

## QUANTIFICAZIONE AUTOMATIZZATA DELL'INTENSITÀ DI MALATTIE CARATTERIZZATE DA LESIONI FOGLIARI NECROTICHE

L. LAZZARATO<sup>(1)</sup>, P. EDUARDO<sup>(2)</sup>, M. NICOLAZZO<sup>(2)</sup>, G. TREBBI<sup>(1)</sup>, G. L. CALZONI<sup>(3)</sup>,  
A. CANOVA<sup>(1)</sup>, L. BETTI<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> DiSTA-Area Patologia vegetale, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna,  
Viale G. Fanin 44, 40127 (BO) – lucietta.betti@unibo.it

<sup>(2)</sup> Informatica Service, Via San Paolo 11, Casoria (NA)

<sup>(3)</sup> Dipartimento di Biologia E. S., Alma Mater Studiorum, Univ. Bologna, Via Irnerio 42, (BO)

### RIASSUNTO ESTESO

#### RIASSUNTO

Al fine di rendere oggettiva la stima dell'area danneggiata, di automatizzare e velocizzare il conteggio di lesioni fogliari necrotiche, è stato messo a punto un sistema di analisi d'immagini digitali. Il software, denominato "Spot", è stato sviluppato in MS-Visual Basic ed in C (MingW-gcc) -piattaforma Microsoft Windows- per il sistema modello Tabacco/virus del mosaico del tabacco (TMV). Spot è improntato alla massima facilità e versatilità d'impiego, in modo da trovare la più ampia applicazione in fitopatologia nella valutazione di danno fogliare. **Parole chiave:** analisi immagine, conteggio oggetti, quantificazione area, valutazione malattia

#### SUMMARY

#### AUTOMATIZED QUANTIFICATION OF SEVERITY FOR DISEASES CHARACTERIZED BY FOLIAR NECROTIC LESIONS

We developed an image analysis technique to objectively quantify foliar diseased area and automatically count necrotic lesions. The software, named "Spot", was written in MS-Visual Basic and in C (MingW-gcc) on a MicroSoft Windows platform for the Tobacco/tobacco mosaic virus (TMV) model system. Because of its flexibility and user-friendly interface, Spot could be applicable to the assessment of leaf damage in other host-pathogen interactions.

**Key words:** image analysis, object count, area quantification, disease assessment

#### INTRODUZIONE

La valutazione del numero e dell'area di lesioni necrotiche indotte da stress biotici ed abiotici è uno strumento di indagine comunemente utilizzato in Patologia vegetale. I metodi tradizionalmente usati per la valutazione di molte malattie delle piante sono qualitativi o semi-quantitativi e fanno largo impiego della stima visuale (da parte di un operatore). Tale stima è inevitabilmente influenzata dalla soggettività dell'operatore e dai limiti fisiologici dell'occhio umano (Lindow, 1983; Della Mea *et al.* 1997; Martin e Rybicki, 1998). In questi ultimi anni sono entrati in commercio molti sistemi di analisi di immagine che, tuttavia, hanno spesso costi elevati e lo svantaggio di richiedere un sistema hardware dedicato. Il software qui presentato, denominato "Spot", costituisce un modulo del più ampio programma di analisi d'immagine "Plant Meter" il quale permette la misura di parametri morfologici ed anatomici e la valutazione oggettiva dei risultati di test istologici (Aronne e Eduardo, 2001; Aronne *et al.*, 2001). Spot è stato messo a punto per valutare il numero e l'area delle lesioni ipersensibili indotte dal TMV in Tabacco; inoltre, grazie alla sua flessibilità, può essere utilizzato per la valutazione del danno fogliare in altre interazioni ospite/patogeno.

#### MATERIALI E METODI

Piante di *Nicotiana tabacum* cv Samsun NN sono state inoculate con una sospensione purificata di TMV. Da ogni foglia inocolata sono stati ricavati dischi fogliari sui quali è stata

poi effettuata l'analisi delle lesioni ipersensibili: i dischi inoculati e di controllo (preventivamente acquisiti digitalmente tramite scansione a 600 dpi) sono stati sottoposti a valutazione visuale del numero di lesioni (ripetuta da operatori diversi), mentre le corrispondenti immagini acquisite sono state analizzate mediante il software sia come numero di lesioni che come area relativa. Quest'ultima è stata anche valutata da operatori diversi senza l'impiego di Spot. Tale software si basa sull'analisi dell'immagine mediante le sue tre componenti "digitali" fondamentali Rosso Verde e Blu (RGB) nella rappresentazione a 24 bitplane: individua nel tessuto fogliare sano i valori di intensità di colore per ogni componente e li considera come riferimento per filtrare le immagini con lesioni. Il filtro evidenzia in nero tutti i punti che si trovano con almeno una componente di colore al di fuori degli intervalli di riferimento, considera come lesioni i raggruppamenti di punti superiori a una soglia prefissata ed infine ne conta il numero e ne misura l'area.

### RISULTATI

In tabella sono riportati i valori del quadrato del coefficiente di correlazione ( $R^2$ ) calcolati sui rilievi realizzati dai diversi operatori (A e B) con i diversi metodi di valutazione relativamente al numero delle lesioni e alla loro area complessiva. Inoltre è indicato il tempo medio necessario per l'analisi di ogni disco.

Metodo di valutazione	Tempo medio di analisi per disco		Confronto tra operatori (A,B) e tra metodi di valutazione	$R^2$	
	Numero lesioni	Area totale		Numero lesioni	Area necrotica totale
Visuale	2 min	11 min	A vs. B	0,910***	0,917***
Spot	40 sec	40 sec	A vs. B	0,988***	0,995***
			Spot vs. visuale (media AB)	0,914***	0,885***

\*\*\*  $p < 0,01$

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il metodo visuale tra operatori esperti ha evidenziato una correlazione altamente significativa. Analogo risultato è stato ottenuto nel confronto tra Spot ed il metodo visuale, quindi tale software individua correttamente le lesioni necrotiche, con una maggiore accuratezza per quanto riguarda il numero. Inoltre l'impiego di Spot aumenta la riproducibilità dell'analisi e permette di acquisire risultati con un considerevole risparmio di tempo.

### LAVORI CITATI

- ARONNE G., EDUARDO P., 2001. "ROOT": a computer system to measure plant anatomical features automatically. In: S. Mazzoleni, C.J. Colin (Eds.), ModMED: Modelling Mediterranean Ecosystem Dynamics, Final Report ModMED III Project, EU-DGXII Environment (IV) Framework, ENV 4-ct97-0680.
- ARONNE G., CAVUOTO D., EDUARDO P., 2001. Classification and counting of fluorescent pollen using an image analysis system. *Biotechnic and Histochemistry*, 76, 35-40.
- DELLA MEA M., CALZONI G. L., BAGNI N., 1997. Evaluation of ozone injury in *Nicotiana tabacum* cv. Bell-W3 with computerised image analysis. *Fresenius Environmental Bulletin*, 6, 475-480.
- LINDOW S. E., 1983. Estimating disease severity of single plants. *Phytopathology*, 73, 1576-1581.
- MARTIN D. P., RYBICKI E. P., 1998. Microcomputer-based quantification of maize streak virus symptoms in *Zea mays*. *Phytopathology*, 88, 422-427.