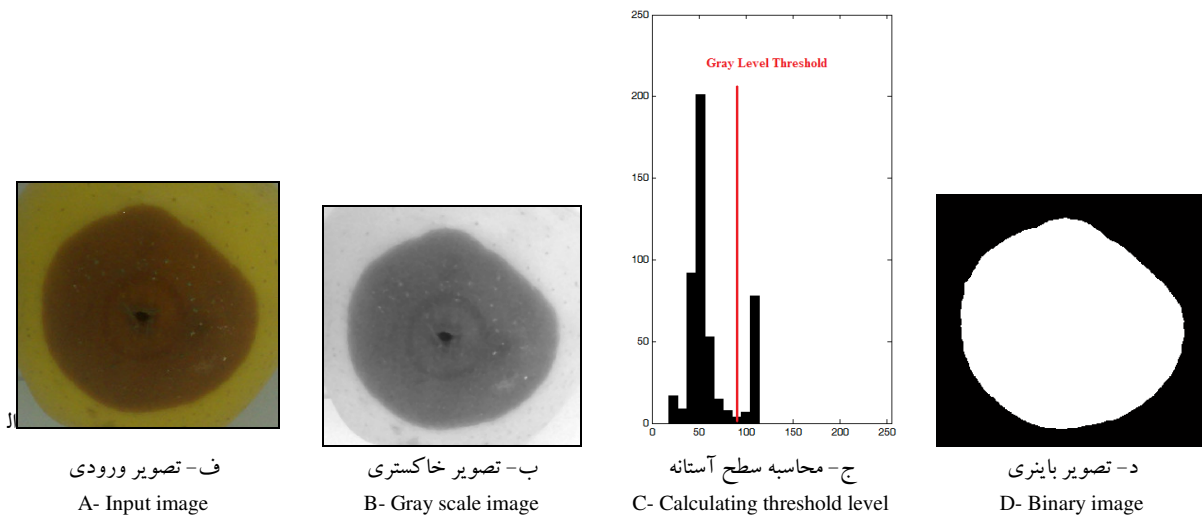
استخراج ناحیه‌ی آلودگی: ناحیه‌ی مورد نظر که به اصطلاح roi (region of interest) نامیده می‌شود شامل ناحیه‌ای از بافت سیب است که در اثر آلودگی قهوه‌ای شده است (شکل ۱-الف). این ناحیه را می‌توان با قطعه‌بندی تصویر دیجیتال و طی مراحل زیر استخراج کرد:

در مرحله‌ی اول تصویر رنگی ورودی به یک تصویر خاکستری تبدیل شد (شکل ۱-ب). در مرحله‌ی دوم سطح آستانه تصویر، بر اساس آنالیز هیستوگرام، محاسبه گردید. آستانه حدی از تصویر خاکستری می‌باشد که نمودار هیستوگرام را به دو بخش تقسیم می‌کند. بخش اول با سطوح خاکستری کمتر به عنوان Region Of Interest (ROI) و بخش دیگر به طور کامل به عنوان پس زمینه شناسایی شد (شکل ۱-ج).

در مرحله‌ی سوم از آستانه‌ی محاسبه شده برای قطعه‌بندی تصویر ورودی استفاده شد. همه‌ی پیکسل‌ها با

^۱ Data Training

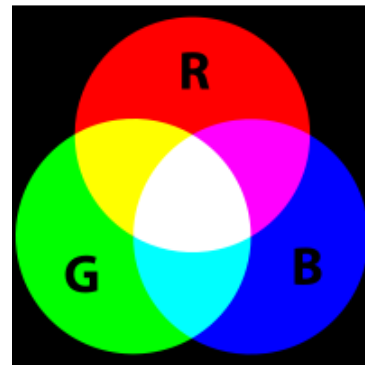
^۲ Data Test



شکل ۱- مراحل قطعه بندی و استخراج roi (region of interest)

Fig. 1. Segmentation steps and roi (region of interest) extraction.

سبب *P. guilliermondii* A6 و *C. membranifaciens* A4 کنترل بهتر بیماری حاصل از جدایه های P1 و P2 شد. تلفیق کردن مخمرهای *C. membranifaciens* A4 با سیلیکون در غلظت های ۰/۵٪، ۰/۳٪ و ۰/۱٪ سبب بهبود چشم گیری در کاهش بیماری حاصل از جدایه های P1 شد و اختلاف معنی داری بین تلفیق Si با مخمر *C. membranifaciens* A4 در کنترل جدایه ی P2 مشاهده نگردید. هم چنین اختلاف معنی داری بین مخمر *P. guilliermondii* A6 در تلفیق با غلظت های مختلف Si در کنترل جدایه های عامل بیماری مشاهده نگردید ($p < 0/05$) (شکل ۳). نتایج سایر محققین نیز نشان دهنده ی کارآیی مخمرهای آنتاگونیست در کنترل کپک آبی میسوهی سیب می باشد (Gholamnejad *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 1999). توانایی مخمرها در کنترل بیولوژیک بیماری ها را به رقابت مخمرها بر سر غذا و فضا، تولید موادی مانند آنتی بیوتیک ها و نیز القای مقاومت نسبت داده اند (Droby *et al.* 1989).

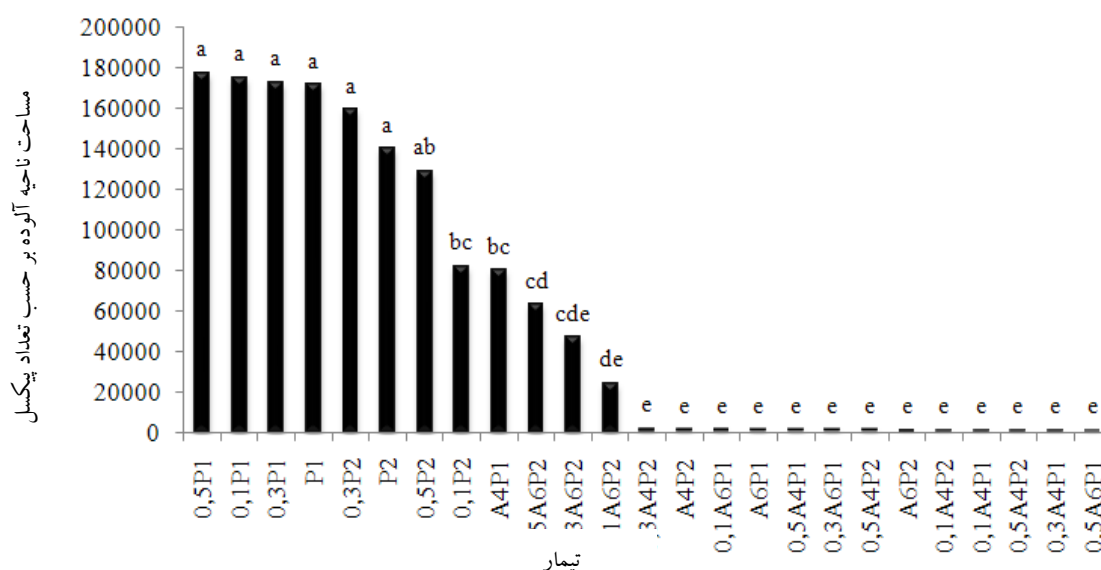


شکل ۲- فضای رنگی RGB.

Fig. 2. RGB color space.

نتایج و بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت معنی داری بین تیمارهای آزمایشی در سطح ۱ درصد وجود داشت. مقایسه ی میانگین مساحت ناحیه ی آلودگی با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن نشان داد که کاربرد سیلیکون به تنهایی تأثیر چندانی در کنترل بیماری کپک آبی نداشت. استفاده از مخمرهای آنتاگونیست



شکل ۳- مساحت ناحیه‌ی آلوده در سیب‌های تیمار شده با مخمرهای *Pichia guilliermondii* (A6)، *Candida membranifaciens* (A4)، سیلیکون (Si) در غلظت‌های ۰/۱٪، ۰/۳٪ و ۰/۵٪ و ترکیب آن‌ها در کنترل جدایه‌های P1 و P2 از قارچ *Penicillium expansum* در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس هر تیمار دارای چهار تکرار بود. بین حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌دار وجود ندارد ($p < 0.05$).

Fig. 3. Infected area apple treated with *Pichia guilliermondii* (A6), *Candida membranifaciens* (A4), Si at 0.1%, 0.3% and 0.5% and combination of them for control of *Penicillium expansum* P1 and P2 at 20 °C. There were four replicates for each treatment. There were no significant difference between the same letter according to Duncan multiple range test ($p < 0.05$).

آبی سیب را نیز به‌توان به ناهمسانی زمان جوانه‌زنی اسپوره‌های قارچ عامل بیماری و القای مقاومت در میوه‌ی سیب در اثر تیمار با Si نسبت داد. هرچند تحقیقات بیشتری در این زمینه ضروری به‌نظر می‌رسد. تاثیر تلفیقی Si مخمرهای آنتاگونیست را نیز علاوه بر رقابت مخمرهای آنتاگونیست با قارچ عامل بیماری، تولید متابولیت‌های فرار و غیر فرار (Gholamnejad et al., 2009)، می‌توان به فعال شدن آنزیم‌های دفاعی مانند پراکسیداز و نیز ترکیبات فنولی نسبت داد (فراهانی، ۱۳۸۹). نتایج این تحقیق با نتایج Qin et al., (2005) مبنی بر کنترل کپک آبی میوه‌ی گیلاس در اثر تلفیق مخمر *Cryptococcus laurentii* با سیلیکون در غلظت ۱٪ منطبق می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر مجموعه‌ی تیمارهای آزمایشی را در هفت گروه متمایز a، ab، bc، cd، cde، de و e قرار داد. به‌منظور تشخیص گروه‌های آماری با استفاده از ویژگی‌های رنگی ناحیه‌ی آلوده‌ی سیب، پس از استخراج ویژگی‌های میانگین،

سیلیکون در فرم $Si(OH)_4$ ، دارای وابستگی شدیدی با ترکیبات پلی هیدروکسیل آلی می‌باشد، مانند فنول‌های ارتو، که در سنتز لیگنین شرکت دارند (Inanaga et al. 1995). فراهانی در سال ۱۳۸۹ نیز نتایجی در رابطه با فعال شدن آنزیم‌های دفاعی میوه‌ی سیب به‌دنبال مایه‌زنی با سیلیکون گزارش نموده‌است (Farahani, 2011). نتایج این تحقیق هم‌چنین نشان دهنده عدم کارآیی سیلیکون به‌تنهایی در کنترل کپک آبی میوه‌ی سیب بود، ولی اثر تلفیقی این عنصر در ترکیب با مخمرهای آنتاگونیست، به‌مراتب بهتر از کاربرد سیلیکون و مخمر تنها بود. در این راستا Yu et al., (2007) در بررسی عدم کارآیی اسید سالیسیلیک در کنترل کپک آبی سیب به این نکته اشاره کردند که زمان جوانه‌زنی اسپوره‌های *P. expansum* قبل از فعال شدن مقاومت القایی در اثر اسید سالیسیلیک می‌باشد. به‌نظر می‌رسد که عدم کنترل‌کنندگی Si در کنترل کپک

شناسایی شدند. کاربرد این چهار صفت در مجموع سبب شناسایی گروه‌ها با میانگین دقت نسبی ۷۲٪ شد که نسب به کاربرد دو صفت که با میانگین دقت نسبی ۵۲٪ شناسایی شده بودند، ۲۰٪ افزایش نشان داد (جدول ۳).

جدول ۲- تحلیل تشخیص خطی گروه‌های بیماری‌زا براساس دو صفت اول از جدول ۱ و با استفاده از آنالیز discrim.

Table 2- Linear discriminant analysis of infected groups according the two first adjective of table 1 using discrim procedure.

	a	ab	bc	cd	cde	de	e
a	66.67%	0	22.22%	0	0	11.11%	0
ab	50%	0	0	0	0	50%	0
bc	0	0	50%	50%	0	0	0
cd	0	0	50%	0	0	50%	0
cde	0	0	0	0	100%	0	0
de	0	0	0	50%	0	50%	0
e	0	0	0	0	0	0	100%

جدول ۳- تحلیل تشخیص خطی گروه‌های بیماری‌زا بر اساس چهار صفت اول از جدول ۱ و با استفاده از آنالیز discrim.

Table 3. Linear discriminant analysis of infected groups according the four first adjective of table 1 using discrim procedure.

	a	ab	bc	cd	cde	de	e
a	55.56%	11.11%	22.22%	0	0	11.11%	0
ab	0	50%	0	50%	0	0	0
bc	0	0	100%	0	0	0	0
cd	0	0	50%	50%	0	0	0
cde	0	0	0	0	100%	0	0
de	50%	0	0	0	0	50%	0
e	0	0	0	0	0	0	100%

شناسایی گروه‌های بیماری‌زا براساس مجموع شش صفت از جدول ۱ (میانگین آبی، میانگین سبز، انحراف معیار آبی، انحراف معیار قرمز، ضریب کشیدگی سبز و انحراف معیار سبز) نشان‌دهنده دقت ۶۶/۶۷٪، ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۵۰٪، ۱۰۰٪، ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ به ترتیب برای هر یک از گروه‌های a، ab، bc، cd، cde، de و e بود که در مجموع این گروه‌ها با میانگین دقت نسبی ۸۰٪ شناسایی شدند. کاربرد این شش

انحراف معیار، ضریب چولگی و ضریب کشیدگی از هر یک از کانال‌های رنگی قرمز، سبز و آبی، از رویه‌ی stepdisc برای تعیین اهمیت صفات در پروسه‌ی تشخیص استفاده گردید. نتایج آماری نشان داد که میانگین رنگی آبی با بیشترین مقدار $ASCC=0.291$ و $R^2=0.7$ بیشترین تأثیر را در شناسایی گروه‌های آماری شدت بیماری داشتند و میانگین رنگ سبز، انحراف معیار رنگ آبی، انحراف معیار رنگ قرمز، ضریب کشیدگی رنگ سبز و انحراف معیار رنگ سبز به ترتیب در درجات بعدی قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- ترتیب صفات و اهمیت آن‌ها در شناسایی گروه‌های بیماری‌زا با استفاده از آنالیز stepdisc.

Table 1. The adjectives and their importance in discrimination of infected groups using stepdisc procedure.

Average Squared Canonical Correlation (ASCC)	R^2	Feature	Step
0.291	0.70	Blue average	1
0.090	0.68	Green average	2
0.049	0.44	Blue standard deviation	3
0.026	0.46	Red standard deviation	4
0.011	0.56	Green kourtosis	5
0.006	0.43	Green standard deviation	6

تحلیل تشخیص خطی فیشر براساس صفات میانگین رنگ آبی و سبز سبب شناسایی گروه‌های بیماری کپک آبی با دقت شد. در این مرحله گروه‌های a، ab، bc، cd، cde، de و e به ترتیب با دقت‌های ۶۶/۶۷٪، صفر، ۵۰٪، صفر، ۱۰۰٪، ۵۰٪ و ۱۰۰٪ شناسایی شدند (جدول ۲).

تحلیل تشخیص خطی گروه‌های بیماری‌زا براساس چهار صفت از جدول ۱ (میانگین آبی، میانگین سبز، انحراف معیار آبی و انحراف معیار قرمز) انجام شد و نتایج حاصله نشان داد که گروه‌های a، ab، bc، cd، cde، de و e به ترتیب با دقت‌های ۵۵/۵۶٪، ۵۰٪، ۱۰۰٪، ۵۰٪، ۱۰۰٪، ۵۰٪ و ۱۰۰٪

کمی و یکسان برای همه‌ی نمونه‌ها روشی نوین در بیماری‌شناسی گیاهی به کار رود. تحقیقات سایر محققین نیز نشان‌دهنده‌ی اهمیت و دقت این تکنیک در تحقیقات بیماری‌شناسی می‌باشد. مثلاً Bock *et al.*, (2008) با ارزیابی بیماری شانکر مرکبات از طریق مشاهده و روش مقیاس دهی و هم‌چنین ارزیابی دقیق با استفاده از نرم‌افزارهای پردازش تصویر بیان کردند که تفاوت‌هایی در این دو روش وجود داشته و در مشاهده و مقیاس دهی اغلب شدت بیماری بیشتر از حد معمول گزارش شده‌است. به‌نظر می‌رسد در روش مقیاس دهی در تعداد زیادی نمونه به‌علت ایجاد خطای چشم روند یک‌سانی را برای کل نمونه‌ها رعایت نشود. براساس اطلاعات ما این تحقیق اولین گزارش از کاربرد آنالیز تصویر در تحقیقات بیماری‌شناسی گیاهی می‌باشد. برای تحقیقات تکمیلی، مطالعه کانال‌های رنگی دیگر، بهبود شرایط تصویربرداری و نورپردازی در جهت کاهش نویز تصاویر و نیز استفاده از روش‌های تشخیص و گروه‌بندی شبکه‌ای عصبی در راستای حصول دقت بالاتر، پیشنهاد می‌گردد.

صفت سبب افزایش ۸۰٪ در میانگین دقت نسبی شناسایی گونه‌ها شد (جدول ۴).

جدول ۴- تحلیل تشخیص خطی گروه‌های بیماری‌زا براساس شش صفت اول از جدول ۱ و با استفاده از آنالیز discrim.

Table 4. Linear discriminant analysis of infected groups according the six first adjective of table 1 using discrim procedure

	a	ab	bc	cd	cde	de	e
a	66.67%	11.11%	22.22%	0	0	0	0
ab	0	100%	0	0	0	0	0
bc	0	0	100%	0	0	0	0
cd	0	0	50%	50%	0	0	0
cde	0	0	0	0	100%	0	0
de	0	0	0	0	0	100%	0
e	0	0	0	0	0	0	100%

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان‌دهنده‌ی قدرتمندی ابزار پردازش تصویر در استخراج اطلاعات زیاد از یک عکس دیجیتال می‌باشد. بر اساس نتایج، رنگ بافت آلوده یک ابزار قوی در تشخیص شدت بیماری‌ها بوده که می‌تواند با صرفه‌جویی در وقت و نیز استخراج داده‌های

References

- Ahmad, I. S., Reid, J. F., Paulsen, M. R., & Sinclair, J. B. 1999. Color classifier for symptomatic soybean seeds using image processing. *Plant Disease*. 83: 320-327.
- Bock, C. H., Parker, P. E., Cook, A. Z., & Gottwald, T. R. 2008. Characteristics of the perception of different severity measures of citrus canker and the relationships between the various symptom types. *Plant Disease*. 92: 927- 939.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C.L., & Wisniewski, M., 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal of Microbiology*. 35: 794-800.
- Druvefors, U. A. 2004. Yeast biocontrol of grain spoilage moulds—mode of action of *Pichia anomala*. Doctor's dissertation, performed at the Department of Microbiology Swedish University of Agri Sci., 44pp.
- El Ghaouth, A., Smilanick, J. L., Brown, G. E., Ippolito, A., Wisniewski, M., & Wilson, C. L. 2000a. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Disease*. 84: 243-248.

- El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., Wisniewski, M., & Wilson, C. L. 2000b.** Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. *Plant Disease*. 84: 249-253.
- El-Ghaouth, A., Wilson, C. L., Wisniewski, M. 1998.** Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology*. 88: 282-291
- Farahani, L. 2011.** Studies of the combination of salicylic acid and silicon with antagonistic yeasts to control of apple blue mold in storage and possible mechanisms involved. M.Sc. dissertation, University of Tehran. P 97. (In Persian with English summary).
- Farahani, L., & Etebarian, H. R. 2012.** Enhancement of the efficacy of two antagonistic yeasts with salicylic acid against *Penicillium expansum*. *Achieves of Phytopathology and Plant Protection*. 45: 260-267.
- Farahani, L., Etebarian, H. R., Sahebani, N., & Aminian, H. 2012.** Biocontrol of blue mould of apple by *Candida membranifaciens* in combination with silicon. *Achieves of Phytopathology and Plant Protection*. 45: 310-317
- Gholamnejad, J. 2009.** Studies on biological control of blue mold in apple by some yeast isolates and their mechanisms of antagonism. M.Sc. dissertation, University of Tehran. P 152. (In Persian with English summary).
- Gholamnejad, J., Etebarian, H. R., & Sahebani, N. 2009.** Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *African Journal of Food. Science*. 4(1): 001-007.
- Inanaga, S., Okasaka, A., & Tanaka, S., 1995.** Does silicon exist in association with organic compounds in rice plant? *Soil Science and Plant Nutrition*. 41: 111-117.
- Lima, G., De Curtis, F., Castoria, R. De Cicco, V. 1998.** Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technology*. 8: 257-267.
- Nilsson, H. E. 1995.** Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 17:154-166.
- Pierson. C. F., Leponis, M. J., & McColloch, L. P. 1971.** Market diseases of apples, pears and quince. U.S. Dep. Agric., Agric. Handb. Vol. 376. U. S. Govt. Printing Office, Washington, DC.
- Suzuki, G., Sawai, H., Ohtani, M., Nogami, S., Sano-Kumagai, F., Saka, A., Yukawa, M., Saito, T. L., Sese, J., Hirata, D., Morishita, S., & Ohya, Y., 2006.** Evaluation of image processing programs for accurate measurement of budding and fission yeast morphology. *Current Genetics*. 49: 237-247.
- Teixido, N., Usall, J., & Vinas, I. 1999.** Efficacy of preharvest and postharvest *Candida sake* biocontrol treatment to prevent blue mold on apples during cold storage. *Food Microbiology*. 50: 302-210.
- Tucker C. C., & Chakraborty S. 1997.** Quantitative assessment of lesion characteristics and disease severity using digital image processing. *Phytopathology*. 145: 273-278.
- Vero, S., Mondino, P., Burgaeno, J., Soubes, M., & Wisniewski, M. 2002.** Characterization of biological activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest biology and Technology*. 26: 91-98.
- Wilson, C. L., & Wisniewski, M. E. 1989.** Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*. 27: 425-441.

- Yao, H., Tian, S., & Wang, Y. 2004.** Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. *International Journal of Food Microbiology*. 93: 297–304.
- Yao, H. J., & Tian, S. P. 2005.** Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 941– 950.
- Yu, T., Li, H. Y., & Zheng, X. D. 2007.** Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. *International Journal of Food Microbiology*. 114: 261–266.

Use of machine vision system for evaluation of biocontrol potential of two antagonistic yeasts in combination with silicon against blue mold of apple fruit

Leila Farahani¹, Hasan Reza Etebarian¹, Hadis Mohseni Takallou², Heshmatolah Aminian¹, Navazolah Sahebani¹

1- Plant Protection Department, Aboureihan Campus, University of Tehran, Tehran, Iran

2- Computer Engineering Department, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

Corresponding author: Leila Farahani, lfarahani@alumni.ut.ac.ir

Received: Sep. 15, 2012

1 (1) 29-39

Accepted: Jan. 14, 2013

Abstract

Plant diseases severity is presently evaluated using manual tools such as ruler, digital ruler or by scaling. Extending the great potential of computer science in accurate and rapid determination of disease severity, this study was conducted to evaluate biological control potential of two yeasts, *Pichia guilliermondii* (A6) and *Candida membranifaciens* (A4) in combination with silicon (Si) at 0.1%, 0.3% and 0.5% for controlling *Penicillium expansum* P1 and P2 at 20 °C. The results showed that antagonistic yeasts controlled blue mold of apple significantly. Combination of the yeasts with Si improved the control of blue mold in comparison with yeasts alone. Statistical information obtained from the infected area in RGB channels showed that blue average ($R^2=0.70$) was the most important and green standard deviation ($R^2=0.43$) was the least important factors in recognition of disease severity. Linear discrimination analysis using blue average, green average, blue standard deviation, red standard deviation, green kurtosis and green standard deviation separated the disease severity statistical groups with the accuracy of 80%. The overall results of this study suggest that the color could be a powerful descriptor which could be applied for determination of disease severity in apple blue mold

Keywords: *Pichia guilliermondii* , *Candida membranifaciens* , *Penicillium expansum* , LDA