

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
Facoltà di Scienze Agrarie e Alimentari
Corso di Laurea Magistrale in Scienze Agrarie



**ANALISI MULTIVARIATA DI DATI
PER LA CARATTERIZZAZIONE DI OIDIO IN CETRIOLO
MEDIANTE TECNICHE DI IMAGING**

Tesi di: Sara VIGNATI

Matr. n.: 920259

Relatore: Prof. Roberto OBERTI

Anno accademico 2018-2019

INDICE

INTRODUZIONE	3
LE PROPRIETÀ OTTICHE DELLE PIANTE E RELAZIONE CON LO STATO SANITARIO DELLE COLTURE	7
1.1. La radiazione elettromagnetica.....	7
1.2. La riflettanza e la “firma o impronta spettrale” della vegetazione	10
1.3. La fluorescenza.....	12
1.4. L’emissione termica	13
1.5. Le trasformazioni nel tessuto vegetale indotte dal patogeno	14
LA DIFESA DELLE COLTURE E LE TECNICHE DI IMAGING	17
2.1. Le malattie delle colture e i metodi per la loro identificazione	17
2.2. Le tecniche spettroscopiche e di imaging	18
2.2.1. Spettroscopia di fluorescenza.....	19
2.2.2. Spettroscopia visibile e infrarossa.....	19
2.2.3. Imaging a fluorescenza.....	20
2.2.3. Imaging multispettrale o iperspettrale	20
2.2.3. Termografia a infrarossi	21
2.3. Ipotesi di potenziale applicazione delle tecniche di imaging	22
MATERIALI E METODI	27
3.1. Scelta della malattia di riferimento e della coltura modello.....	27
3.2. Condizioni di coltivazione della coltura modello e inoculazione del patogeno	27
3.3. Strumentazione per l’acquisizione	28
3.3.1. Telecamera multispettrale	28

3.3.2. Termocamera IR ad alta risoluzione	32
3.3.3. Sorgente luminosa e DAQ device	34
3.3.4. Il setup di acquisizione.....	35
3.4. Software di analisi	36
3.4.1. MATLAB®	36
3.4.2. ResearchIR	37
3.5. Protocollo sperimentale di acquisizione	38
3.6. Elaborazione delle immagini multispettrali e di fluorescenza.....	43
3.6.1. Normalizzazione delle immagini multispettrali e calcolo degli indici spettrali	43
3.6.2. Estrazione delle ROI e classificazione del tessuto fogliare	48
3.7. Analisi statistica	50
3.7.1. Principal Component Analysis (PCA)	50
3.7.2. Analisi degli indici spettrali	52
RISULTATI	53
4.1. Principal Component Analysis (PCA)	53
4.2. Evoluzione degli indici spettrali	57
CONCLUSIONI	62
BIBLIOGRAFIA.....	64
SITOGRAFIA	67
APPENDICE I.....	68
APPENDICE II.....	70
APPENDICE III	71
APPENDICE IV	74
APPENDICE V.....	81

INTRODUZIONE

Ai nostri giorni, l'agricoltura si trova ad affrontare scenari economici, sociali ed ambientali in rapida evoluzione, che la obbligano ad individuare soluzioni tecnologiche sempre più innovative e più adatte a:

- sistemi colturali a basso impatto ambientale e a costo ridotto, attraverso l'utilizzo di strumenti per il controllo automatico della distribuzione dei fattori di produzione;
- attuazione di forme di gestione aziendale avanzate, con lo scopo di migliorare la qualità dei controlli da parte della direzione dell'azienda agricola, aumentando la produttività del lavoro e riducendo i costi di produzione;
- attuazione di forme automatiche di documentazione per raggiungere obiettivi di certificazione di qualità (tipo ISO 9000 e 14000), di trasparenza dei protocolli di produzione e di tracciabilità delle produzioni realizzate.

In questo modo, si cerca di realizzare un'agricoltura sostenibile sia in termini ecologico-ambientali sia socio-economici. Le iniziative scientifiche e commerciali, già in atto dalla metà degli anni '90, si basano sulla realizzazione della cosiddetta "Agricoltura di Precisione" (AP). Negli ultimi decenni, sono state proposte numerose definizioni di tale termine, che possono essere riassunte in una delle più conosciute ed è quella di un approccio alla gestione del processo produttivo agricolo che consenta di *"fare la cosa giusta, nel momento giusto, al posto giusto"* (Gebbers and Adamchuk, 2010). Infatti, l'Agricoltura di Precisione ha come obiettivo fondante la gestione razionale dei fattori produttivi (biologici, chimici, fisici, energetici) in funzione della variabilità spaziale e temporale delle condizioni pedologiche e colturali all'interno dei singoli appezzamenti, al fine di ottimizzare la resa, la qualità e la sostenibilità economica e ambientale delle produzioni agricole.

La gestione della variabilità avviene secondo logiche “sito-specifiche”, grazie all’utilizzo di diverse tecnologie: sensoristica, elettronica, meccatronica ed informatica, per la raccolta di dati e il loro successivo utilizzo nell’ambito di decisioni riguardanti le attività produttive di campo. Ciò, dunque, riguarda sia l’ambito decisionale operativo (distribuzione dei fattori di produzione secondo logiche sito-specifiche, guida assistita o automatica, ecc.), sia l’ambito decisionale direttivo (organizzazione del lavoro e modalità di svolgimento delle operazioni). L’innovazione tecnologica alla base dell’Agricoltura di Precisione è lo sviluppo dei sistemi di posizionamento e navigazione satellitare (GNSS - *Global Navigation Satellite Systems*), nati per scopo militare alla fine degli anni ‘80 e in seguito resi disponibili anche per usi civili. Nel 1973 viene approvato dal Dipartimento della Difesa Statunitense un progetto per creare un sistema di navigazione satellitare globale: nasce il sistema NAVSTAR (*NAVigation Satellite Timing And Ranging*), più comunemente noto come GPS (*Global Positioning System*) e capostipite dei sistemi GNSS. In agricoltura, un sistema di posizionamento può essere utilizzato in diversi campi di applicazione che possono essere suddivisi in due gruppi: la navigazione e la gestione sito-specifica. Il primo riguarda il monitoraggio e il coordinamento delle singole macchine agricole o del cantiere di lavoro, mentre nel secondo sono comprese le attività rivolte all’acquisizione di dati per produrre documentazione legata, per esempio, al monitoraggio colturale o operativo, al campionamento del suolo, alla mappatura delle produzioni e altre operazioni legate al controllo operativo delle attività meccanizzate in campo come, ad esempio, la distribuzione a rateo variabile (VRT - *Variable Rate Technologies*) di un agrofarmaco. Attualmente, le applicazioni di trattamenti fitosanitari in colture erbacee riguardano principalmente la gestione sito-specifica delle piante infestanti o *site-specific weed management* (SSWM), mentre le soluzioni per il controllo sito-specifico dei patogeni sono ancora in fase di sperimentazione. L’obiettivo della SSWM è quello di erogare il prodotto solo dove sono presenti le infestanti e nella dose necessaria, cioè in funzione del livello di infestazione presente. L’irrorazione di precisione può essere eseguita con due tecniche:

- a) *distribuzione a dose variabile* del prodotto fitosanitario, attraverso la variazione della portata del sistema di distribuzione in funzione di esigenze specifiche del trattamento (es. stadio vegetativo, grado di presenza delle infestanti) nei diversi punti dell'appezzamento;
- b) *distribuzione a chiazze o patch-spraying*, con cui il prodotto fitosanitario viene distribuito ad una sola dose prefissata e solo nelle aree dell'appezzamento dove l'irrorazione è necessaria o ritenuta tale, cioè in presenza o ipotesi di presenza delle infestanti.

Per quanto riguarda la prima tecnica, la localizzazione della macchina irroratrice mediante sistema GNSS consente di distribuire la dose di agrofarmaco ritenuta idonea per le diverse zone in cui viene suddiviso l'appezzamento. La redazione di carte tematiche di distribuzione si basa sempre su informazioni georeferenziate relative al livello di infestazione presente nel periodo di trattamento, a quello rilevato alla raccolta e in fase di emergenza della coltura o delle colture precedenti. La distribuzione mirata a chiazze si realizza mediante l'impiego di sensori ottici che rilevano presenza delle infestanti attivando automaticamente la distribuzione dell'erbicida, a livello di singolo ugello oppure di sezioni della barra irroratrice. I sistemi attualmente in commercio si basano sulla determinazione di un valore soglia di un indice spettrale (es. NDVI - *Normalized Difference Vegetation Index*) per distinguere il suolo dalla malerba, ma non discriminano le piante infestanti dalla coltura in atto. Per questo motivo sono utilizzati solo in fase di pre-semina oppure in post-emergenza delle colture seminate a file, in modo da posizionare i sensori sulla verticale dell'interfila. Inoltre, la distribuzione mirata dei diserbanti può essere basata anche su mappe che riproducono la diffusione delle infestanti all'interno dell'appezzamento. La mappatura delle malerbe può essere eseguita mediante diverse modalità:

- monitoraggio a terra (*scouting*);
- registrazione delle zone ad alto grado di infestazione durante la raccolta, con sistemi montati sulla mietitrebbia;
- sistemi di telerilevamento da satellite, mediante sensori multispettrali o iperspettrali;

- acquisizione di immagini ad alta risoluzione tramite droni.

Quest'ultima tecnologia si presta molto bene per la mappatura delle piante infestanti, poiché consente di acquisire dati in momenti diversi del ciclo colturale. I continui sviluppi tecnologici delle camere e dei sensori ottici stanno consentendo di aumentare la risoluzione spaziale e spettrale degli strumenti a bordo dei droni, in modo tale da avere dati di maggior qualità e rendendo questi sistemi più interessanti per le applicazioni in agricoltura di precisione.

Una volta ottenuta la mappatura della distribuzione delle malerbe, si ricavano delle carte tematiche che vengono caricate sul computer di bordo dell'irroratrice, interfacciato al sistema di posizionamento e a quello di controllo della barra irroratrice. Tale sistema consente l'irrorazione del diserbante in base alle dosi previste solo nelle zone in cui l'infestazione supera determinate soglie. La gestione sito-specifica del diserbo, dunque, consente di ridurre le dosi di diserbante applicato, con vantaggi sia economici che ambientali. Tali obiettivi si potrebbero ottenere anche con la pianificazione di una gestione di precisione dei patogeni e dei parassiti (in inglese, PPM - *Precision Pest Management*), tema di ricerca molto attuale. Per far fronte all'aumento delle pressioni per ridurre l'uso dei pesticidi nelle produzioni agricole, si ricercano soluzioni sensoristiche innovative, legate alle proprietà ottiche della vegetazione, e che permettano l'individuazione di sintomi di malattie nelle colture, in modo tale da definire una gestione sito-specifica dei focolai iniziali mediante trattamenti mirati.

In tale contesto, si inserisce il presente lavoro di tesi.

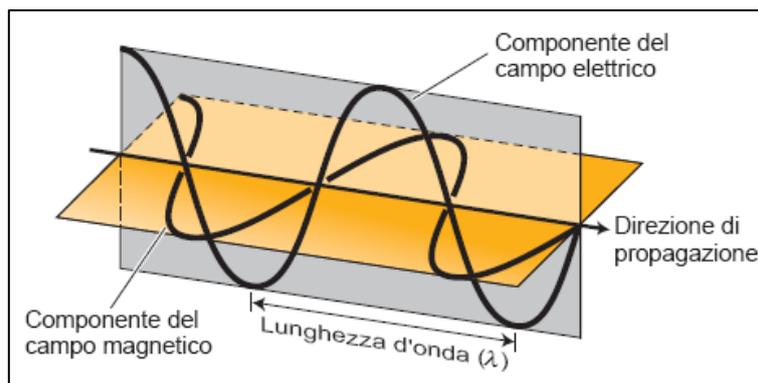
CAPITOLO PRIMO

LE PROPRIETÀ OTTICHE DELLE PIANTE E RELAZIONE CON LO STATO SANITARIO DELLE COLTURE

1.1. La radiazione elettromagnetica

Il monitoraggio colturale si basa sulle onde elettromagnetiche, cioè sull'interazione tra la radiazione elettromagnetica (o luce) e la vegetazione, da cui si vuole trarre delle informazioni. La luce è un'onda trasversale elettromagnetica risultante dalla variazione di intensità e di direzione di un campo elettrico e magnetico, e che si manifesta con delle oscillazioni periodiche di questi campi, posti perpendicolarmente l'uno rispetto all'altro (Fig. 1.1).

Figura 1.1 - Componenti della luce

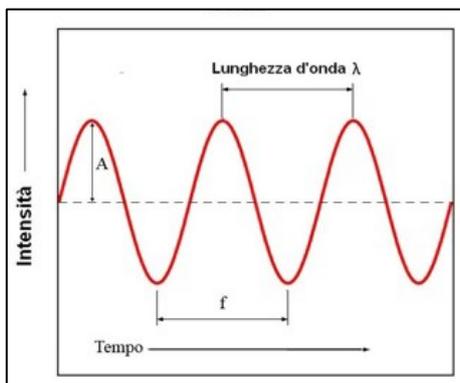


Fonte: slide del corso di Biochimica e fisiologia vegetale della prof.ssa Negrini N.

Le radiazioni elettromagnetiche possono essere considerate come dotate di una doppia natura di onda e di particella (“pacchetti” o “quanti” di energia). Se si considera la luce come onda, poiché si propaga nello spazio ad una velocità costante ($c = 3 \cdot 10^8 \text{ m sec}^{-1}$), può essere caratterizzata in base alla sua ampiezza, lunghezza e frequenza (Fig. 1.2). L'ampiezza (A) corrisponde

all'altezza delle onde, cioè alla distanza tra una cresta e la posizione di equilibrio; la lunghezza d'onda (λ) è la distanza tra due creste successive e si misura in sottomultipli del metro [mm, μm , nm]; la frequenza (f) coincide con il numero di onde che arrivano in un punto in un dato intervallo di tempo e si misura in cicli al secondo (Hertz, Hz) e multipli (kHz, MHz, GHz). C'è una relazione inversa tra lunghezza d'onda e frequenza, per cui onde più corte hanno una frequenza maggiore e viceversa. Invece, se si considera la luce come formata da particelle (“pacchetti” energetici discreti o “quanti”), è possibile definirne il contenuto energetico (E), come: $E = h \cdot f = h \cdot c/\lambda$, dove h è la costante di Planck ($6.6 \cdot 10^{-34}$ J sec) ed è costante per tutte le radiazioni e c è la velocità della luce. Ne deriva che quanto minore è la lunghezza d'onda di una radiazione elettromagnetica tanto maggiore è il suo contenuto energetico.

Figura 1.2 - Le grandezze caratteristiche delle onde

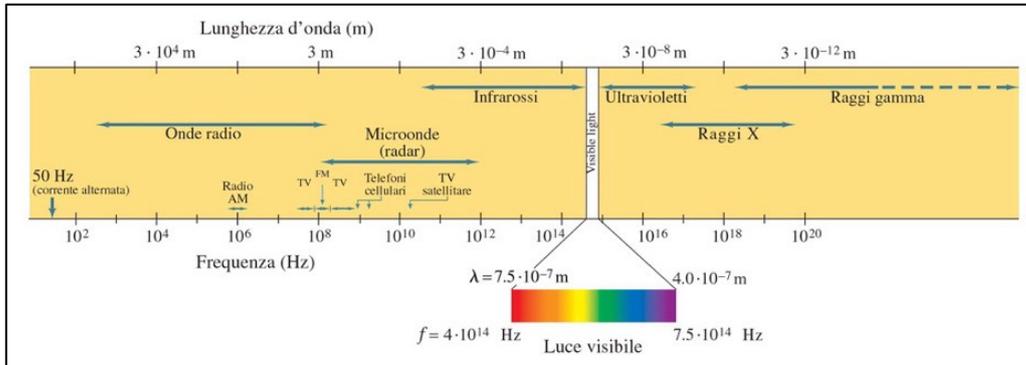


Fonte: slide del corso di Fisica del prof. Rossi M.

I corpi emettono radiazione elettromagnetica all'interno di un intervallo di lunghezze d'onda, definito “spettro elettromagnetico” (Fig. 1.3). Lo spettro è suddiviso in una serie di regioni, dette “bande spettrali”, caratterizzate da frequenze diverse, da cui dipendono le proprietà di ciascun tipo di radiazione. La “banda del visibile” (VIS) è la luce percepibile dall'occhio umano, è utilizzata dalle piante per fare la fotosintesi e ha lunghezze d'onda comprese tra 400 e 700 nm. Oltre i 700 nm, si ha la “banda dell'infrarosso” (IR), che può essere suddiviso in: vicino infrarosso o NIR (*Near Infra Red*, 700-1300 nm), infrarosso medio o MIR (*Medium Infra Red*, 1300-8000 nm) ed infrarosso termico

o TIR (*Thermal Infra Red*, 8000-14000 nm). A lunghezze d'onda inferiori al visibile (minori di 400 nm) corrisponde la “banda dell’ultravioletto” (UV) e quelle dei raggi X (10 nm - 100 pm) e dei raggi γ ($\lambda < 100$ pm).

Figura 1.3 - Lo spettro elettromagnetico

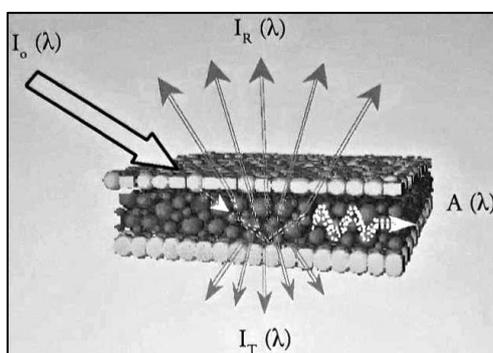


Fonte: slide del corso di Fisica del prof. Rossi M.

1.2. La riflettanza e la “firma o impronta spettrale” della vegetazione

La possibilità di valutare a livello ottico lo stato fisiologico delle colture si basa sulle modificazioni che la radiazione luminosa subisce incidendo sulla pianta e interagendo con i suoi tessuti. Ogni costituente del tessuto vegetale assorbe la radiazione incidente in specifiche bande spettrali, modificando lo spettro della frazione riflessa in funzione della concentrazione con cui esso è presente nella pianta (Fig. 1.4).

Figura 1.4 - La radiazione incidente (I_o) sul tessuto vegetale viene in parte assorbita (A), in parte trasmessa (I_T) e in parte riflessa (I_R), in funzione della lunghezza d'onda della radiazione (λ)



Fonte: Oberti R. (2003): *Sistemi ottici per la valutazione dello stato sanitario delle piante*, Atti dell'Accademia dei Georgofili, Serie VII, Vol. L

La *riflettanza* $R(\lambda)$ è, quindi, il rapporto tra la radiazione riflessa (I_R) e quella incidente (I_o) definita ad ogni lunghezza d'onda (λ):

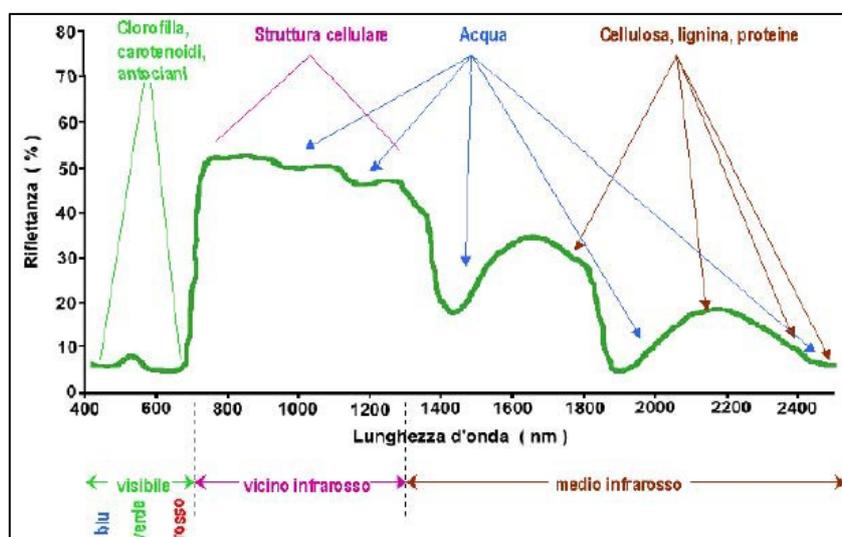
$$R(\lambda) = \frac{I_R}{I_o}(\lambda)$$

Essa costituisce la “firma o impronta spettrale” della vegetazione, che fornisce informazioni riguardanti la natura e la concentrazione dei diversi componenti del tessuto vegetale. Una tipica curva di riflettanza del tessuto fogliare sano è mostrata in figura 1.5. L'intervallo spettrale considerato comprende la banda del visibile e parte dell'infrarosso ed è di particolare interesse per studiare lo stato fisiologico delle piante. La curva di riflettanza è caratterizzata da:

- valori bassi nella regione del visibile (400-700 nm) dovuti al forte assorbimento da parte della clorofilla e degli altri pigmenti secondari e all'utilizzo della radiazione per il processo di fotosintesi; tuttavia, la riflettanza è minore nel blu e nel rosso, bande più adatte al processo fotosintetico, e maggiore nel verde, motivo per cui la vegetazione appare di questo colore ai nostri occhi;
- valori elevati nella zona del vicino infrarosso (700-1300 nm) a causa dell'assenza di assorbimenti specifici a queste lunghezze d'onda e alle riflessioni multiple nelle interfacce aria-cellula;
- valori più contenuti nella regione del medio infrarosso (1300-2500 nm) corrispondenti ai picchi di assorbimento dell'acqua e di alcuni deboli assorbimenti da parte di composti azotati e carboidrati.

Infine, l'intervallo spettrale in cui si osserva un forte aumento della riflettanza, nella zona di transizione dal visibile al vicino infrarosso, dovuto all'assenza di assorbimento di radiazione per il processo fotosintetico, è comunemente definito "red edge".

Figura 1.5 - La "firma spettrale" di un tessuto fogliare sano nell'intervallo 400-2500 nm



Fonte: slide del corso di Pianificazione e gestione dei processi meccanizzati del prof. Calcante

1.3. La fluorescenza

Il termine “fluorescenza” indica un flusso di radiazione emessa da una pianta. Al contrario della riflettanza, la radiazione fluorescente può essere ricondotta ai fotoni che sono entrati in un processo di assorbimento nelle piante. Infatti, la radiazione visibile e ultravioletta assorbita dalla clorofilla e dai pigmenti secondari viene solo in parte utilizzata nel processo fotosintetico. Una piccola frazione di essa, circa il 1-3% in condizioni normali, viene dissipata sotto forma di fluorescenza, ossia viene riemessa a lunghezze d’onda maggiori di quelle assorbite; ciò significa che, in termini di energia per fotone, la luce fluorescente ha meno valore. La fluorescenza viene emessa in due bande principali, dal rosso al rosso lontano (690 nm e 740 nm), e in due secondarie, dal blu al verde (450 nm e 550 nm). La “fluorescenza blu-verde” è indotta dalla luce ultravioletta, quindi dalla luce non utilizzata nella fotosintesi, e si presume che tale fluorescenza si sviluppi all’interno di materiali fenolici nelle pareti cellulari delle piante (Bauchmann e Lichtenthaler, 1998). Al contrario, la fluorescenza dal rosso al rosso-lontano, oltre che da radiazioni ultraviolette, può derivare dalla luce che è entrata in un processo fotosintetico e, quindi, dalle molecole di clorofilla. Ecco perché viene definita “fluorescenza della clorofilla”. Tale radiazione è considerata una perdita di energia ed è emessa quando il processo fotosintetico non può avvenire, sebbene sia disponibile una radiazione fotosinteticamente attiva sufficiente, come ad esempio in seguito alla mancanza o all’errata fornitura di acqua o nutrienti oppure alla presenza di malattie o di infestazioni di parassiti. In queste situazioni, la fluorescenza della clorofilla emessa è sei volte superiore. Teoricamente, la dissipazione del calore o della fluorescenza potrebbe essere un possibile indicatore, per i rispettivi segnali, dello stato del processo di fotosintesi. Per quanto riguarda le radiazioni fluorescenti, il telerilevamento da piattaforme aeree e il rilevamento prossimale da macchine agricole on-line e in movimento è lo stato dell’arte.

1.4. L'emissione termica

Un secondo canale di dissipazione della radiazione assorbita è l'emissione termica nell'infrarosso lontano ($\approx 10 \mu\text{m}$), regione nella quale i corpi emettono radiazione elettromagnetica con intensità proporzionale alla propria temperatura. La temperatura è un importante parametro fisico che determina le performance della pianta. Allo stesso tempo, la temperatura della pianta è legata sia a fattori ambientali sia a diverse caratteristiche strutturali e funzionali della pianta, come l'orientamento fogliare, la capacità di riscaldamento, le proprietà della superficie, la capacità di assorbimento dell'infrarosso e il raffreddamento dovuto al tasso di traspirazione (flusso di calore latente verso l'esterno). Invece, l'attività metabolica ha un ruolo marginale (Chaerle L. and Van Der Straeten D., 2000). I cambiamenti di temperatura nella foglia dipendono principalmente dall'alterazione del processo di traspirazione in risposta a particolari stress. Le misurazioni della temperatura fogliare e della chioma tramite la termografia sono state introdotte sia a livello di laboratorio che di campo, per valutare lo stato idrico delle foglie. L'*imaging* termico utilizza un range spettrale da 3 a 14 μm ed è principalmente utilizzato per stimare lo stato idrico della pianta, la traspirazione e la conduttanza stomatica (Fiorani F. e Schurr U., 2013). Per essere fisicamente significative, queste misurazioni devono essere correlate alla temperatura della superficie attraverso una calibrazione estensiva per ogni superficie vegetale e specie esaminata (Fiorani F. et al., 2012).

Anche l'emissione termica è una perdita di energia. Infatti, se il processo fotosintetico è bloccato, oltre all'aumento nell'emissione della fluorescenza, si ha un incremento della dissipazione del calore fino a sei volte. Tuttavia, il livello assoluto di dissipazione di energia attraverso il calore è molto più elevato rispetto alla fluorescenza: nelle stesse condizioni, si perde circa sette volte più energia dal calore che dalla fluorescenza.

1.5. Le trasformazioni nel tessuto vegetale indotte dal patogeno

I sintomi di un attacco patologico sono diversi a seconda della natura del patogeno e del suo stadio di sviluppo. Tuttavia, vi sono alcune caratteristiche comuni che possono essere utili per sviluppare sistemi ottici per l'individuazione automatica di malattie. Generalmente, nelle fasi iniziali la malattia si manifesta con aree depigmentate, di qualche millimetro di dimensione, che compaiono dove il tessuto cellulare è stato danneggiato in seguito all'attività del patogeno. In corrispondenza di tali lesioni, la clorofilla si degrada rapidamente e la sua concentrazione locale è molto inferiore a quella propria del tessuto sano circostante. Ciò causa una diminuzione localizzata della capacità di assorbire la luce visibile e, dunque, un incremento della riflettanza nella banda del rosso attorno a 670 nm. Alla riduzione dell'assorbimento nella regione del rosso è legato anche il fenomeno dello spostamento verso lunghezze d'onda minori del *red-edge*, tipico della superficie fogliare che presenta sintomi clorotici (West J. S. et al., 2003; Moshou D. et al, 2011). Col progredire della patologia, la lesione tende ad espandersi, occupando maggiori porzioni di tessuto e causando fenomeni di necrosi e senescenza. Durante questa fase, vengono prodotti pigmenti bruni, di origine fenolica, responsabili di una diminuzione della riflettanza nella regione del vicino infrarosso, in particolare nell'intervallo 700-800 nm.

Contemporaneamente, la riduzione della densità della chioma, legata alla senescenza dei tessuti e all'inibizione della crescita della pianta, contribuiscono alla riduzione della riflettanza nel vicino infrarosso. Infine, la progressiva disidratazione dei tessuti che accompagna l'estendersi delle lesioni, ne aumenta la riflettanza in corrispondenza delle bande di assorbimento dell'acqua nel medio infrarosso. Anche la fluorescenza e l'emissione termica, avvenendo in competizione con il processo fotosintetico, sono proprietà fortemente dipendenti dallo stato sanitario della pianta. Infatti, un tessuto sano, avendo un'elevata efficienza fotosintetica, mostra un'emissione di fluorescenza e di radiazione termica inferiore a quella di un tessuto in condizioni di stress. Queste caratteristiche consentono di utilizzare tali

fenomeni di emissione per studiare le reazioni del tessuto fogliare in modo tempestivo rispetto all'attacco del patogeno. In particolare, il rallentamento o il blocco del processo fotosintetico nelle regioni del tessuto vegetale colpite dal patogeno, determina un incremento sia dell'emissione di fluorescenza sia della radiazione termica, prima della comparsa di sintomi visibili. Tuttavia, questi fenomeni riguardano solo porzioni millimetriche di tessuto e, successivamente, col progredire della malattia e la distruzione del tessuto vegetale, sia ha una forte riduzione dell'anomala emissione di fluorescenza e di radiazione termica in corrispondenza delle lesioni. Inoltre, tali fenomeni risultano difficili da misurare in condizioni di campo a causa dei disturbi legati all'illuminazione naturale che si sovrappone al debole segnale di fluorescenza e, dall'altro lato, alla convezione termica e all'irraggiamento solare che mascherano la distribuzione disomogenea della temperatura sulla superficie fogliare. Le principali modificazioni del tessuto vegetale causate da un patogeno sono rappresentate nella figura 1.6 e riassunte nella tabella 1.1.

Figura 1.6 - Rappresentazione esemplificativa delle modificazioni delle proprietà ottiche del tessuto vegetale da sano a malato



Fonte: slide del corso di pianificazione e gestione dei processi meccanizzati del prof. Calcante

Tabella 1.1 - Principali modificazioni ottiche del tessuto vegetale causate da un attacco patologico

Intervallo spettrale	Modificazione	Causa
550-700 nm	incremento $R(\lambda)$	degradazione della clorofilla
680-730 nm	slittamento <i>red-edge</i>	degradazione della clorofilla
690-740 nm	incremento $F(\lambda)$	riduzione dell'efficienza fotosintetica
700-800 nm	diminuzione $R(\lambda)$	pigmenti fenolici, necrosi
700-1300 nm	diminuzione $R(\lambda)$	riduzione della biomassa
1450, 1900, 2450 nm	incremento $R(\lambda)$	disidratazione
10 μm	incremento $E(\lambda)$	riduzione dell'efficienza fotosintetica e dell'evapotraspirazione
Legenda: $R(\lambda)$ = riflettanza; $F(\lambda)$ = fluorescenza; $E(\lambda)$ = emissione		

Fonte: Oberti R. (2003): *Sistemi ottici per la valutazione dello stato sanitario delle piante*, Atti dell'Accademia dei Georgofili, Serie VII, Vol. L

CAPITOLO SECONDO

LA DIFESA DELLE COLTURE E LE TECNICHE DI IMAGING

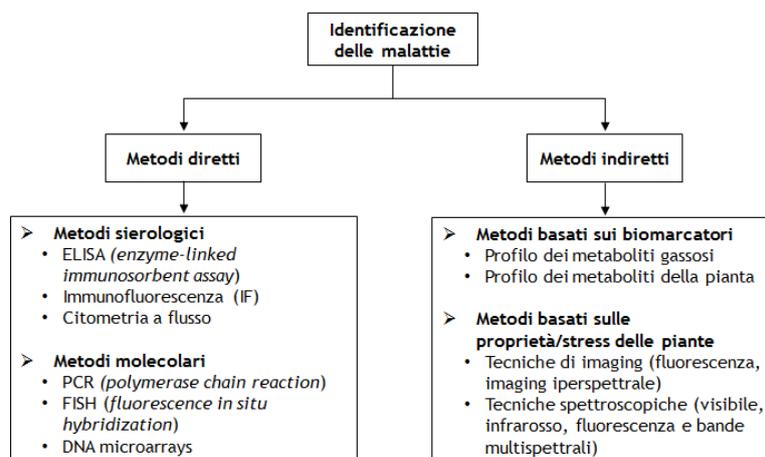
2.1. Le malattie delle colture e i metodi per la loro identificazione

In agricoltura, i patogeni che colpiscono le colture causano le maggiori perdite sia produttive che economiche. A titolo esemplificativo, si riportano le perdite produttive, a livello mondiale, delle sei principali colture:

- frumento: circa il 18%;
- riso: circa il 15%;
- mais: circa il 12%;
- patate: circa il 29%;
- soia: circa il 12%;
- cotone: circa il 9% (Oerke E.-C., 2006, 2007).

Lo sviluppo di un sistema di identificazione delle fasi iniziali di una malattia potrebbe contribuire a prevenirne la diffusione e a ridurre le perdite. A tale scopo sono state sviluppate diverse metodologie che possono essere classificate in: metodi diretti e indiretti, riassunti nella figura 2.1.

Figura 2.1 - Metodi diretti e indiretti di identificazione delle malattie



Fonte: Sankaran et al. (2010), A review of advanced techniques for detecting plant diseases.

I metodi diretti sono eseguibili in laboratorio, ma presentano alcune limitazioni: sono dispendiosi i termini di tempo e lavoro, richiedono una procedura elaborata, in particolare durante la fase di preparazione del campione (raccolta ed estrazione), per ottenere risultati affidabili e accurati. Inoltre, richiedono reagenti specifici per rilevare ciascun agente patogeno. Le tecniche molecolari, quindi, potrebbero essere utilizzate come strumenti robusti per assicurarsi della presenza di una malattia, ma non possono essere usate come strumento di *screening* primario per analizzare un elevato numero di piante in tempi brevi. Perciò, per l'identificazione precoce e rapida delle patologie sono ritenuti più idonei i metodi indiretti, non invasivi e non distruttivi, basati sui biomarcatori o sulle proprietà ottiche. In particolare, le tecniche di imaging (o di produzione di immagini) e spettroscopiche, descritte nel paragrafo seguente, risultano essere i metodi migliori per individuare i sintomi delle malattie delle colture.

2.2. Le tecniche spettroscopiche e di imaging

Le tecniche spettroscopiche e di imaging sono gli unici metodi che sono stati utilizzati nell'identificazione di malattie e stress dovuti a diversi fattori. Infatti, sono state applicate con successo per individuare stress idrici e nutrizionali e nel monitoraggio della qualità dei prodotti ortofrutticoli in post-raccolta. Tra queste tecniche troviamo: spettroscopia di fluorescenza (Marcassa et al., 2006; Belasque et al., 2008; Lins et al., 2009), spettroscopia infrarossa (Spinelli et al., 2006; Purcell et al., 2009), spettroscopia visibile o multibanda (Yang et al., 2007; Delalieux et al., 2007; Chen et al., 2008), imaging a fluorescenza (Bravo et al., 2004; Moshou et al., 2005; Chaerle et al., 2007), imaging multispettrale o iperspettrale (Moshou et al., 2004; Shafri and Hamdan, 2009; Qin et al., 2009), termografia a infrarossi (Chaerle et al., 2001, 2003; Van Der Straeten, 2000).

2.2.1. Spettroscopia di fluorescenza

La spettroscopia di fluorescenza fa riferimento ad un tipo di metodo spettroscopico, dove la fluorescenza emessa da un oggetto di interesse viene misurata dopo l'eccitazione mediante un fascio di luce, solitamente nella banda dell'ultravioletto. Negli ultimi vent'anni, la fluorescenza indotta con laser è stata utilizzata in studi sulla vegetazione, come nel monitoraggio dei livelli di stress e degli stati fisiologici delle piante (Belasque et al., 2008). Questa tecnica può essere utilizzata per monitorare le carenze di nutrienti, le condizioni ambientali basate sui livelli di stress e le malattie nelle piante (Cerovic et al., 1999; Belasque et al., 2008). Per esempio, Lins et al. (2009) ha condotto esperimenti in campo per distinguere foglie di *Citrus* sane, stressate dal cancro (malattia batterica causata da *Xanthomonas citri* - *X. Axonopodis* pv. *citri*) o clorotiche infettate dal batterio *Xilella fastidiosa*.

2.2.2. Spettroscopia visibile e infrarossa

Simile alla spettroscopia di fluorescenza, la spettroscopia visibile e infrarossa è usata utilizzata come metodo rapido, non distruttivo ed economico per la rilevazione di malattie delle piante, stress e lesioni. Le regioni spettrali del visibile e dell'infrarosso sono note per fornire informazioni sui livelli di stress fisiologico nelle piante (Muhammed, 2002, 2005; Xu et al., 2007) e, in generale, le due spettroscopie vengono utilizzate in combinazione per rilevare malattie nelle piante (Malthus e Madeira, 1993; Bravo et al., 2003; Huang et al., 2004; Larsolle e Muhammed, 2007). Per esempio, Spinelli et al. (2006) hanno valutato la tecnica basata sul vicino infrarosso (NIR) per rilevare la presenza di peronospora in piante di pere asintomatiche, in condizioni di serra. La tecnica NIR, però, si è dimostrata incapace di distinguere le piante infette da quelle sane, al contrario di un naso elettronico. Gli autori hanno spiegato che tale incapacità potrebbe essere dovuta all'area di scansione fogliare troppo piccola (2 mm² in questo studio) e hanno raccomandato che un'analisi di immagine multidimensionale potrebbe fornire maggiori informazioni sulle piante malate

piuttosto che un campo visivo più piccolo. Ciò significa che le tecniche di imaging, basate sulla spettroscopia, potrebbero essere più solide nell'identificazione della malattia nelle prime fasi, rispetto ai soli metodi spettroscopici.

2.2.3. Imaging a fluorescenza

Il cambiamento nella fluorescenza blu-verde e nella fluorescenza della clorofilla delle piante in seguito all'eccitazione ultravioletta potrebbe fornire informazioni sulle condizioni fisiologiche della pianta (Belasque et al., 2008). L'imaging a fluorescenza è un progresso della spettroscopia di fluorescenza, in cui le immagini di fluorescenza (anziché singoli spettri) sono ottenute utilizzando una fotocamera. Una lampada allo xeno o alogena viene utilizzata come sorgente di luce UV, utilizzata come radiazione eccitante, e la fluorescenza a lunghezze d'onda specifiche viene registrata utilizzando una fotocamera con CCD (dispositivo ad accoppiamento di carica) (Bravo et al., 2004; Lenk e Buschmann, 2006; Chaerle et al., 2007; Lenk et al., 2007). Le regioni dello spettro elettromagnetico che vengono comunemente utilizzate per l'imaging a fluorescenza sono: blu (440 nm), verde (520-550 nm), rosso (690 nm), rosso lontano (740 nm) e vicino infrarosso (800 nm) (Lenk e Buschmann, 2006; Chaerle et al., 2007). L'imaging a fluorescenza della clorofilla può essere uno strumento efficace nel monitoraggio delle malattie delle foglie (Chaerle et al., 2004; Scharte et al., 2005; Lenk et al., 2007).

2.2.3. Imaging multispettrale o iperspettrale

Nell'imaging iperspettrale, la riflettanza spettrale di ciascun *pixel* viene acquisita per una gamma di lunghezze d'onda che possono includere le regioni spettrali del visibile e dell'infrarosso. L'imaging multispettrale è simile a quello iperspettrale, con la differenza che, nell'iperspettrale, una gamma più ampia di lunghezze d'onda (maggior numero di bande spettrali) viene scansionata per ciascun pixel. Le informazioni che si ottengono sono un insieme di valori di pixel

(intensità della riflettanza) a ciascuna lunghezza d'onda degli spettri, nella forma di un'immagine. L'imaging iperspettrale viene spesso utilizzato per monitorare la qualità dei prodotti alimentari (es. frutti), mentre le principali sfide di questa tecnica riguardano il rilevamento delle patologie e sono: la selezione della banda spettrale specifica della malattia e la selezione dell'algoritmo di classificazione statistica per una particolare applicazione, che dipende dalla configurazione dell'acquisizione dei dati in condizioni di campo. Ogni regione spettrale, infatti, fornisce informazioni uniche sulla pianta. Ad esempio, la riflettanza alla lunghezza d'onda visibile fornisce informazioni sulle pigmentazioni fogliari, mentre la riflettanza alla lunghezza d'onda dell'infrarosso sulle condizioni fisiologiche della pianta (Huang et al., 2007).

2.2.3. Termografia a infrarossi

La termografia a infrarossi si riferisce ad una tecnica di imaging che utilizza l'energia termica nella banda a infrarossi e trasforma le informazioni acquisite in un'immagine visibile. La termografia a infrarossi, in modo simile ad altre tecniche di imaging, può essere utilizzata per il monitoraggio non distruttivo dello stato fisiologico delle piante (Chaerle et al., 1999, 2001). Chaerle et al. (2003) e Chaerle e Van Der Straeten (2000) hanno esaminato l'applicazione delle tecniche di imaging in agronomia e il rilevamento degli stress. Hanno riferito che i cambiamenti stomatici nelle foglie delle piante a seguito di infezione da parte di agenti patogeni potrebbero essere monitorati mediante termografia. Allo stesso modo, anche i cambiamenti della temperatura locale dovuti a meccanismi di difesa delle piante contro le malattie possono aiutare a monitorare le stesse.

Concludendo, le tecniche di imaging possono essere utilizzate per l'identificazione delle malattie e sono un miglioramento rispetto alle tecniche spettroscopiche, in quanto acquisiscono informazioni spettrali su un'area più ampia e le mostrano sotto forma di immagini.

2.3. Ipotesi di potenziale applicazione delle tecniche di imaging

Le tecniche di imaging possono essere utilizzate nel monitoraggio colturale, sia da remoto che prossimale, per valutare lo stato fitosanitario delle colture. Il sistema di monitoraggio da remoto (*remote sensing*) o telerilevamento consiste nell'acquisizione a distanza, tramite satelliti, aerei o droni, di immagini multispettrali del territorio. Il rilievo aereo, pur avendo costi di esercizio molto elevati, consente di monitorare ampie superfici con una buona tempestività, anche durante le fasi fenologiche nelle quali la coltura è più esposta alle patologie. La risoluzione spaziale che si può ottenere con questo tipo di rilievi dipende dalla quota del volo e, al massimo, può essere pari ad alcune decine di centimetri. Questo valore è sufficiente per analizzare le condizioni fisiologiche della coltura all'interno di ogni appezzamento, ma non consente di individuare i focolai delle patologie nelle loro fasi iniziali, quando le modificazioni spettrali del tessuto vegetale sono circoscritte ad areole di dimensioni centimetriche o millimetriche. Il telerilevamento da satellite, pur basandosi sui sensori più avanzati, consente risoluzioni spaziali ancora meno dettagliate, nell'ordine di qualche metro fino a diverse decine di metri. Sono, quindi, adatte a fornire informazioni per la valutazione delle patologie su ampia scala, ma non per una gestione di precisione delle patologie. Un'ulteriore limitazione è rappresentata dall'intervallo temporale che intercorre fra i successivi rilievi (risoluzione temporale), che può essere di un mese o più, a seconda delle condizioni meteorologiche, poiché la presenza di copertura nuvolosa impedisce l'acquisizione di immagini utili. Per ovviare a questi problemi, si può effettuare il *ground o proximal sensing* che consiste nel monitoraggio colturale attraverso rilievi a terra, che consentono l'acquisizione e l'elaborazione di dati in breve tempo o in "*real-time*". Inoltre, consente di effettuare l'analisi a livello di singola foglia, con un elevato livello di dettaglio spaziale, massima tempestività dei rilievi e massima adattabilità alle esigenze della gestione aziendale. Tuttavia, il monitoraggio prossimale risulta essere lento, costoso e non sempre rappresentativo dell'intera coltura. In entrambe le tipologie di monitoraggio, vengono utilizzati sensori ottici che si basano sulla riflettanza spettrale della

coltura nelle diverse lunghezze d'onda che si vanno ad indagare a seconda della tecnica di imaging scelta. Per valutare la presenza e lo sviluppo di una patologia, si possono analizzare le singole lunghezze d'onda oppure si possono utilizzare alcuni "indici spettrali", ottenuti dalla combinazione algebrica dei valori spettrali misurati a due o più specifiche lunghezze d'onda. Tali indici consentono di ridurre l'informazione multispettrale ad un singolo parametro correlato allo stato fisiologico e sanitario della coltura. Tra gli indici spettrali più utilizzati vi sono:

- l'indice di vegetazione a differenza normalizzata o NDVI (*Normalized Difference Vegetation Index*) definito dal rapporto tra la differenza e la somma della riflettanza (R) nel vicino infrarosso (NIR) e nel rosso (red):

$$NDVI = \frac{(R_{NIR} - R_{red})}{(R_{NIR} + R_{red})}$$

Varia tra -1 e +1 ed è legato alla radiazione fotosinteticamente attiva assorbita dalla canopy, cioè è un indice dello stato di salute e di rendimento biologico della pianta; l'indice aumenta nel tempo con la crescita della coltura fino a saturazione.

- l'indice fotochimico di riflettanza o PRI (*Photochemical Reflectance Index*) definito dal rapporto tra la differenza e la somma della riflettanza (R) a 531 e 570 nm (Peñuelas et al., 1995):

$$PRI = \frac{(R_{531} - R_{570})}{(R_{531} + R_{570})}$$

È fortemente influenzato dall'orientamento delle foglie, dalla struttura della canopy e dal contenuto di clorofilla. È stato utilizzato come indice di stress, applicato al rilevamento di sintomi di patologie e fornisce una buona stima dell'efficienza di utilizzo della luce da parte della foglia.

- l'indice di vegetazione "migliorato", EVI (*Enhanced Vegetation Index*), è simile all'NDVI, ma corregge alcuni effetti dovuti alle condizioni atmosferiche e al suolo e si calcola con la seguente formula:

$$EVI = 2,5 \cdot \frac{(R_{NIR} - R_{red})}{(R_{NIR} + c_1 \cdot R_{red} - c_2 \cdot R_{blue} + L)}$$

dove c_1 e c_2 sono fattori di correzione atmosferica per il rosso e per il blu, con valori rispettivamente pari a 6 e 7,5, mentre L è il fattore di correzione del suolo ed è pari a 1.

- l'indice trasformato di assorbimento e riflettanza della clorofilla o TCARI (*Transformed Chlorophyll Absorption and Reflectance Index*) che è molto sensibile alla clorofilla e si calcola con la seguente formula:

$$TCARI = 3 \cdot \left[(R_{700} - R_{600}) - 0,2 \cdot (R_{700} - R_{550}) \cdot \left(\frac{R_{700}}{R_{850} + R_{670}} \right) \right]$$

In letteratura ci sono molti esempi sull'impiego di tecniche di imaging e degli indici spettrali nell'identificazione delle patologie. Di seguito si riportano alcune applicazioni. Moshou et al. (2011) hanno sviluppato il prototipo di un sistema ottico multi-sensore, da montare su trattore e munito di GPS, per il rilevamento automatico di due malattie fungine (*Septoria tritici* e *Puccinia striiformis*) su frumento, integrando immagini iperspettrali e multispettrali. Tramite gli algoritmi di analisi delle immagini sono state individuate le regioni corrispondenti a lesioni clorotiche o necrotiche, in base al rapporto fra l'intensità dei pixel nel NIR e nel rosso. In questo modo è stato possibile localizzare e quantificare l'estensione delle lesioni, stimando la gravità della malattia e, utilizzando le coordinate geografiche dei punti di misura, riunire i valori ottenuti in mappe di infestazione degli appezzamenti. Invece, Devadas et al. (2009) hanno valutato dieci indici di vegetazione, basati su combinazioni matematiche di misurazioni di riflettanza a banda stretta nella gamma di lunghezze d'onda del visibile e del vicino infrarosso, nella loro capacità di discriminare le foglie di piante di frumento infettate dalla ruggine gialla. Gli indici a banda stretta, che rappresentano i cambiamenti nella concentrazione dei pigmenti non clorofillici, e il rapporto tra i pigmenti non clorofillici e clorofillici si sono dimostrati più affidabili nel discriminare le foglie infettate dalla ruggine dal tessuto vegetale sano. Tuttavia, la ruggine gialla ha prodotto la risposta più forte in tutti gli indici calcolati rispetto alle foglie sane.

Per quanto riguarda l'imaging a fluorescenza, Chaerle et al. (2007) hanno utilizzato la fluorescenza blu-verde per valutare l'efficacia di questa tecnica osservando lo sviluppo dell'infezione da virus del mosaico del tabacco (TMV). È

stato osservato un effetto temporale dell'infezione da TMV sulla fluorescenza, blu-verde e della clorofilla, delle piante infette. L'immagine di riflettanza a 550 e 800 nm sono state acquisite e considerate come immagini di riferimento. Gli autori hanno riportato un aumento della fluorescenza del blu, del verde e della clorofilla dopo circa 40-55 ore dall'inoculo del virus. L'imaging a fluorescenza ha dimostrato una differenza visibile tra le foglie infette e sane in un breve periodo di tempo (50 ore) rispetto alle immagini di riferimento (14 giorni per i sintomi visibili dell'infezione).

Molti ricercatori hanno dimostrato che l'infrarosso termico è uno strumento utile per studiare l'effetto pre-sintomatico di malattie e agenti patogeni sulle piante. Oerke et al. (2005 e 2006) hanno utilizzato l'infrarosso termico per rilevare *Pseudoperonospora cubensis* agente della peronospora del cetriolo. La massima differenza di temperatura (MTD) all'interno di una foglia o di una canopy si è rivelata adatta per distinguere il tessuto infetto da quello non infetto in condizioni controllate, mentre la velocità di traspirazione e la temperatura delle foglie erano simili per le foglie sane e infette in condizioni non controllate, ma per i tessuti infetti, le percentuali di traspirazione mostravano una variazione maggiore a seconda dei sintomi della malattia. Invece, Xu et al. (2006) hanno valutato la distribuzione diversa della temperatura tra le foglie infettate dal virus del mosaico del tabacco (ceppo TMV-U1) e quelle sane di alcune varietà di pomodoro, utilizzando l'imaging termico a infrarossi in combinazione con osservazioni microscopiche. Hanno riscontrato una diminuzione della temperatura fogliare di circa 0,5-1,3°C inferiore nelle foglie infette rispetto a quelle sane. Successivamente, Oerke et al. (2011) hanno scoperto che l'MTD è aumentato con lo sviluppo della scabbia delle mele ed è stato fortemente correlato alla dimensione dei siti di infezione. Tuttavia, nelle fasi successive della malattia, l'MTD è diminuito a causa della senescenza delle foglie, mentre la traspirazione delle foglie è aumentata in tutte le fasi di sviluppo della malattia; pertanto la massima differenza di temperatura può essere utilizzata non solo per la differenziazione tra foglie malate e sane, ma anche per quantificare la malattia.

Sulla base dello stato dell'arte del monitoraggio e della difesa delle colture, per la sperimentazione oggetto della presente tesi, sono state scelte alcune tecniche di imaging, quali: l'imaging a fluorescenza e multispettrale e la termografia a infrarossi. Tali metodologie sono state applicate in laboratorio con l'obiettivo di individuare stadi precoci del patogeno *Erisiphe cichoracearum*, fungo agente dell'oidio o mal bianco, su *Cucumis sativus* L. e di valutare la cinetica delle proprietà ottiche durante lo sviluppo della malattia.

CAPITOLO TERZO

MATERIALI E METODI

3.1. Scelta della malattia di riferimento e della coltura modello

Come malattia di riferimento è stato scelto l'oidio o mal bianco in quanto è una malattia fungina molto diffusa tra le colture, causando perdite sia produttive che economiche. Inoltre, il patogeno si propaga in modo semplice anche in condizioni ambientali controllate e causa infezioni localizzate che possono essere individuate con tecniche di imaging.

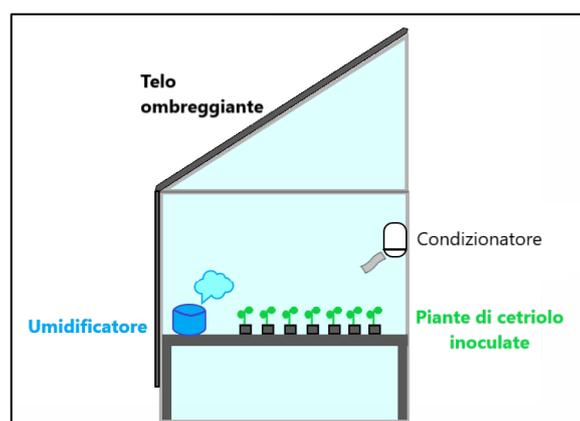
Per quanto riguarda la coltura modello è stato scelto il cetriolo (*Cucumis sativus* L.) in rappresentanza della famiglia delle *Cucurbitaceae*, che comprende piante molto sensibili all'oidio; inoltre, il cetriolo ha uno sviluppo rapido e presenta foglie con lamina ampia e generalmente parallela al terreno, caratteristiche che facilitano l'acquisizione con tecniche di imaging.

3.2. Condizioni di coltivazione della coltura modello e inoculazione del patogeno

La sperimentazione oggetto della tesi è stata svolta da metà aprile ai primi di agosto del 2019. Diversi lotti di piante di cetriolo sono stati allevati fino al completo sviluppo della prima foglia vera in una serra esente da patogeni della Facoltà di Scienze Agrarie e Alimentari di Milano. A partire da questo stadio le piante sono state suddivise in due lotti: "piante sane" e "piante malate" e sottoposte al protocollo di acquisizione ogni due o tre giorni (vedi par. 3.5.). Le piante malate sono state mantenute separate dalle sane all'interno di una serra più piccola (sempre presso la Facoltà di Scienze Agrarie e Alimentari di Milano), con un ambiente idoneo allo sviluppo del mal bianco (vedi Fig. 3.1). A tal fine, all'esterno della serra è stato posto un telo ombreggiante mentre,

all'interno della stessa, sono stati utilizzati un condizionatore, per mantenere la temperatura attorno ai 23-25°C, e un umidificatore, per mantenere un livello di umidità ottimale allo sviluppo del fungo (UR 50-90%). Inoltre, le piante sono state irrorate periodicamente con una soluzione di acqua e spore fungine per favorire l'infezione.

Figura 3.1 - Schema esemplificativo della serra dove sono state poste le piante malate di *C. sativus* L.



3.3. Strumentazione per l'acquisizione

3.3.1. Telecamera multispettrale

Nella sperimentazione è stata utilizzata una telecamera multispettrale QSI (*Quantum Scientific Imaging*), modello 640, per l'acquisizione di immagini multispettrali e di fluorescenza delle foglie di *Cucumis sativus* L. Tale strumento appartiene ad una famiglia di telecamere CCD (*Charge Coupled Device* - dispositivo ad accoppiamento di carica) con raffreddamento - QSI serie 500/600 - progettate per produrre immagini di alta qualità con *frame rate* elevati, linearità eccellente e rumore basso.

3.3.1.1. Componenti esterne

Le principali componenti esterne della telecamera sono (Fig. 3.2):

- (a) corpo della macchina;

- (b) adattatore a T, per attaccare la macchina ad un telescopio o ad altri obiettivi;
- (c) due ventole di raffreddamento;
- (d) alette di raffreddamento;
- (e) fori di montaggio dello scambiatore di calore, per raffreddamento ad aria e liquido regolato ad una temperatura superiore a 45-50° C;
- (f) indicatore LED dello stato della macchina;
- (g) USB 2.0 ad alta velocità;
- (h) ingresso dell'alimentazione.

Figura 3.2 - Le principali componenti esterne di una tipica telecamera multispettrale QSI serie 500/600



Fonte: QSI 500/600 Series User Guide

La telecamera è normalmente alimentata attraverso l'adattatore di alimentazione AC incluso, che si collega al connettore centrale nella parte inferiore della telecamera. Poco dopo l'accensione della telecamera, l'indicatore di stato della stessa, posto sul retro, si accende e diventa giallo, indicando che la telecamera si sta avviando. Dopodiché, la telecamera emette due suoni ad indicare che ha completato con successo i suoi passaggi di inizializzazione e l'indicatore di stato diventa di colore verde fisso se la macchina è collegata al computer tramite il cavo USB, altrimenti lampeggia. L'interfaccia USB della telecamera è compatibile con USB 2.0 e tutti i comandi

di controllo della telecamera e le immagini risultanti passano al computer attraverso il cavo USB. Invece, il raffreddamento del CCD è essenziale per il successo dell'*imaging*, se si effettua un lungo utilizzo della telecamera. Il raffreddamento del sensore riduce il rumore termico in un'immagine e rende pratiche le lunghe esposizioni. Le telecamere della serie QSI 500/600 utilizzano due diversi metodi per rimuovere il calore: il raffreddamento ad aria standard e il raffreddamento a liquido. Per quanto riguarda la prima modalità, la parte posteriore della telecamera funge da grande dissipatore di calore grazie alla presenza di alette di raffreddamento ricavate direttamente nel corpo; inoltre, sono presenti due ventole di raffreddamento, controllate automaticamente, che forzano l'aria attraverso queste alette. In questo modo, il movimento dell'aria attraverso le alette aumenta notevolmente la quantità di calore rimosso dalla telecamera. È importante tenere presente che la temperatura minima a cui il CCD può essere raffreddato è limitata dalla temperatura dell'aria dell'ambiente in cui si utilizza la telecamera e dalla velocità delle ventole di raffreddamento. Se fa particolarmente freddo, potrebbe non essere necessario accendere i ventilatori, mentre in caso di clima caldo e umido, potrebbe non essere possibile raffreddare il CCD alla temperatura desiderata. Per raggiungere tale scopo, si può utilizzare il raffreddamento aggiuntivo a liquido. Lo scambiatore di calore a liquido o LHX utilizza acqua a ricircolo per una più efficiente rimozione del calore dalla telecamera. A parità di condizioni, l'LHX può fornire un ulteriore raffreddamento da 7°C a 10°C del CCD; si collega alla parte posteriore del corpo della camera.

3.3.1.2. Componenti interne

Il CCD è il sensore tipico delle macchine fotografiche ed è alla base dell'acquisizione di immagini multispettrali. Funziona convertendo i fotoni in elettroni, che vengono memorizzati nei singoli pixel, detti "fotosito". Successivamente, gli elettroni vengono convertiti in un numero, attraverso un convertitore analogico-digitale, indicando quanto fosse scuro (minor quantitativo di fotoni) o chiaro (maggior numero di fotoni) ogni singolo pixel. Tali valori di luminosità per ciascun pixel vengono, quindi, memorizzati in un

file di immagine. Tuttavia, il sensore legge in “bianco e nero” e per intrappolare l’informazione del colore si utilizzano dei filtri ottici, ovvero delle microlenti poste al di sopra dei fotositi, detti “passabanda” poiché in grado di selezionare le lunghezze d’onda del colore. Per alcune telecamere della serie QSI 500/600 è disponibile una ruota di filtri interna a cinque o otto posizioni. Tale ruota è progettata per contenere cinque o otto filtri standard da 1,25” e, su alcuni modelli, filtri da 31 mm non montati opzionali. Per l’acquisizione delle immagini multispettrali e di fluorescenza, nella sperimentazione, è stata utilizzata una telecamera multispettrale con una ruota a otto posizioni (Fig. 3.4) occupate, rispettivamente, dai seguenti filtri:

- 1) 685 nm
- 2) 530 nm
- 3) 430 nm
- 4) 740 nm
- 5) L (visibile: 400-700 nm)
- 6) R (rosso)
- 7) G (verde)
- 8) B (blu)

In particolare, sono stati utilizzati i filtri nelle posizioni 1, 4, 6, 7 e 8. La ruota del filtro è progettata per essere rimossa e sostituita facilmente, consentendo all’utente di avere ruote del filtro aggiuntive con diverse combinazioni di filtri e di scambiarle rapidamente anche durante le operazioni sul campo.

Figura 3.4 - Ruota dei filtri “passabanda” a otto posizioni interna alla telecamera QSI utilizzata nella sperimentazione

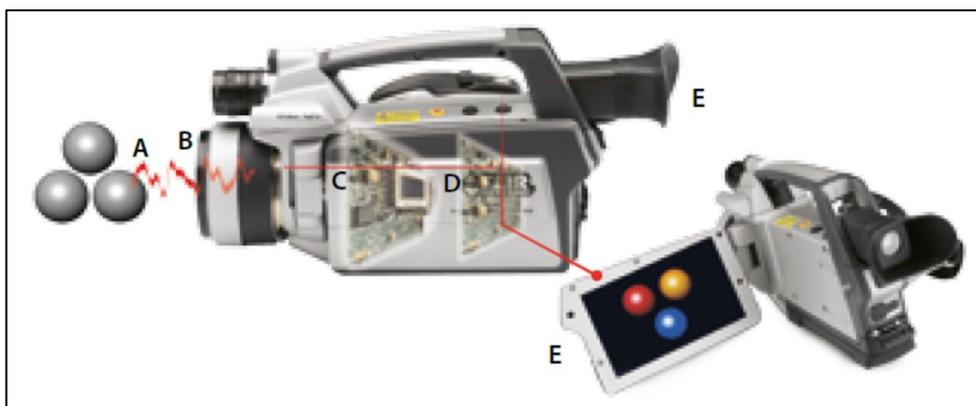


Fonte: <https://qsimaging.com/products/600-series>

3.3.2. Termocamera IR ad alta risoluzione

Per l'acquisizione di immagini termiche è stata utilizzata una termocamera, cioè un convertitore in grado di rendere visibile all'occhio umano il calore emesso spontaneamente dagli oggetti sotto forma di irraggiamento. La termocamera registra l'intensità della radiazione nella parte infrarossa dello spettro elettromagnetico e la converte in un'immagine visibile. L'energia all'infrarosso (A) emessa da un oggetto viene fatta convergere dai componenti ottici (B) verso un detector all'infrarosso (C), che invia le informazioni al sensore elettronico (D) per l'elaborazione dell'immagine. L'elettronica traduce i dati provenienti dal detector in un'immagine (E) visibile direttamente nel mirino oppure sullo schermo di un monitor standard o su un LCD (vedi Fig. 3.5). La termografia, quindi, è l'arte di trasformare un'immagine ad infrarossi in un'immagine radiometrica, su cui è possibile leggere i valori della temperatura, contenuti all'interno di ogni pixel.

Figura 3.5 - Schema esemplificativo del funzionamento di una termocamera a infrarossi



Fonte: <https://www.flir.it>

Nel presente lavoro di tesi è stata utilizzata una termocamera IR della FLIR®, modello T650sc (FLIR® Systems, Wilsonville, OR), che offre immagini termiche e visive, con eccellente risoluzione a distanza e misurazioni di temperatura accurate e affidabili (vedi Fig. 3.6).

Inoltre, è caratterizzata da:

- una fotocamera digitale integrata, che può essere utilizzata per acquisire un'immagine reale del soggetto, per comprendere più facilmente quali componenti sono visibili nell'immagine termica;
- un puntatore laser, che permette di vedere con precisione cosa inquadra l'obiettivo della termocamera;
- un GPS, che consente di aggiungere alle immagini termiche dei *tag* relativi alla posizione geografica e informazioni relative al luogo in cui è stata acquisita ogni immagine;
- obiettivi intercambiabili, in funzione delle diverse esigenze operative;
- possibilità di scrivere annotazioni di testo, tramite tastiera integrata sul monitor touch screen, e anche di registrare commenti vocali durante il lavoro;
- connettività wireless, per comunicare con la termocamera, per esempio, inviando immagini direttamente ad uno smartphone o ad un tablet o ad un computer.

L'unità infrarossa è inclinabile e assicura grande versatilità per condurre gli esperimenti più rapidamente e in posizione confortevole. La termocamera T650sc è dotata di un sensore microbolometrico all'ossido di vanadio (VOx) non raffreddato, che produce immagini termiche a 640x480 pixel, nitide, dettagliate, facili da interpretare, di elevata accuratezza ($\pm 1^\circ\text{C}$) e affidabilità e che vengono visualizzate sul monitor touch screen LCD. Inoltre, può trasmettere video in streaming ad un computer via USB o a dispositivi mobili tramite Wi-Fi. Il modello T650sc integra anche funzioni quali:

- Multi Spectral Dynamic Imaging (MSX®), che aggiunge i dettagli nel visibile all'immagine termica;
- il miglioramento dell'immagine UltraMax™, che consente di aumentare la risoluzione delle immagini e ottenere una maggiore nitidezza e accuratezza di misurazione;
- la rotazione automatica dell'immagine;
- il disegno sull'immagine;
- l'autofocus.

Il software ResearchIR consente la visualizzazione, la registrazione e l'elaborazione avanzata dei dati termici (vedi sotto-par. 3.4.2).

Figura 3.6 - Termocamera FLIR® T650sc



Fonte: <https://www.flir.it>

3.3.3. Sorgente luminosa e DAQ device

Come radiazione eccitante è stata utilizzata una sorgente luminosa composta da quattro LED a luce UV-blu e quattro LED a luce rossa alternati per l'acquisizione delle immagini di fluorescenza e due lampade alogene a luce bianca per le immagini multispettrali (vedi Fig. 3.7). Per controllare l'accensione e lo spegnimento delle luci, è stato utilizzato un dispositivo DAQ (*Data Acquisition*) della National InstrumentTM (Fig. 3.8), a sua volta comandato attraverso apposite funzioni del software MATLAB[®] e posizionato tra l'alimentazione e la sorgente luminosa. Tale strumento è un sistema I/O analogico e digitale, grazie alla presenza sui lati dei rispettivi canali, analogici e digitali, a cui è possibile collegare facilmente sensori tramite collegamenti con terminale a vite. Inoltre, il dispositivo si collega al computer tramite un'apposita porta, attraverso cui viene alimentato e che costituisce l'interfaccia di comunicazione tra il device e il computer per il trasferimento delle istruzioni e dei dati misurati.

Figura 3.7 - La sorgente luminosa all'interno della camera oscura

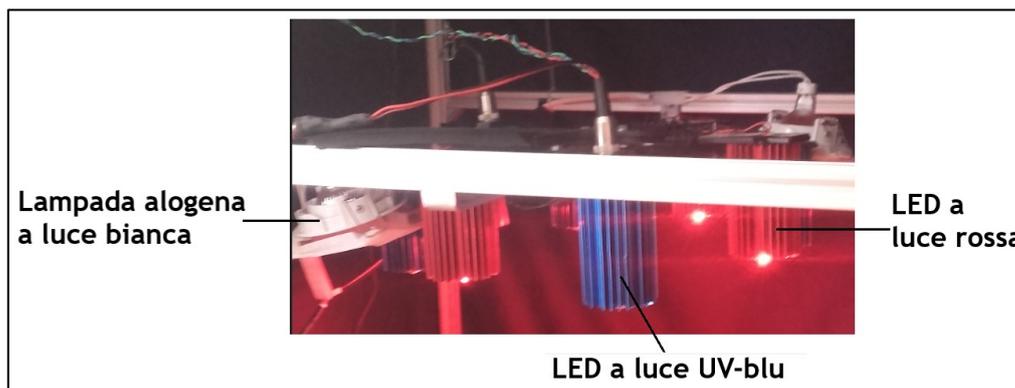


Figura 3.8 - Dispositivo DAQ della National Instrument™

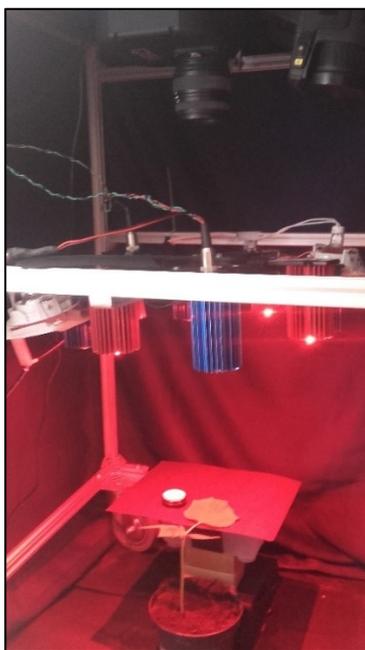


Fonte: <http://www.ni.com/it-it.html>

3.3.4. Il setup di acquisizione

Il setup di acquisizione approntato era costituito da una camera oscura composta da un telaio mobile in ferro, quadrato (58x58x93 cm), sulla cui sommità sono state montate due barre mobili portanti la telecamera multispettrale e la termocamera IR (obiettivi a circa 74 cm da terra) e, al di sotto dei loro obiettivi (a 50 cm da terra), è stata fissata la sorgente luminosa. L'intera struttura è stata coperta con un telo oscurante e posta su sfondo nero (vedi Fig. 3.9). La camera oscura è stata utilizzata con lo scopo di ridurre al minimo l'influenza della luce dell'ambiente sulle immagini acquisite.

Figura 3.9 - La camera oscura utilizzata nella sperimentazione durante l'acquisizione delle immagini di un campione con la telecamera multispettrale



3.4. Software di analisi

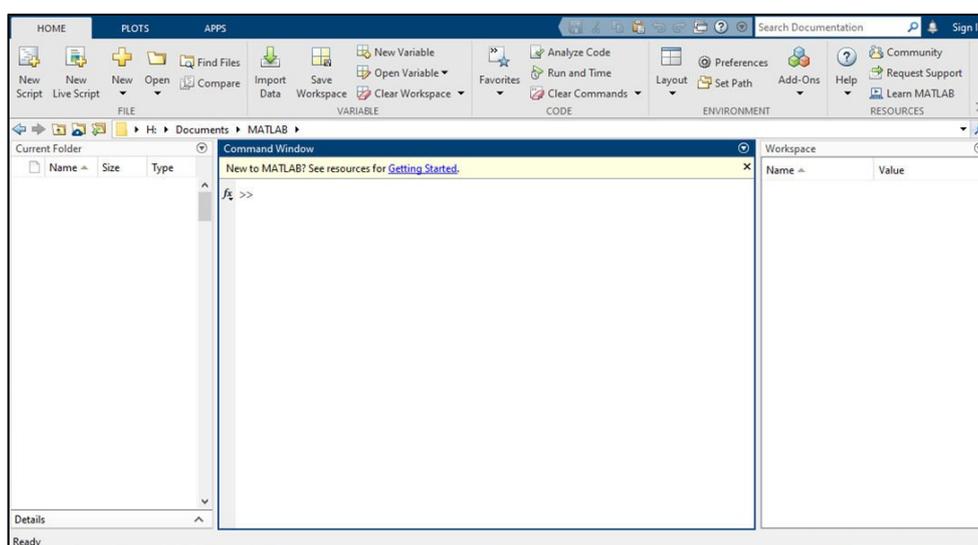
3.4.1. MATLAB®

MATLAB® (*MATrix LABoratory*) è un ambiente per il calcolo numerico e l'analisi statistica, creato dalla *MathWorks*. Viene utilizzato per l'elaborazione di segnali e immagini, la visione artificiale, le comunicazioni, la progettazione dei controlli, la robotica e molto altro. Consente di manipolare matrici, visualizzare funzioni e dati, implementare algoritmi grazie ad una vasta libreria di *toolbox* predefiniti, creare interfacce utente e interfacciarsi con altri programmi. È possibile eseguire le analisi su dataset molto grandi e il linguaggio di MATLAB® può essere integrato con altre lingue, consentendo di distribuire algoritmi e applicazioni all'interno di sistemi Web, aziendali e di produzione. All'avvio di MATLAB®, il layout predefinito del desktop (Fig. 3.10) include i seguenti pannelli:

- *Current folder*: consente di accedere ai file;

- *Command Window*: o “*prompt dei comandi*”, è una finestra nella quale è possibile digitare i comandi nella riga di comando indicata dal *prompt (>>)* e visualizzare i risultati in tempo reale;
- *Workspace*: è lo spazio che elenca tutte le variabili create o importate da file esterni.

Figura 3.10 - Layout predefinito del desktop all'avvio di MATLAB®



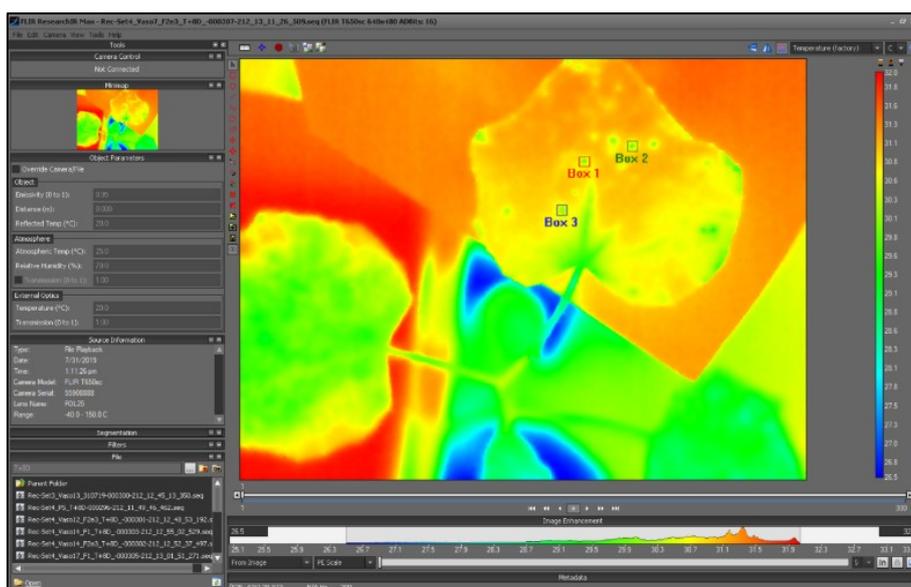
Fonte: https://it.mathworks.com/help/pdf_doc/matlab/getstart.pdf

3.4.2. ResearchIR

ResearchIR è il potente pacchetto software facile da usare per le termocamere FLIR® per ricerca e sviluppo ed applicazioni scientifiche. Rende disponibili le funzioni per il controllo della termocamera, la registrazione di dati ad alta velocità, l'analisi delle immagini e la condivisione di dati. Il software si collega direttamente alla termocamera via USB, Firewire, Gigabit Ethernet e Camera Link per acquisire immagini o filmati termici. Inoltre, supporta molte opzioni di acquisizione, inclusa la registrazione in modalità sequenza ad alta velocità in RAM o la registrazione di dati su hard-disk a velocità inferiore. Gli utenti possono facilmente personalizzare le opzioni di registrazione tra cui: l'ora di inizio e di fine, o il numero di *frame* da acquisire. ResearchIR analizza l'immagine in tempo reale, con un set avanzato di strumenti di misura che

includono punti, linee e aree e offre una serie di funzionalità per grafici e tracciati che includono profili di temperatura, istogrammi e tracciati temporali per tutti gli strumenti di misura. Le immagini e i dati possono essere esportati come file bitmap o CSV per le attività di reportistica e l'analisi in altri software. Inoltre, ogni frame di dati può essere facilmente esportato in software di analisi di terze parti in formato CSV, TIFF 32-bit, MATLAB®, ecc. Il layout del software è illustrato nella figura 3.11.

Figura 3.11 - Layout del desktop durante l'acquisizione di un filmato termico di una foglia con sintomi visibili di oidio con il software ResearchIR



3.5. Protocollo sperimentale di acquisizione

Il protocollo di acquisizione è stato eseguito ogni due o tre giorni, per avere una sequenza di immagini che seguissero lo sviluppo della malattia. A partire dal completo sviluppo della prima foglia vera, i lotti di piante sane e malate selezionati sono stati analizzati utilizzando il setup di misura approntato. I vasi sono stati numerati e, uno alla volta, sono stati posizionati all'interno della camera oscura, facendo attenzione che le foglie fossero il più possibile parallele al pavimento e agli obiettivi delle telecamere. Per facilitare tale operazione sono stati utilizzati dei sostegni rivestiti con del cartoncino nero.

Successivamente, tramite uno script di MATLAB® (riportato nell'Appendice I), è stata avviata l'acquisizione delle immagini tramite la telecamera multispettrale, nel seguente ordine:

- due *background*: immagini di sfondo in assenza di illuminazione artificiale all'interno della camera oscura, utilizzando i filtri in posizione 4 e 1;
- due immagini del segnale di fluorescenza, con lunghezza d'onda pari a 685 nm e a 740 nm, in seguito all'accensione dei LED a luce UV-blu;
- due immagini del segnale di fluorescenza, nelle stesse bande di cui sopra, in seguito all'accensione dei LED a luce rossa;
- immagini multispettrali nelle bande del vicino infrarosso (NIR - *Near InfraRed*, 740 nm), del rosso (670 nm), del verde (550 nm) e del blu (450 nm), in seguito all'accensione delle lampade alogene e utilizzando i rispettivi filtri in posizione 4, 6, 7, 8.

Ad ogni acquisizione segue una breve pausa per consentire alla telecamera di cambiare il filtro. Le immagini di fluorescenza utilizzate per l'analisi sono state ottenute sottraendo dall'immagine del segnale di fluorescenza il *background*, nelle rispettive lunghezze d'onda:

$fluo_740 = Uv_740 - bgd_740;$

$fluo_685 = Uv_685 - bgd_685;$

$fluo_R_740 = red_740 - bgd_740;$

$fluo_R_685 = red_685 - bgd_685.$

Ogni immagine è stata acquisita in presenza di un *reference* di riflettanza della *Labsphere*® (Fig. 3.12) costituito da un materiale con riflettanza costante (circa 50%) alle diverse lunghezze d'onda e utilizzato per controllare la saturazione nell'immagine e nella fase di elaborazione delle immagini, per la normalizzazione delle immagini multispettrali. Una volta completate tutte le acquisizioni nelle diverse lunghezze d'onda, le piante sono state riposizionate, una alla volta, all'interno della camera oscura per essere sottoposte all'acquisizione delle immagini termiche, utilizzando il software ResearchIR. Una volta impostati, sul software, la durata dell'acquisizione pari a 1 minuto e la frequenza dei *frame* da acquisire pari a 5 Hz, è stata avviata l'acquisizione

di un filmato termico, per registrare la variazione di temperatura della foglia esposta alla luce dei LED a luce rossa. Tale sorgente luminosa è stata accesa, dopo qualche secondo dall'inizio della registrazione, tramite un apposito script di MATLAB® (vedi Appendice II), illuminando il campione per un tempo pari a 30 secondi. Al termine della procedura di acquisizione, le piante sono state riportate nelle relative serre.

Figura 3.12 - Reference di riflettanza della Labsphere® utilizzato nella sperimentazione



Fonte: <https://www.google.it/imghp?hl=it&tab=wi&ogbl>

La figura 3.13 mostra tre campioni all'interno della camera oscura durante le diverse fasi dell'acquisizione, mentre nelle figure seguenti (3.14-3.17) sono illustrate le immagini di un'altra pianta ottenute dalla telecamera multispettrale. Infine, la figura 3.18 mostra lo schermo della termocamera durante l'acquisizione del filmato termico di un campione; è possibile notare che le immagini termiche sono visualizzate utilizzando una falsa scala di colori.

Figura 3.13 - Tre piante di cetriolo all'interno della camera oscura nelle diverse fasi dell'acquisizione, rispettivamente con i LED a luce UV-blu, i LED a luce rossa e le lampade alogene, accesi

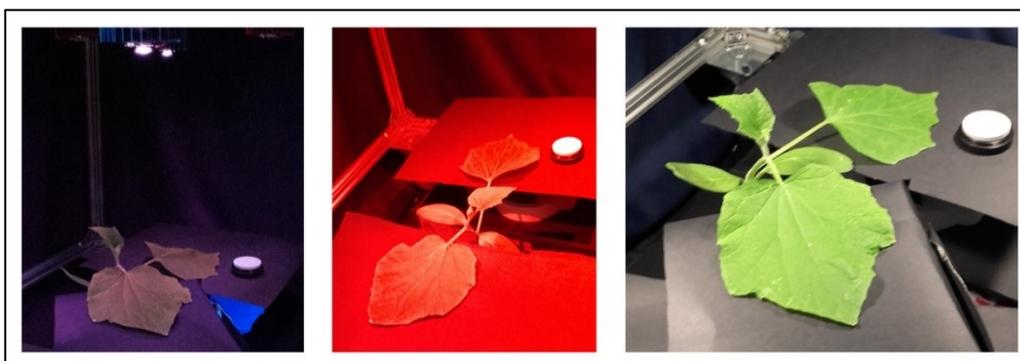


Figura 3.14 - Immagini dei background, rispettivamente a 685 e 740 nm

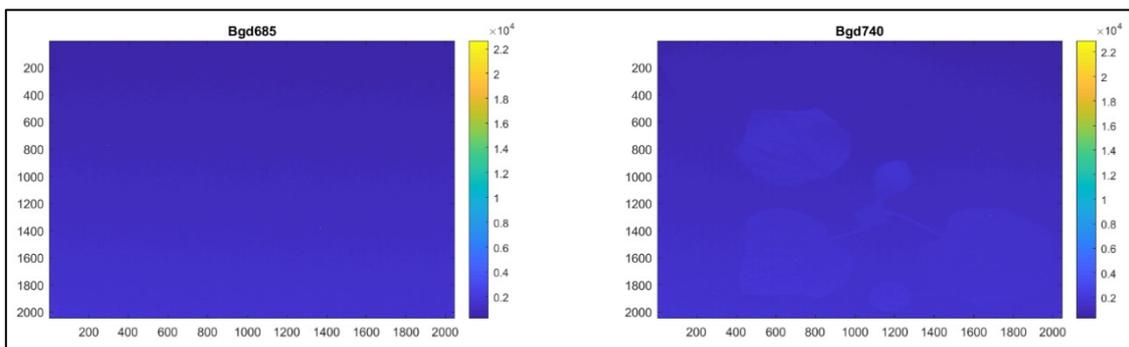


Figura 3.15 - Immagini dei segnali di fluorescenza nel blu (sopra) e nel rosso (sotto) a 685 e 740 nm

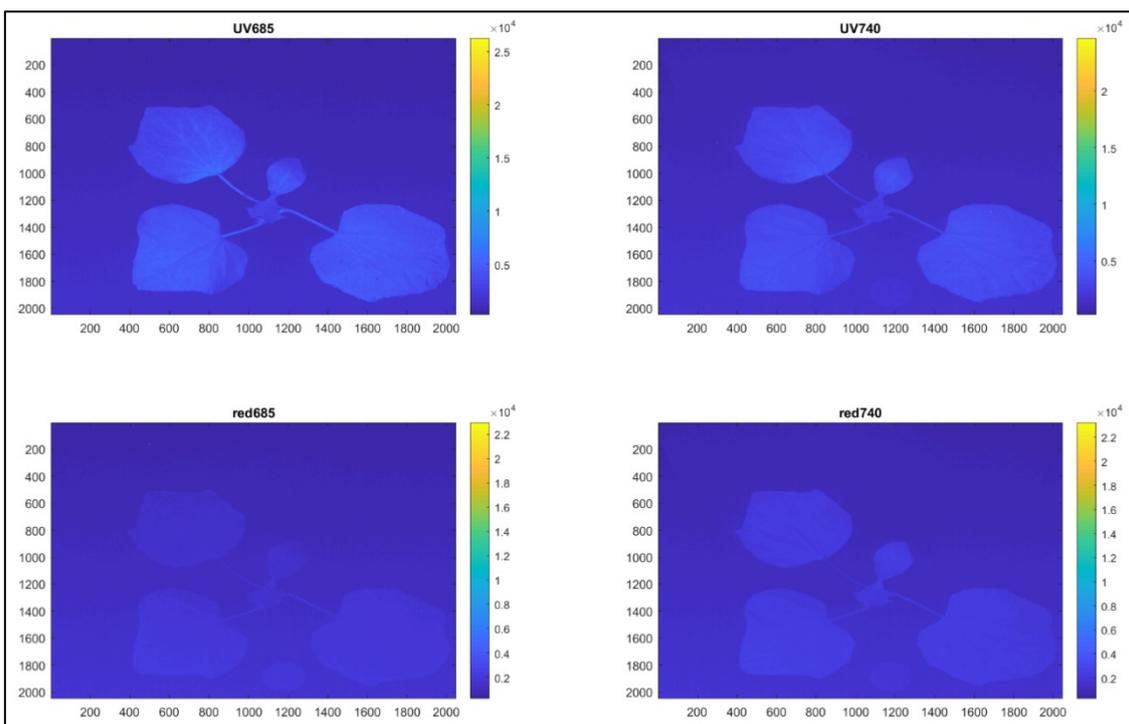


Figura 3.16 - Immagini multispettrali nel vicino infrarosso (NIR), nel rosso (Red), nel verde (Green) e nel blu (Blue)

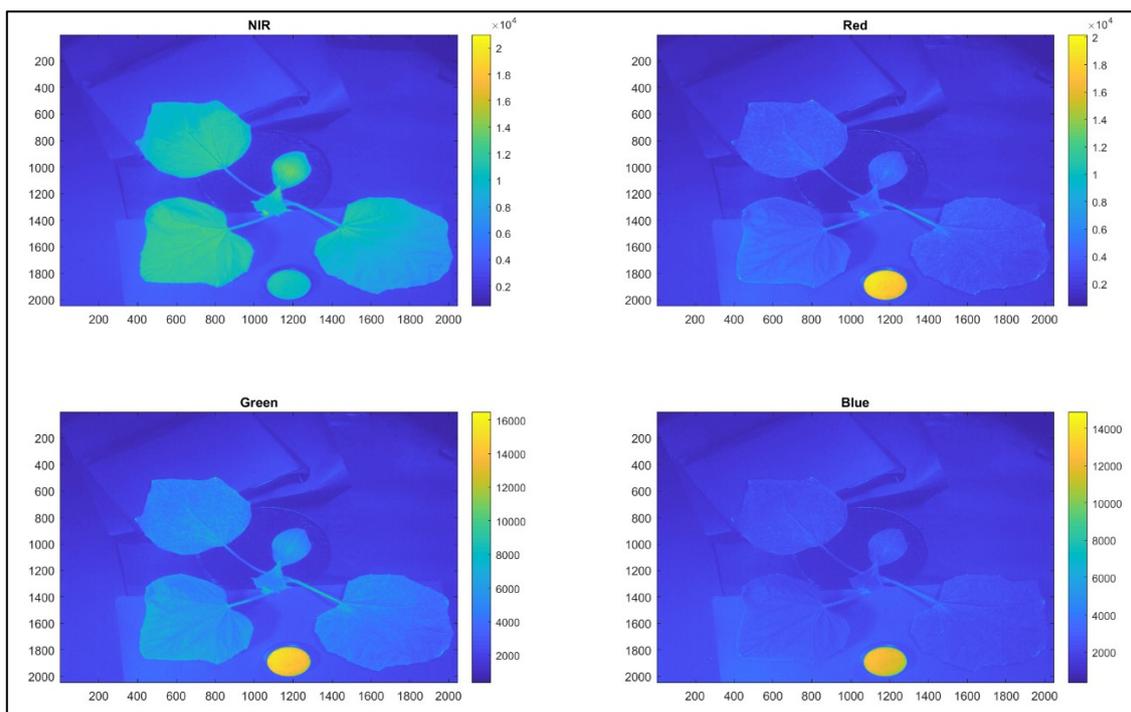


Figura 3.17 - Immagini di fluorescenza nel blu (sopra) e nel rosso (sotto) a 685 e 740 nm

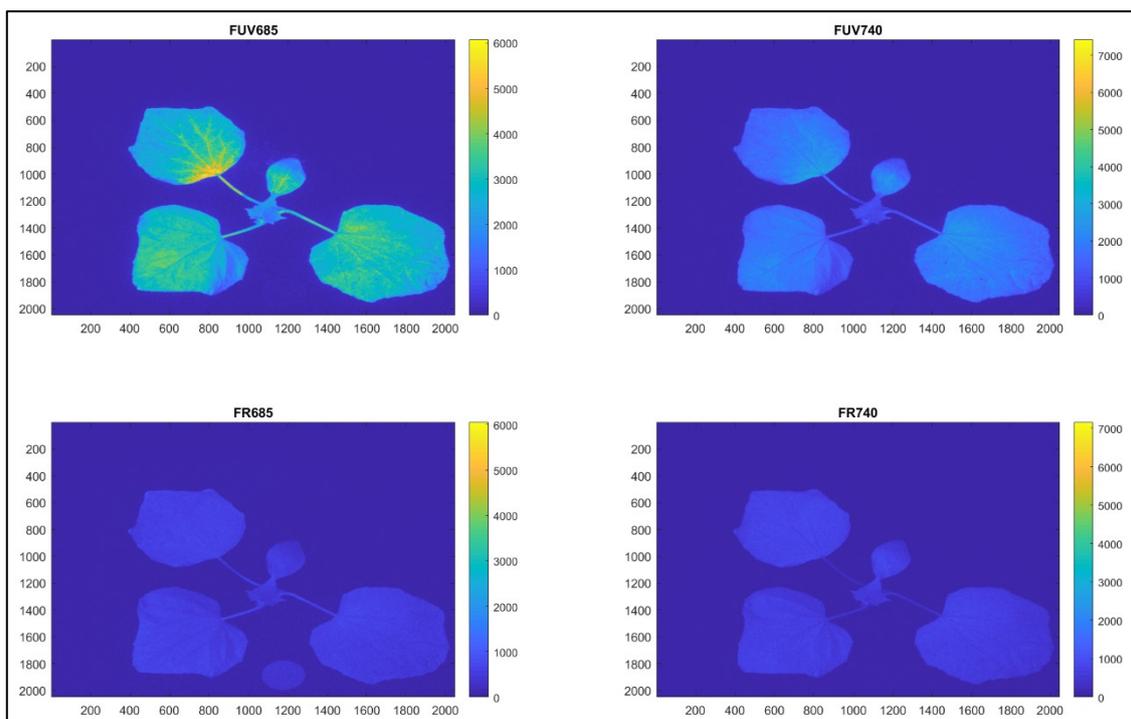
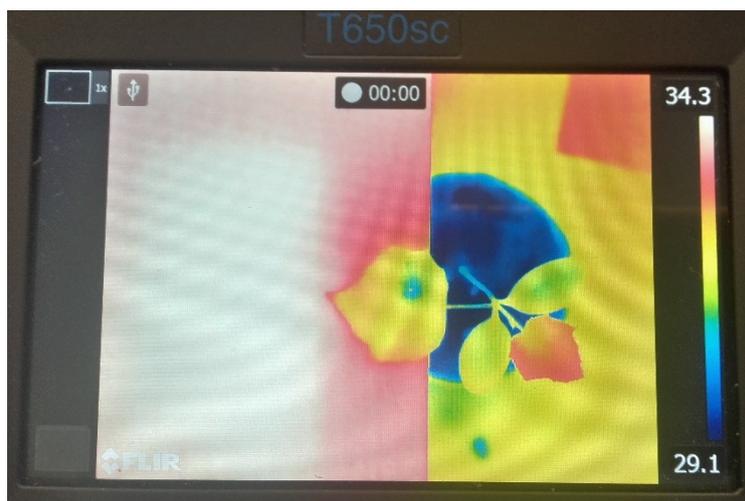


Figura 3.18 - Schermo della termocamera FLIR® T650sc durante l'acquisizione del filmato termico di un campione

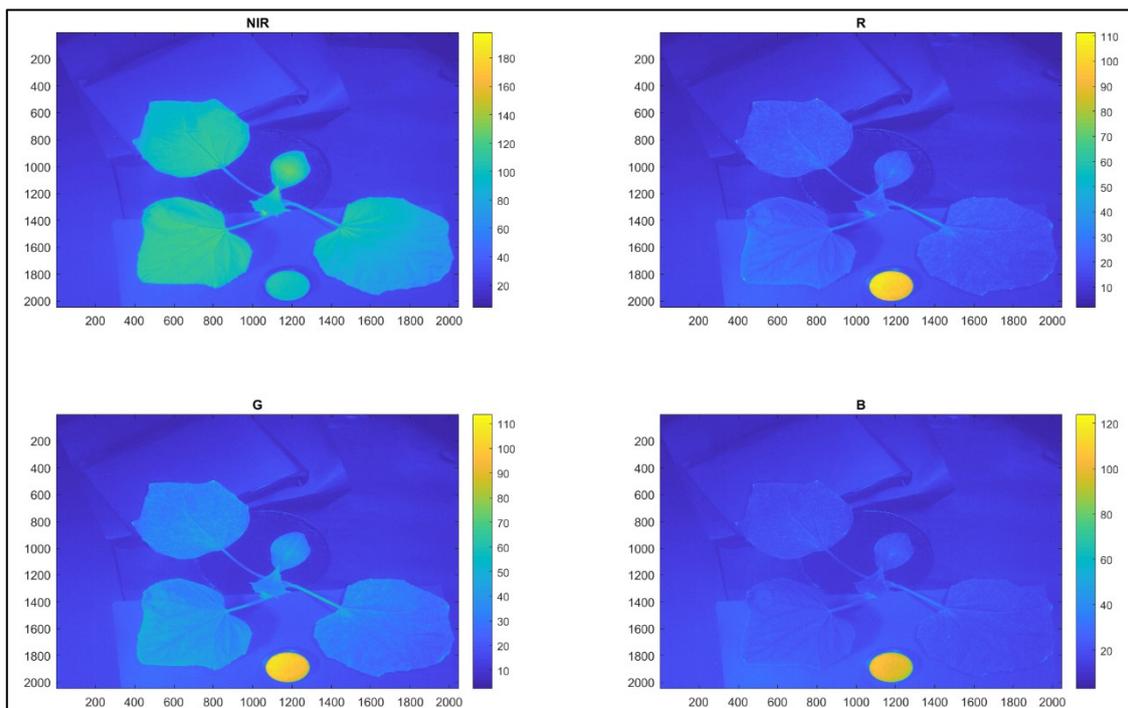


3.6. Elaborazione delle immagini multispettrali e di fluorescenza

3.6.1. Normalizzazione delle immagini multispettrali e calcolo degli indici spettrali

Le immagini acquisite con la telecamera multispettrale sono costituite da una matrice di dati: ciascun pixel contiene un valore di lunghezza d'onda. Inoltre, rappresentano un campione a diverse lunghezze d'onda che possono essere usate come canali tal quali oppure per calcolare indici spettrali (per esempio: R/NIR, G/NIR, NDVI, ecc.) e studiare l'evoluzione, ai diversi tempi di acquisizione, dei valori nelle singole ROI (*Regions Of Interest*), come ad esempio le zone infette della foglia. Prima di tutto, occorre normalizzare le immagini multispettrali (l'insieme di: NIR, R, G, B), cioè fare in modo che, in ciascuna, i pixel appartenenti al *reference* di riflettanza abbiano lo stesso valore di intensità, posto pari a 100. In questo modo, le immagini hanno valori normalizzati e rappresentano una "mappa di riflettanza" della pianta alle quattro lunghezze d'onda considerate (Fig. 3.19).

Figura 3.19 - Immagini multispettrali (NIR, R, G, B) normalizzate



Successivamente, utilizzando le immagini multispettrali normalizzate e le immagini di fluorescenza, sono stati calcolati i seguenti indici spettrali:

- B/NIR : è il rapporto tra il canale del blu (hal_B) e del vicino infrarosso (hal_740);
- R/NIR : è il rapporto tra il canale del rosso (hal_R) e del vicino infrarosso (hal_740);
- G/NIR : è il rapporto tra il canale del verde (hal_G) e del vicino infrarosso (hal_740);
- BR/NIR : è un indice composto dato dal prodotto tra gli indici R/NIR e B/NIR ;
- GR/NIR : è un indice composto dato dal prodotto tra gli indici G/NIR e R/NIR ;
- GB/NIR : è un indice composto dato dal prodotto tra gli indici G/NIR e B/NIR ;
- $NDVI$: è l'indice di vegetazione a differenza normalizzata (vedi par. 2.3);
- PRI : è l'indice fotochimico di riflettanza (vedi par. 2.3);
- EVI : è l'indice di vegetazione "migliorato" (vedi par. 2.3);

- FUV685mUV740: è il prodotto tra le due fluorescenze eccitate nel blu (FUV685 e FUV740);
- FR685mR740: è il prodotto tra le due fluorescenze nel rosso (FR685 e FR740);
- FUV685mR740: è il prodotto tra la fluorescenza nel blu a 685 nm (FUV685) e la fluorescenza nel rosso a 740 nm (FR740);
- FR685mUV740: è il prodotto tra la fluorescenza nel rosso a 685 nm (FR685) e la fluorescenza nel blu a 740 nm (FUV740);
- FUV685dUV740: è il rapporto tra le due fluorescenze eccitate nel blu (FUV685 e FUV740);
- FR685dR740: è il rapporto tra le due fluorescenze nel rosso (FR685 e FR740);
- FUV685dR740: è il rapporto tra la fluorescenza nel blu a 685 nm (FUV685) e la fluorescenza nel rosso a 740 nm (FR740);
- FR685dUV740: è il rapporto tra la fluorescenza nel rosso a 685 nm (FR685) e la fluorescenza nel blu a 740 nm (FUV740);

Ciascuno di questi indici spettrali va a costituire una nuova immagine virtuale, riportate nelle figure 3.20-3.24. I singoli canali multispettrali (NIR, R, G, B) e delle fluorescenze unitamente agli indici multispettrali vanno a costituire i venticinque indici che caratterizzeranno le regioni d'interesse (ROI) che saranno estratte nella fase successiva. Sia per la normalizzazione delle immagini che per il calcolo degli indici spettrali è stato utilizzato lo script di MATLAB® riportato nell'Appendice III.

Figura 3.20 - Immagine virtuale degli indici spettrali R/NIR, B/NIR, G/NIR e BR/NIR

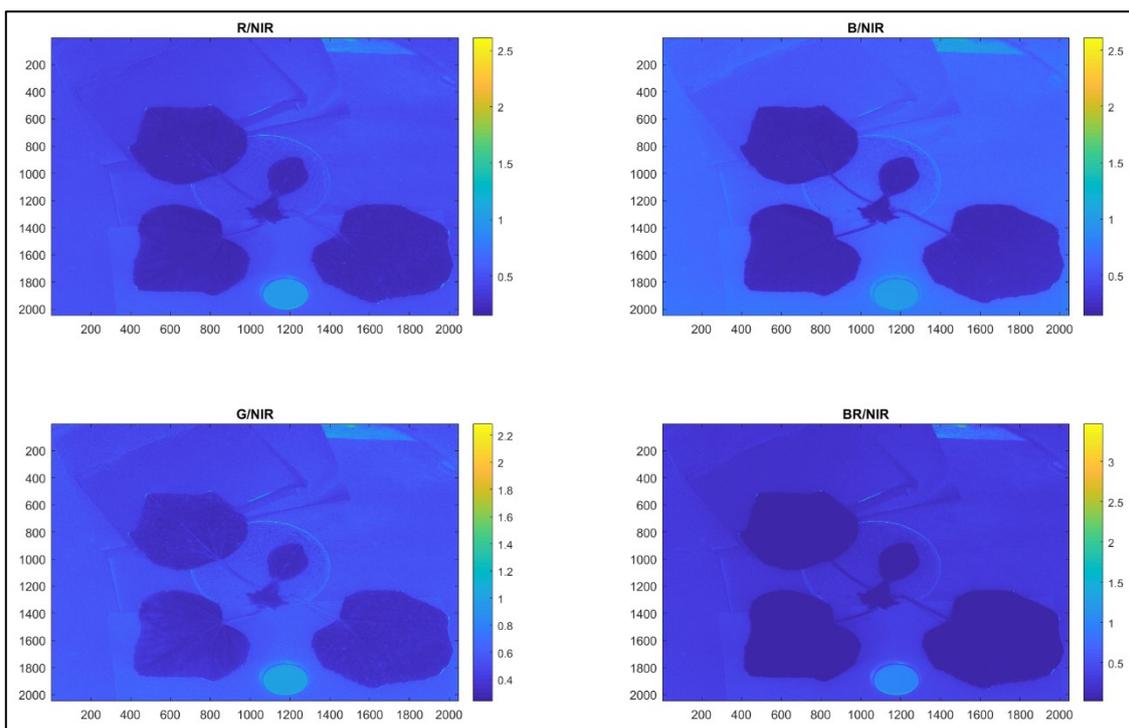


Figura 3.21 - Immagine virtuale degli indici spettrali GR/NIR, GB/NIR, NDVI e PRI

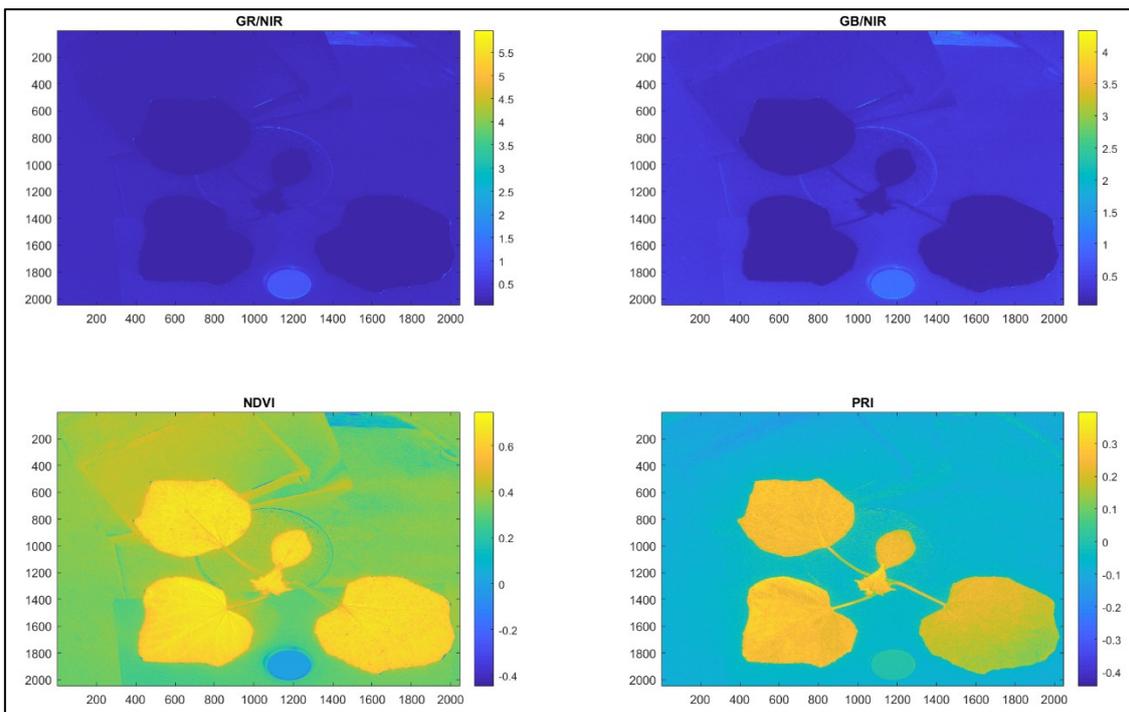


Figura 3.22 - Immagine virtuale dell'indice spettrale EVI

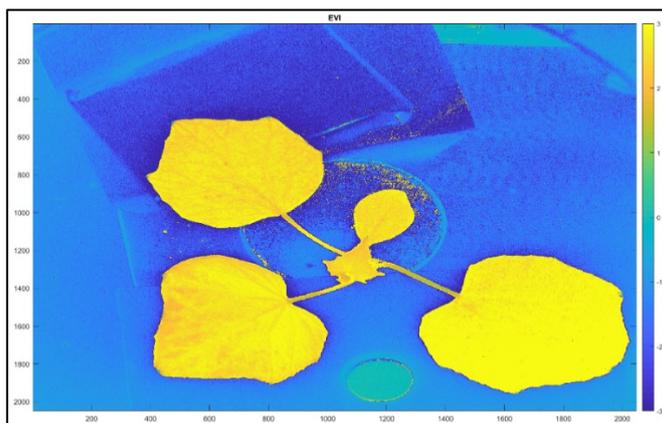


Figura 3.23 - Immagine virtuale degli indici spettrali FUV685mUV740, FR685mR740, FUV685mR740 e FR685mUV740

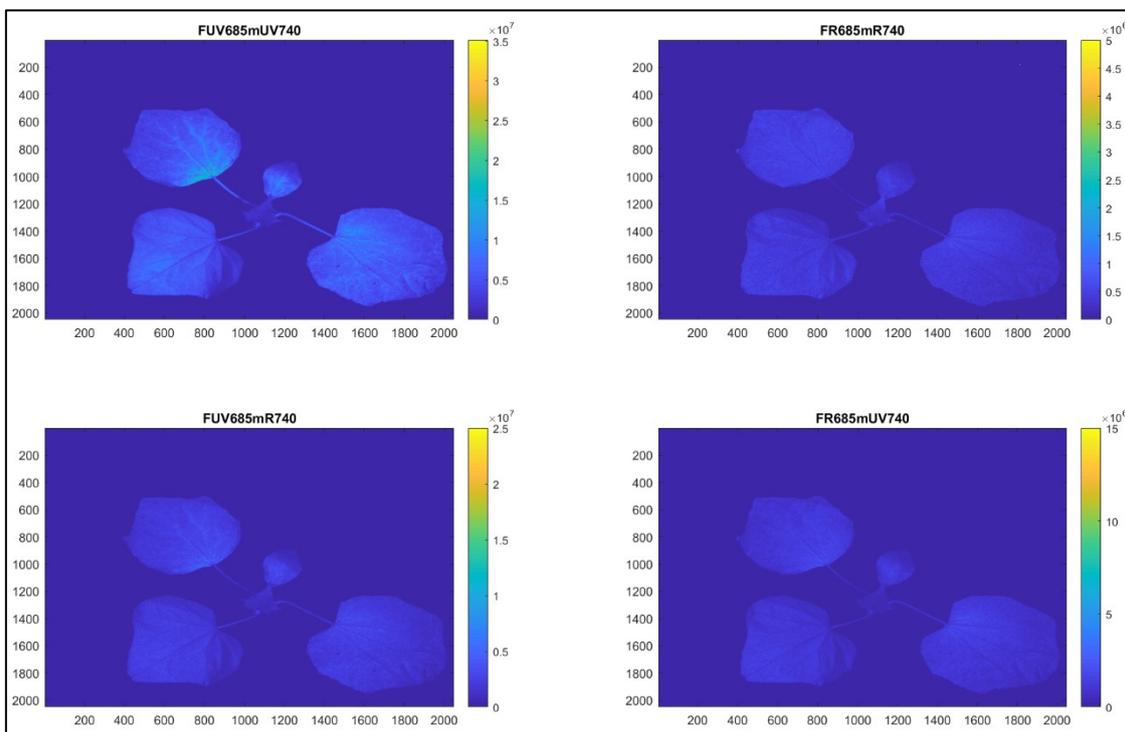
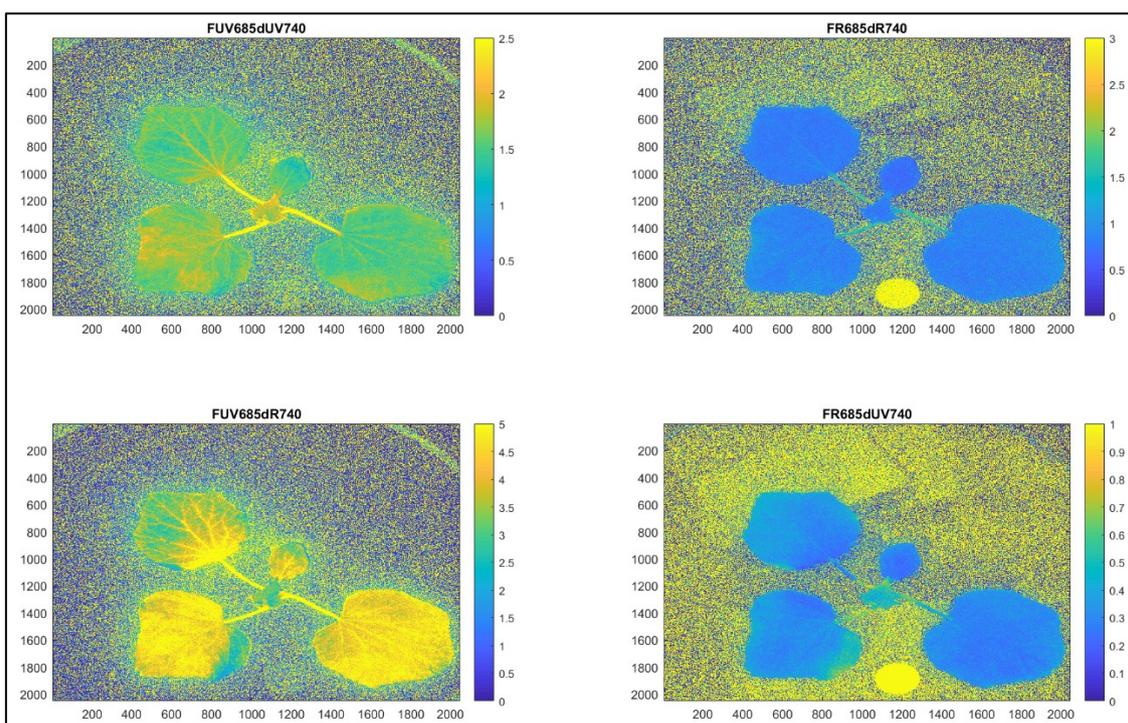


Figura 3.24 - Immagine virtuale degli indici spettrali FUV685dUV740, FR685dR740, FUV685dR740 e FR685dUV740



3.6.2. Estrazione delle ROI e classificazione del tessuto fogliare

Per ogni foglia di ogni campione, dalle immagini normalizzate e da quelle virtuali degli indici spettrali, sono state estratte le “regioni d’interesse” o ROI (*Regions Of Interest*), sempre con l’ausilio di uno script di MATLAB® (Appendice IV). Tali aree sono porzioni di tessuto fogliare a cui è stata attribuita una classe tissutale, secondo il seguente ordine:

1. Sana;
2. Punti clorotici (piccole aree decolorate di 1-2 mm di diametro);
3. Primi sintomi (piccole aree bianche di 1-2 mm di diametro, rare e difficili da vedere a occhio nudo);
4. Stadio intermedio (aree di 2-8 mm di diametro, con micelio fungino visibile);
5. Stadio avanzato (colonie estese di 8-20 mm di diametro);
6. Senescenza/Necrosi;
7. Rosure di insetti;

8. Nervature;
9. Picciolo;
10. Assenza di tessuto.

Inoltre, ad ogni ROI è stata associata l'informazione relativa alla foglia di appartenenza, indicando con "F1" la prima foglia emessa, "F2" la seconda e così via. Le ROI sono state estratte partendo dall'ultimo tempo di acquisizione e regredendo nel tempo, per analizzare, in un secondo momento, l'evoluzione della malattia e/o di eventuali lesioni o altre parti di tessuto, fino a giungere al tessuto sano. Infatti, ogni ROI è caratterizzata da quattro coordinate e da cinque specifici valori, per ciascuno dei venticinque indici ottenuti, corrispondenti a: media, media al netto di 0,2 volte la deviazione standard, media addizionata di 0,2 volte la deviazione standard, media al netto della deviazione standard e media sommata alla deviazione standard. Al termine dell'estrazione di tali aree, per ogni campione, è stata generata un'immagine (Fig. 3.25), denominata "RoiTrack", in cui ogni quadratino giallo rappresenta i confini della regione d'interesse individuata; mentre, tutti i dati generati dal software (nome del vaso, numero del set di semina, tempo di acquisizione, data di acquisizione, coordinate della ROI, classe tissutale e valori degli indici) sono stati raccolti e salvati in una tabella Excel e nel formato ".mat" di MATLAB®.

Figura 3.25 - RoiTrack di un campione al termine dell'estrazione delle ROI



3.7. Analisi statistica

3.7.1. Principal Component Analysis (PCA)

La *Principal Component Analysis* (PCA), o Analisi delle Componenti Principali, è una tipologia di analisi multivariata, definita anche “analisi dei fattori” e ha lo scopo di semplificare i dati riducendo il numero più o meno elevato di variabili che li descrivono, limitando il più possibile la perdita di informazioni. La PCA comporta una trasformazione matematica astratta della matrice di dati originale, che può essere rappresentata dall’equazione:

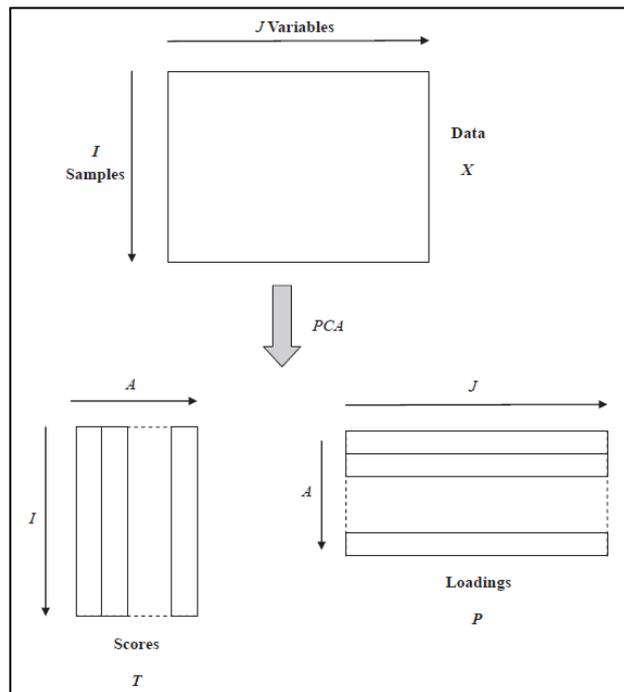
$$X = TP + E$$

dove:

- X è la matrice di dati originale di dimensioni $I \times J$, le cui righe rappresentano i campioni, le colonne sono le variabili e i gli elementi corrispondono ai valori delle misurazioni sui campioni. Il numero di colonne nella matrice (T) è uguale al numero di righe nella matrice (P) ed è pari al numero di componenti significative chiamate “A”.
- T sono gli *scores* o punteggi, rappresentati da una matrice di dimensioni $I \times A$ e hanno tutte le righe della matrice di dati originale.
- P sono i *loadings*, rappresentati da una matrice di dimensioni $A \times J$ e hanno tante colonne quante la matrice di dati originale.
- L’ a th colonna di T e l’ a th riga di P possono essere rappresentate dai vettori t_a e p_a e sono le rappresentazioni vettoriali dell’ a th PC (*Principal Component*).
- Il prodotto TP può essere considerato come un modello di dati che è un’approssimazione del set di dati originale, mentre l’errore è rappresentato dalla matrice E .

Il primo vettore degli *scores* e il primo dei *loadings* sono spesso chiamati “auto-vettori” della prima componente principale (PC1). Ogni componente successivo è caratterizzato da una coppia di auto-vettori sia per gli *scores* che per i *loadings*. Questo è illustrato nella figura 3.26.

Figura 3.26 - Metodo della PCA



Fonte: Brereton R. G. (2009), *Chemometrics for Pattern Recognition*

Dopo la PCA, le variabili originali sono ridotte a ‘n’ PC significative (ad es. 3); ciascuna componente principale è una combinazione lineare delle variabili osservate:

$$PC1 = a_1 \cdot I_1 + a_2 \cdot I_2 + a_3 \cdot I_3 + \dots + a_n \cdot I_n$$

dove a_n sono i *loadings*, I_n sono le variabili.

È importante determinare la dimensione di ciascuna componente principale, definita come “autovalore”: maggiore è il numero delle componenti (e più sono significative), maggiori sono le loro dimensioni. L’autovalore di una PC può essere definito come la somma dei quadrati dei punteggi. Spesso gli autovalori vengono presentati come percentuali, ad esempio la somma dei quadrati dell’intero set di dati, che viene definita “varianza percentuale”. A volte può essere utile determinare tale valore per ciascuna PC, poiché se le prime componenti principali corrispondono ad una piccola variazione percentuale, significa che non modellano gran parte dei dati, ma anche che potrebbero esserci molti fattori che influenzano le osservazioni. L’autovalore percentuale cumulativo viene utilizzato per determinare (approssimativamente) quale parte

dei dati è stata modellata mediante PCA: più la somma totale dei quadrati dei dati si avvicina al 100%, più il modello è fedele. Per costruzione, le componenti principali sono fra loro non correlate (ortogonali) e ordinate in ordine decrescente di varianza e, quindi, di importanza nella spiegazione del fenomeno. Questo permette di ridurre il numero di variabili da considerare scartando le ultime componenti principali (laddove si ritenga trascurabile il loro contributo alla spiegazione della variabilità osservata) e di spiegare il fenomeno oggetto di studio, mediante un'opportuna interpretazione delle PC scelte.

La PCA, quindi, riduce il set di dati originale di grandi dimensioni ad un set di dati molto più piccolo e più gestibile (ad esempio composto da 3 PC) che può essere visualizzato più facilmente. I *loadings* sono il mezzo per giungere a tale risultato, ma aiutano anche a interpretare quali variabili sono probabilmente le più responsabili del raggruppamento o della separazione tra i campioni.

Una volta calcolati gli *scores* (relativi ai campioni) e i *loadings* (relativi alle variabili), esistono diversi modi per rappresentarli graficamente. Si può utilizzare un grafico a una dimensione e, generalmente, si tratta di un grafico a barre; oppure si possono rappresentare mediante un grafico a due dimensioni (rappresentazione dei punteggi di una PC rispetto a quelli di un'altra) o a tre dimensioni, in cui ciascun asse rappresenta una componente principale.

Sulla base del dataset della sperimentazione oggetto della tesi, la PCA è stata eseguita tramite un apposito script di MATLAB® (riportato nell'Appendice V) e i relativi grafici ottenuti sono illustrati nel capitolo quarto, al paragrafo 1.

3.7.2. Analisi degli indici spettrali

Sulla base dei risultati ottenuti dall'Analisi delle Componenti Principali e a loro conferma, sono state scelte alcune regioni d'interesse, tra quelle individuate precedentemente, per analizzare l'evoluzione nel tempo degli indici spettrali in relazione allo sviluppo della malattia. Ogni ROI è stata identificata attribuendole un "codice" (es. V8_F2_V) riportante alcune indicazioni relative al vaso di provenienza (es. 'V8'), alla foglia su cui si trova (es. 'F2') e un numero progressivo (es. 'V'). Partendo dall'ultimo tempo di acquisizione in cui le ROI

presentavano uno stadio di malattia intermedio o avanzato (classe tissutale: 4 o 5) e regredendo nel tempo fino a giungere al tessuto sano, i dati relativi agli indici delle singole regioni d'interesse sono stati riuniti in una prima tabella Excel. Successivamente, gli stessi dati sono stati ordinati partendo dal tessuto sano fino alle classi tissutali 4 o 5 (vedi Tab.3.1). Un ulteriore step è stato quello di calcolare la media e la deviazione standard di ogni indice per ogni tempo di acquisizione e di rappresentarle in grafici, utilizzando il software MATLAB®. Per facilitare la lettura di tali grafici, gli indici sono stati suddivisi nei seguenti gruppi:

1. NIR, R, G, B;
2. Rapporti spettrali (B/NIR, R/NIR, G/NIR, BR/NIR, GR/NIR, GB/NIR);
3. NDVI, PRI, EVI;
4. Fluorescenze (FUV685, FUV740, FR685, FR740);
5. Prodotti tra le fluorescenze (FUV685mUV740, FR685mR740, FUV685mR740, FR685mUV740);
6. Rapporti tra le fluorescenze (FUV685dUV740, FR685dR740, FUV685dR740, FR685dUV740).

Lo stesso procedimento è stato applicato anche alle piante sane per poter confrontare i valori con quelli del tessuto sano delle piante infettate e utilizzarli come riferimento per valutare la variazione degli indici spettrali nei tessuti malati. Tutti i grafici ottenuti sono illustrati nel capitolo quarto, al paragrafo 2.

1 Tabella 3.1 - Esempio di una tabella Excel riportante i dati dei primi indici relativi ad una regione d'interesse scelta

ID_im	ID_temp	ID_roi	Coord_1	Coord_2	Coord_3	Coord_4	ROI	Class	NIR	B	G	R
Vaso8_	T+2D	F2	495.51	1700.51	7.98	7.98	V8_F2_V	1	109.0896	30.17291	40.22768	26.99319
Vaso8_	T+2D	F2	495.51	1700.51	7.98	7.98	V8_F2_V	1	108.8025	29.9616	40.00402	26.82292
Vaso8_	T+2D	F2	495.51	1700.51	7.98	7.98	V8_F2_V	1	109.3768	30.38423	40.45134	27.16345
Vaso8_	T+2D	F2	495.51	1700.51	7.98	7.98	V8_F2_V	1	107.6539	29.11633	39.1094	26.14187
Vaso8_	T+2D	F2	495.51	1700.51	7.98	7.98	V8_F2_V	1	110.5254	31.2295	41.34596	27.8445
Vaso8_	T+6D	F2	322.51	653.51	10.98	11.98	V8_F2_V	2	69.54726	14.10817	21.14028	13.69236
Vaso8_	T+6D	F2	322.51	653.51	10.98	11.98	V8_F2_V	2	69.27735	13.9039	20.96114	13.53525
Vaso8_	T+6D	F2	322.51	653.51	10.98	11.98	V8_F2_V	2	69.81717	14.31243	21.31942	13.84948
Vaso8_	T+6D	F2	322.51	653.51	10.98	11.98	V8_F2_V	2	68.19773	13.08683	20.24458	12.90679
Vaso8_	T+6D	F2	322.51	653.51	10.98	11.98	V8_F2_V	2	70.89679	15.1295	22.03598	14.47794
Vaso8_	T+8D	F2	872.51	1690.51	18.98	18.98	V8_F2_V	3	126.4986	31.06186	45.37796	30.88483
Vaso8_	T+8D	F2	872.51	1690.51	18.98	18.98	V8_F2_V	3	126.072	30.76773	45.04127	30.6159
Vaso8_	T+8D	F2	872.51	1690.51	18.98	18.98	V8_F2_V	3	126.9251	31.35598	45.71465	31.15377
Vaso8_	T+8D	F2	872.51	1690.51	18.98	18.98	V8_F2_V	3	124.3656	29.59124	43.69451	29.54015
Vaso8_	T+8D	F2	872.51	1690.51	18.98	18.98	V8_F2_V	3	128.6315	32.53247	47.0614	32.22951
Vaso8_	T+15D	F2	826.51	1636.51	20.98	24.98	V8_F2_V	4	110.929	31.233	40.88115	28.55835
Vaso8_	T+15D	F2	826.51	1636.51	20.98	24.98	V8_F2_V	4	110.5194	30.87336	40.39182	28.14811
Vaso8_	T+15D	F2	826.51	1636.51	20.98	24.98	V8_F2_V	4	111.3385	31.59265	41.37049	28.96859
Vaso8_	T+15D	F2	826.51	1636.51	20.98	24.98	V8_F2_V	4	108.8811	29.43478	38.4345	26.50716
Vaso8_	T+15D	F2	826.51	1636.51	20.98	24.98	V8_F2_V	4	112.9768	33.03123	43.32781	30.60955

CAPITOLO QUARTO

RISULTATI

4.1. Principal Component Analysis (PCA)

Il primo grafico (Fig. 4.1) rappresenta la varianza percentuale delle prime otto componenti principali calcolate dal software. Si può notare che il 60% della varianza è spiegata dalle prime due componenti principali, che sono state scelte come componenti in grado di spiegare il fenomeno, come mostra anche la figura 4.2. Infatti, in tale grafico si può vedere l'evoluzione della malattia, partendo da valori alti di PC1 (a destra) corrispondenti al tessuto sano (in azzurro), a cui seguono i primi sintomi (in blu e verde; classe tissutale: 2 e 3), gli stadi intermedio (in rosso; classe tissutale 4) e avanzato (in magenta; classe tissutale 5), fino al tessuto senescente o necrotico (in nero). In giallo sono evidenziati il gruppo dei "falsi positivi", corrispondenti alle punture di insetti e all'assenza di tessuto fogliare, che si sovrappongono principalmente alle classi tissutali 4 e 5. In figura 4.3, invece, sono rappresentate la terza e la quarta componente principale che, tuttavia, non spiegano molto il fenomeno, in quanto tutti i dati risultano essere concentrati al centro del grafico, ad eccezione di qualche punto estremo, agli angoli.

Figura 4.1 - Varianza percentuale e cumulativa delle componenti principali

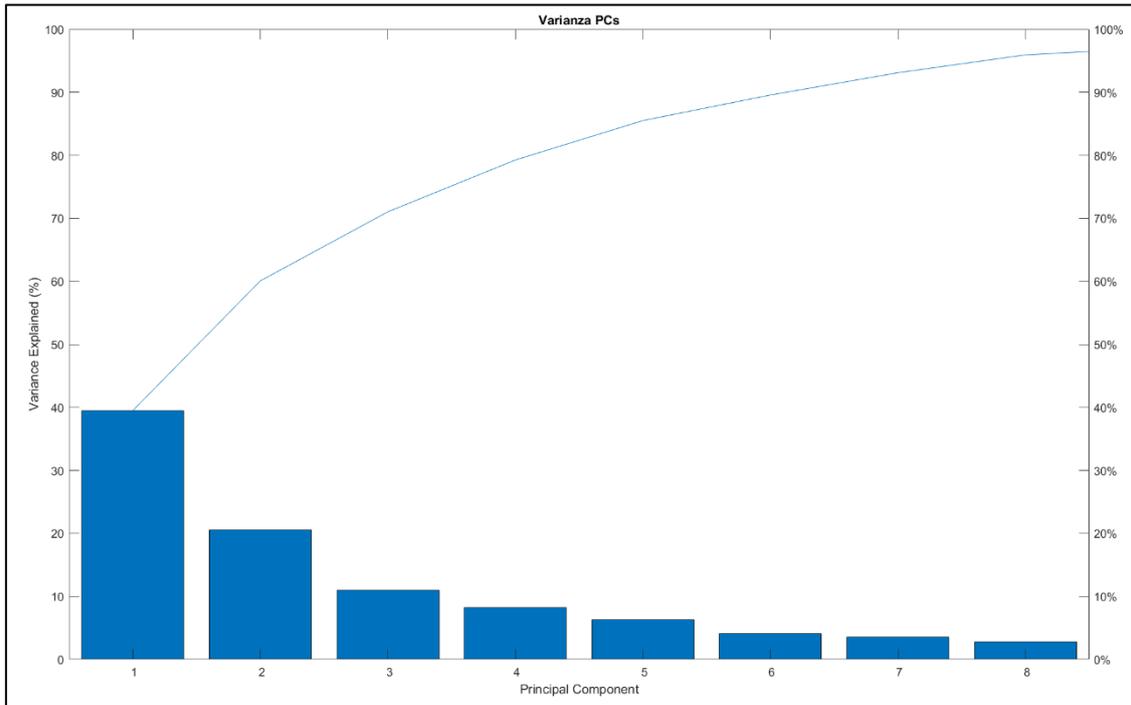


Figura 4.2 - PC1 e PC2 del tessuto vegetale da sano a senescente/necrotico con alcuni falsi positivi (classi tissutali 7 e 10: rosure di insetti e assenza di tessuto)

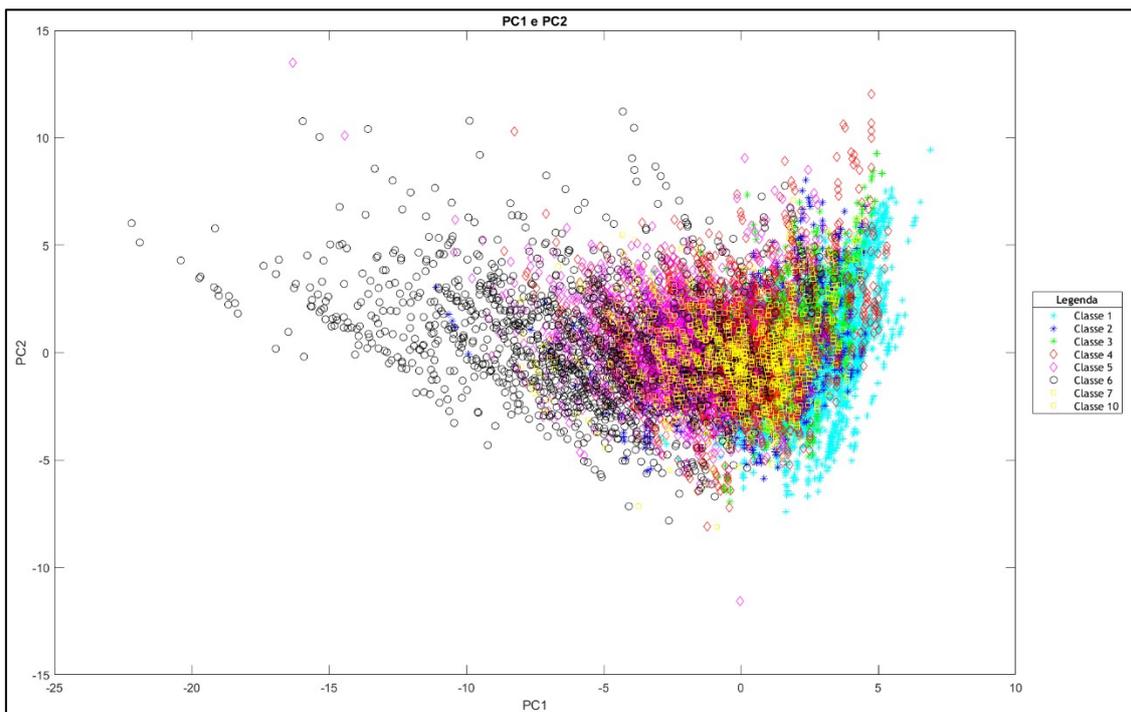
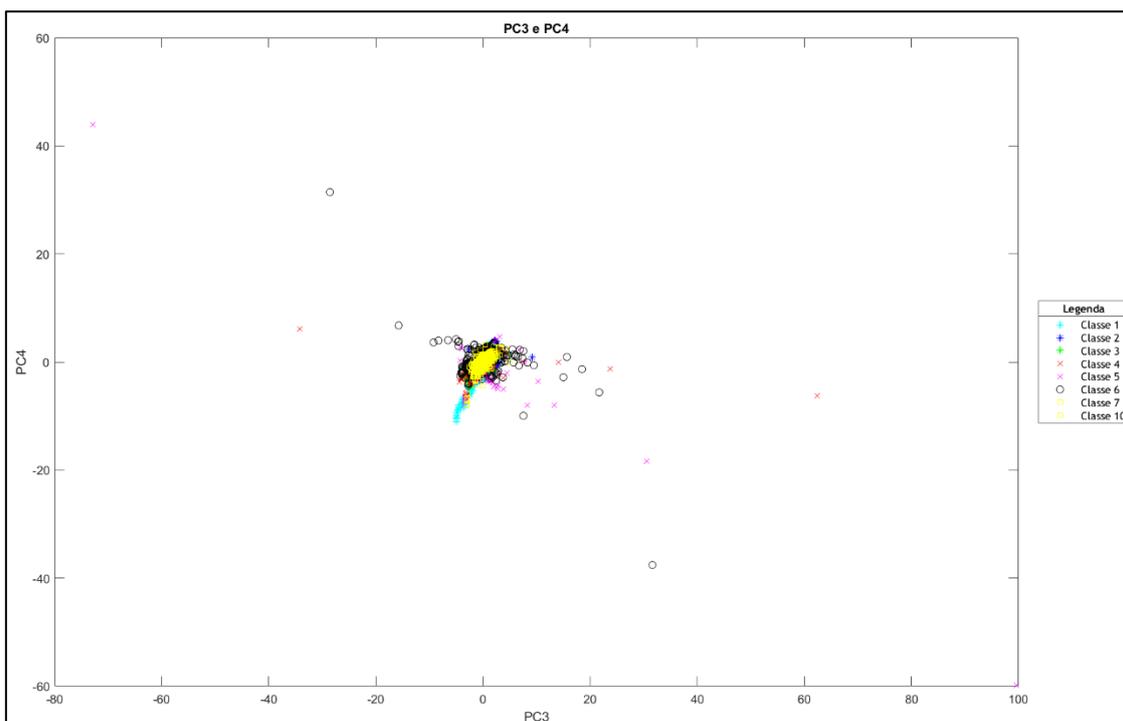


Figura 4.3 - PC3 e PC4 del tessuto vegetale da sano a senescente/necrotico con alcuni falsi positivi (classi tissutali 7 e 10: rosure di insetti e assenza di tessuto)



Per facilitare la lettura e valutare meglio l'evoluzione della malattia, ci si è concentrati sul grafico relativo alle prime due componenti principali, ripulendolo prima dai falsi positivi (Fig. 4.4) e, in un secondo momento, dai dati relativi al tessuto senescente/necrotico (Fig. 4.5).

Invece, il grafico riportato in figura 4.6 è relativo alla distribuzione degli indici spettrali. Si può notare che i valori positivi della PC1 sono più legati ai rapporti spettrali, mentre i valori positivi della PC2 sono maggiormente correlati agli indici legati alla fluorescenza. Di questi indici è stata analizzata l'evoluzione nel tempo in funzione dello stadio di sviluppo dell'oidio (vedi par. 4.2.).

Figura 4.4 - PC1 e PC2 del tessuto vegetale da sano a senescente/necrotico

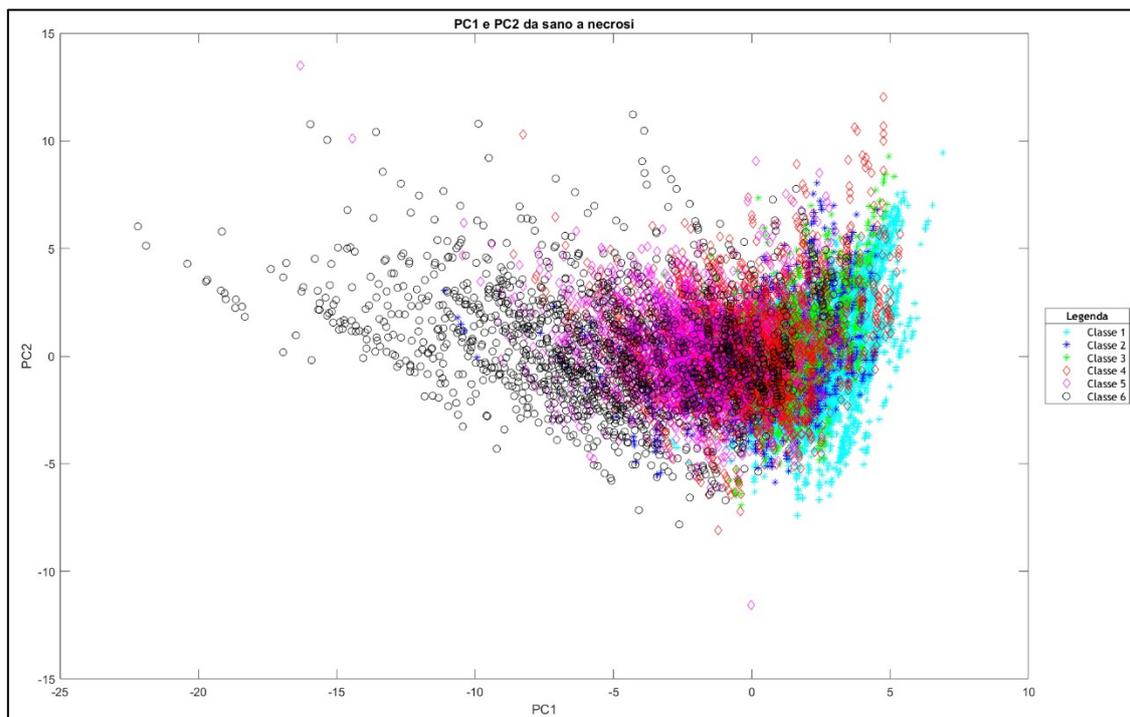


Figura 4.5 - PC1 e PC2 del tessuto vegetale da sano a malato

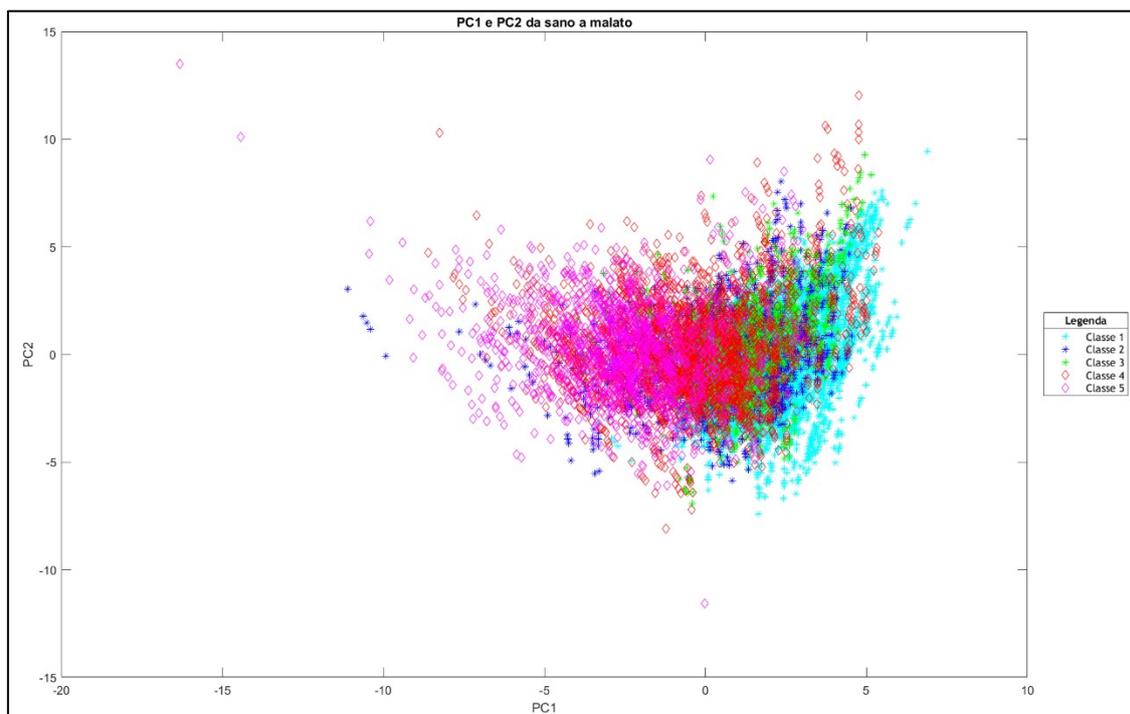
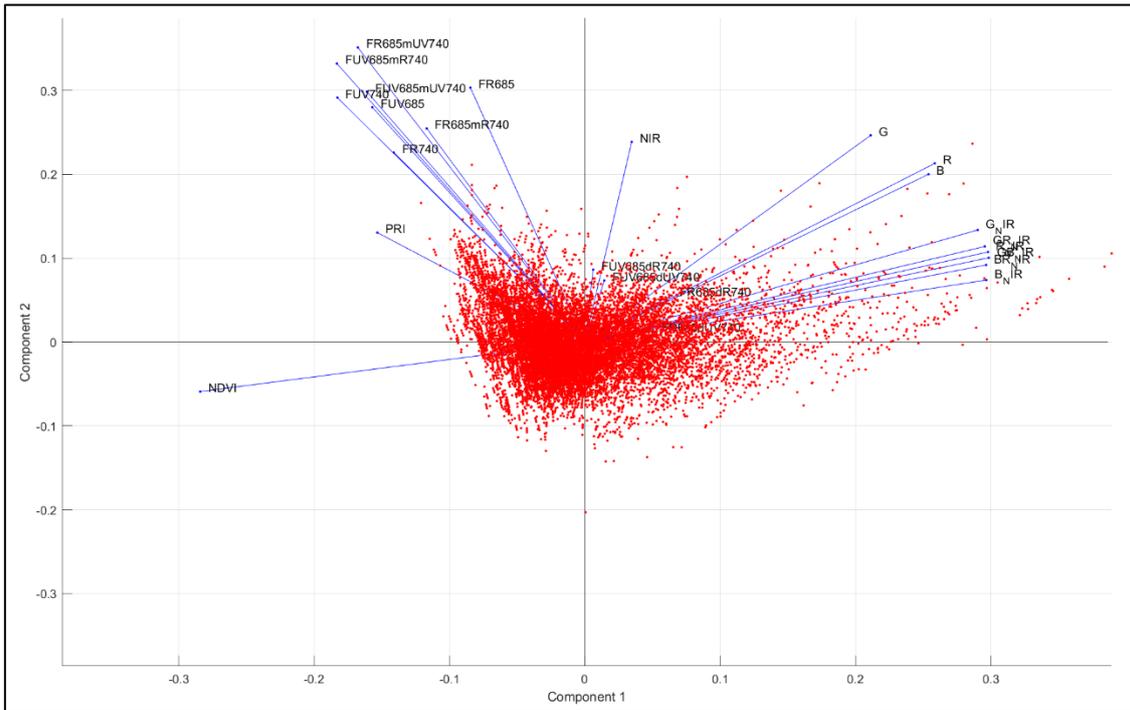


Figura 4.6 - Distribuzione degli indici spettrali



4.2. Evoluzione degli indici spettrali

Dai grafici degli indici spettrali delle singole ROI è emersa una maggior correlazione tra i primi sintomi di malattia e le fluorescenze eccitate nel blu a 685 e 740 nm, rispetto agli altri indici calcolati (Fig. 4.7). Anche i prodotti tra le fluorescenze FUV685mUV740 e FUV685mR740 (Fig. 4.8) e il rapporto FUV685dR740 sono risultati essere i più significativi e con un andamento simile ai singoli segnali di fluorescenza (Fig. 4.9). Tutti gli indici, infatti, presentano un picco in corrispondenza della comparsa dei primi sintomi di oidio, dopo due o quattro giorni dall'inoculazione. Tuttavia, alcune regioni d'interesse presentano un andamento anomalo dei valori (visibile, per esempio, nella ROI V4_F2_IV). Questa anomalia è rappresentata da un nuovo picco degli indici nell'ultima acquisizione. Ciò potrebbe essere dovuto a diversi fattori, tra cui la senescenza della pianta oppure a variazioni nelle condizioni di misura, come la crescita della pianta, una maggior vicinanza della foglia alla sorgente luminosa, un lieve spostamento o errato posizionamento della foglia stessa durante l'acquisizione delle immagini.

Figura 4.7 - Evoluzione temporale degli indici di fluorescenza di alcune ROI presenti sulla seconda e terza foglia di differenti campioni

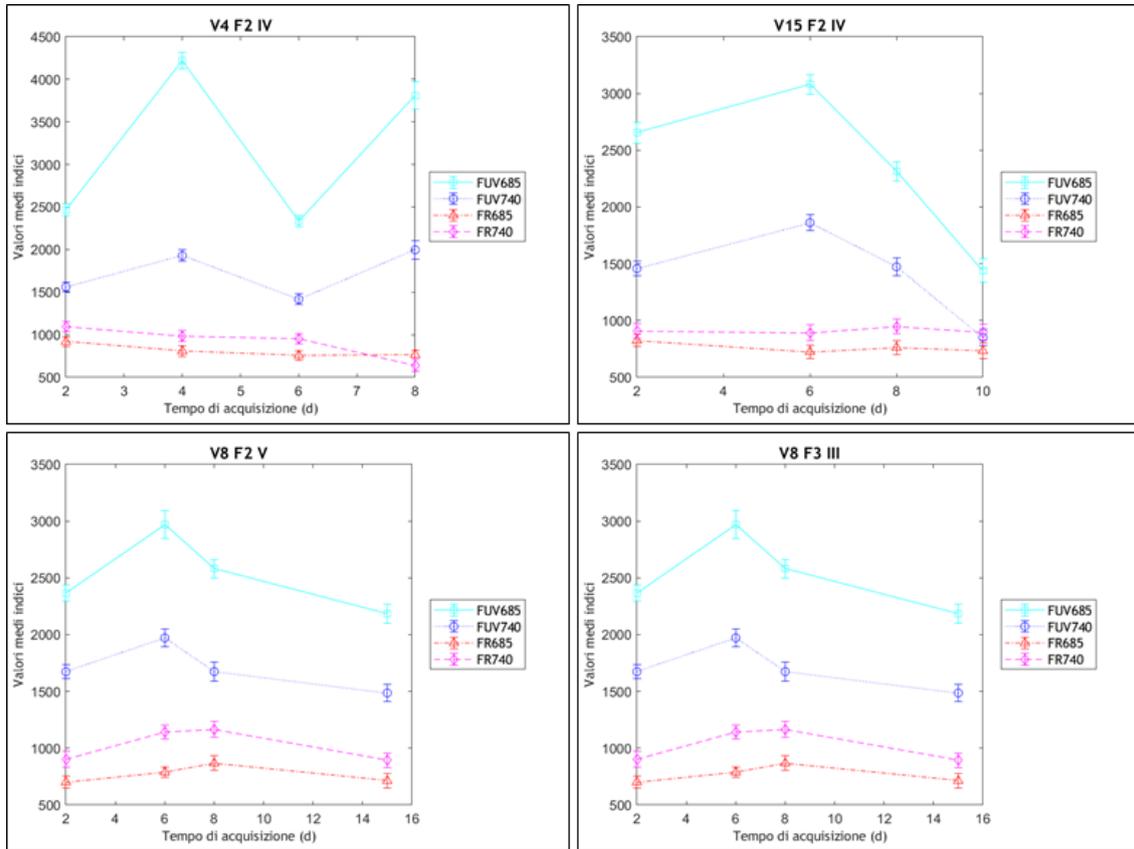
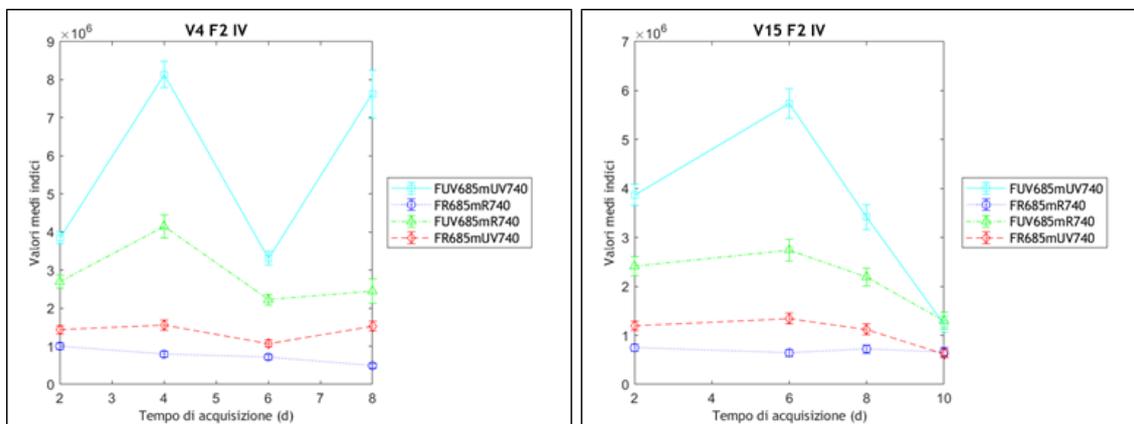


Figura 4.8 - Evoluzione temporale degli indici dei prodotti tra le fluorescenze di alcune ROI presenti sulla seconda e terza foglia di differenti campioni



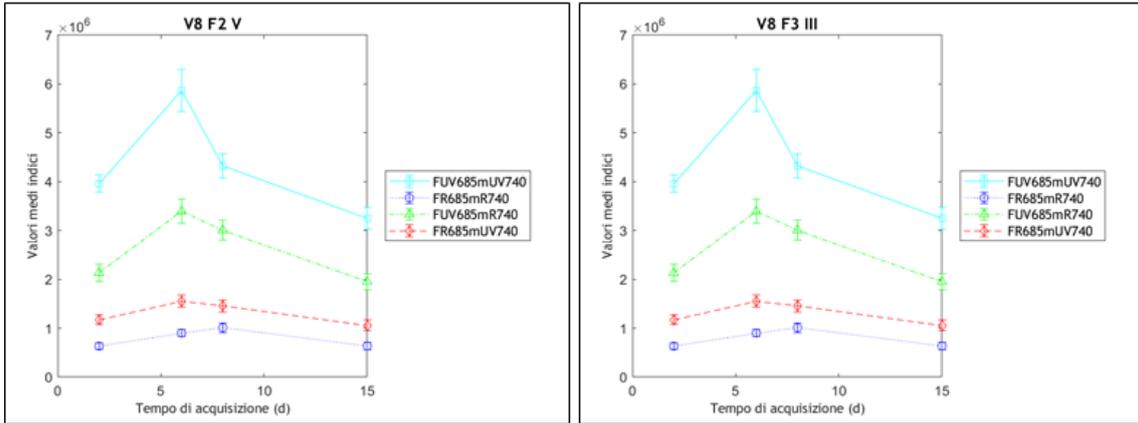
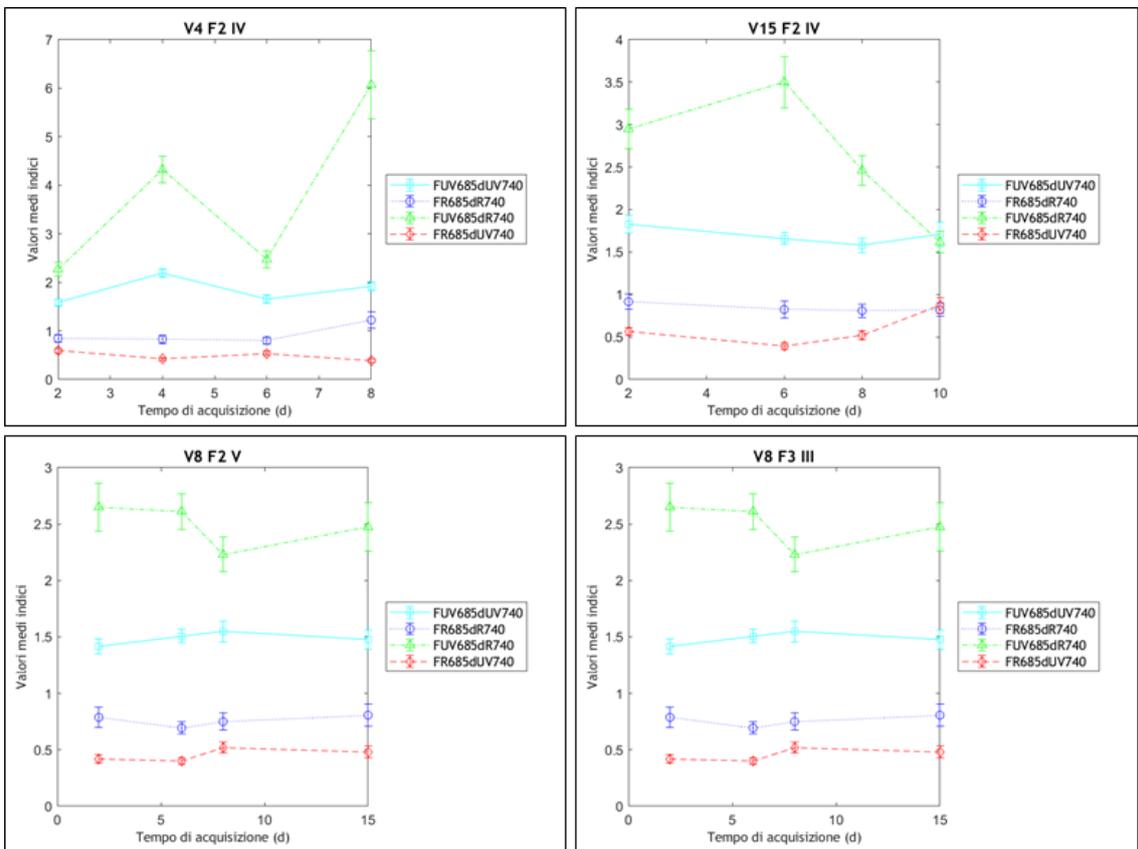


Figura 4.9 - Evoluzione temporale degli indici dei quozienti tra le fluorescenze di alcune ROI presenti sulla seconda e terza foglia di differenti campioni



Per quanto riguarda i rapporti spettrali, a sinistra, e le lunghezze d'onda nel visibile e nel NIR, a destra, presentano un andamento abbastanza costante per poi aumentare quando il tessuto è malato. Il NIR e i canali nel visibile possono

presentare una diminuzione finale, probabilmente dovuta all'inizio dei fenomeni di senescenza/necrosi del tessuto fogliare.

Per quanto riguarda i rapporti spettrali e le lunghezze d'onda nel visibile e nel vicino infrarosso (NIR), essi risultano essere gli indici da preferire per descrivere gli stadi più avanzati della malattia. Come mostrato in figura 4.10, i rapporti spettrali presentano un andamento abbastanza costante per aumentare successivamente quando il tessuto è malato. Tuttavia, in alcune regioni d'interesse (per esempio, in V15_F2_IV e in V8_F2_V) diminuiscono lievemente alla comparsa dei primi sintomi di malattia e poi aumentano. Inoltre, il NIR e i canali nel visibile possono presentare una diminuzione finale, probabilmente dovuta all'inizio dei fenomeni di senescenza e di necrosi del tessuto fogliare (Fig. 4.11).

Figura 4.10 - Evoluzione temporale dei rapporti spettrali di alcune ROI presenti sulla seconda e terza foglia di differenti campioni

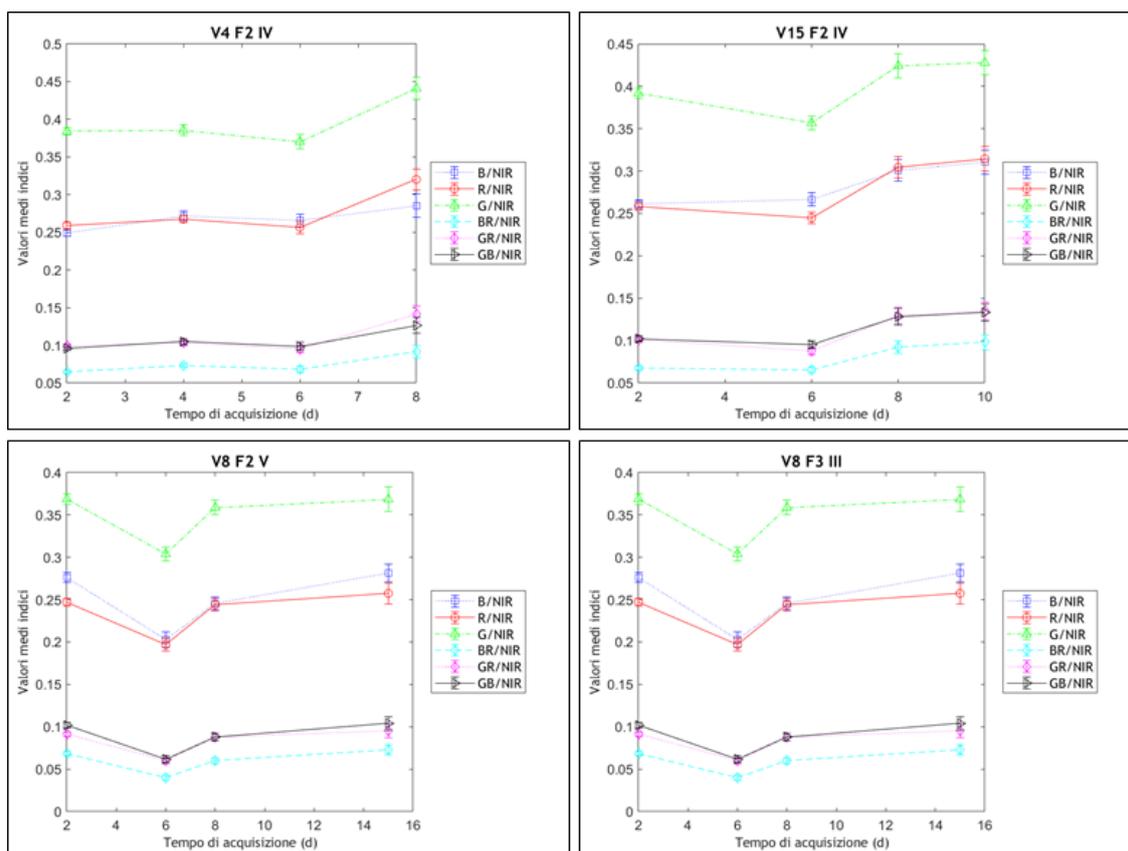
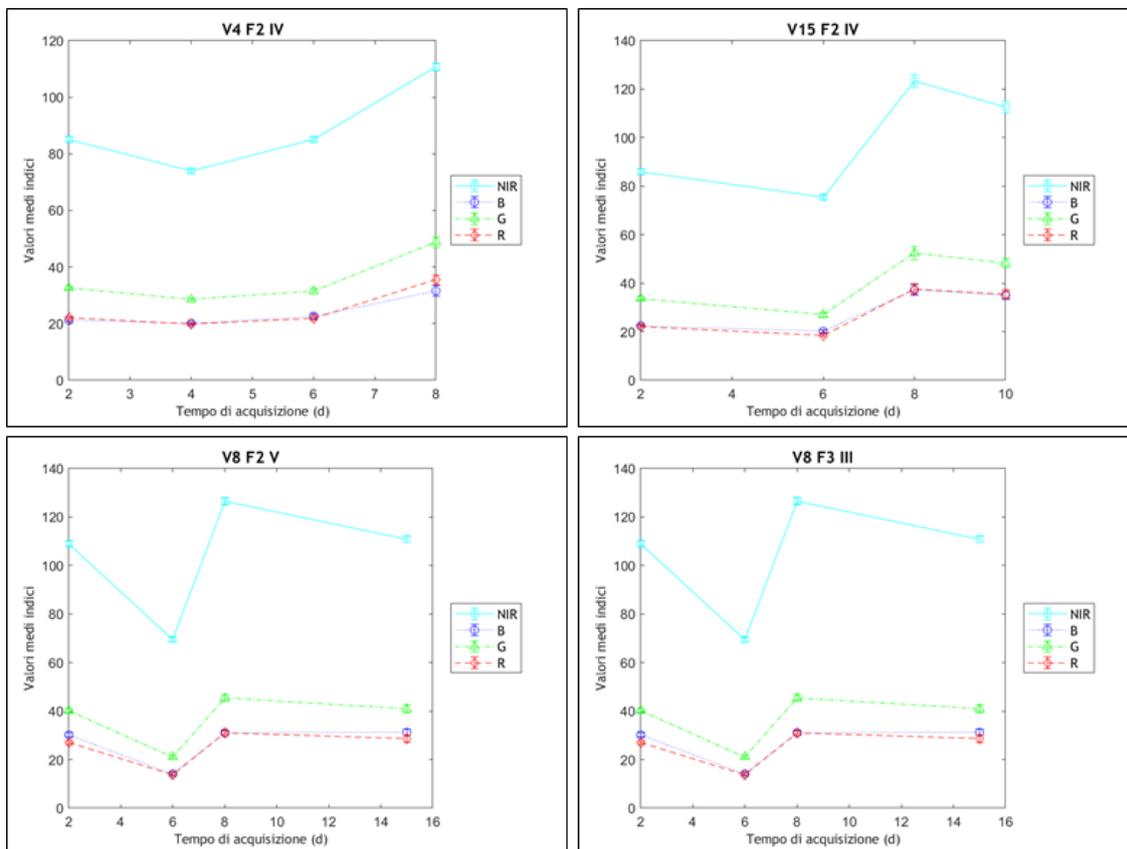
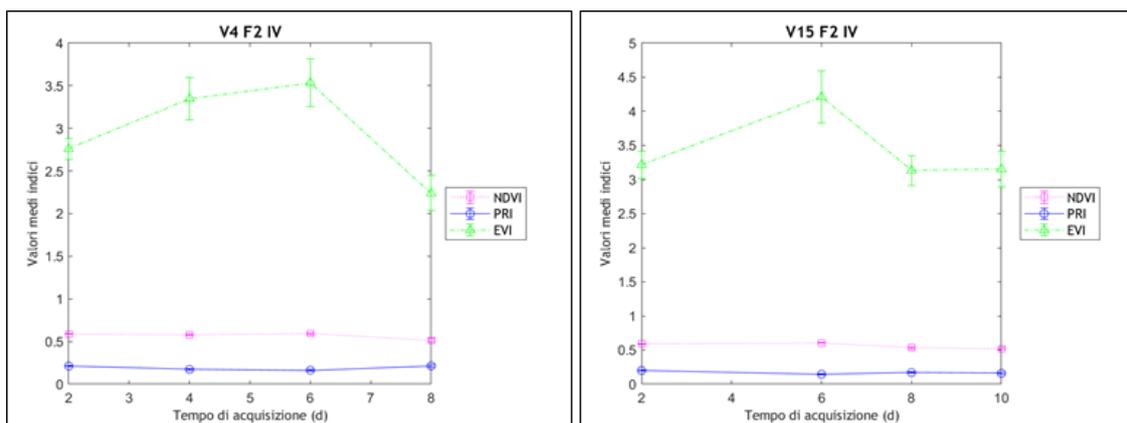


Figura 4.11 - Evoluzione temporale delle lunghezze d'onda nel rosso (R), nel blu (B), nel verde (G) e nel vicino infrarosso (NIR) di alcune ROI presenti sulla seconda e terza foglia di differenti campioni



Invece, poco significativi sono risultati gli indici NDVI, PRI ed EVI in quanto non mostrano andamenti particolari nel tempo (vedi Fig. 4.12).

Figura 4.12 - Evoluzione temporale degli indici NDVI, PRI ed EVI di alcune ROI presenti sulla seconda e terza foglia di due campioni



CAPITOLO QUINTO

CONCLUSIONI

Dalla sperimentazione oggetto della tesi è emerso che, in laboratorio, è possibile identificare e caratterizzare l'oidio sulla coltura di cetriolo utilizzando alcune tecniche di imaging. In particolare, le prove sperimentali hanno previsto l'utilizzo di alcune fra le tecniche di imaging descritte in letteratura, quali: imaging di fluorescenza e multispettrale e termografia a infrarossi.

La selezione nei diversi tempi di acquisizione di regioni d'interesse o ROI dalle immagini ottenute e la relativa attribuzione di una classe tissutale alle stesse hanno consentito l'esecuzione della *Principal Component Analysis* (PCA). Tale analisi multivariata ha permesso di identificare quali fossero gli indici spettrali da sottoporre ad un'analisi più approfondita sulla loro evoluzione nel tempo.

Da questa analisi è emerso che le fluorescenze eccitate con luce UV-blu (a 685 e 740 nm) e gli indici FUV685mUV740, FR685mR740, FUV685dR740 sono i più adatti a descrivere la comparsa dei primi sintomi della malattia fungina, non sempre visibili a occhio nudo. Questi indici, infatti, presentano un picco in corrispondenza di tali fasi della malattia. I rapporti spettrali, le lunghezze d'onda nel visibile (R, G, B) e nel vicino infrarosso (NIR), al contrario, presentano un aumento nelle ultime acquisizioni in corrispondenza degli stadi più avanzati, in cui la malattia è ben visibile a occhio nudo. Poco significativi sono risultati gli indici NDVI, PRI ed EVI.

Tuttavia, la presenza di alcune anomalie riscontrate nel comportamento degli indici legati alla fluorescenza, rendono necessarie ulteriori prove sperimentali e l'impiego di alcuni accorgimenti durante l'acquisizione delle immagini che consentano di ripetere nel tempo le condizioni di misura, senza manipolare in modo eccessivo le piante. Si consiglia, ad esempio, di predisporre un telaietto per mantenere le foglie perfettamente orizzontali rispetto agli obiettivi delle telecamere ed evitare qualsiasi spostamento della foglia, seppur lieve, durante

la procedura di acquisizione. Inoltre, occorre fare attenzione all'altezza della pianta, evitando che le foglie siano troppo vicine alla sorgente luminosa, per non ottenere dati falsati. Al riguardo si suggerisce di montare la sorgente luminosa e le telecamere su un supporto mobile, per poterne regolare l'altezza in funzione dello sviluppo della pianta.

Infine, la variabilità dei dati riscontrata mostra quanto sia ancora difficile l'applicazione di queste tecniche in condizioni di campo, ad esempio tramite l'impiego di droni.

BIBLIOGRAFIA

• Articoli scientifici

Bellow S., Latouche G., Brown S. C., Poutaraud A., Cerovic Z. G. (2012): *Optical detection of downy mildew in grapevine leaves: daily kinetics of autofluorescence upon infection*, "Journal of Experimental Botany", Vol. 64, No. 1, pp. 333-341

Chaerle L., Sándor L., Hagenbeeka D., Buschmannb 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, pp. 253-262

Devadas R., Lamb D. W., Simpfendorfer S., Backhouse D. (2009): *Evaluating ten spectral vegetation indices for identifying rust infection in individual wheat leaves*, "Precision Agriculture", 10, pp. 459-470

Fiorani F., Rascher U., Jahnke S., Schurr U. (2012): *Imaging plants dynamics in heterogenic environments*, "Current Opinion in Biotechnology", Elsevier, 23, pp. 227-235

Huang W., Lamb D. W., Niu Z., Zhang Y., Liu L., Wang J. (2007): *Identification of yellow rust in wheat using in-situ spectral reflectance measurements and airborne hyperspectral imaging*, "Precision Agriculture", 8, pp. 187-197

Li L., Zhang Q., Huang D. (2014): *A Review of Imaging Techniques for Plant Phenotyping*, "Sensors", 14, pp. 20078-20111

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, pp. 319-330.

Moshou D., Bravo C., Oberti R., West J.S., Ramon H., Vougioukas S., Bochtis D. (2011): *Intelligent multi-sensor system for the detection and treatment of fungal diseases in arable crops*, "Biosystems Engineering", Elsevier, 108, pp. 311-321

Oberti R. (2003): *Sistemi ottici per la valutazione dello stato sanitario delle piante*, Atti dell'Accademia dei Georgofili, Serie VII, Vol. L

Oberti R., Marchi M., Tirelli P., Calcante A., Iriti M., Borghese A. N. (2014): *Automatic detection of powdery mildew on grapevine leaves by image analysis: Optimal view-angle range to increase the sensitivity*, "Computers and Electronics in Agriculture", Elsevier, 104, pp. 1-8

Oerke E.-C. (2006): *Crop losses to pests*, "Journal of Agricultural Science", 144, pp. 31-43

Oerke E.-C. (2007): *Crop Losses to Animal Pests, Plant Pathogens, and Weeds*, "Encyclopedia of Pest Management II", pp. 116-120

Pérez-Bueno M. L., Pineda M., Cabeza F. M., Barón M. (2016): *Multicolor Fluorescence Imaging as a Candidate for Disease Detection in Plant Phenotyping*, "Frontiers in Plant Science", vol. 7

Rumpf T., Mahlein A.-K., Steiner U., Oerke E.-C., Dehne H.-W., Plümer L. (2010): *Early detection and classification of plant diseases with Support Vector Machines based on hyperspectral reflectance*, "Computers and Electronics in Agriculture", Elsevier, 72, pp. 91-99

Sankaran S., Mishra A., Ehsani R., Davis C. (2010): *A review of advanced techniques for detecting plant diseases*, "Computers and Electronics in Agriculture", Elsevier, 72, pp. 1-13

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 diseases*, "Annual Review of Phytopathology", Annual Reviews, Paolo Alto (USA), 41, pp. 593-614

Xue J., Su B. (2017): *Significant Remote Sensing Vegetation Indices: A Review of Developments and Applications*, "Journal of Sensors", Hindawi, pp. 1-17

- **Testi**

Autori vari (2016), *Agricoltura di Precisione. Metodi e tecnologie per migliorare l'efficienza e la sostenibilità dei sistemi colturali*, a cura di Raffaele Casa, Edagricole, Bologna, ISBN: 9788850655106

Bodria L., Pellizzi G., Piccarolo P. (2013), *Meccanica e meccanizzazione agricola*, Edagricole, Bologna, ISBN: 9788850654130

Brereton R. G. (2009), *Chemometrics for Pattern Recognition*, John Wiley and Sons, Ltd., United Kingdom, ISBN: 9780470987254

Hermann J. Heege Editor (2013), *Precision in Crop Farming. Site Specific Concepts and Sensing Methods: Applications and Results*, Springer, ISBN: 9789400767591

Taiz L., Zeiger E. (2013), *Elementi di fisiologia vegetale*, Piccin, ISBN: 9788829923229

- **Pubblicazioni varie**

Appunti e slide del corso di Pianificazione e gestione dei processi meccanizzati del prof. Calcante A.

Appunti e slide del corso di Biochimica e fisiologia vegetale della prof.ssa Negrini N.

Appunti e slide del corso di Fisica del prof. Rossi M.

Luca La Rocca (13 maggio 2005), *Analisi in Componenti Principali*

QSI 500/600 *Series User Guide e Quick Start*

FLIR®, *User's manual FLIR® T6xx series*

FLIR® Systems (2011), *Manuale di termografia ad infrarossi per il mercato delle costruzioni e delle energie rinnovabili*, www.flir.com

SITOGRAFIA

<https://www.flir.it>

<https://www.flir.it/products/researchir/>

<https://www.mathworks.com>

https://it.mathworks.com/help/pdf_doc/matlab/getstart.pdf

<http://www.ni.com/it-it.html>

APPENDICE I

```
%% Acquisizione delle immagini
disp('acquisizione background')
src.FilterWheel = 'Position 4'; % filtro
bgd_740= getsnapshot(vid); % acquisizione
pause(0.5)
src.FilterWheel = 'Position 1';
bgd_685= getsnapshot(vid);
pause(0.5)

disp('acquisizione Uv')
s1.outputSingleScan(blu); % led ON
src.FilterWheel = 'Position 1';
Uv_685 = getsnapshot(vid);
s1.outputSingleScan(off); % led OFF
pause(0.5)

s1.outputSingleScan(blu);
src.FilterWheel = 'Position 4';
Uv_740 = getsnapshot(vid);

disp('acquisizione Red')
s1.outputSingleScan(red);
src.FilterWheel = 'Position 4';
red_740 = getsnapshot(vid);
s1.outputSingleScan(off);
pause(0.5)

s1.outputSingleScan(red);
src.FilterWheel = 'Position 1';
red_685 = getsnapshot(vid);
s1.outputSingleScan(off);
```

```

fluo_740=Uv_740-bgd_740;
fluo_685=Uv_685-bgd_685;
fluo_R_740=red_740-bgd_740;
fluo_R_685=red_685-bgd_685;

disp('acquisizione alogena')
s1.outputSingleScan(hal);
src.ExposureTime = 0.6;
src.FilterWheel = 'Position 4';
hal_740= getsnapshot(vid);
pause(0.5)

src.FilterWheel = 'Position 6';
src.ExposureTime = 0.2;
hal_R = getsnapshot(vid);
pause(0.5)

src.FilterWheel = 'Position 7';
src.ExposureTime = 0.25;
hal_G = getsnapshot(vid);
pause(0.5)

src.FilterWheel = 'Position 8';
src.ExposureTime = 0.7;
hal_B = getsnapshot(vid);
pause(0.5)
s1.outputSingleScan(off);

%% Salvataggio delle immagini in un file .mat
t=now;
t1=datestr(t,'yyyymmdd_HHMMSS');
I=int2str(1i);
file=strcat(cart,Idsample,t1,'_',I,'.mat');
save(file,'bgd_740','bgd_685','Uv_685','Uv_740','red_740','red_6
85','fluo_740','fluo_685','fluo_R_740','fluo_R_685','hal_740','h
al_R','hal_G','hal_B');

```

APPENDICE II

```
%% USB-DAQ config
s1 = daq.createSession('ni');
s2 = daq.createSession('ni');
s1.addDigitalChannel('Dev2', 'Port0/Line0:2', 'OutputOnly');
s2.addAnalogOutputChannel('Dev2',0:1, 'Voltage');

off=[0 0 1];
blu=[1 0 1];
red=[0 1 1];
hal=[0 0 0];
Volt=[2.5 2.5];

s2.outputSingleScan(Volt);
s1.outputSingleScan(red); % led ON
pause(30)
s1.outputSingleScan(off); % led OFF
```

APPENDICE III

%% Normalizzazione

```
disp( 'seleziona un rettangolo interno al reference')
[J, rect] = imcrop(hal_740);
NIRref= double(median(J,'all'));
NIR=100*double(hal_740)./NIRref;
savenome = fullfile(savefolder1, 'NIR');
save(savenome, 'NIR');
close all
```

```
J=imcrop(hal_B,rect);
Bref= double(median(J,'all'));
B= 100*double(hal_B) ./ Bref;
savenome = fullfile(savefolder1, 'B')
save(savenome, 'B');
```

```
J=imcrop(hal_G,rect);
Gref= double(median(J,'all'));
G= 100*double(hal_G) ./ Gref;
savenome = fullfile(savefolder1, 'G')
save(savenome, 'G');
```

```
J=imcrop(hal_R,rect);
Rref= double(median(J,'all'));
R = 100*double(hal_R) ./ Rref;
savenome = fullfile(savefolder1, 'R')
save(savenome, 'R');
```

%% Indici spettrali

```
B_NIR=B./NIR;
savenome = fullfile(savefolder1, 'B_NIR')
save(savenome, 'B_NIR');
```

```

R_NIR=R./NIR;
savenome = fullfile(savefolder1, 'R_NIR')
save(savenome, 'R_NIR');

G_NIR=G./NIR;
savenome = fullfile(savefolder1, 'G_NIR')
save(savenome, 'G_NIR');

BR_NIR=R_NIR.*B_NIR;
savenome = fullfile(savefolder1, 'BR_NIR')
save(savenome, 'BR_NIR');

NDVI=(NIR-R) ./ (NIR+R);
savenome = fullfile(savefolder1, 'NDVI')
save(savenome, 'NDVI');

GR_NIR = (G_NIR .*R_NIR);
savenome = fullfile(savefolder1, 'GR_NIR')
save(savenome, 'GR_NIR');

GB_NIR= (G_NIR.*B_NIR);
savenome = fullfile(savefolder1, 'GB_NIR')
save(savenome, 'GB_NIR');

PRI=(G-B) ./ (G+B);
savenome=fullfile(savefolder1, 'PRI')
save(savenome, 'PRI');

EVI=2.5* ((NIR-R) ./ ((NIR+6*R) - (7.5*B+1)));
savenome=fullfile(savefolder1, 'EVI')
save(savenome, 'EVI');

```

```

%% Fluorescenza - Prodotti

```

```

FUV685mUV740= (FUV685 .*FUV740);

```

```

savenome=fullfile(savefolder1,'FUV685mUV740')
save(savenome,'FUV685mUV740');
FR685mR740= (FR685 .*FR740);
savenome=fullfile(savefolder1,'FR685mR740')
save(savenome,'FR685mR740');

FUV685mR740=(FUV685 .*FR740);
savenome=fullfile(savefolder1,'FUV685mR740')
save(savenome,'FUV685mR740');

FR685mUV740=(FR685.* FUV740);
savenome=fullfile(savefolder1,'FR685mUV740')
save(savenome,'FR685mUV740');

```

%% Fluorescenza - Rapporti

```

FUV685dUV740= (FUV685 ./FUV740);
savenome=fullfile(savefolder1,'FUV685dUV740')
save(savenome,'FUV685dUV740');

FR685dR740= (FR685 ./FR740);
savenome=fullfile(savefolder1,'FR685dR740')
save(savenome,'FR685dR740');

FUV685dR740=(FUV685 ./FR740);
savenome=fullfile(savefolder1,'FUV685dR740')
save(savenome,'FUV685dR740');

FR685dUV740=(FR685 ./FUV740);
savenome=fullfile(savefolder1,'FR685dUV740')
save(savenome,'FR685dUV740');

```

APPENDICE IV

```
%% Estrazione delle ROI
while n==1
disp( 'seleziona un rettangolo di tessuto')
[roi, rect] = imcrop(NDVI);

roiNIR=imcrop(NIR,rect);
roiR=imcrop(R,rect);
roiB=imcrop(B,rect);
roiG=imcrop(G,rect);
roiB_NIR=imcrop(B_NIR,rect);
roiR_NIR=imcrop(R_NIR,rect);
roiG_NIR=imcrop(G_NIR,rect);
roiBR_NIR=imcrop(BR_NIR,rect);
roiNDVI=imcrop(NDVI,rect);
roiGR_NIR=imcrop(GR_NIR,rect);
roiGB_NIR=imcrop(GB_NIR,rect);
roiPRI=imcrop(PRI,rect);
roiEVI=imcrop(EVI,rect);
roiFUV685=imcrop(FUV685,rect);
roiFUV740=imcrop(FUV740,rect);
roiFR685=imcrop(FR685,rect);
roiFR740=imcrop(FR740,rect);
roiFUV685mUV740=imcrop(FUV685mUV740,rect);
roiFR685mR740=imcrop(FR685mR740,rect);
roiFUV685mR740=imcrop(FUV685mR740,rect);
roiFR685mUV740=imcrop(FR685mUV740,rect);
roiFUV685dUV740=imcrop(FUV685dUV740,rect);
roiFR685dR740=imcrop(FR685dR740,rect);
roiFUV685dR740=imcrop(FUV685dR740,rect);
roiFR685dUV740=imcrop(FR685dUV740,rect);
```

```

%% Classificazione del tessuto all'interno della ROI
    def={'xxxx'};
    answer=inputdlg({'Classi: 1-Sano 2-Punti clorotici 3-Primi
sintomi 4-Studio intermedio 5-Studio avanzato 6-Senescenza/
necrosi 7-Punture 8-Nervature 9-Picciolo 10-Assenza di tessuto.
A quale classe appartiene il campione?: '},'ID',[1 150], def);
    e=answer{1}; % definisce la classe tissutale
    def={'xxxx'};
    answer=inputdlg({'Da quale foglia è stata estratta la roi:
F1, F2, F3 ? '},'ID',[1 100], def);
    F=answer{1};

%% Raccolta valori statistici dei 25 indici
    medNIR=double(mean(roiNIR,'all'));
    stdNIR=double(std(roiNIR,0,'all'));
    vNIRn= [medNIR; medNIR-0.2*stdNIR; medNIR+0.2*stdNIR;
medNIR-stdNIR; medNIR+stdNIR];
    vNIR=cat(1,vNIR,vNIRn);

    medR=double(mean(roiR,'all'));
    stdR=double(std(roiR,0,'all'));
    vRn= [medR; medR-0.2*stdR; medR+0.2*stdR; medR-stdR;
medR+stdR];
    vR=cat(1,vR,vRn);

    medB=double(mean(roiB,'all'));
    stdB=double(std(roiB,0,'all'));
    vBn=[medB; medB-0.2*stdB; medB+0.2*stdB; medB-stdB;
medB+stdB];
    vB=cat(1,vB,vBn);

    medG=double(mean(roiG,'all'));
    stdG=double(std(roiG,0,'all'));
    vGn=[medG; medG-0.2*stdG; medG+0.2*stdG; medG-stdG;
medG+stdG];
    vG=cat(1,vG,vGn);

```

```

medB_NIR=double(mean(roiB_NIR,'all'));
stdB_NIR=double(std(roiB_NIR,0,'all'));
vB_NIRn=[medB_NIR; medB_NIR-0.2*stdB_NIR;
medB_NIR+0.2*stdB_NIR; medB_NIR-stdB_NIR; medB_NIR+stdB_NIR];
vB_NIR=cat(1,vB_NIR,vB_NIRn);

medR_NIR=double(mean(roiR_NIR,'all'));
stdR_NIR=double(std(roiR_NIR,0,'all'));
vR_NIRn=[medR_NIR; medR_NIR-0.2*stdR_NIR;
medR_NIR+0.2*stdR_NIR; medR_NIR-stdR_NIR; medR_NIR+stdR_NIR];
vR_NIR=cat(1,vR_NIR,vR_NIRn);

medG_NIR=double(mean(roiG_NIR,'all'));
stdG_NIR=double(std(roiG_NIR,0,'all'));
vG_NIRn=[medG_NIR; medG_NIR-0.2*stdG_NIR;
medG_NIR+0.2*stdG_NIR; medG_NIR-stdG_NIR; medG_NIR+stdG_NIR];
vG_NIR=cat(1,vG_NIR,vG_NIRn);

medBR_NIR=double(mean(roiBR_NIR,'all'));
stdBR_NIR=double(std(roiBR_NIR,0,'all'));
vBR_NIRn=[medBR_NIR; medBR_NIR-0.2*stdBR_NIR;
medBR_NIR+0.2*stdBR_NIR; medBR_NIR-stdBR_NIR;
medBR_NIR+stdBR_NIR];
vBR_NIR=cat(1,vBR_NIR,vBR_NIRn);

medNDVI=double(mean(roiNDVI,'all'));
stdNDVI=double(std(roiNDVI,0,'all'));
vNDVIIn=[medNDVI; medNDVI-0.2*stdNDVI; medNDVI+0.2*stdNDVI;
medNDVI-stdNDVI; medNDVI+stdNDVI];
vNDVI=cat(1,vNDVI,vNDVIIn);

medGR_NIR=double(mean(roiGR_NIR,'all'));
stdGR_NIR=double(std(roiGR_NIR,0,'all'));
vGR_NIRn=[medGR_NIR; medGR_NIR-0.2*stdGR_NIR;
medGR_NIR+0.2*stdGR_NIR; medGR_NIR-stdGR_NIR;
medGR_NIR+stdGR_NIR];

```

```

vGR_NIR=cat(1,vGR_NIR,vGR_NIRn);

medGB_NIR=double(mean(roiGB_NIR,'all'));
stdGB_NIR=double(std(roiGB_NIR,0,'all'));
vGB_NIRn=[medGB_NIR; medGB_NIR-0.2*stdGB_NIR;
medGB_NIR+0.2*stdGB_NIR; medGB_NIR-stdGB_NIR;
medGB_NIR+stdGB_NIR];
vGB_NIR=cat(1,vGB_NIR,vGB_NIRn);

medPRI=double(mean(roiPRI,'all'));
stdPRI=double(std(roiPRI,0,'all'));
vPRIIn=[medPRI; medPRI-0.2*stdPRI; medPRI+0.2*stdPRI; medPRI-
stdPRI; medPRI+stdPRI];
vPRI=cat(1,vPRI,vPRIIn);

medEVI=double(mean(roiEVI,'all'));
stdEVI=double(std(roiEVI,0,'all'));
vEVIIn=[medEVI; medEVI-0.2*stdEVI; medEVI+0.2*stdEVI; medEVI-
stdEVI; medEVI+stdEVI];
vEVI=cat(1,vEVI,vEVIIn);

medFUV685=double(mean(roiFUV685,'all'));
stdFUV685=double(std(roiFUV685,0,'all'));
vFUV685n=[medFUV685; medFUV685-0.2*stdFUV685;
medFUV685+0.2*stdFUV685; medFUV685-stdFUV685;
medFUV685+stdFUV685];
vFUV685=cat(1,vFUV685,vFUV685n);

medFUV740=double(mean(roiFUV740,'all'));
stdFUV740=double(std(roiFUV740,0,'all'));
vFUV740n=[medFUV740; medFUV740-0.2*stdFUV740;
medFUV740+0.2*stdFUV740; medFUV740-stdFUV740;
medFUV740+stdFUV740];
vFUV740=cat(1,vFUV740,vFUV740n);

```

```
medFR685=double(mean(roiFR685,'all'));
stdFR685=double(std(roiFR685,0,'all'));
vFR685n=[medFR685; medFR685-0.2*stdFR685;
medFR685+0.2*stdFR685; medFR685-stdFR685; medFR685+stdFR685];
vFR685=cat(1,vFR685,vFR685n);
```

```
medFR740=double(mean(roiFR740,'all'));
stdFR740=double(std(roiFR740,0,'all'));
vFR740n=[medFR740; medFR740-0.2*stdFR740;
medFR740+0.2*stdFR740; medFR740-stdFR740; medFR740+stdFR740];
vFR740=cat(1,vFR740,vFR740n);
```

```
medFUV685mUV740=double(mean(roiFUV685mUV740,'all'));
stdFUV685mUV740=double(std(roiFUV685mUV740,0,'all'));
vFUV685mUV740n=[medFUV685mUV740; medFUV685mUV740-
0.2*stdFUV685mUV740; medFUV685mUV740+0.2*stdFUV685mUV740;
medFUV685mUV740-stdFUV685mUV740;
medFUV685mUV740+stdFUV685mUV740];
vFUV685mUV740=cat(1,vFUV685mUV740,vFUV685mUV740n);
```

```
medFR685mR740=double(mean(roiFR685mR740,'all'));
stdFR685mR740=double(std(roiFR685mR740,0,'all'));
vFR685mR740n=[medFR685mR740; medFR685mR740-
0.2*stdFR685mR740; medFR685mR740+0.2*stdFR685mR740;
medFR685mR740-stdFR685mR740; medFR685mR740+stdFR685mR740];
vFR685mR740=cat(1,vFR685mR740,vFR685mR740n);
```

```
medFUV685mR740=double(mean(roiFUV685mR740,'all'));
stdFUV685mR740=double(std(roiFUV685mR740,0,'all'));
vFUV685mR740n=[medFUV685mR740; medFUV685mR740-
0.2*stdFUV685mR740; medFUV685mR740+0.2*stdFUV685mR740;
medFUV685mR740-stdFUV685mR740; medFUV685mR740+stdFUV685mR740];
vFUV685mR740=cat(1,vFUV685mR740,vFUV685mR740n);
```

```
medFR685mUV740=double(mean(roiFR685mUV740,'all'));
stdFR685mUV740=double(std(roiFR685mUV740,0,'all'));
```

```

vFR685mUV740n=[medFR685mUV740; medFR685mUV740-
0.2*stdFR685mUV740; medFR685mUV740+0.2*stdFR685mUV740;
medFR685mUV740-stdFR685mUV740; medFR685mUV740+stdFR685mUV740];
vFR685mUV740=cat (1,vFR685mUV740,vFR685mUV740n);

medFUV685dUV740=double (mean (roiFUV685dUV740,'all'));
stdFUV685dUV740=double (std (roiFUV685dUV740,0,'all'));
vFUV685dUV740n=[medFUV685dUV740; medFUV685dUV740-
0.2*stdFUV685dUV740; medFUV685dUV740+0.2*stdFUV685dUV740;
medFUV685dUV740-stdFUV685dUV740;
medFUV685dUV740+stdFUV685dUV740];
vFUV685dUV740=cat (1,vFUV685dUV740,vFUV685dUV740n);

medFR685dR740=double (mean (roiFR685dR740,'all'));
stdFR685dR740=double (std (roiFR685dR740,0,'all'));
vFR685dR740n=[medFR685dR740; medFR685dR740-
0.2*stdFR685dR740; medFR685dR740+0.2*stdFR685dR740;
medFR685dR740-stdFR685dR740; medFR685dR740+stdFR685dR740];
vFR685dR740=cat (1,vFR685dR740,vFR685dR740n);

medFUV685dR740=double (mean (roiFUV685dR740,'all'));
stdFUV685dR740=double (std (roiFUV685dR740,0,'all'));
vFUV685dR740n=[medFUV685dR740; medFUV685dR740-
0.2*stdFUV685dR740; medFUV685dR740+0.2*stdFUV685dR740;
medFUV685dR740-stdFUV685dR740; medFUV685dR740+stdFUV685dR740];
vFUV685dR740=cat (1,vFUV685dR740,vFUV685dR740n);

medFR685dUV740=double (mean (roiFR685dUV740,'all'));
stdFR685dUV740=double (std (roiFR685dUV740,0,'all'));
vFR685dUV740n=[medFR685dUV740; medFR685dUV740-
0.2*stdFR685dUV740; medFR685dUV740+0.2*stdFR685dUV740;
medFR685dUV740-stdFR685dUV740; medFR685dUV740+stdFR685dUV740];
vFR685dUV740=cat (1,vFR685dUV740,vFR685dUV740n);

```

```
%% Salvataggio dei dati in una tabella
```

```
T=table(ID_im, ID_setn, ID_tempn, Data_imn, ID_roi, Coord, Class, vNIR,  
vB, vG, vR, vB_NIR, vR_NIR, vG_NIR, vBR_NIR, vNDVI, vGR_NIR, vGB_NIR, vPRI  
, vEVI, vFUV685, vFUV740, vFR685, vFR740, vFUV685mUV740, vFR685mR740, vF  
UV685mR740, vFR685mUV740, vFUV685dUV740, vFR685dR740, vFUV685dR740, v  
FR685dUV740);
```

```
T.Properties.VariableNames={'ID_im', 'ID_set', 'ID_temp', 'Data_im'  
, 'ID_roi', 'Coord', 'Class', 'NIR', 'B', 'G', 'R', 'B_NIR', 'R_NIR', 'G_N  
IR', 'BR_NIR', 'NDVI', 'GR_NIR', 'GB_NIR', 'PRI', 'EVI', 'FUV685', 'FUV7  
40', 'FR685', 'FR740', 'FUV685mUV740', 'FR685mR740', 'FUV685mR740', 'F  
R685mUV740', 'FUV685dUV740', 'FR685dR740', 'FUV685dR740', 'FR685dUV7  
40'};
```

```
    tabNome=fullfile(readfolder, 'results.xls');
```

```
    resNome=fullfile(readfolder, 'results.mat');
```

```
writetable(T, tabNome, 'FileType', 'spreadsheet', 'WriteVariableName  
s', true);
```

```
save(resNome, 'T');
```

APPENDICE V

```
%% Inizializzazione
readfolder= 'C:\Users\sara9\Documents\MATLAB\Tesi\SCRIPT_PCA';
savefolder='C:\Users\sara9\Documents\MATLAB\Tesi\SCRIPT_PCA\Fig_
PCA';
mkdir(savefolder);
load dataset;
load variables;
load class;

%% Normalizzazione dei dati e calcolo PCs
w = 1./var(dataset);
[wcoeff,score,latent,tsquared,explained] = pca(dataset,...
'VariableWeights',w);

%% Trasformare i coefficienti affinché siano ortonormali
coefforth = inv(diag(std(dataset))) *wcoeff;
cscores = zscore(dataset)*coefforth;

%% Grafico della varianza tra le PCs
figure('Name','Varianza_PCs')
pareto(explained)
title('Varianza PCs')
xlabel('Principal Component')
ylabel('Variance Explained (%)')
savefig('Varianza_PCs.fig');

%% Definire le righe appartenenti alle diverse classi e grafici
delle prime 4 PCs
score1=score(class==1,:);
score2=score(class==2,:);
score3=score(class==3,:);
```

```

score4=score(class==4,:);
score5=score(class==5,:);
score6=score(class==6,:);
score7=score(class==7,:);
score10=score(class==10,:);

figure('Name', 'PC1_PC2')
plot(score1(:,1),score1(:,2),'c*')
hold on
plot(score2(:,1),score2(:,2),'b*')
plot(score3(:,1),score3(:,2),'g*')
plot(score4(:,1),score4(:,2),'rd')
plot(score5(:,1),score5(:,2),'md')
plot(score6(:,1),score6(:,2),'ko')
plot(score7(:,1),score7(:,2),'ys')
% plot(score8(:,1),score8(:,2),'y*')
% plot(score9(:,1),score9(:,2),'yo')
plot(score10(:,1),score10(:,2),'ys')
title('PC1 e PC2')
xlabel('PC1')
ylabel('PC2')
hold off
legend({'Classe 1','Classe 2','Classe 3','Classe 4','Classe 5',
'Classe 6','Classe 7','Classe 10'},
'Location','eastoutside','FontName','Trebuchet MS')
title(legend,'Legenda');
savefig('PC1_PC2.fig');

figure('Name', 'PC3_PC4')
plot(score1(:,3),score1(:,4),'c*')
hold on
plot(score2(:,3),score2(:,4),'b*')
plot(score3(:,3),score3(:,4),'g*')
plot(score4(:,3),score4(:,4),'rx')
plot(score5(:,3),score5(:,4),'mx')
plot(score6(:,3),score6(:,4),'ko')

```

```

plot(score7(:,3),score7(:,4),'ys')
plot(score10(:,3),score10(:,4),'ys')
title('PC3 e PC4')
xlabel('PC3')
ylabel('PC4')
hold off
legend({'Classe 1','Classe 2','Classe 3','Classe 4','Classe 5',
'Classe 6','Classe 7','Classe 10'},
'Location','eastoutside','FontName','Trebuchet MS')
title(legend,'Legenda');
savefig('PC3_PC4.fig');

% PC1 e PC2 tra sane, primi sintomi e malattia
figure('Name', 'PC1_PC2_da_sano_a_malato')
plot(score1(:,1),score1(:,2),'c*')
hold on
plot(score2(:,1),score2(:,2),'b*')
plot(score3(:,1),score3(:,2),'g*')
plot(score4(:,1),score4(:,2),'rd')
plot(score5(:,1),score5(:,2),'md')
title('PC1 e PC2 da sano a malato')
xlabel('PC1')
ylabel('PC2')
hold off
legend({'Classe 1','Classe 2','Classe 3','Classe 4','Classe 5'},
'Location','eastoutside','FontName','Trebuchet MS')
title(legend,'Legenda');
savefig('PC1_PC2_da_sano_a_malato.fig');

% PC1 tra sane, primi sintomi, malattia e necrosi
figure('Name', 'PC1_PC2_da_sano_a_necrosi')
plot(score1(:,1),score1(:,2),'c*')
hold on
plot(score2(:,1),score2(:,2),'b*')
plot(score3(:,1),score3(:,2),'g*')
plot(score4(:,1),score4(:,2),'rd')

```

```

plot(score5(:,1),score5(:,2),'md')
plot(score6(:,1),score6(:,2),'ko')
title('PC1 e PC2 da sano a necrosi')
xlabel('PC1')
ylabel('PC2')
hold off
legend({'Classe 1','Classe 2','Classe 3','Classe 4','Classe 5',
'Classe 6'},'Location','eastoutside','FontName','Trebuchet MS')
title(legend,'Legenda');
savefig('PC1_PC2_da_sano_a_necrosi.fig');

%% T-squared
[st2,index] = sort(tsquared,'descend');
extreme = index(1);
class(extreme,:)

%% grafici distribuzione indici
figure('Name', 'distribuzione_indici')
biplot(coefforth(:,1:2),'Scores',score(:,1:2),'Varlabels',variables);
savefig('distribuzione_indici.fig');

```


Ringraziamenti

Un particolare ringraziamento al Prof. Roberto Oberti, per avermi permesso di prendere parte a questo progetto e avermi guidato nello svolgimento di questo lavoro, condividendo con me le sue conoscenze e la sua passione per la ricerca.

Ringrazio anche la mia famiglia e gli amici che mi hanno sostenuto e sopportato durante tutto il mio percorso di studio.