PLANT RESEARCH INTERNATIONAL
WAGENINGEN UR

Geautomatiseerde niet-invasieve methoden om de kwaliteit van aangevoerde rozen te meten

Een onderzoek met beeldvormende chlorofylfluorescentie (MIPS™) en flowcytometrie (GreenFlow™)

Jan Bergervoet, Henk Jalink, Rob van der Schoor, Ad Schapendonk, Jan Snel & Jan van der Wolf



Productschap Tuinbouw
Voor een bloeiende zaak

Rapport 143

PLANT RESEARCH INTERNATIONAL
WAGENINGEN UR

Geautomatiseerde niet-invasieve methoden om de kwaliteit van aangevoerde rozen te meten

Een onderzoek met beeldvormende chlorofylfluorescentie (MIPS™) en flowcytometrie (GreenFlow™)

Jan Bergervoet[2], Henk Jalink[2], Rob van der Schoor[2], Ad Schapendonk[1], Jan Snel[2] & Jan van der Wolf[2]

[1] Plant Dynamics BV
[2] Plant Research International B.V.

Plant Research International B.V., Wageningen
april 2007

Rapport 143

© 2007 Wageningen, Plant Research International B.V.
Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Plant Research International B.V.

Dit project is uitgevoerd in opdracht van en gefinancierd door het Productschap Tuinbouw.

Projectnummer: 11549

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 - 47 70 00
Fax : 0317 - 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

		pagina
Voorwoord		1
Samenvatting		2
1.	Inleiding	3
2.	Plan van aanpak	4
3.	Resultaten detectie aantasting Botrytis	5
3.1	Meetprincipe	5
3.2	Metingen roos en gerbera onder praktijkcondities	6
3.3	Softwarematige herkenning aantasting Botrytis	7
3.4	Optimaliseren criteria voor analyse aantasting	8
3.5	Automatiseren van beeldanalyse van tijdreeksen	10
3.6	Discussie	12
4.	Flowcytometrie	13
4.1	Procedure	13
4.2	Resultaten	13
5.	Hyacint	15
6.	Referenties	16

Voorwoord

Voor u ziet u het verslag van het project 'Geautomatiseerde niet-invasieve methoden (MIPS) en GreenFlow om de kwaliteit van aangevoerde rozen te meten'. Het verslag beschrijft het experimentele werk en de behaalde resultaten betreffende de vroege detectie van Botrytis, zowel de symptomen (MIPS) als de infectiedruk (GreenFlow). In het onderzoek is ook gerbera meegenomen. Bij hyacint is gekeken of verdroogde nagels aangetoond kunnen worden met MIPS.
Dit rapport wordt gecompleteerd door de eerder verschenen deelrapporten *Multiple Imaging of Plant Stress (MIPS): keteninventarisatie* (A&F rapport 536) en *Multiple Imaging of Plant Stress (MIPS): uitbloeiexperimenten* (A&F rapport 483). Op aanvraag is een USB stick verkrijgbaar met daarop demonstratiesoftware voor automatische herkenning van Botrytis in individuele rozen tijdens de uitbloei.

Jan Snel
Projectleider

Samenvatting

1. MIPS

a. Roos

Het deelproject 'MIPS-screening Botrytis' heeft een technisch protocol opgeleverd waarmee infectie van Botrytis bij partijen rozen kan worden onderkend. Hoewel uit het onderzoek blijkt dat Botrytis-aantasting in principe het beste van de zijkant kan worden waargenomen, is ook observatie van het bovenaanzicht van de bloem in principe mogelijk. In een uitbloeiproef is een matching van 82% bereikt tussen door MIPS van boven af herkende infecties en visuele inspectie van de hele bloem aan het eind van de uitbloeiproef. Als rekening gehouden wordt met het feit dat de MIPS alleen vanaf de bovenzijde meet is de matching zelfs beter dan 98%.

De methode is qua gevoeligheid vergelijkbaar met het menselijke oog. De methode heeft als voordeel dat het Botrytis automatisch en objectief kan bepalen en dat de methode volgens een standaard-protocol kan worden uitgevoerd. Het ontwikkelde protocol biedt goede perspectieven voor praktische toepassing. Niet direct voor vroegtijdige diagnose van Botrytis-infectie, maar met name voor het objectief meten van Botrytis-aantastingen in uitbloeiproeven.

b. Gerbera

De voor roos ontwikkelde methode is niet toepasbaar bij gerbera omdat de bloem veel minder chlorofyl bevat waardoor de kwaliteit van de metingen te laag is.

c. Hyacint

Verdroogde nagels kunnen met de MIPS opgespoord worden op het moment dat de nagels van bovenaf zichtbaar worden.

2. GreenFlow

Met behulp van de GreenFlow-faciliteit zijn de dichtheid en de kwaliteit van niet-gekiemde Botrytis-sporen in en op kunstmatig en van nature besmette rozen bepaald door middel van specifieke fluorescente merkers en flowcytometrische analyses. De methode is gebaseerd op het (gelijktijdig) specifiek detecteren van de conidiën met antistoffen en het vaststellen van de vitaliteit van sporen met specifieke fluorescente vitaliteitsmarkers. De methode is gevalideerd door gedetecteerde sporen vanuit het plantenweefsel te sorteren en te analyseren met microscooptechnieken. De flowcytometrische techniek kan worden gebruikt om een totaal beeld te krijgen van de infectiedruk van Botrytis.

1. Inleiding

Botrytis cinerea is een plantpathogene schimmel met een zeer brede waardplantenreeks. Deze gastheren maken plantafweerstoffen van uiteenlopende structuur. Kennelijk kan *B. cinerea* de toxische effecten van phyto-alexines en phytoanticipines omzeilen. Verder ontwikkelt het pathogeen snel tolerantie voor gewasbeschermingsmiddelen. Bloem- en kelkbladeren die met Botrytis zijn besmet hebben een significant geringere sierwaarde en de gevoeligheid voor het pathogeen is bovendien een belangrijke factor die de duur van het vaasleven aanzienlijk verkort. Aanvankelijk verschijnen de eerste symptomen op de geïnfecteerde bloembladeren als beperkte aantastingen. Vervolgens sterft het levende weefsel binnen de vlekvormige aantastingen af en verspreidt de ziekte zich over hele bloembladeren en de bloembodem, hetgeen resulteert in vernietiging van de hele bloem. Botrytis infecteert gezond plantmateriaal maar de groei van het mycelium en de sporulatie treedt alleen op in verouderd of afgestorven bladmateriaal, Een infectie is daarom vrijwel altijd geïnduceerd in de periode voorafgaand aan de oogst. Omdat de eerste symptomen moeilijk zichtbaar zijn, zeker bij gekleurde rozen, is de infectie moeilijk te zien en zeker moeilijk in een objectief cijfer te vatten.
De economische schade door Botrytis in de sierteeltsector is groot. Sierteeltproducten worden immers voornamelijk voor hun sierwaarde verhandeld en slechts geringe Botrytis-aantasting maakt de producten al onverkoopbaar. Botrytis-besmetting vindt waarschijnlijk al tijdens de teeltfase plaats, maar is vaak nog niet zichtbaar bij de oogst. Het product kan besmet zijn met sporen of er kunnen rustende infecties aanwezig zijn. De aantasting komt vaak pas tot uiting tijdens de distributiefase, waar de omstandigheden doorgaans gunstig zijn voor de uitgroei van Botrytis. Micro-klimatologische factoren, vooral de luchtvochtigheid, zijn van groot belang voor de verspreiding van de ziekte over de bloem. Het probleem voor vroegtijdige herkenning wordt vergroot door de latente periode voorafgaand aan de manifesterende van de vlekken in de petalen.

Multiple Imaging van Plant Stress (MIPS)

MIIPS visualiseert vitaliteit en functionaliteit van planten via fluorescentie en warmtebeelden. Hiermee is aangetoond dat de reactie van de plant op een Botrytis-infectie van een blad gemeten kan worden voordat de infectie met het blote oog zichtbaar is.

Flowcytometrische detectie Botrytis

Flowcytometrie is een snelle objectieve methode voor het tellen en het bepalen van de vitaliteit van bijvoorbeeld micro-organismen. De micro-organismen worden in suspensie gebracht, of zijn al in suspensie (vaaswater), en gekleurd met een combinatie van merkers voor vitaliteit. Voor een specifieke herkenning van Botrytis wordt gebruik gemaakt van een Botrytis-specifiek antilichaam.

Het onderzoek bestaat uit twee samenhangende deelprojecten:
1. vroegtijdige geautomatiseerde detectie van schade aan de plant (MIPS), en
2. snelle detectie van Botrytis-druk (GreenFlow).

De onderzoeksvragen zijn:
1. Is MIPS geschikt voor vroege detectie Botrytis-aantasting (d.w.z. nog voor het zichtbare stadium) in roos en gerbera?
2. Zijn dichtheid en kwaliteit van Botrytis-sporen de bepalen met flowcytometrische technieken?
3. Wat zijn de praktijkvoorwaarden voor deze technologie?

Dit alles onder de randvoorwaarde dat de te ontwikkelen technologie geïntegreerd kan worden in de huidige kwaliteitsbewakingsystematiek voor roos en gerbera.

2. Plan van aanpak

Het onderzoek is als volgt opgezet.

I Keteninventarisatie: onderzoek naar problematiek en randvoorwaarden voor toepassing van niet-invasieve technieken in de keten. De resultaten van dit onderzoek zijn eerder gepubliceerd in het rapport 'Multiple Imaging of Plant Stress (MIPS): uitbloeiexperimenten'.

II Detectie Botrytis-druk en -aantasting in roos en gerbera.
1. Aanpassing van technische installatie en ontwikkeling van software.
2. Optimaliseren van meetcriteria en vergelijking met uitbloei proeven.
3. Automatiseren van beeldverwerking en analyse van tijdreeksen.
4. Kwantificering infectiedruk Botrytis met flowcytometrie.

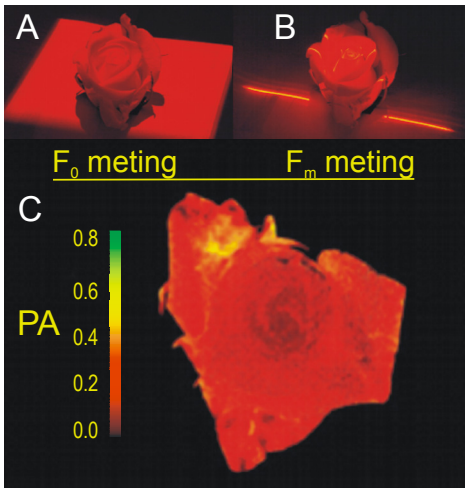
III Detectie van verdroogde nagels bij hyacinten.

3. Resultaten detectie aantasting Botrytis

De centrale vraagstelling is of MIPS in staat is tot vroege detectie van Botrytis in roos en gerbera. Om dit te realiseren is de meting technische verbeterd en is er speciale software ontwikkeld voor automatische herkenning.

3.1 Meetprincipe

De efficiëntie van de fotosynthese (PA) wordt berekend uit de basisfluorescentie F_0 en de maximale fluorescentie F_M (zie Figuur 1). Naarmate PA hoger is, is het plantaardige weefsel vitaler. De PA van rozen is afhankelijk van de rijpheid. De PA van een jonge bloem ligt tussen 0.3 en 0.7.



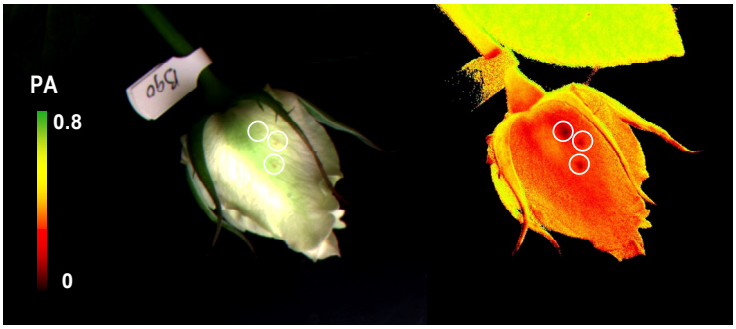
Figuur 1.
De belichting van de roos gebeurt met een laser die een scannende beweging maakt over het object.

Voor de F_0 meting wordt een aantal snelle scans uitgevoerd (A). In deze opname wordt een witte roos doorgemeten. Een digitale camera registreert het fluorescentiebeeld. De F_M meting wordt uitgevoerd met één langzame scan (B). De PA waarde van een pixel wordt uit de grijswaarde van de corresponderende pixels van de F_0 en de F_M afbeeldingen berekend (C). De PA waarde van planten ligt meestal tussen 0 en 0.8.
De rode kleur van de witte roos in A en B wordt veroorzaakt door het rode licht van de laser.

Figuur 2 laat een meting zien van een aangetaste witte roos. De donkere vlekjes in het PA beeld duiden op de aantasting met Botrytis. Deze aantasting is met MIPS 8-12 uur eerder te zien dat met visuele waarneming. Bij rode rozen is dit verschil waarschijnlijk nog groter vanwege het geringere optische contrast tussen de het aangetaste weefsel en het gezonde weefsel.

Figuur 2.
Kleurenbeeld (links) en PA beeld (rechts) van een aangetaste witte roos.

Er is een goede overeenkomst tussen de plekken met lagere PA en de donkere plekken in het kleurenbeeld. De witte cirkels geven de symptomen aan.



3.2 Metingen roos en gerbera onder praktijkcondities

Signaalkwaliteit van roos en gerbera

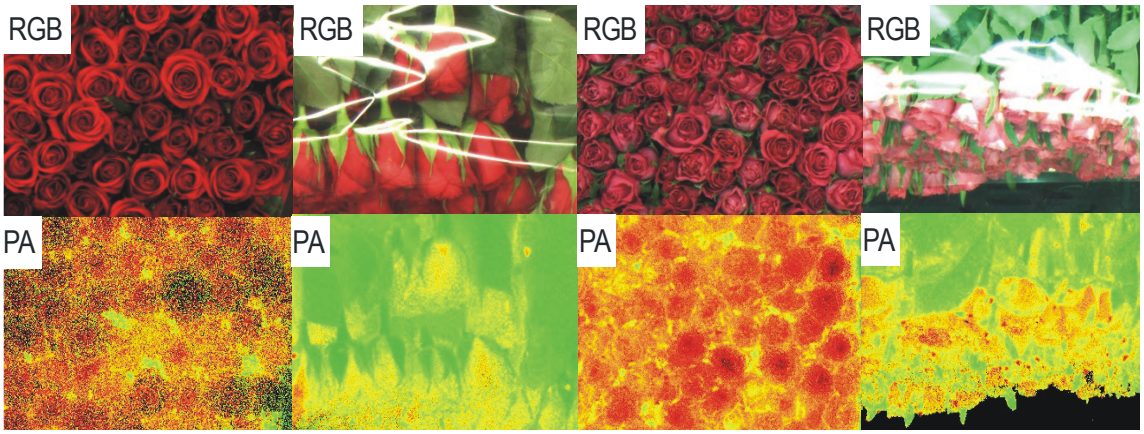
De vraagstelling in dit onderdeel was of de bloemen voldoende bladgroen bevatten om goede fluorescentie opnamen te maken. Van fusten met rozen en gerbera's zijn MIPS opnamen gemaakt. Rozen bevatten voldoende bladgroen en geven dus een PA beeld met een goede signaal-ruisverhouding. Gerbera bloemen geven daarentegen geen goede PA opnamen.

Conclusie

- Gerbera bloemen zijn niet goed te meten door laag bladgroengehalte.

Meetoriëntatie

Het doel van deze metingen was om te bepalen of bossen van opzij of van boven moeten worden gemeten. De beelden in Figuur 3 laten zien dat zowel metingen vanaf de bovenkant als metingen vanaf de zijkant mogelijk zijn. Zelfs een doorzichtige verpakking is geen probleem voor de MIPS. Wel is duidelijk dat bij de opnamen van bovenaf het beeld veel bloem bevat. Bij de opnamen vanaf de zijkant is daarentegen veel blad en stengel te zien en relatief weinig bloem. Bij de beelden van boven valt verder op dat er binnen één bos flinke verschillen bestaan in de PA; deze zijn gerelateerd aan de rijpheid van de bloem.



Figuur 3. *MIPS opnamen van rode en roze rozen (boven: kleurenbeeld; onder beelden PA). De opnamen zijn van bovenaf genomen met de MIPS-Robot. De bossen stonden in het fust of lagen in verpakking op de grond.*

De metingen van de zijkant maken het moeilijk om onderscheid te maken tussen de bloem en het bladgroen. Een tweede argument tegen het meten vanaf de zijkant is dat alleen de bloemen aan de zijkant van het fust worden gemeten; bloemen in het midden van het fust komen niet in beeld. Voordeel van een opname van bovenaf is dat alle bloemen worden afgebeeld, maar ook hier geldt dat een deel van de bloem niet zichtbaar is, n.l. de onderkant. De meting van bovenaf maakt het wel gemakkelijker om de rijpheidsverdeling van een fust te meten.

Conclusie

- Opnamen van bovenaf hebben de voorkeur.

Invloed van temperatuur op de meting

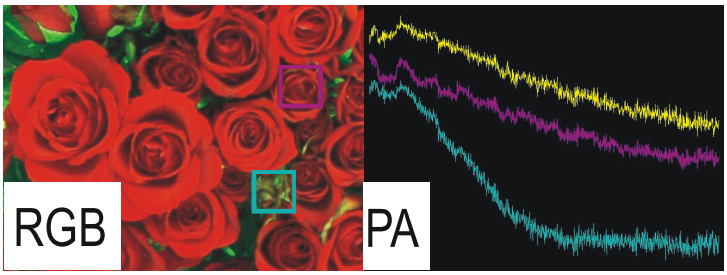
Om de invloed van temperatuur op de fluorescentiemeting te kunnen beoordelen is een experiment opgezet waarbij de een wisselend temperatuursregime is aangelegd. De temperatuur werd stapsgewijs gevarieerd tussen 18 °C en 12 °C. Gedurende het experiment werd met de MIPS de fluorescentie- en kleurbeelden opgenomen.

Conclusie

- De berekende PA blijkt niet of nauwelijks gevoelig voor veranderingen in temperatuur.

Detectie symptomen Botrytis-aantasting in fusten met roos en gerbera

Om na te gaan of detectie van symptomen van Botrytis-infectie met MIPS gemeten kunnen worden zijn rozen en gerbera's in fusten bij een hoge luchtvochtigheid bewaard en zijn gedurende bewaring MIPS opnamen gemaakt om de Botrytis-aantasting te detecteren. Figuur 4 laat zien dat de PA van de rozen in de tijd afneemt.



Figuur 4. *Kleurenfoto (RGB) van een fust met rozen en het tijdsverloop van de PA van alle rozen in beeld (gele lijn) en van twee ROI's over een periode van 100 uur. De PA van de aangetaste roos (blauwe ROI) neemt door de Botrytis-aantasting sneller af dan bij de andere rozen.*

Bij roos is met de MIPS een verandering in PA te meten ter plaatse van de Botrytis-aantasting (zie blauwe ROI). In deze ROI neemt de PA veel sneller af dan in een gezonde roos (groene ROI) en het gemiddelde van het gehele beeld (gele lijn).

Conclusies

1. Botrytis-aantasting veroorzaakt bij roos een snelle en sterke verlaging van de PA.
2. Afrijping/veroudering leidt ook tot een verlaging van de PA, maar dat proces verloopt langzamer dan bij aantasting door Botrytis.
3. Bij gerbera kon geen Botrytis-aantasting worden geïnduceerd.

3.3 Softwarematige herkenning aantasting Botrytis

Botrytis-aantasting verlaagt dus zowel de F_0, de F_M als de PA. Een complicerende factor is dat ook veroudering en rijping de PA verlagen. Omdat Botrytis-aantastingen een lokaal karakter hebben, is gezocht naar die delen van de bloem die een lagere PA hebben ten opzichte van de omgeving.
Voor softwarematige herkenning van Botrytis-aantasting op basis van de fluorescentiemeting werden de metingen eerst handmatig stuk voor stuk geanalyseerd op de drie karakteristieken F_0, F_M en PA:

1. De basale fluorescentie (F_0). F_0 is gerelateerd aan de hoeveelheid bladgroen, de fotosynthese en de fysiologische leeftijd van de bloem.
2. De maximale fluorescentie (F_M). F_M is gerelateerd aan dezelfde factoren als de F_0, maar reageert sterker op beschadiging van het fotosyntheseapparaat.
3. De efficiëntie van de fotosynthese (PA). PA is ongevoelig voor de hoeveelheid bladgroen.

Hiervoor werden 4 software routines ontwikkeld.

- Routine 1. Herkenning plant en bepaling plantoppervlak.
- Routine 2. Discriminatie groene en niet-groene delen plant.
- Routine 3. Automatische drempeling.
- Routine 4. Analyse beeld via 'Regions of Interest'.

Deze routines zijn ingebouwd in een programma waarmee tijdsreeksen gemaakt met MIPS automatisch geanalyseerd worden op Botrytis-aantastingen.

3.4 Optimaliseren criteria voor analyse aantasting

Om de Botrytis-aantasting goed te kunnen herkennen moet de analysesoftware geoptimaliseerd worden aan de hand van rozen met verschillende mate van aantasting. Rozen van twee verschillende telers werden voorafgaand aan de MIPS metingen bij 60% RV in de klimaatkamer bewaard. De helft werd gedurende 24 uur bij 100% RV voorbehandeld om infectie en kieming van sporen te versnellen. Alle bloemen werden vervolgens na de MIPS meting bij 60% RV in uitbloeiruimte bewaard voor het toetsen van de lengte van het vaasleven (zie beschrijving experiment 1 en 2 in deelrapport 'Multiple Imaging of Plant Stress (MIPS): uitbloeiexperimenten' voor experimentele details).

Tabel 1. *Basisfluorescentie (F_0), maximale fluorescentie (Fm) en fotosynthese efficiëntie in het hart van de bloem (PArio) tijdens experiment 1.*
Afkortingen: Bo -, Bo +: rozen aan eind uitbloei niet resp. wel aangetast door Botrytis;
se: standaardfout; PARio: Pa in een gespecificeerd gebied van de bloem, in dit geval ongeveer 1/3 deel van het bloemoppervlak en gesitueerd in het hart van de bloem.

Partij A	Aantal	F_0	se	Fm	se	Pario	se
A 60 (Bo -)	83	681	16	1099	32	37,4	0,9
A 60 (Bo +)	12	630	58	1011	116	32,6	2,7
A 100 (Bo -)	32	550	30	779	56	28,4	1,4
A 100 (Bo+)	64	460	20	652	37	25,0	0,8
Partij B	Aantal	F_0	se	Fm	se	Pario	se
B 60 (Bo -)	25	657	35	987	60	43,5	1,3
B 60 (Bo +)	71	661	20	981	35	39,0	0,9
B 100 (Bo -)	2	597	2	818	4	34,0	0,0
B 100 (Bo+)	94	474	21	615	32	27,5	0,7

Tabel 2. *Resultaten van optimalisering analyse MIPS metingen tijdens experiment 1. Vaasleven is uitgedrukt in dagen. PA; fotosynthese efficiëntie bepaald met fluorescentie; PA<30 percentage pixels in het beeld dat een PA had die lager was dan 30% van de maximale waarde.*

Partij A	Vaasleven	se	PA<30	se	PA>70	se	PA	se
A 60 (Bo -)	13,0	0,3	23,6	1,5	46,1	1,4	46,4	0,7
A 60 (Bo +)	5,8	0,5	29,7	4,7	39,2	3,4	41,0	2,8
A 100 (Bo -)	10,3	0,6	41,2	3,4	32,7	2,6	36,1	1,5
A 100 (Bo+)	4,7	0,2	45,8	2,3	29,5	1,5	34,1	1,0
Partij B	Vaasleven	se	PA<30	se	PA>70		PA	
B 60 (Bo -)	7,4	0,2	13,9	2,2	61,3	3,3	47,1	1,0
B 60 (Bo +)	3,9	0,2	17,7	1,7	56,4	2,2	43,3	0,8
B 100 (Bo -)	6,0	1,0	27,0	1,5	39,8	2,0	38,5	0,5
B 100 (Bo+)	2,1	0,1	49,4	1,8	24,7	1,5	31,6	0,7

Tabel 3. *Correlatie tussen behandeling (RV). Vaasleven en MIPS parameters (PA<30, PA>70, PA, Pario, F_0 en Fm) uit experiment 1.*

	R.V.	Vaasleven	PA<30	PA>70	PA	Pario	F_0	Fm
R.V.	1							
vaasleven	-0,1916	**1**						
PA<30	0,910883	**-0,45**	1					
PA>70	-0,96664	**0,32**	-0,975	1				
PA	-0,90321	**0,5**	-0,957	0,964	1			
Pario	-0,89481	**0,5**	-0,939	0,956	0,997	1		
f0	-0,65433	**0,65**	-0,899	0,784	0,808	0,77	1	
Fm	-0,81025	**0,56**	-0,977	0,908	0,908	0,88	1	1

In experiment 1 werden de volgende aspecten van de MIPS analyse geoptimaliseerd:

- Drempeling PA voor betere correlaties met Botrytis-infectie. De resultaten laten zien dat screening op PA waarden < 40% de beste diagnose voor Botrytis-infectie geeft.
- Fluorescentieparameters F_M en F_0. Deze parameters blijken met name een rol te spelen bij het openen van de bloem. Dan stijgt met name de F_0 in het hart van de bloem sterk en kan interfereren met de detectie van Botrytis.

Tabel 1 vat de resultaten van meetserie 1 samen. Partijen A en B waren erg verschillend in kwaliteit. Partij B was sterk besmet. Na een behandeling van 1 dag bij 100% RV bleken in de uitbloeiruimte 94 van de 96 bloemen zichtbaar besmet met Botrytis. Ook van de bloemen in partij B die bij een RV van 60%, bleken 71 van de 96 bloemen besmet. De rozen die geïnfecteerd waren met Botrytis hadden een statistisch significant lagere F0 en FM. De verschillen tussen wel en niet aangetaste rozen zijn het grootst na een periode met hoge luchtvochtigheid. Door de behandeling met 100% RV wordt zowel de F0 als de FM verlaagd, los van infectie door Botrytis.
Er werd op 2 manieren gedrempeld: Pa < 30 (maat voor aangetast deel bloem) en Pa >70 (maat voor gezond deel bloem). Beide parameters laten een trend zien in de relatie tussen de geconstateerde Botrytis-infectie (kort vaasleven) zien die in overeenstemming is met de verwachting (Tabel 2), maar de correlaties zijn niet significant binnen de hele partij (Tabel 3). De parameters kunnen ieder slechts voor een deel de waargenomen variatie in het vaasleven verklaren.

Het vaasleven wordt meer dan gehalveerd door de Botrytis-infectie. Ook de behandeling van 24 uur bij hoge RV heeft een desastreuze invloed op het vaasleven zonder dat er sprake is van Botrytis-infectie. Mogelijk hebben beide fenomenen met elkaar te maken omdat er in beide gevallen een duidelijke toename van Pa<30 en een afname van het vaasleven is geconstateerd.

Conclusies optimalisering analysecriteria

- Er is een set analysecriteria ontwikkeld die een correlatie toont tussen MIPS parameters en Botrytis-infectie binnen een behandeling, maar niet over de behandelingen heen.
- Er is een matige correlatie tussen het vaasleven (algemeen bepaald over de behandelingen heen) en MIPS parameters (PA, FM en F0).
- Hoewel F0 en FM tenminste even goede correlaties met Botrytis-aantasting en vaasleven hebben als PA waarden, gaat de voorkeur voor verdere analyse toch uit naar de PA. Dit omdat de PA een relatieve waarde is die veel minder afhankelijk van storende factoren en verschillen in achtergrondconcentraties van chlorofyl in het object.
- Hoge RV heeft een nadelig effect op vaasleven en MIPS parameters (PA, FM en F0), onafhankelijk of er Botrytis-aantasting geconstateerd is.

3.5 Automatiseren van beeldanalyse van tijdreeksen

Voor het verwerken van de beelden van individuele rozen is software geschreven die automatisch een gebied met lage PA in het beeld kan detecteren. In het hart van de roos kan de PA snel afnemen. Dit is geen Botrytis-aantasting maar het gevolg van natuurlijke afrijping en het openen van de bloem waardoor de bloembodem zichtbaar wordt. Door het hart van de bloem niet mee te nemen in de analyse wordt deze complicatie vermeden. Een tweede kenmerk is dat de aantasting (gebied met lage PA) een zekere grootte moet hebben. Afname in PA gebeurt ook t.g.v. de afrijping van de hele bloem, maar dit is te zien in het beeld als een soort van 'ruis'. Deze pixels waarvan de PA afneemt, vormen geen aanééngesloten gebied, maar zijn willekeurig verdeeld over de roos.
De resultaten van de analyse van de MIPS metingen op basis van deze methode zijn vergeleken met de resultaten van de uitbloeiproeven die door A&F zijn uitgevoerd (deelrapport). De uitkomst is weergegeven in Tabel 4.

Tabel 4. Matching van automatische herkenning met MIPS en de visuele beoordeling Botrytis in de uitbloeiproeven.

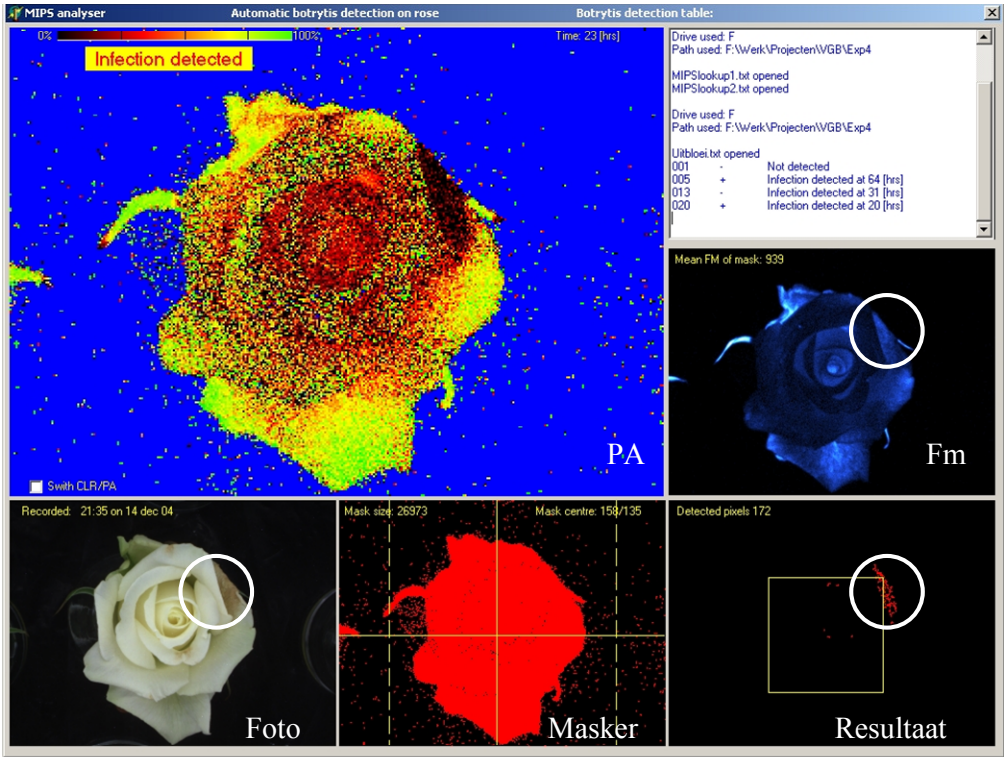
	MIPS vs uitbloeiproef		MIPS vs foto
	Matching	Matching (gecorrigeerd*)	Matching
Exp. I	64%	69%	98%
Exp. II	60%	63%	100%
Exp. III	78%	82%	100%
Exp. IV	73%	75%	100%

* *De MIPS software detecteerde Botrytis-aantastingen die niet in de uitbloeiproef gezien werden maar wel duidelijk op de MIPS kleurenfoto zichtbaar waren. In deze gevallen is aangenomen dat de aantasting wel plaatsgevonden heeft, maar over het hoofd gezien is bij de beoordeling in de uitbloeiproef.*

Tabel 4 laat zien dat een directe vergelijking al een redelijke matching (60%-68%) oplevert. Na analyse van de MIPS resultaten bleek dat er in een aantal gevallen duidelijk sprake was van aantastingen die wel met de MIPS te zien waren maar niet als infectie naar voren kwamen in de uitbloeiproef. Correctie voor deze gevallen levert een betere matching op (69%-82%).

De relatief slechte matching wordt niet veroorzaakt door limitaties van de MIPS, maar is een gevolg van de gekozen proefopzet:

- MIPS meting van bovenaf
  Hierdoor zijn aantastingen aan onder- en zijkant van de bloem niet gedetecteerd met de MIPS maar wel in de uitbloeiproef. In deze vergelijkingen is echter nog geen rekening gehouden met het feit dat in de uitbloeiproef alle zijden van de bloem meegenomen worden bij de visuele beoordeling. Daarom is gekeken in hoeverre de automatische analyse overeenkomt met een visuele beoordeling van de bloem op basis van de (met de MIPS) genomen kleurenfoto's. Hiermee wordt een iets eerlijker vergelijking mogelijk tussen visuele beoordeling en een automatische beoordeling met MIPS. Tabel 4 (rechter kolom) laat zien dat er dan een nagenoeg perfecte match is (98%-100%). Dat betekent dat met een MIPS meting van alle kanten de Botrytis-aantasting met grote mate van zekerheid vastgesteld kan worden.
- Correlatie met uitbloeiproef na afloop
  De MIPS metingen zijn in de eerste 72 uur na aanlevering uitgevoerd. De eerste infecties werden na 18 uur vastgesteld, maar ook tussen 48 en 72 uur werden nog nieuwe infecties waargenomen. Het is dus waarschijnlijk dat ook na 72 uur nog nieuwe infecties ontstaan zijn die niet in de MIPS analyse maar wel in de visuele beoordeling in de uitbloeiproef gevonden zijn.



Figuur 5. *Screenshot van het programma MIPS analyser voor de automatische herkenning van Botrytis-aantasting bij Bianca rozen. In de vensters Fm, Foto, en Resultaat is de Botrytis-aantasting omcirkeld. Het vensterresultaat geeft de pixels in rood die herkend worden als Botrytis-aantasting.*

Van één reeks metingen is een demo gemaakt om een indruk te geven van het analyseprogramma. Deze software berekent, zoals als hierboven aangegeven, automatisch de Botrytis-aantasting en geeft dit weer in een tabel met de tijd waarop de Botrytis-aantasting geconstateerd is. In de tabel staat eveneens een '+' ('-') voor (g)een Botrytis-aantasting gevonden in de uitbloeiproef. Dit programma is verkrijgbaar bij Plant Research International als een executable op een USB-stick.

3.6 Discussie

Vroege detectie van Botrytis-infectie

Er is een technisch protocol opgeleverd waarmee de MIPS Botrytis-aantasting bij partijen rozen objectief en kan kwantitatief kan bepalen. De methode detecteert de aantasting en niet de infectie zelf, zoals bij phytophthora in aardappel (Van Os *et al.*, 2007) en Xanthomonas in kool (Polder *et al.*, 2006) waar de PA beïnvloed wordt voordat er zichtbare symptomen. De Botrytis-aantasting wordt dus in een vergelijkbaar of iets eerder stadium waargenomen als het menselijke oog. De op chlorofylfluorescentie gebaseerde MIPS methode biedt dus weliswaar perspectieven voor praktische toepassing, maar niet voor vroege detectie van Botrytis. Deze conclusie wordt bevestigd in een recent onderzoek naar houdbaarheid van rozen (Ammerlaan, 2007).

Detectie van Botrytis-aantasting

Uit het onderzoek blijkt dat Botrytis-aantasting zowel vanaf de zijkant als vanaf de bovenkant van de bloem gemeten kan worden. Voor bossen of partijen moet vanaf de bovenzijde gemeten worden om iedere roos in beeld te krijgen en geen aantasting te missen. Voor uitbloeiproeven waarbij de rozen individueel worden beoordeeld is automatische beoordeling op Botrytis-aantasting goed bruikbaar. De MIPS kan dan latentietijd en snelheid van uitgroei kwantificeren. De snelheid van de meting is bij de gebruikte versie van de MIPS nog te beperkt, maar inmiddels is een nieuwe versie in ontwikkeling die de meting een factor 60-100x sneller uitvoert.

Correlatie met uitbloeiproeven

De behandeling met een hoge RV stimuleert niet alleen het kiemen van de sporen, maar beïnvloedt ook het natuurlijke rijpingsproces. Het natuurlijke rijpingsproces van een bloem wordt gekenmerkt door een langzame afname van de efficiëntie van de fotosynthese en van de fluorescentie (zie Figuur 4). Tabel 3 laat duidelijk zien dat RV behandeling tot een verlaging van de efficiëntie van de fotosynthese (PA) en de fluorescentie (F0 en FM) leidt (sterke, negatieve correlatie). Dat wijst op een versnelde rijping onder hoge RV en verzwakking van de weerstand tegen Botrytis-infectie.
Omdat MIPS niet de infectie zelf maar wel de aantasting meet, was mogelijk een groot deel van de bloemen ten tijde van de MIPS meting wel geïnfecteerd maar nog niet aangetast. De MIPS diagnose voorspelt dan, net als een visuele beoordeling, een veel langer vaasleven dan in de uitbloei gemeten wordt.

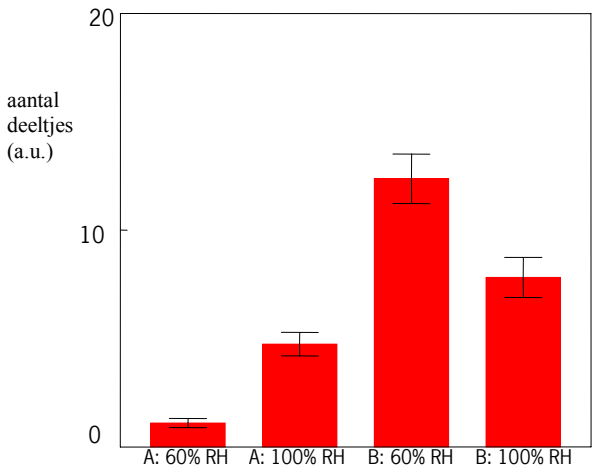
4. Flowcytometrie

4.1 Procedure

Rozen die door A&F bij verschillende RV behandelingen in de uitbloeiruimtes werden bewaard, werden in een kleine hoeveelheid buffer afgespoeld. Deze spoelvloeistof werd vervolgens afgedraaid in een centrifuge en het pellet werd geresuspendeerd in een klein volume verse buffer en vervolgens overgebracht naar een nieuwe buis. Aan iedere buis werd daarna SYTO9 (vitale merker) en PI (niet vitale merker) toegevoegd. Na een korte incubatie bij kamertemperatuur werden de monsters gemeten. In de eerste series proeven werden alleen de aantallen vitale cellen gebruikt voor het bepalen van de kwaliteit van de bloem.

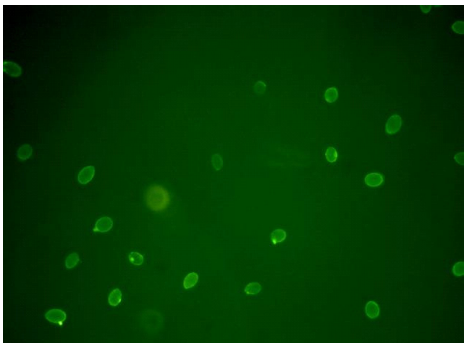
4.2 Resultaten

De verkregen resultaten in het eerste deel van dit onderzoek laten zien dat er correlatie is tussen het percentage Botrytis-aantasting in de uitbloeiproef en de aantallen deeltjes bepaald met de flowcytometer (Figuur 6).

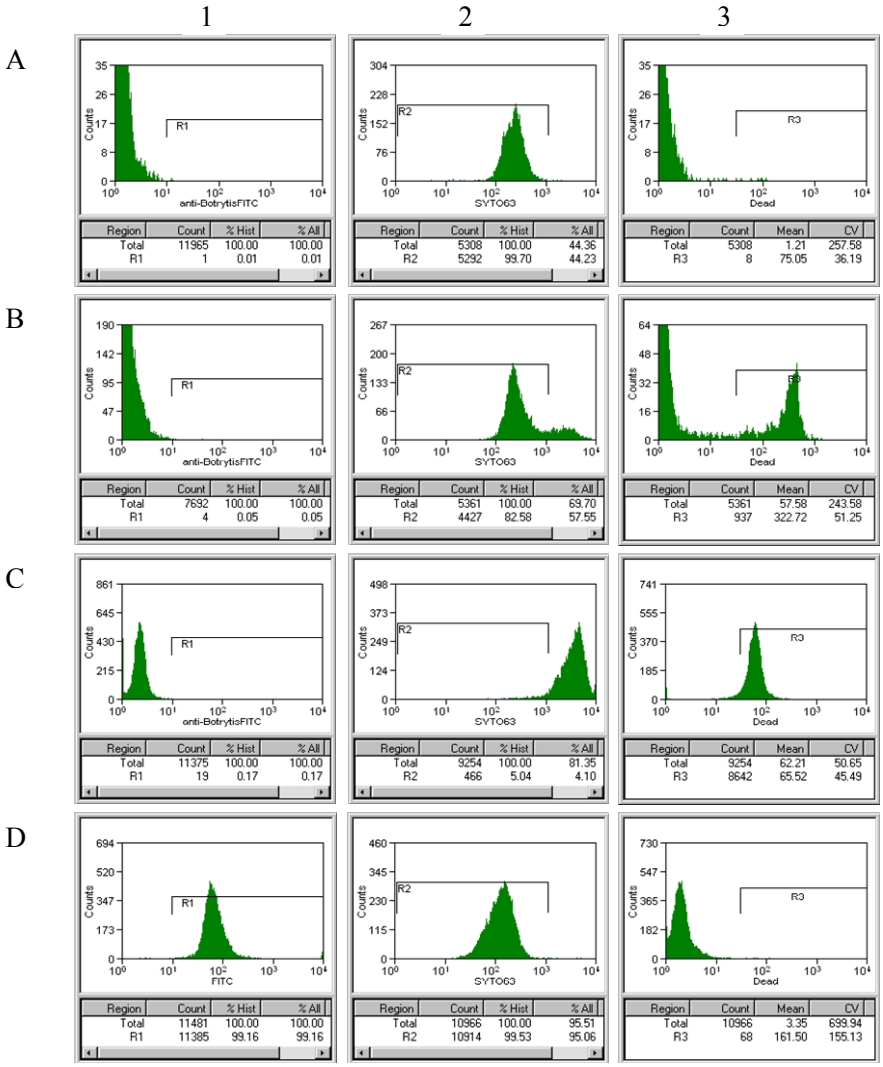


Figuur 6.
Vergelijk micro-organismen populaties op rozenpartijen na incubatie in een uitbloeikamer bij verschillende relatieve luchtvochtigheid.

Er kon in dit eerste deel van de metingen geen verband gelegd worden met aantallen Botrytis-deeltjes omdat er nog geen antilichamen beschikbaar waren. Omdat er wel een verband is met de geconstateerde Botrytis-aantasting tijdens de uitbloeiproeven, is het niet nodig om wat betreft de houdbaarheid nog specifiek op Botrytis te controleren. Als die controle op Botrytis toch noodzakelijk is dan kan dat m.b.v. immunofluorescentie (Figuur 7) of immunoflowcytometrie worden gedaan (Figuur 8). Daarnaast blijft het de vraag wanneer er gecontroleerd moet worden, flowcytometrie kan goed worden gebruikt als het te meten materiaal al in suspensie is of gemakkelijk automatisch in suspensie gebracht kan worden, bijv. fust- of vaaswater en luchtmonsters die m.b.v. een cyclotron worden genomen.



Figuur 7.
Botrytis cinerea sporen zichtbaar gemaakt met fluorescente antilichamen.

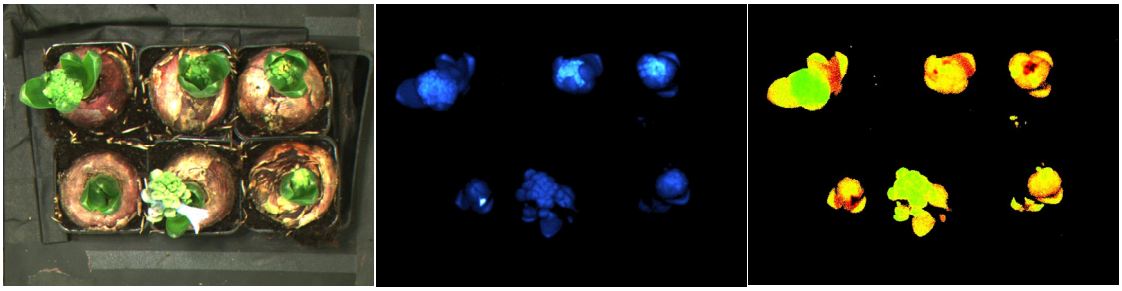


Figuur 8. *Detectie van Botrytis-sporen met behulp van flowcytometrie.*
Kolom 1: antilichaam signaal, kolom 2: SYTO63 signaal (vitaal) en kolom 3: PI signaal (dood).
Histogrammen A1-3; kleuring van vitale sporen met SYTO63 (A2) en PI (A3), er is hier geen antilichaam toegevoegd (A1).
Histogrammen B1-3; kleuring van intermediaire sporen met SYTO63 (B2) en PI (B3), er is hier geen antilichaam toegevoegd (B1).
Histogrammen C1-3; kleuring van dode sporen met SYTO63 (C2) en PI (C3), er is hier geen antilichaam toegevoegd (C1).
Histogrammen D1-3; kleuring van vitale sporen met SYTO63 (D2) en PI (D3), er is hier antilichaam toegevoegd (D1), en er is een duidelijk positief signaal zichtbaar. SYTO63 lijkt in dode sporen een sterker signaal te geven dan in levende sporen, maar door het ontbreken van een PI positief signaal van vitale sporen is dit geen probleem.

5. Hyacint

Detectie van verdroogde nagels

Een partij van 144 witte en blauwe hyacinten is onderverdeeld in 24 bakjes van 6 hyacinten. Van ieder bakje werden 8 opnamen gemaakt over een periode van 11 dagen. Verdroogde nagels zijn met de MIPS te herkennen aan hun lage PA. In de opnamen van de PA is dit waar te nemen als een klein zwart vlekje; in de F_0 en F_M opnamen is op diezelfde positie de intensiteit van de fluorescentie hoog (Figuur 9).



Figuur 9. *Van links naar rechts: kleuren-, fluorescentie- (F0) en PA beelden van 6 hyacinten op 270 uur na de start van het experiment. Bij de bollen in de witte cirkels zijn verdroogde nagels geconstateerd.*

Van elke bol is aan het eind van het experiment bepaald hoeveel verdroogde nagels er waren. De resultaten staan in Tabel 5.

Tabel 5. *Aanwezigheid verdroogde nagels bij hyacint in experiment 2004.*

	Blauwe hyacint		Witte hyacint	
	Partij 25-12 # verdroogde nagels/bol	Partij 25-13 # verdroogde nagels/bol	Partij 25-15 # verdroogde nagels/bol	Partij 25-16 # verdroogde nagels/bol
Totaal	324	10	60	22
Average	9,3	0,3	2,3	0,5
Stdev	8,7	1,4	4,5	1,6

6. Referenties

Ammerlaan, W.P.J., 2007.
The effects of cooling temperature and period on infection of rose petals by *Botrytis cinerea* measured by chlorophyll fluorescence imaging. Afstudeerverslag Tuinbouwproductieketens, Wageningen UR.

Os, E. van, J. Hemming, J. van de Zande & J.F.H. Snel, 2007.
Met nieuwe detectiemiddelen minder spuiten. Onder glas 3 (maart 2007): 60-61.

Polder, G., G.W.A.M. van der Heijden, H. Jalink & J.F.H. Snel, 2006.
Correcting and matching time sequence images of plant leaves using Penalized Likelihood Warping and Robust Point Matching. Computers and Electronics in Agriculture 55 (1): 1 - 15.