

## ارزیابی آلودگی ویروسی بر پایه شناسایی الگوی تغییرات بازتابش طیفی در گیاهان دختری سیب زمینی بذری

کبری مسلم خانی<sup>۱\*</sup>، فرشید حسنی<sup>۲</sup>، اسماعیل نصراللهی آذر<sup>۳</sup>، صمد مبصر<sup>۴</sup>، محمدرضا جزائری نوش آبادی<sup>۵</sup>

۱. دانشیار پژوهشی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر ونهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
  ۲. استادیار پژوهشی، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر ونهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
  ۳. محقق مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر ونهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
  ۴. مربی پژوهشی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر ونهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
  ۵. استادیار پژوهشی، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر ونهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۰۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۳۰)

### چکیده

تشخیص دقیق و سریع گیاهان آلوده یک فرایند ضروری در سیستم گواهی بذر سیب زمینی به شمار می رود. انگشت نگاری طیفی به عنوان روش غیر تخریبی و سریع برای تشخیص گیاهان بیمار یا تحت استرس، در حال توسعه می باشد. تحقیق حاضر با استفاده از داده های طیف سنجی به تشخیص بوته های آلوده سیب زمینی (که به طور همزمان به دو ویروس PVY و PLRV آلوده بودند) بدون هرگونه فرایند تخریبی پرداخته است. داده های طیفی از ۳۲ گیاه (۱۶ گیاه آلوده و ۱۶ گیاه سالم) که وضعیت آلودگی یا سلامت آنها با استفاده از آزمون ELISA و RT-PCR محرز شده بود، برداشت گردید. قبل از مدل سازی به منظور حذف سیگنال های ناخواسته از روش پیش پردازش داده های طیفی (Multiplicative scatter correction) و سپس روش طبقه بندی Soft Independent Modeling of a Class Analogy (SIMCA) استفاده شد. در این بررسی هیچ نمونه ای به طبقه اشتباه یا به طور هم زمان به دو طبقه تعلق نگرفت که حاکی از پتانسیل قابل قبول این روش طبقه بندی در تمایز گیاهان آلوده به ویروس است. نتایج نشان داد طول موج ها به ترتیب در سه محدوده ۹۱۰-۸۶۳ نانومتر (جزء محدوده طیفی مادون قرمز نزدیک)، ۷۲۵-۷۰۴ نانومتر (جزء محدوده لبه قرمز) و ۵۸۰-۵۳۰ نانومتر (جزء محدوده سبز) بیشترین مشارکت را در تمایز گیاهان آلوده و سالم و تفکیک مدل های مرتبط با آن داشته اند.

**کلمات کلیدی:** بیماری های ویروسی، سیب زمینی بذری، طیف سنجی، ردیابی

## Virus infection assessment based on changes in spectral reflectance pattern on daughter seed potato plants

K. Moslemkhani<sup>1\*</sup>, F. Hassani<sup>2</sup>, E. Nasrollahi Azar<sup>3</sup>, S. Mobasser<sup>4</sup>, M.R. Jazayeri Noushabadi<sup>5</sup>

1. Associate Professor, Seed and Plant Certification and Registration Institute. Agricultural Research, education and Extension Organization (AREEO). Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Institute. Agricultural Research, education and Extension Organization (AREEO). Tehran, Iran
3. Researcher, Seed and Plant Certification and Registration Institute. Agricultural Research, education and Extension Organization (AREEO). Tehran, Iran
4. Instructor, Seed and Plant Certification and Registration Institute. Agricultural Research, education and Extension Organization (AREEO). Tehran, Iran
5. Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Institute. Agricultural Research, education and Extension Organization (AREEO). Tehran, Iran

(Received: Apr. 25, 2020 – Accepted: Dec. 20, 2020)

### Abstract

Fast and precise detection of infected potato plants is an essential practice in the seed potato certification system. Spectral fingerprinting as non-destructive and rapid method is going to be developed for discriminating plants with different stress such as disease. In this research virus infections of experimental plants (that infected with both PVY and PLRV viruses) were analyzed by spectral data without any destruction. Spectral data were collected from 32 plants (16 infected plants and 16 healthy plants) that were found to be infected or healthy using the ELISA and RT-PCR test. Some pretreatment methods of spectral data such as multiplicative scatter correction were used to remove noise. Soft independent modeling of class analogy (SIMCA) based on PCA analysis predicted the disease with high detection accuracy. The results showed, none of the samples belonged to the wrong group or to two groups simultaneously. The wavelengths in three ranges of 910-863 nm (near-infrared), 725-704 nm (red edge) and 580-530 nm (green), had the greatest contribution to the complete differentiation of infected and healthy plants and development of models respectively.

**Keywords:** Potato, spectra, virus diseases, detection

\* Email: moslemkhany@yahoo.com

## مقدمه

در تحقیق دیگری با استفاده از روش سنجش از راه دور بر پایه تجزیه و تحلیل داده‌های طیفی، آلودگی گیاه سیب‌زمینی به ویروس زردی رگبرگ سیب‌زمینی (Potato yellow vein virus) قبل از ظهور کامل علائم بیماری، محرز گردید (Chávez *et al.*, 2010). نیدو و همکاران (Naidu *et al.*, 2009) از بازتابش‌های طیفی برگ برای تشخیص آلودگی ویروسی در انگور استفاده کردند. آنها از دستگاه اسپکتروفتومتر قابل حمل برای جمع‌آوری داده‌های طیفی بهره بردند و مشخص کردند شاخص‌های رویشی، فاکتور مهمی در تفکیک گیاهان سالم و آلوده به شمار می‌روند. روش‌های طیف سنجی عموماً متکی بر اندازه‌گیری همزمان بازتابش در یک یا تعداد بیشتری طول موج است. تحقیقات نشان داده است که نواحی مرئی (visible) و نزدیک مادون قرمز (near infrared) بیشترین اطلاعات را در خصوص سطوح تنش در گیاهان مختلف نشان می‌دهند (Muhammad, 2002). در واقع این نواحی طیفی بیشتر تحت تاثیر ترکیبات رنگدانه‌ها در برگ، ساختار برگ و محتوای آب برگ است (Mahlein *et al.*, 2013). از آنجایی که بیماری می‌تواند ویژگی‌های اپتیکی را در بسیاری از طول موج‌ها در برگ تغییر دهد؛ لذا یک سیستم تشخیصی قابل اطمینان باید بر پایه اندازه‌گیری‌های طیفی در طول موج‌های مشخص یا ترکیبی از طول موج‌های مختلف بنا نهاده شود (Krezhova *et al.*, 2010). تحقیق حاضر با هدف توسعه روش‌های تشخیص سریع و غیر تخریبی گیاهان آلوده به دو ویروس مهم سیب‌زمینی (PVY, PLRV) در سیستم گواهی بذر؛ به بررسی قابلیت اسپکتروفتومتری در دامنه طول موج ۱۱۰۰-۲۰۰ نانومتر در تمایز گیاهان آلوده پرداخته است.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

داده‌های بذری گیاه سیب‌زمینی (رقم بانبا) که از نظر آلودگی همزمان به دو ویروس وای سیب‌زمینی

پایش سلامت گیاه در مزرعه با روش‌های مبتنی بر ارزیابی تغییرات بازتابش طیفی به عنوان ابزار کارآمد و ارزشمند در مدیریت مزارع در حال توسعه است (Chavez *et al.*, 2011). آنالیزهای طیفی به طور موفقیت‌آمیزی در استخراج اطلاعات کیفی مهم محصولات کشاورزی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Blackburn and Ferwerda, 2008). داده‌های طیفی خصوصاً اطلاعات مربوط به بازتابش‌های طیفی قادر هستند تغییرات بیوفیزیکی گیاه یا پوشش‌های گیاهی آلوده به بیمارگر را با هزینه اندک و در زمان کوتاه با تکرارهای متعدد تشخیص دهند (Guo *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008; Moshou *et al.*, 2005). در سال‌های اخیر تحقیقات مختلفی در خصوص توان روش‌های غیر تخریبی مانند اسپکتروفتومتری برای تشخیص انواع بیماری‌های مختلف در گیاهان انجام شده است. سیریسومبون و همکاران (Sirisomboon *et al.*, 2009) از این روش‌ها در تشخیص آلودگی‌ها و پوسیدگی‌های درونی و بیرونی غلاف‌های سویا استفاده نمودند. آن‌ها در این تحقیق با بهره‌گیری از تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA) به خوبی غلاف‌های آلوده به بیماری سفیدک پودری (که آفت زده نیز بودند) را از غلاف‌هایی که فقط آفت زده بودند و نیز غلاف‌های سالم سویا متمایز نمودند. هانگ و آپان (Huang and Apan, 2006) داده‌های طیفی را با استفاده از تجزیه و تحلیل رگرسیون حداقل مربعات جزئی (PLSR) برای تشخیص بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی در کرفس بررسی نمودند. نتایج آنها نشان داد در برخی موارد، پیش تیمار داده‌های طیفی باعث کاهش خطای مدل می‌گردد و این پیش تیمارها می‌توانند محققین را در دستیابی به مدل‌های معتبرتر یاری نمایند. همچنین تحقیقات آنها مشخص کرد نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های طیفی در دامنه ۴۰۰ تا ۱۳۰۰ نانومتر مشابه نتایج بررسی‌ها در دامنه وسیع طیفی ۴۰۰ تا ۲۵۰۰ نانومتر است.

### تشخیص آلودگی گیاه با استفاده از RT-PCR

آلودگی گیاهان به دو ویروس PVY و PLRV با استفاده از آزمون RT-PCR قبل و بعد از انجام آزمایشات طیف‌سنجی محرز گردید. برای استخراج RNA از کیت Ribosin plant (GeneAll, Korea) استفاده شد. واکنش نسخه‌برداری معکوس با استفاده از HyperScript<sup>TM</sup> (GeneAll, Korea) Mater mix طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. برای انجام آزمون RT-PCR واکنش ۲۵ میکرولیتری از کیت Taq 2x Master Mix (Ampliqon, denmark) Red و آغازگرهای Y3S و Y4A (با محصول ۴۸۰ bp) و پرایمرهای PLRV و PLRVF (با محصول ۲۰۸ bp) به ترتیب برای تشخیص ویروس PVY و PLRV استفاده شد (Du *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 1996). از پرایمرهای 18S rRNAF و 18S rRNAR به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. سیکل دمایی به صورت یک سیکل در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه، ۳۵ سیکل شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، یک دقیقه در ۵۶ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه و نهایتاً یک سیکل در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. محصول PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد حاوی ژل رد، مشاهده گردید.

(PVY) و ویروس لوله‌ای شدن برگ سیب‌زمینی (PLRV) با استفاده از روش‌های RT-PCR و ELISA مثبت ارزیابی شدند از نظر عدم آلودگی به سایر بیماری‌های ویروسی شایع در ایران (PVS, PVM, PVA, PVX)، عوامل قارچی و باکتریایی طبق روش‌های استاندارد آزمایشگاه ملی سلامت نهال و مواد تکثیری بررسی شدند. بر اساس نتایج ارزیابی‌ها از غده‌های مربوط به یک توده بذری که صرفاً به صورت همزمان به دو ویروس PVY و PLRV آلوده بودند، در مراحل بعدی آزمایشات استفاده گردید. همچنین غده‌های بذری (مینی تیوبر) کاملاً سالم و عاری از بیماری‌های مختلف نیز به عنوان گیاهان شاهد در آزمایشات در نظر گرفته شدند (این غده‌ها حاصل از گیاهچه‌های کشت بافتی از منشاء مریستم ترموتراپی شده بوده‌اند که مجدداً ضمن علائم سنجی گیاهچه‌های حاصله، از نظر شش ویروس مورد اشاره جهت اطمینان از سلامت ارزیابی شدند. آزمایشات در شرایط کاملاً کنترل شده گلخانه در محفظه‌های توری‌دار به منظور جلوگیری از حمله حشرات ناقل یا آفات انجام شد. جوانه‌ی غده‌ها در ترکیب مساوی از خاک، پیت و پرلیت کشت شدند.

جدول ۱- لیست و مشخصات آغازگرهای استفاده شده در آزمون‌های RT-PCR

Table 1- List of primers used for RT-PCR analysis

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer Sequence	اندازه محصول (bp) Product Size (bp)	موقعیت آغازگر روی ژنوم Position of primer on the genome	منبع Reference
PVYF	5' ATACTCGRGCAACTCAATCACA 3'	166	8817-8838	Du <i>et al.</i> , 2006
PVYR	5' CCATCCATCATAACCCAAACTC 3'		8961-8982	
Y3S	5' ACGTCCAAAATGAGAATGCC 3'	480	8721-8740	Singh <i>et al.</i> , 1996
Y4A	5' TGGTGTTTCGTGATGTGACT 3'		9181-9200	
18S rRNAF	5' GAGAAACGGCTACCACATCCA 3'	255	399-419	Du <i>et al.</i> , 2006
18S rRNAR	5' CGTGCCATCCCAAAGTCCAAC 3'		633-653	

## آزمون ELISA و تعیین کمی آلودگی ویروسی

### در زمان طیف سنجی

قبل از طیف‌سنجی با استفاده از آزمون TAS-ELISA آلودگی گیاهان به دو ویروس PVY و PLRV مشخص گردید و به سرعت پس از طیف‌سنجی، برگ‌های مورد ارزیابی از بوته‌های گیاه آلوده و سالم جدا شدند و با هدف تعیین کمی آلودگی ویروسی در زمان طیف‌سنجی مورد ارزیابی قرار گرفتند (Clark and Adams, 1977). آلودگی ویروسی به صورت کمی در هر برگ تعیین شد و اثر میزان آلودگی در روند تغییرات طول موج‌های مؤثر مورد بررسی قرار گرفت.

### جمع‌آوری داده‌های طیفی

داده‌های طیفی یک ماه پس از رشد جوانه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر AvaSpec-3648 Fiber Optic (آوانتس، هلند)، دارای دو منبع نوری هالوژن و دوتریوم در دامنه موجی ۱۱۰۰-۲۰۰ نانومتر از برگ‌های مختلف در گیاهان سالم و آلوده برداشت شد. بازتابش در هر برگ از میانگین ۲۵ بار خوانش در هر نقطه اتصال پروب به برگ حاصل گردید. دستگاه قبل از برداشت داده‌های جذب و بازتابش برگ‌ها با روش توصیه شده توسط شرکت سازنده (آوانتس، هلند) در مرکز خدمات آزمایشگاهی دانشگاه صنعتی شریف کالیبره شد. این ارزیابی به طور مجزا در ۱۶ تکرار برای گیاه آلوده و ۱۶

تکرار در گیاه سالم انجام شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های طیفی ابتدا به صورت کامل روی کل داده‌ها در دامنه ۴۰۰ تا ۱۱۰۰ نانومتر با استفاده از نرم افزار Unscramble 10.5 انجام شد. پیش تیمار داده‌های طیفی با استفاده از مشتق اول و دوم با روش Savitzky Goley، mean normalization، multiplicative scatter correction (MSC) به دو صورت کامل (Full) و معمولی (common offset) و Baseline correction انجام شد. سپس تحلیل مؤلفه‌های اصلی (Principle Component Analysis, PCA) بر روی داده‌های اولیه (بدون پیش‌تیمار) و داده‌های طیفی پیش‌تیمار شده انجام شد و نتایج حاصله مقایسه و بهترین روش انتخاب شد. از روش طبقه‌بندی SIMCA برای توسعه مدل و گروه‌بندی داده‌های طیفی نمونه‌های آلوده و سالم استفاده شد (Sirisomboon *et al.*, 2009).

### نتایج و بحث

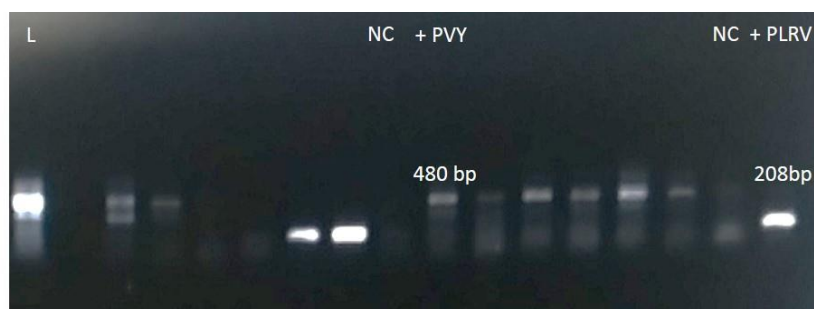
گیاهان آلوده سبب‌زمینی رقم بانبا از کشت جوانه‌های حاصل از غده‌های آلوده به ویروس PVY و PLRV در گلخانه در تعداد زیاد تکثیر و مستقر شدند (شکل ۱).



شکل ۱- تکثیر گیاهان آلوده به دو ویروس PVY و PLRV از طریق کشت جوانه غده‌های آلوده  
Fig. 1- Multiplication of PVY infected plants via culture of tuber sprouts.

و سرولوژیک عدم وجود آلودگی‌های ویروسی را در گیاهان شاهد که از هسته‌های اولیه عاری از ویروس تامین شدند، اثبات نمود.

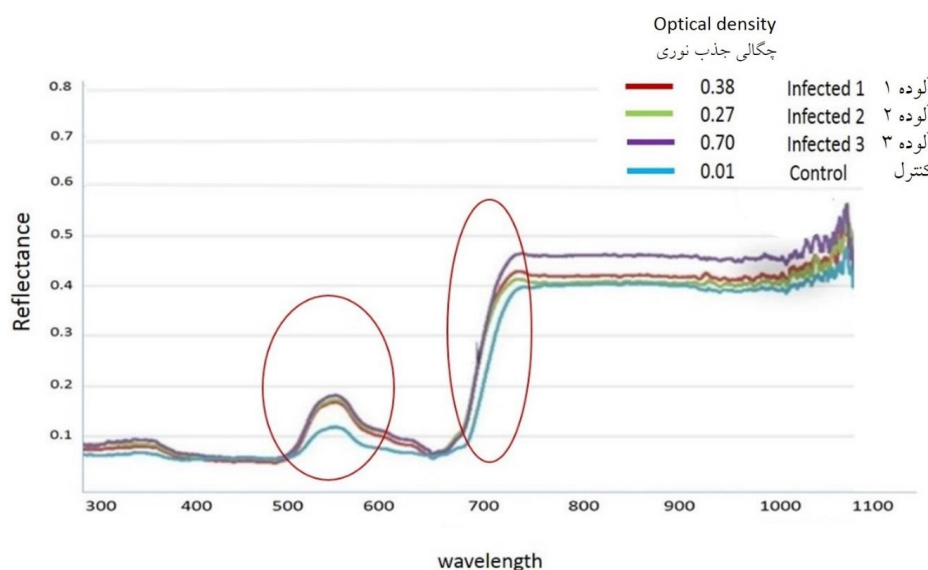
بر اساس نتایج آزمایشات RT-PCR و ELISA بوت‌های آلوده به هر دو ویروس برای ارزیابی‌های آتی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۲). آزمون‌های مولکولی



شکل ۲- ردیابی آلودگی ویروسی PVY و PLRV در گیاهان مورد آزمایش با استفاده از RT-PCR؛ PVY: کنترل مثبت ویروس PVY (باند ۴۸۰ bp)؛ +PLRV: کنترل مثبت ویروس PLRV (باند ۲۰۸ bp)؛ NC: کنترل منفی، L: مارکر ۱۰۰ bp؛ Fig. 2- Detection of PVY and PLRV infection on experimental plants by RT-PCR. PVY : positive control of +Fig. 2- Detection of PVY and PLRV infection on experimental plants by RT-PCR. PVY : positive control of PLRV infection (208 bp); NC: negative control; L: +PVY infection (480 bp); PLRV molecular marker (100 bp).

نشانه‌های طیفی خاص در گیاه مورد نظر می‌شود (Gazala *et al.*, 2013). منحنی شکل ۳ نشان می‌دهد با افزایش غلظت آلودگی ویروسی، میزان بازتابش در ناحیه طیفی مرئی افزایش می‌یابد؛ احتمالاً از آنجایی که تکثیر سریع ویروس‌ها باعث کاهش سطوح نیتروژن محلول، کربوهیدرات (Grishama *et al.*, 2010) و در نهایت فتوسنتز می‌شود (Rahoutei *et al.*, 2000)، الگوی بازتابش طیفی دچار تغییر می‌شود. در خصوص تغییرات بازتابشی در ناحیه نزدیک مادون قرمز (۷۰۰-۱۲۰۰ نانومتر)، کرزوا و همکاران (Krezhova *et al.*, 2010) پراکنش چند جانبه ناشی از هوا در فواصل بین سلولی بافت‌های درونی برگ گوجه فرنگی آلوده به ویروس را عامل تغییرات بازتابشی در این ناحیه معرفی کرده‌اند؛ در واقع از نظر آن‌ها آلودگی‌های ویروسی باعث تغییرات هیستوپاتولوژیکی می‌شود که با کاهش یا افزایش سایز سلولی و تغییر در فواصل سلولی، تغییرات بازتابشی گیاه را در این ناحیه باعث می‌شوند (Chaerle *et al.*, 2007).

شکل طیفی به دست آمده از میانگین داده‌های طیفی در تکرارهای متعدد برگ‌های آلوده (با غلظت‌های متفاوت آلودگی) در مقایسه با نمونه سالم نشان می‌دهد با تغییر غلظت ویروس منحنی طیفی گیاه نیز دچار تغییر می‌شود. در ناحیه مرئی (۷۰۰-۴۰۰ نانومتر) برگ‌های سالم بازتابش کمتری نسبت به برگ‌های آلوده نشان می‌دهند. تحقیقات سایر محققین نشان داده میزان جذب امواج در ناحیه مرئی با افزایش رنگ دانه‌های فتواکتیو مانند کلروفیل، آنتوسیانین و کارتنوئیدها بیشتر می‌شود و به تبع آن کاهش بازتابش را در این ناحیه طیفی سبب ساز می‌شود (Krezhova *et al.*, 2010). در گیاهان بیمار عموماً لکه‌های رنگ پریده با نواحی کلروتیک روی برگ ظاهر می‌شود که به دلیل کاهش رنگ دانه‌های فتواکتیو میزان بازتابش در ناحیه مرئی خصوصاً در ناحیه باندی جذب کلروفیل افزایش می‌یابد. در واقع تشخیص بیماری بر پایه اطلاعات طیفی مبتنی بر نور ساطع شده از گیاه است که تحت تاثیر میزان عبور، جذب و بازتابش نور توسط بافت گیاهی حاصل می‌شود و امواج بازتابش شده باعث ایجاد



شکل ۳- بازتابش طیفی گیاه آلوده سیب زمینی رقم بانبا در غلظت های مختلف آلودگی ویروسی در مقایسه با گیاه سالم. (خطوط بنفش، قرمز و سبز به ترتیب نمایانگر بازتابش طیفی نمونه هایی با غلظت آلودگی زیاد با میزان جذب ۰/۷، آلودگی متوسط با میزان جذب ۰/۳۸ و آلودگی کم با جذب ۰/۲۷ و خط آبی مربوط به گیاه سالم در آزمون ELISA است).

Fig. 3- Spectral reflectance of infected potato plant (Banba cultivars) in different virus concentration in comparison with healthy plant. (Violet, red and yellow line belong to spectral reflectance of infected plants that detected by ELISA with high (OD: 0.7), medium (OD: 0.38) and low (OD: 0.27) infection, respectively and blue line belong to healthy plant

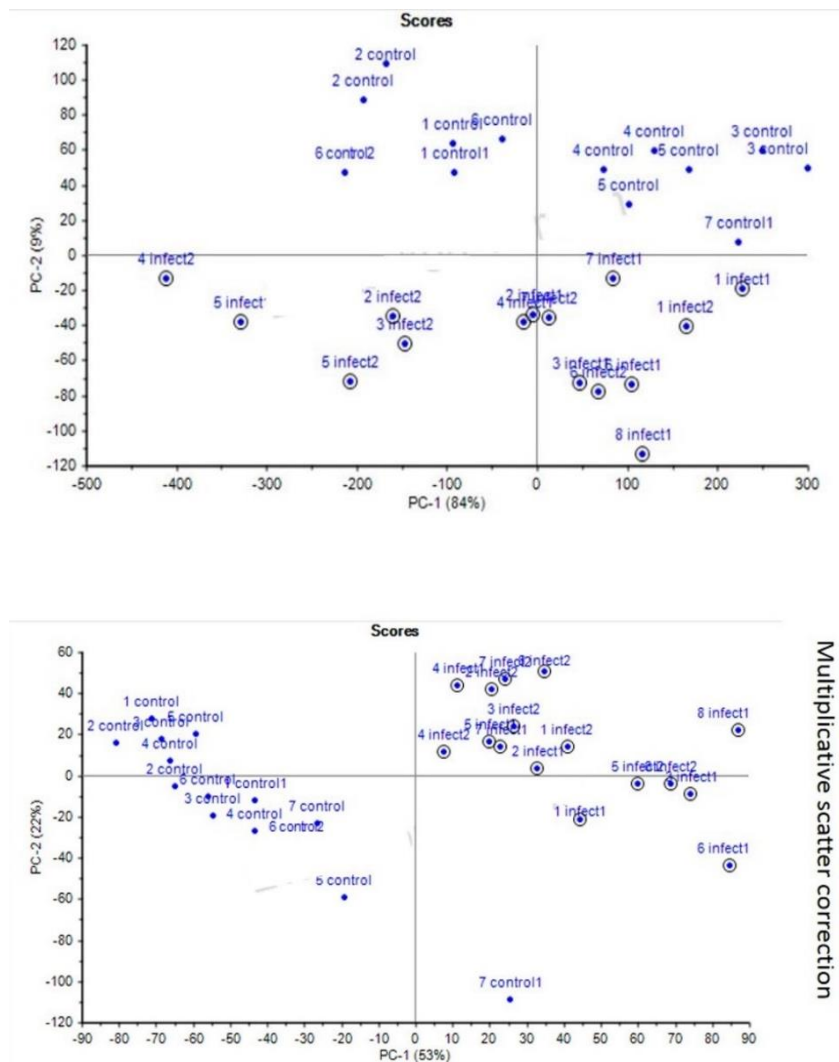
دادند. در پیش تیمار تصحیح پراکنش افزایش داده (Multipliative scatter correction, MSC)، فاکتور اول ۶۳ و فاکتور دوم ۲۲ درصد (در مجموع ۸۵ درصد) از واریانس را در داده های طیفی تبیین نمودند و گروه بندی دقیق تری در مقایسه با داده های تیمار نشده و سایر تیمارها ارائه دادند (شکل ۴). این روش رایج ترین روش پیش پردازش داده های طیفی برای تصحیح اثرهای جمعی و انحراف ناشی از عوامل فیزیکی مانند پخش غیریکنواخت در کل طیف و ضریب شکست نور به کار می رود. در این روش حذف اثرهای پخش با خطی سازی طیف هر نمونه با طیف میانگین نمونه انجام می شود (Jamshidi et al., 2014).

روش SIMCA بر اساس تفاوت منحنی های بازتابش طیفی بر پایه مدل PCA ایجاد شده (با لحاظ نمودن پیش تیمار Multipliative scatter correction)، گیاهان آلوده را از گیاهان سالم با دقت قابل قبولی از هم تفکیک کرد.

روش تحلیل مؤلفه های (PCA) اصلی به عنوان یک روش مهم آماری برای استخراج اطلاعات مرتبط از مجموعه داده های پیچیده نظیر داده های طیفی مورد استفاده قرار گرفت. این روش از طریق کاهش تعداد متغیرها، ساختار ارتباطی بین متغیرها را تعیین می نماید و به نوعی به دسته بندی متغیرها می پردازد. نمودار اسکور مؤلفه های اصلی نشان می دهد که مؤلفه های اول و دوم واریانس بین داده های حاصل از اندازه گیری نمونه ها را بیان می کنند. گاهی انجام پیش تیمار بر روی داده های طیفی امکان گروه بندی دقیق تر نمونه ها را فراهم می نماید. در داده های طیفی بدون پیش تیمار ۹۳ درصد از واریانس توسط عامل اول و دوم ( $PC1=84\%$  ,  $PC2=9\%$ ) تبیین می شود. اکثر پیش تیمارها نظیر نرمال سازی و یا مشتق مرحله اول یا دوم داده ها نه تنها در بهبود تجزیه و تحلیل ها موثر واقع نشدند، بلکه قدرت گروه بندی صحیح نمونه ها را کاهش

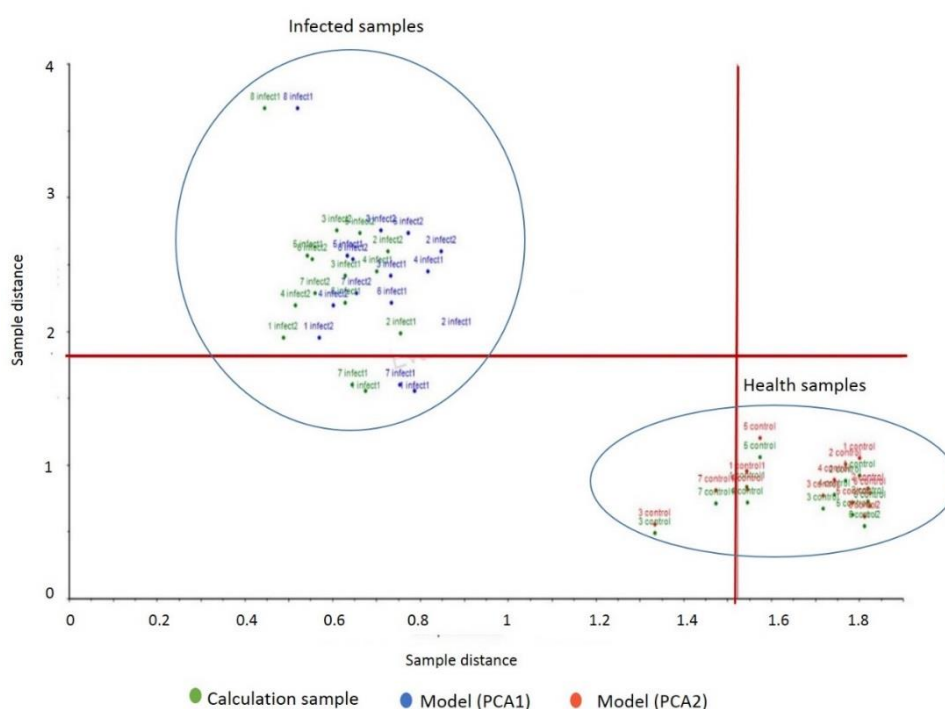
آلودگی و تفکیک گیاهان سالم از آلوده بود. در این بررسی هیچ نمونه‌ای به طبقه اشتباه یا به طور هم زمان به دو طبقه تعلق نگرفت که حاکی از اعتبار مناسب این روش طبقه بندی است. SIMCA در تحقیقات دیگری نیز به عنوان ابزاری قدرتمند در تمایز گیاهان سالم از آلوده در بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (Sirisomboon *et al.*, 2009).

SIMCA به عنوان یک روش طبقه‌بندی آماری بر پایه مدل PCA عمل می‌نماید (Saiz-Abajo *et al.*, 2004) که بر اساس مدل توسعه یافته با این روش می‌توان گروه‌های نامعلوم را بسته به میزان شباهت طبقه‌بندی و تفکیک نمود (Woo *et al.*, 2005). شکل ۵ فاصله نمونه‌های آلوده و سالم را در طبقه بندی SIMCA در دامنه طیفی ۴۰۰-۱۱۰۰ نانومتر نشان می‌دهد. این روش به خوبی قادر به پیش بینی



شکل ۴- اسکور پلات حاصل از تحلیل مؤلفه های اصلی داده های طیفی بدون پیش تیمار (پلات بالا) و داده های طیفی پیش تیمار شده با روش ها Multiplicative scatter correction در دامنه طیفی ۴۰۰ تا ۱۱۰۰ نانومتر در گیاهان سالم و آلوده به ویروس. نمونه های مشخص شده با دوایر نقطه‌دار، مربوط به گیاهان آلوده است.

Fig. 4- PCA score plot of primary (above plot) and pretreated data in spectral regions between 400-1100 nm in virus infected and healthy potato plants. Samples indicated with black circle are infected plants.



شکل ۵- پلات فاصله نمونه با استفاده از آنالیز SIMCA بر پایه تحلیل مؤلفه‌های اصلی و تفکیک دقیق گیاهان آلوده از گیاهان سالم.

Fig. 5- Plot of sample distance in SIMCA analysis based on PCA and properly discrimination of infected plants from healthy control plants.

بود که در طول موج‌های نواحی قرمز، سبز و آبی (طول موج‌های قابل رؤیت با چشم) تنها ۴۶/۹ درصد از نمونه‌ها طبقه‌بندی صحیح داشته‌اند.

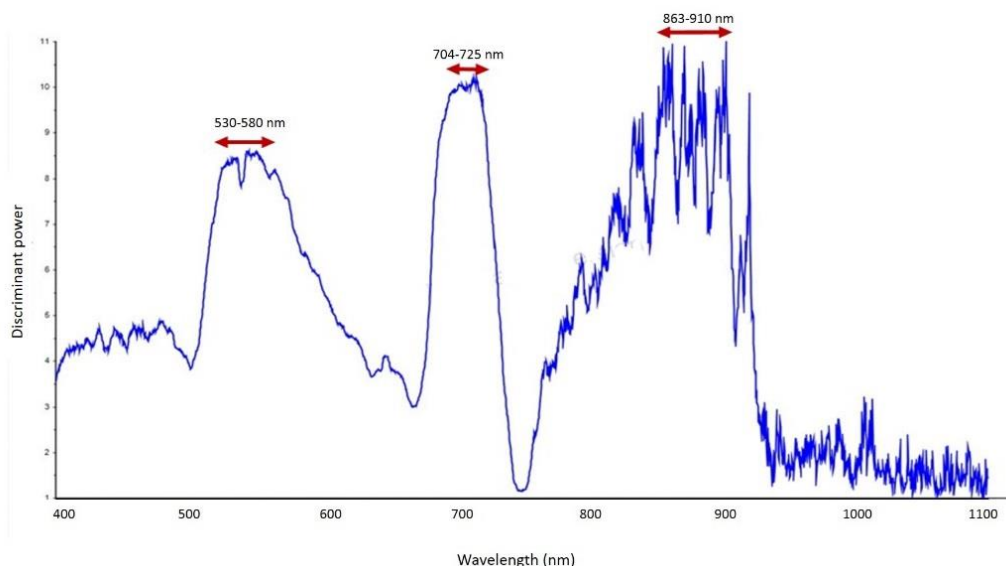
تحقیق حاضر نیز مشابه نتایج گریفل و همکاران (Griffel *et al.*, 2018) نشان داد برخی از طول موج‌ها به ویژه در محدوده نزدیک مادون قرمز، بیشترین قدرت را در تمایز گیاهان آلوده به ویروس داشته‌اند. تاکنون تغییرات ساختاری سلولی ناشی از استرس‌های بیوتیک در گیاهان، مهمترین عامل در تغییرات طیفی این محدوده گزارش شده است (Prabhakar *et al.*, 2012). اگرچه به صورت کلی در استرس‌هایی مانند کم آبی، سرما، ازن و بیماری محتوای کلروفیل گیاه نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد و باعث تغییر در بازتابش طیفی در ناحیه مرئی ۵۷۵-۵۵۰ و ناحیه ۷۲۰-۶۵۰ می‌شود. نتایج این تحقیق نشان داد داده‌های طیفی قابلیت استفاده برای توسعه روش‌های

طول موج‌ها در سه محدوده ۵۸۰-۵۳۰، ۷۲۵-۷۰۴ و ۹۱۰-۸۶۳ نانومتر بیشترین مشارکت را در تمایز گیاهان آلوده و سالم و تفکیک مدل‌های مرتبط با آن داشته‌اند (شکل ۶). بر اساس تحقیقات سایر محققین، مهمترین داده‌های طیفی که در اثر آلودگی یا وقوع تنش در گیاهان دچار تغییر می‌شوند در محدوده سبز (۵۸۰-۵۲۰ نانومتر)، لبه قرمز (۷۱۰-۶۹۰) و در قسمت‌هایی از محدوده طیفی مادون قرمز نزدیک (۱۲۰۰-۷۰۰ نانومتر) هستند (Krezhova *et al.*, 2010; Jinendra *et al.*, 2010). گریفل و همکاران (Griffel *et al.*, 2018) نیز با استفاده از روش طبقه‌بندی Support vector machines بر روی داده‌های طیفی حاصل از گیاهان آلوده و سالم سیب‌زمینی به ویروس PVY توانستند با بیشترین مشارکت طول موج‌های طیفی مادون قرمز نزدیک و موج کوتاه مادون قرمز، تفکیک را با دقت ۸۹/۸ درصد انجام دهند. این در حالی



در ردیابی ویروس PVY در مزارع بذری اثبات نموده‌اند (Polder *et al.*, 2019; Griffel *et al.*, 2018).

تشخیصی غیر تخریبی برای ردیابی سریع بیماری‌های ویروسی سیب زمینی را دارند. اخیراً نیز تحقیقات دیگری توانایی روش‌های مبتنی بر طیف سنجی را



شکل ۶- قدرت متفاوت نواحی طیفی و طول موج‌های مختلف در مدل SIMCA. بیشترین قدرت تمایز گیاهان آلوده از سالم در سه محدوده مختلف طیفی است که با فلش‌های قرمز رنگ در شکل مشخص شده است.

Fig. 6- Discriminative power of individual wavelengths of the spectra in SIMCA model. Highest discriminating power are in three different regions that indicated with red arrows.

کنترل شده آزمایشگاه انجام شده، تفکیک و طبقه بندی گیاهان سالم از آلوده با دقت بسیار بالا و بدون خطا در تمایز گیاهان آلوده انجام شد اما با توجه به اهمیت کاربردی بودن این سیستم تشخیصی در مزارع بذری، در حال حاضر ادامه این تحقیقات در محل مزرعه‌های تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال در دو استان البرز و کردستان با استفاده از دستگاه پرتابل در حال اجرا می‌باشد.

پولدر و همکاران (Polder *et al.*, 2019) با تمرکز بر معضل کشاورزان تولید کننده بذر سیب زمینی در حذف بوته‌های آلوده به ویروس به دلیل اتکا بر مشاهده چشمی علائم بیماری، با بهره برداری از تصویر برداری فراتطیفی و استقرار آن بر روی ماشین آلات کشاورزی با دقت ۰/۷۸ و حساسیت ۰/۸۸ از این تکنولوژی به عنوان روش‌های تشخیصی پیشرفته رو به رشد برای توسعه کشاورزی دقیق به ویژه در مزارع بذری یاد کردند. با توجه به اینکه برداشت داده‌های طیفی تحقیق حاضر در شرایط کاملاً

## Reference

**Blackburn, G.A., and J.G. Ferwerda. 2008.** Retrieval of chlorophyll concentration from leaf reflectance spectra using wavelet analysis. *Remote Sens. Environ.* 112:614– 1632.

## منابع

- Chaerle, L., D. Hagenbeek, X. Vanrobaeys, and D. Van Der Straeten. 2007.** Early detection of nutrient and biotic stress in *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Remote Sens.* 28:3479–3492.
- Chávez, P., C. Yarlequé, O. Piro, A. Posadas, V. Mares, H. Loayza, C. Chuquillanqui, P. Zorogastúa, J. Flexas, and R. Quiroz. 2010.** Applying Multifractal Analysis to Remotely Sensed Data for Assessing PVYV Infection in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Crops. *Remote Sens.* 2:1197-1216
- Chavez, P., P. Zorogastua, C. Chuquillanqui, L.F Salazar, V. Mares, and R. Quiroz. 2011.** Assessing potato yellow vein virus (PVYV) infection using remotely sensed data. *Int. J. Pest Manage.* 55:251–6.
- Clark, M. F., and A. N. Adams. 1977.** Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34(3): 475-483.
- Du, Z., J. Chen, and C. Hiruki. 2006.** Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. *Plant Dis.* 90:185–189.
- Gazala, I.F.S., R.N. Sahoo, P. Pandey, B. Mandal, V.K. Gupta, R. Singh, and P. Sinha. 2013.** Spectral reflectance pattern in soybean for assessing yellow mosaic disease. *Indian J. Virol.* 2:242-249
- Griffel, L.M., D. Delparte, and J. Edwards. 2018.** Using Support Vector Machines classification to differentiate spectral signatures of potato plants infected with Potato Virus Y. *Comput. Electron. Agric.* 153:318-324.
- Grishama, M.P., R.M. Johnsona, and P.V. Zimba. 2010.** Detecting Sugarcane yellow leaf virus infection in asymptomatic leaves with hyperspectral remote sensing and associated leaf pigment changes. *J. Virol. Methods.* 167:140–145
- Guo, T.T., L. Guo, X.H. Wang, and M. Li. 2009.** Application of NIR spectroscopy in classification of plant species. In: *International Workshop on Education Technology and Computer Science, Wuhan, Hubei, China.* 3: 879–883.
- Huang, J.F., and A. Apan. 2006.** Detection of Sclerotinia rot disease on celery using hyperspectral data and partial least squares regression. *J. Spat. Sci.* 51: 129–142.
- Jamshidi, B., S. Minaei, E. Mohajerani, and H. Ghassemian. 2014.** Effect of Spectral Pre-Processing Methods on Non-Destructive Quality Assessment of Oranges Using NIRS. *J. Agric. Eng. Res.* 2:27-44
- Jinendra, B., K. Tamaki, S. Kuroki, M. Vassileva, S. Yoshida, and R. Tsenkova. 2010.** Near infrared spectroscopy and aquaphotomics: Novel approach for rapid in vivo diagnosis of virus infected soybean. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397: 685–690
- Krezhova, D., D. Hristovsa, and T. Yanev. 2010.** Spectral Remote Sensing of Tomato Plants (*Lycopersicon esculentum* L.) Infected with Tomato Mosaic Virus (ToMV). Pp 715–722. In R. Reuter (Ed). *Proc. 30<sup>th</sup> EARSeL Symp. Remote Sensing Sci. Educ. Nat. Cult. Heritage*, 31 May-3 June 2010, France
- Mahlein, A.K., T. Rumpf, P. Welke, H.W. Dehne, L. Plümer, U. Steiner, and E.C. Oerke. 2013.** Development of spectral indices for detecting and identifying plant diseases. *Remote Sens. Environ.* 128: 21–30.
- Moshou, D., C. Bravo, R. Oberti, J. West, L. Bodria, A. McCartney, and Ramon. H. 2005.** Plant disease detection based on data fusion of hyper-spectral and multi-spectral fluorescence imaging using Kohonen maps. *Real-Time Image.* 11:75– 83.
- Muhammad, H.H. 2002.** Using Hyperspectral Reflectance Data for Discrimination between Healthy and Diseased Plants, and Determination of Damage-level in Diseased Plants. Pp. 49–54. In *Proc. 31<sup>st</sup> Appl. Imagery Pattern Recognition Workshop*, 16–18 October. Washington, DC, USA. IEEE.
- Naidu, R.A., E.M. Perry, F.J. Pierce, and T. Mekuria. 2009.** The potential of spectral reflectance technique for the detection of Grapevine leaf roll-associated virus-3 in two red-berried wine grape cultivars. *Comput. Electron. Agric.* 66:38-45
- Polder, G., P.M. Blok, H. de Villiers, J.M. van der Wolf, and J. Kamp. 2019.** Potato virus Y detection in seed potatoes using deep learning on hyperspectral images. *Front. Plant Sci.* 10: p.209.
- Prabhakar, M., Y. Prasad, and M. Rao. 2012.** Remote sensing of biotic stress. Pp 517-545. In B. Venkateswarlu et al. (Ed). *Crop plants and its applications for pest management Crop stress and its management. Perspectives and strategies.* Springer Science, Dordrecht.

- Rahoutei, J., I. García-Luque, and M. Barón. 2000.** Inhibition of photosynthesis by viral infection: effect on PSII structure and function. *Physiol. Plant.* 110: 286-292.
- Saiz-Abajo, M. J., J. M. Gonzalez-Saiz, and C. J. Pizarro. 2004.** Near infrared spectroscopy and pattern recognition methods applied to the classification of vinegar according to raw material and elaboration process. *J. Near Infrared Spectrosc.* 12: 207-219.
- Singh, R.P., J. Kurz, and G. Boiteau. 1996.** Detection of stylet-borne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 59:189–196.
- Sirisomboon, P., Y. Hashimoto, and M. Tanaka. 2009.** Study on non-destructive evaluation methods for defect pods for green soybean processing by near-infrared spectroscopy. *J. Food Eng.* 93:502–512.
- Woo, Y.A., H.J. Kim, K.R. Ze, and H. Chung. 2005.** Near-infrared (NIR) spectroscopy for the non-destructive and fast determination of geographical origin of *Angelicae gigantis* Radix. *J Pharm Biomed Anal.* 36: 955-959.
- Zhang, C., Y Shen, J. Chen, P. Xiao, and J. Bao. 2008.** Nondestructive prediction of total phenolics, flavonoid contents, and antioxidant capacity of rice grain using near-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 56:8268–8272.

