

Praktijkproef ziekzoekkar

Geautomatiseerde (machinale) detectie van tulpenvirus in het open veld
2009

Joop van Doorn, Gerrit Polder, Gerie van der Heijden en Ton Baltissen

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit
PPO nr. 3236085800/PT 13638
Lisse, mei 2010

© 2010 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Alle intellectuele eigendomsrechten en auteursrechten op de inhoud van dit document behoren uitsluitend toe aan de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO). Elke openbaarmaking, reproductie, verspreiding en/of ongeoorloofd gebruik van de informatie beschreven in dit document is niet toegestaan zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Deelnemende kwekers en bedrijven
S.Schouten en Zn
Karel Bolbloemen BV
Fa. Th. Apeldoorn
Horizon Flowers
Leek bloembollen
Boon Bloembollen
G. Oud
Poel Bloembollen
Wit Flowerbulbs
Agrifirm B.V.
Agro Syntens

Deelnemende bedrijven



Ministerie van Landbouw, Natuur en
Voedselkwaliteit



PPO - Projectnummer: 32 360858 00

PT - Projectnummer: 13638

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit

Adres : Prof. van SLogterenweg 2, Lisse
Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252-462111

Fax : 0252-462100

E-mail : infobollen.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
1.1 Algemeen.....	7
1.2 Plan van aanpak	8
2 MATERIALEN EN METHODEN.....	11
2.1 Inleiding	11
2.2 Ziekzoekrobot: prototype	11
2.3 Proefveld	13
2.4 Proefveldopzet	13
2.5 Materialen en methoden	13
2.6 Beeldanalyse	15
3 RESULTATEN EN CONCLUSIES.....	17
3.1 ELISA-waarden.....	17
3.2 Ziekzoeken.....	17
3.3 Beeldanalyse	19
4 DISCUSSIE	23
5 OUTPUT	27
5.1 Begeleidingscommissievergaderingen	27
5.2 Communicatie	28
6 LITERATUUR.....	29
BIJLAGE 1. RUWE DATASET	31
BIJLAGE 2. COMMUNICATIE.....	33
BIJLAGE 3. COMMUNICATIE.....	35
BIJLAGE 4. POSTER KENNISDAG PPO 2009	37
BIJLAGE 5. VAKBLADARTIKEL ZIEKZOEKEN 2009	39

Samenvatting

Tulpenmozaïekvirus (tulip breaking virus - TBV) veroorzaakt jaarlijks veel economische schade in tulpen. Vooral in witte en gele tulpencultivars is de afkeur groot, daar hier de symptomen moeilijk zichtbaar zijn en de benodigde visuele expertise om de subtiele virusbeelden te zien nog maar beperkt aanwezig is bij de tulpentelers.

In een laboratoriumproef in 2008 ("geautomatiseerd ziekzoeken", PT12997; 2008) bleek een geavanceerde kleurencamera perspectief te bieden om betrouwbaar virussymptomen in tulp, veroorzaakt door TBV, op te sporen. De resultaten in het laboratorium waren vergelijkbaar met de visuele beoordeling door een expert. Dit heeft geleid tot een vervolproject in 2009 waarbij een proef met TBV-geïnfekteerde tulpen in het open veld is uitgevoerd.

Het doel van dit project was, om te zien of een rijdend camerasysteem de menselijke ziekzoeker kan vervangen. Hiertoe is een "ziekzoekrobot" ontwikkeld: een rijdend platform voorzien van een speciaal camerasysteem met filterwiel en verlichting. Deze werd ingezet in een aangepaste veldproef met planten, bestaande uit viruszieke tulpencultivars. De tulpen werden aan het einde van het groeiseizoen met een serologische toets (ELISA) geanalyseerd om te bepalen of individuele tulpen daadwerkelijk virusgeïnfecteerd waren.

Voor deze veldproef werden de cultivars Monte Carlo, Yokohama en Barcelona met een viruspercentage variërend van 14 tot 20% in het najaar van 2008 geplant op een dichtheid van 25 bollen per vierkante meter. In het vroege voorjaar zijn deze per tulp voorzien van een label met een z.g. QR-code. Met deze plant-specifieke code konden planten, via computeranalyse van de fotobeelden, op nummer geïdentificeerd worden.

Het prototype ziekzoekrobot is ontwikkeld door PRI Biometris. In de zoveel mogelijk lichtdichtgemaakte kar is een speciale kleurencamera met filtersysteem gemonteerd, waarmee per 30 cm 6 opnames met halogeen- en/of flitslicht werden gemaakt van de gelabelde tulpen. Bovendien werden de opnames gemaakt onder een hoek van 45° en 90° voor optimale analyse van de virussymptomen op de planten. Deze opnames werden opgeslagen op een laptop in de ziekzoekrobot. Verkregen beeldmateriaal werd voor gedetailleerde digitale analyse verstuurd naar WUR-Biometris.

De tulpen uit het proefveld zijn tevens op verschillende tijdstippen visueel beoordeeld door zes ziekzoekers, die de nummers van de virusverdachte tulpen noteerden. Nadat het maken van de beeldopnames met de ziekzoekrobot gestopt waren, zijn in mei bladmonsters genomen van de tulpen van het proefveld. Deze zijn vervolgens met behulp van ELISA getoetst op TBV.

De inzet van de ziekzoekkar zorgde voor de nodige publiciteit; twee regionale TV-zenders en kranten stuurden hun verslaggevers voor meer informatie.

Gedurende 3-4 weken zijn er metingen uitgevoerd. Door technische beperkingen vergden de metingen veel tijd; zo moesten er per tulp per meetmoment 8 opnames gemaakt worden.

De gegevens van de bladtoets van de drie cultivars en de bevindingen van de ziekzoekers zijn met elkaar vergeleken. Gebleken is dat, met de serologische toetsing op TBV (ELISA) als absolute referentie, de ziekzoekers gesommeerd in de tijd 59% van de zieke tulpen wisten te identificeren. Voor de ziekzoekkar kon dit totaal percentage vanwege technische opstartproblemen niet worden bepaald.

De digitale beeldanalyse heeft zich geconcentreerd op de cultivar Barcelona, daar hier de beste opnames van gemaakt zijn. Het camerasysteem/softwarestelsel wist ongeveer 25% van de virusbesmette tulpen aan te tonen ten opzichte van 39% door de ziekzoeker, bij gelijktijdige opname in het veld. De beeldanalyse is gebaseerd op de methode die in 2008 in het laboratorium is ontwikkeld.

Hoewel in een aantal gevallen viruszieke planten konden worden gevonden, voldeden de resultaten van 2009 in het open veld niet aan de verwachting. Dit heeft mede te maken met tekortkomingen in het beeldopname-systeem in 2009, zoals leklicht. Verdere analyses van het beeldmateriaal zijn in overleg met de begeleidingscommissie stopgezet. Op basis van de behaalde resultaten wordt voorgesteld de proef te herhalen in 2010 met aanpassingen in het opnamesysteem, functionaliteit van de kar en verbeteringen op proefveldniveau.

1 Inleiding

1.1 Algemeen

De virusproblematiek is een chronisch probleem binnen de teelt en export van bloembollen in Nederland. Zeker de tulp, het belangrijkste exportbolgewas, wordt belaagd door een scala aan virussen. Er zijn een aantal virusziekten, zoals Tabaksnecrosevirus, Tulpengrijsvirus, Komkommermozaïekvirus, Tabaksratelvirus en Tulpenvirus X (Tabel 1) die schade veroorzaken, maar ook de export kunnen beperken. Vooral Japan stelt strenge eisen. Het Tulpenmozaïekvirus (TBV) is vanouds een van de grootste problemen.

Tabel 1. Virussoorten in tulp (Gegevens BKD, 2009)

virus	afkorting	Exporteisen (Japan)	opmerkingen
Tulpenmozaïekvirus	TBV		Relatief veel voorkomend
Tulp virus X	TVX		Kan symptoomloos voorkomen
Augustaziek	TNV		Via schimmel verspreid
Tabaksratelvirus	TRV		Via nematoden verspreid
Tabakskringvlekkenvirus	TRSV	0 % tolerantie	
Arabismozaïekvirus	ArMV		Via nematode verspreid
Symptoomloos Lelie Virus	LSV		
Komkommer Mozaïek Virus	CMV		Ook in andere gewassen
Grijsvirus	TSMV	0 % tolerantie	

Om deze virusproblemen in de hand te houden is een goede keuring van partijen bollen belangrijk. Door slechte partijen niet meer te telen kan het viruspercentage verlaagd worden. Toch blijft het (visueel) beoordelen van grote arealen tulp noodzakelijk, omdat het niet mogelijk is, om al het plantgoed te toetsen. Dit beoordelen van opgeplante tulpen in het open veld blijft een taak voor ervaren ziekzoekers. Deze zijn schaars; een alternatieve opsporing zonder menselijke tussenkomst is wenselijk. Het idee om hier de automatisering en beeldtechnieken voor in te zetten is jaren gelden geboren en vorm gegeven door de tulpenteler Piet Apeldoorn.

Probleemstelling

De teelt van tulpen kampt met aantasting door verschillende virussen, met name door het mozaïekvirus (Tulip Breaking Virus of TBV). Virusaantasting uit zich in de vorm van strepen, vlekken in het blad en kleurafwijkingen in de bloemen. De aanwezigheid van het virus in de tulpenbol verlaagt de opbrengst en de kwaliteit en is een belemmering voor de export. Bij een hoge besmetting (2 % of meer) worden hele partijen afgekeurd.

Momenteel inspecteren ervaren ziekzoekers de tulpenpercelen en verwijderen zieke planten. Dit is vermoeiend, arbeidsintensief en daardoor duur. De handmatige selectie van zieke tulpenplanten kost naar schatting jaarlijks meer dan 9 miljoen Euro. Bovendien is de vereiste expertise niet of nauwelijks meer voorhanden: dit vereist ervaring en zorgvuldigheid. Daarnaast worden niet alle viruszieke planten herkend en blijven dus op het veld staan.

Er is ook een milieutechnische reden. Om de verspreiding van het virus gedurende het teeltseizoen tegen te gaan, vindt er een intensieve chemische bestrijding van luizen plaats.

Zeker door de toenemende bezorgdheid om het gebruik van bepaalde middelen, is een milieuvriendelijke wijze van ziekzoeken een aantrekkelijk alternatief.

Het is dus om economische, arbeidstechnische én milieukundige redenen gewenst virusaantasting zoveel mogelijk te voorkomen.

In het verleden zijn diverse studies uitgevoerd naar mogelijke oplossingen (o.a. AKC, haalbaarheidstudie 2003). Uit deze studies is naar voren gekomen dat de meest haalbare oplossing gebaseerd is op beeldvormende spectroscopie en mogelijk fluorescentie technieken. Moleculaire technieken zijn niet haalbaar binnen de gewenste omvang en analysesnelheid van het vinden van zieke planten.

In 2008 is een uitgebreid haalbaarheidsonderzoek uitgevoerd om op laboratoriumniveau visuele, serologische en optische technieken te vergelijken, om zo het tulpenmozaïekvirus (TBV) in een drietal cultivars van tulp te onderscheiden. Het onderzoek werd uitgevoerd op gele genotypen, daar vooral in witte en gele tulpen symptomen als gevolg van virusaantasting, lastig te zien zijn, ook door ervaren ziekzoekers. In een eerste fase zijn diverse technieken op hun geschiktheid vergeleken. In de tweede fase zijn de vier meest kansrijke technieken in een proef vergeleken op nauwkeurigheid en haalbaarheid. In deze proef zijn drie rassen met een hoge graad van besmetting gebruikt, die speciaal hiervoor zijn opgekweekt in aparte bakken. De gehanteerde technieken zijn: beeldvormende spectroscopie (in golflengtegebied 430-900 nm), RGB-beeldverwerking (vorm plant en patronen op bladeren), spectroscopie (golflengtegebied 350-2500 nm) en chlorofyl-fluorescentie.

Het onderscheidend vermogen van deze technieken is vergeleken met visuele beoordelingen door experts en geverifieerd met een ELISA-toets.

De resultaten met deze technieken waren veelbelovend. Uit deze laboratoriumstudie (PT12997, 2008) is gebleken, dat een kleurencamera, voorzien van speciale filters, symptomen goed kan waarnemen. In cultivar Yokohama scoorde de camerawaarneming even goed als de ziekzoeker.

Afhankelijk van het ras wordt 80-90% van de zieke planten opgespoord. Dit percentage kan mogelijk nog verbeterd worden door verfijningen in de opnamemethode en de software.

Op grond hiervan heeft de begeleidingscommissie, bestaande uit o.a. tulpentelers, voorgesteld om een veldexperiment te starten. Hiervoor zou dan een prototype ziekzoekrobot met camerasysteem ontwikkeld en gebouwd moeten worden, die bedden met zieke en gezonde tulpen zou moeten analyseren.

Doelstelling.

Voor 2009 is de doelstelling beperkt tot fase 1: de ontwikkeling van een in het veld werkend detectiesysteem. In deze fase wordt een eenvoudige constructie ontwikkeld waarmee in het veld (handmatig) beeldopnames kunnen worden gemaakt. Het systeem moet ontwikkeld en getraind worden op beelden met gezond en door virus aangetast plantmateriaal met al zijn variaties. Analyse van de beelden zal achteraf plaatsvinden.

Fase 2 bestaat uit het ontwikkelen van een systeem dat virusverdachte tulpen kan merken, afdoden of verwijderen. Deze fase is voorzien vanaf 2011.

1.2 Plan van aanpak

- A. Bouw prototype ziekzoekkar: bouw in januari en februari 2009 door PRI. Het is een handmatig te bedienen kar, voorzien van een geschikte camera met een filterwiel met 6 kleurfilters, belichtingssysteem (halogeen, flitslicht) en computersysteem, die handmatig door een onderzoeksveld (tulpen met virus) geduwd kan worden. Rekening is gehouden met variabele spoorbreedte vanwege het voorkomen van verschillende bedbreedtes. Uiteindelijk is deze variabele spoorbreedte niet gebruikt. De data (fotobeelden) worden verzameld op een laptop in de ziekzoekkar, gevoed door een batterij, voor latere analyse.
- B. Opplant viruszieke tulpen: van 3 tulpencultivars (Monte Carlo, Barcelona, Yokohama) zijn 1000 bollen geplant op dubbele plantafstand. Ook zouden er een of meerdere praktijkpercelen met lage percentages TBV worden getraceerd (i.s.m. de BKD) voor ziekzoekexperimenten. Door gebrek aan tijd (snelle opkomst van de tulpen vanwege een warme periode in het voorjaar van 2009) zijn deze praktijkvelden niet gebruikt voor een experiment.

De opgekomen tulpen zijn door een aantal ervaren ziekzoekers beoordeeld, waarna (en tussendoor) de ziekzoekkar de waarnemingen heeft uitgevoerd. De gemerkte bollen zijn middels ELISA (bladtoets) op TBV beoordeeld en bewaard voor eventuele aanvullende toetsen (andere virussen, RT-PCR).

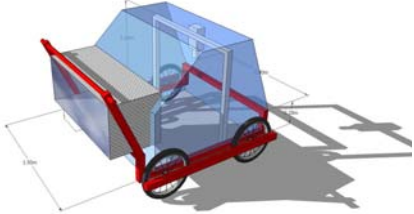
- C. De verkregen data zijn verwerkt (visuele beoordeling, ELISA-beoordeling, beeldanalyse beoordeling) en besproken met de begeleidingsgroep.

2 Materialen en Methoden

2.1 Inleiding

De opzet van het veldexperiment met de ziekezoekkar viel uiteen in drie delen: de bouw van een ziekezoekrobot, aanleg van een proefveld en het uitvoeren van de metingen. De ziekezoekrobot werd voorzien van camera en belichting zodanig, dat van bovenaf (90°) en onder een hoek van 45° opnames gemaakt konden worden bij verschillende filterstanden en twee belichtingstypen.

In de figuren 1A, 1B en 1C wordt de ontwikkeling van de ziekezoekkar en een detail getoond.

			
Fig. 1A. Ontwerp ziekezoekkar	Fig. 1B. Accu, regelkast, computer en laptopscherm	Fig. 1C. Ziekezoekkar	

2.2 Ziekezoekrobot: prototype

Ziekezoekkar

Er is een mobiel systeem ontworpen (de ziekezoekkar, Fig. 1A)) dat met de hand over de tulpenbedden geduwd kan worden (Fig. 1). De breedte van de kar was 1.50 meter, aangepast op de breedte van de proefvelden in Lisse. Om de kar ook geschikt te maken voor praktijkbedden van 1.80 meter werd een uitschuifconstructie gemaakt voor de wielen. Het camerasysteem werd gemonteerd op een scharnierende arm, zodat zowel onder 45 graden als 90 graden opnames gemaakt konden worden. Het opnamegedeelte van de kar werd overtrokken met lichtdicht zeildoek (Fig. 1C), om zodoende invloed van buitenlicht te voorkomen. Aan de voor- en achterkant van de kar kon het zeildoek opgehaald worden, om op die manier ruimte te geven voor de tulpenplanten. In de praktijk bleek dat er veel leklicht onder de kar doorkwam; dit is opgelost door de onderkant van de kar extra af te schermen met zwart landbouwplastic.

Onder de duwboom werd een kast met computer, besturingselektronica en accu gemonteerd (Fig. 1B).

Camerasysteem

Uit een eerdere fase van het onderzoek in het laboratorium was gebleken, dat de meeste informatie in het zichtbare licht (380 tot 780 nm) zit. Dit betekent dat er geen dure infrarood camera nodig is in het systeem. Een 'zwart-wit' infrarood camera is erg duur (>30 K€) en een spectrale uitvoering van een infrarood camera is nog duurder.

Ook was uit de laboratoriumproef gebleken, dat een spectraal camera in het zichtbare licht beter onderscheid vindt tussen zieke en gezonde tulpen dan een gewone kleurencamera. De spectraal camera in het laboratorium was echter gebaseerd op een lijnscan-principe, dat niet geschikt is voor het open veld. Daarom zijn enkele alternatieve spectrale cameratechnieken onderzocht en getest. Elk systeem had zijn eigen voor- en nadelen met betrekking tot mogelijkheden, complexiteit en prijs. Het bleek heel moeilijk te

zijn om een goed systeem te vinden wat robuust genoeg is, om in het veld te gebruiken en bovendien betaalbaar is.

Ten opzichte van een kleurencamera heeft een spectraal camera meer banden dan alleen de drie standaard kleuren (rood, groen en blauw). Hoeveel meer hangt af van het gebruikte principe. In Fig. 2 staat ter verduidelijking een voorbeeld van een spectraal beeld met 15 banden van 400 nm tot 700 nm (blauw-rood).

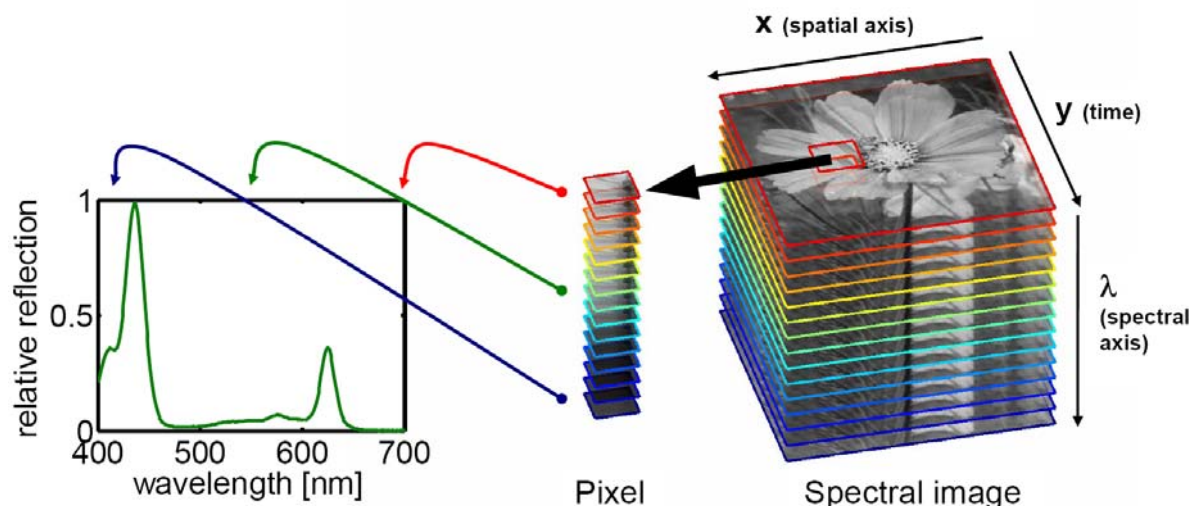


Fig. 2. Voorbeeld van een multispectraal beeld.

Uiteindelijk is gekozen voor een camera met een filterwielconstructie. Met behulp van een smalbandfilter voor de lens van een camera kan een klein gedeelte van het licht spectrum worden geselecteerd. Een filterwiel is een constructie, waarbij meerdere van deze filters, één voor één voor de lens kunnen worden geplaatst. Dit geeft een flexibele configuratie; echter, deze oplossing is relatief traag en weinig robuust. Bovendien zijn de individuele beelden door verschillende lichtbreking in de filters ten opzichte van elkaar verschoven.

Voor de proef van 2009 is de ziekzoekkar uitgerust met een filterwiel met zes filters met een bandbreedte van 50 nm, van 450 – 700 nm. Filterwiel systemen worden primair gebruikt in de astrofysica, op telescopen of onder laboratoriumcondities. Voor het veld blijkt het systeem niet erg robuust te zijn. Door kleine afwijkingen in de positie van de filters was de lichtbreking niet constant en moest achteraf voor elk beeld de onderlinge verschuiving afzonderlijk gecorrigeerd worden. Voor de proef van 2009 betekende dit een rekenklus van bijna een maand computertijd!

Het complete camerasysteem (Fig.3) bestond uit een 5 mega pixel camera met lens en filterwiel met zes filters. Voor de belichting werden twee systemen gebruikt, namelijk halogeen verlichting, die continu aan staat en een xenon flitsbron die lichtpulsen geeft met een lengte van 50 μ s. De field of view (FOV) van het systeem was 50 cm, dus een compleet bed moest in twee gedeelten worden opgenomen (links en rechts). Hetgeen ook weer een extra arbeidsinspanning vergde. Verder moest van elk bed opnames gemaakt worden onder 45 en 90 graden, met halogeen en met flits licht. In totaal betekende dit, dat van een enkele rij bollen in het veld 6 (filters) x 2 (links/rechts) x 2 (halogeen/flits) x 2 (45/90 hoek) = 48 opnames moesten worden gemaakt per opnamedatum. Het meten onder twee hoeken vond de begeleidingscommissie noodzakelijk vanuit praktijk ervaringen. Ook een ziekzoeker kijkt vanuit een hoek naar de tulpen om waar te nemen.



Fig.3. Het camerasysteem met filterwiel, camera, halogeenlampen en flitser zoals geplaatst in de ziekzoekkar.

2.3 Proefveld

In de haalbaarheidstudie van 2008 zijn bakken met tulpecultivars ingegraven en voor beeldanalyse in het lab weer opgegraven. Als vervolgonderzoek op deze laboratoriumanalyses met geavanceerde cameratechnieken van virussymptomen is voor 2009 een veldexperiment opgezet om de cameratechniek te beproeven.

2.4 Proefveldopzet

Er is gekozen voor de proefvelden te Lisse van PPO Bollen, Bomen en Fruit. De metingen met de te ontwikkelen prototype ziekzoekkar met camera konden hier goed worden uitgevoerd, vanwege de directe beschikbaarheid van onderzoekers van PPO. Locatie: Proefveld Lisse (PPO, tuin 7 (de "van Ruitentuin" tegen de Achterweg aan). De totale oppervlakte van de aanplant was ongeveer 200 m² (Fig.5).

2.5 Materialen en methoden

Gegevens betreffende materialen en methoden:

Cultivars: Yokohama (22% virus), Monte Carlo (28%) en Barcelona (14%); gezonde tulpen (cv Yokohama). Deze percentages TBV zijn bepaald door de BKD (boltoets najaar 2008).

Aantallen: 1000 stuks elk; van de gezonde Yokohama's werden er nog 1000 op praktijkdichtheid (100/m²) geplant (Fig. 4D).

Opplantschema en voorbereiding bollen: 500 bollen van elke cultivar werden op viervoudige afstand (25/m² = 5x 5 = ongeveer 20 cm afstand) op 25 november na 17°C; 500 bollen werden na 3 weken extra bewaring 17 °C (11 december) geplant. Op deze wijze is getracht om bij de helft van de tulpen ten minste een week verlating van opkomst te bewerkstelligen. De tweede serie van 500 bollen per cv is uitgeplant op 25 stuks per vierkante meter (Fig. 4B). Het onderhoud aan het proefveld was standaard, waaronder tweemaal per week bespuiting met het middel Decis tegen bladluizen.

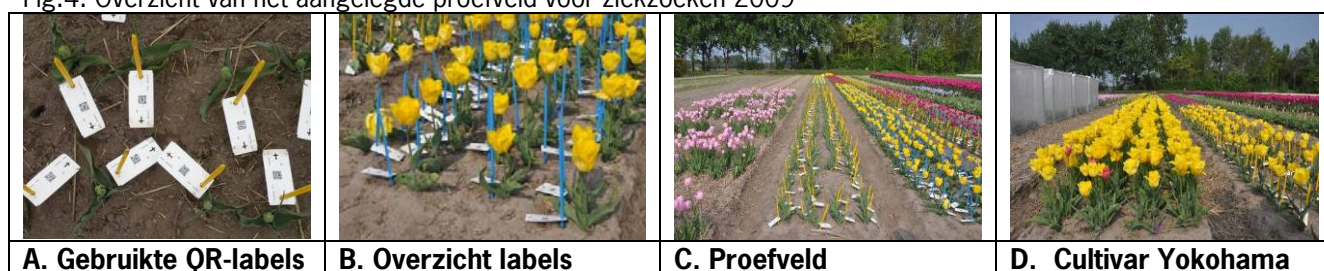
Labeling: bij het opkomen van de tulpen in maart werden de planten individueel genummerd door plaatsing van kleine plastic steekhoutjes met een plastic label (met zg. QR-code, Fig. 4A).

Ziekzoekers: bij het opkomen (periode 2009 maart-april): zijn ziekzoekers tweemaal of driemaal (enkelen) gaan ziekzoeken; zij noteerden de nummers van de planten welke zij verdachten van TBV of andere afwijkingen.

Vervolgens is de ziekzoekkar door de percelen (Fig.4C) gereden en zijn de opnames gemaakt. Data (camerabeelden van de tulpen) werden opgeslagen op de computer in de ziekzoekrobot en via Internet naar PRI Biometris gestuurd voor verdere analyses. Later (na afloop van het veldexperiment) zijn deze analyses gecorreleerd met de uitslagen van de ziekzoekers ("visuele beoordeling").

Na afloop werden monsters genomen voor controle op TBV via ELISA: een of twee bladdelen van de tulpen zijn in zakjes op nummer genomen en door BQ Support (Lisse) geanalyseerd op de aanwezigheid van TBV; een deel van het sap werd bewaard voor eventuele aanvullende toetsen (PCR). Deze extra controles zijn niet uitgevoerd.

Fig.4. Overzicht van het aangelegde proefveld voor ziekzoeken 2009



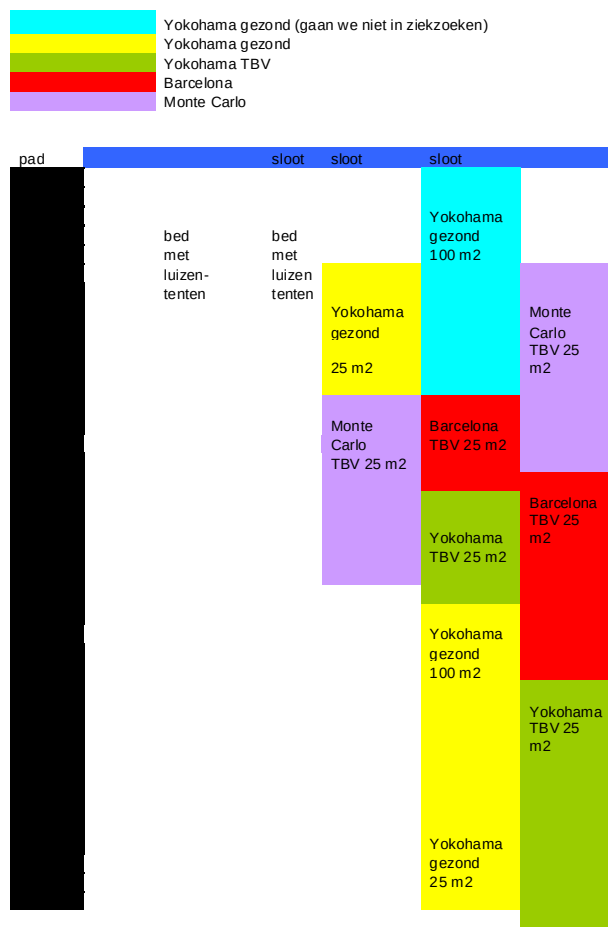


Fig. 5. Schematische weergave van het proefveld met de plots met verschillende cultivars.

2.6 Beeldanalyse

Met het verrijdbare camerasysteem (de ziekzoekrobot) zijn per bed 8 verschillende metingen uitgevoerd:

- Camerahoek van 45 en 90 ° om zowel van bovenaf als van de zijkant het gewas te fotograferen
- Halogeen- en flitslicht
- Linkerdeel - rechterdeel van het bed

Bovendien werden met het filterwiel 6 opnames (verschillende golflengtes) per keer gemaakt.

Allereerst zijn met behulp van de software de verschuivingen tussen de zes beelden van het filterwiel berekend en is hiervoor gecorrigeerd. Dit was een rekenintensieve operatie, die een maand computertijd vergde.

De zes bands multispectraal beelden werden gesegmenteerd naar achtergrond, label, blad en paarsverkleuring. Vervolgens zijn vormkenmerken van de plant gemeten en de grootte van de paarsverkleuring, gewogen naar positie (midden of rand van blad). Ook werd het aantal van de paarse vlekken per plant en de grilligheid gemeten.

De volgende processtappen voor beeldanalyses zijn uitgevoerd:

- Uitlijnen beelden van verschillende golflengtes (6)
- Creëren van "false colour" beelden
- Creëren van een database met plannummers, beeldcoördinaten en scores (ziekzoekers en ELISA)
- Multispectrale segmentatie (contouren van planten en paarse spots)

- Metingen:
 - o Vormkenmerken plant
 - o Aantal en structuur van bladranden in plant
 - o Gewogen grootte paarse spots
 - o Aantal en vormkenmerken paarse spots
- Classificatie met verschillende metingen en instellingen

Nadat de kenmerken per plant zijn gemeten, wordt een wiskundig beslismodel getraind om zo goed mogelijk te classificeren/beoordelen op basis van de gemeten kenmerken. Hierbij wordt gebruik gemaakt van “leave-one-out” kruis-validatie. Dat houdt in dat het wiskundig model getraind wordt op alle planten op één na, en vervolgens wordt de classificatie berekend van de overgebleven plant met het getrainde model en wordt deze uitslag vergeleken met de ELISA-score (validatie). Dit wordt herhaald totdat alle planten individueel gevalideerd zijn. In Figuur 6 staat deze aanpak schematisch weergegeven. Details zijn weergegeven in een wetenschappelijke publicatie (Polder et al. 2010).

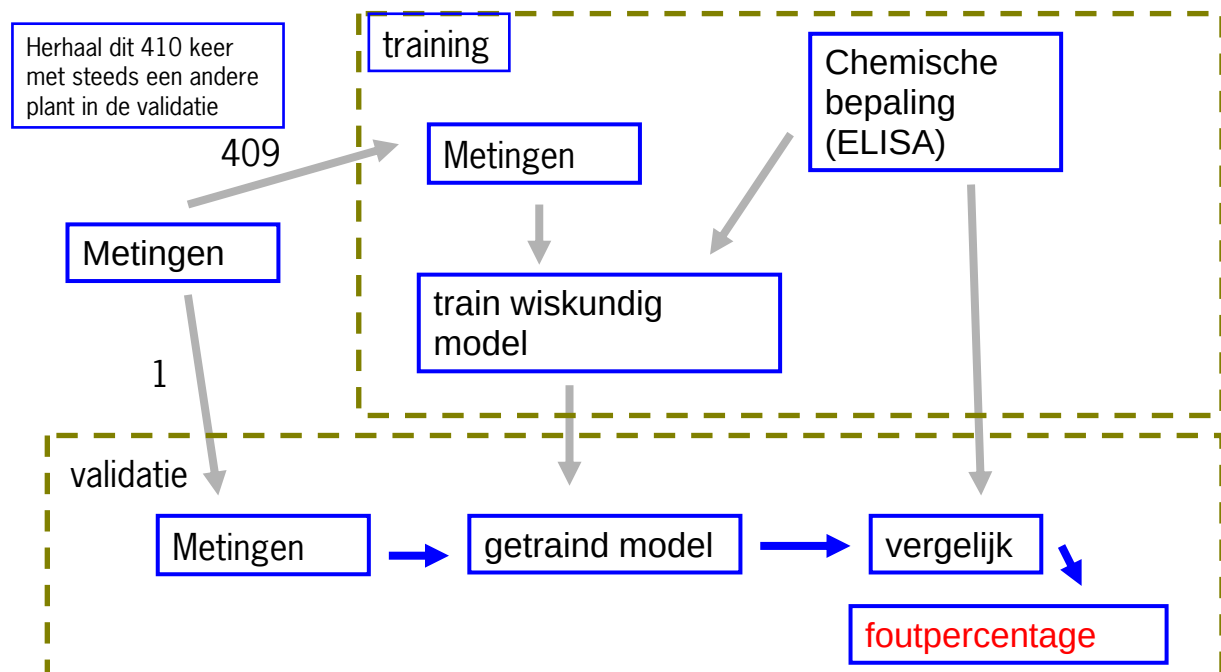


Fig.6. Schematische weergave van kruis-validatie

3 Resultaten en Conclusies

3.1 ELISA-waarden

Om het percentage TBV te bepalen in de gemeten tulpen, is van elke plant het tweede blad genomen en opgestuurd naar BQ Support om via serologische analyse vast te stellen of er wel of niet TBV virus aanwezig was. Dit betrof 3500 monsters. Achteraf zijn alleen de monsters van Barcelona gebruikt om de analyse van de ziekzoekers en ziekzoekkar te vergelijken.

In ongeveer 400 tulpen van cv Barcelona werden 87 zieke tulpen gevonden (22%), terwijl in de BKD uitslag van de bollen (boltoets 2008) 14% is vastgesteld. Voor Yokohama werd in de bladtoets 77 zieke tulpen in 861 tulpen gevonden (9%); in de boltoets van 2008 werd 22% vastgesteld. Voor Monte Carlo is in de bladtoets 27% gevonden tegen 28% in de boltoets van 2008 (BKD). Dit verschil tussen bol- en bladtoets bij Barcelona kan feitelijk niet door secundaire infectie van de tulpen op het veld verklaard worden. Er is overigens regelmatig (tweemaal per week met het middel Decis) tegen luizen gespoten; eventuele secundaire infecties door luizen zou dan ook bij Monte Carlo en Yokohama gezien moeten worden. Het verschil tussen bol- en bladtoets bij Yokohama is onduidelijk; er is geen reden om te twijfelen aan de uitvoering van zowel de boltoets (BKD) als de bladtoets (PPO).

3.2 Ziekzoeken

In de periode april - mei hebben zes ziekzoekers de planten beoordeeld op virus. De tulpen, op een kwart van de normale dichtheid geplant, bleken lastig te beoordelen op symptomen; ook waren de meeste ziekzoekers van mening dat er eerder gestart had moeten worden met het ziekzoeken. Het moment van ziekzoeken is van belang omdat de symptomen slechts in een bepaalde fase van het gewas het beste waarneembaar zijn. Door sommige ziekzoekers werden ook andere virussymptomen dan TBV waargenomen; dit betrof slechts enkele tulpen met een ander virus (TVX).

De cultivars: Yokohama (22% virus), Monte Carlo (28%) en Barcelona (14%) en een plot gezonde tulpen (cv Yokohama) werden visueel door de ziekzoekers beoordeeld; de bijbehorende nummers werden genoteerd. Uiteindelijk zijn, na overleg met de begeleidingscommissie, alleen de waarnemingen in Barcelona opgenomen in de analyses, zowel wat betreft de ziekzoekgegevens als de camerabeelden. De waarnemingen aan de andere cv's waren minder betrouwbaar door de te late beoordeling door zowel de ziekzoekers als de ziekzoekkar en werden derhalve niet verder opgenomen in de uitwerkingen. De gegevens zijn wel bewaard en eventueel beschikbaar voor verdere computeranalyses indien nodig of wenselijk.

De resultaten van de ziekzoekers, gerelateerd aan de uiteindelijke ELISA-waarden zijn weergegeven in Fig. 7. Deze serologische toetsing met specifiek anti-TBV antiserum is aangenomen als de absolute referentie van het ziek of niet-ziek zijn van de tulpen.

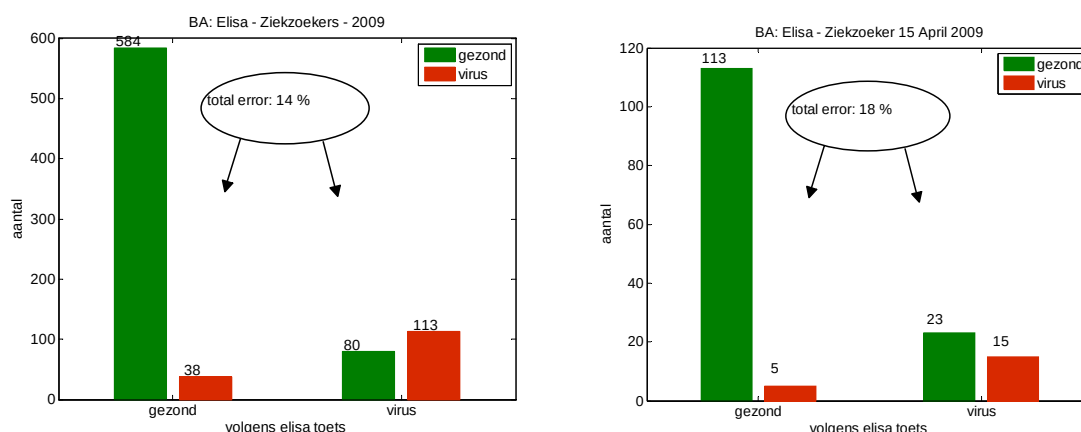


Fig. 7 A en B. Analyse van de tulpen (cv. Barcelona) met als referentiewaarde de ELISA (X-as) en het aantal gescoorde zieke of gezonde tulpen op de Y-as. Totaal score (A) en op 15 april 2009 (B).

In totaal zijn er 815 tulpen beoordeeld. In Fig. 7A is te zien, dat de ziekzoekers gezonde planten ten onrechte ziek verklaarden in 38 van de 622 planten = 6 % van de gezonde planten. Omgekeerd kwam ook voor: zieke planten werden ten onrechte gezond verklaard in 80 van de 193 planten = 41% van de zieke planten. Figuur 7 B geeft weer de analyse op 15 april 2009 (zie ook Tabel 8B), welke dicht op 16 april ligt om zo de gegevens goed te correleren enerzijds verkregen door de ziekzoekers, anderzijds door de ziekzoekkar.

Uit de figuur 7 A blijkt ook dat er 193 tulpen ziek waren (volgens ELISA) en dat de ziekzoekers er 113 aanwezen als ziek. Een score van 59 %.

Er is ook gekeken naar de overeenstemming tussen de ziekzoekers. Een eerste eenvoudige vergelijking kan worden verkregen door te kijken naar de correlatie tussen de waarnemers en de ELISA methode. Dit is te zien in Tabel 2.

Tabel 2. Correlatiematrix tussen Elisa score en beoordeling door vier ziekzoekers.

Elisa	1.000				
zz1	0.639	1.000			
zz2	0.505	0.610	1.000		
zz3	0.517	0.551	0.506	1.000	
zz4	0.503	0.547	0.502	0.473	1.000
Elisa	zz1	zz2	zz3	zz4	

De overeenstemming tussen de vier ziekzoeker onderling en met ELISA ligt veelal rond de 0.5. Een redelijk goede correlatie ligt rond 0.7, dat wil zeggen dat er hier geen goede overeenstemming is. De ziekzoekers wijzen dus verschillende tulpen als ziek aan.

Daarnaast kunnen we ook naar werkelijke aantallen van de overeenkomst kijken. Dit is weergegeven in Tabel 3. Ook hier blijkt weer dat er een behoorlijke discrepantie is tussen de ziekzoekers.

Tabel 3: overeenkomst tussen ziekzoekers 2, 3 en 4 ten opzichte van ziekzoeker 1 met betrekking tot beoordeling van gezonde en zieke bollen.

	zz1		
	gezond	ziek	totaal
zz2			
gezond	1916	109	2025
ziek	115	223	338
totaal	2031	332	2363
zz3			
gezond	1843	96	1930
ziek	197	236	433
totaal	2031	332	2363
zz4			
gezond	1945	153	2098
ziek	86	179	265
totaal	2031	332	2363

3.3 Beeldanalyse

Het was de bedoeling dat van elke plant automatisch het bijbehorende QR-label gelezen kon worden met behulp van de beeldverwerking. Dit bleek in de praktijk toch niet mogelijk vanwege (proef-) technische problemen, waardoor de planten in de beelden allemaal met de hand moesten worden gelabeld.

Voor een eerste analyse zijn beelden gebruikt van Barcelona van 16 april 2009 die van bovenaf (90 graden) zijn opgenomen. In deze beelden waren 410 opnamen van planten geschikt voor analyse. Van deze beelden bleek uit de ELISA-toets dat 337 planten (82%) gezond waren en 73 planten (18%) besmet met TBV. De ziekzoekers hebben een deel van dezelfde planten geanalyseerd op 15 april (Fig. 7B). Een deel van de ruwe data is weergegeven in Bijlage 1.

De kenmerken van deze planten zijn gemeten en het wiskundig beslismodel is getraind. Het resultaat van de classificatie staat in Fig. 8.

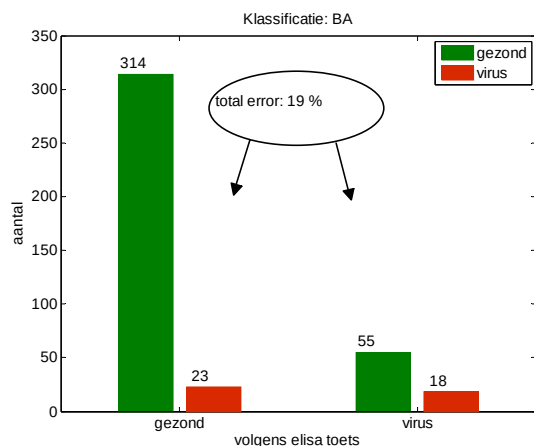


Fig. 8. Classificatie van het totale resultaat.

De totale fout is in dit geval 19%. Er zijn twee soorten fouten, namelijk gezonde tulpen die als ziek worden aangemerkt, en zieke tulpen die als gezond worden aangemerkt. In dit geval zijn 23 van de 337 (=7%)

gezonde tulpen onterecht als ziek gemeten en 55 van de 73 (=75%) zieke tulpen zijn niet gevonden. Door de parameters (de “priors” zie hoofdstuk 2.6) wat te variëren kunnen deze waarden anders komen te liggen, zoals te zien is in figuur 9 A en B. In Fig. 8 zijn deze 0.6 voor gezond en 0.4 voor ziek (TBV), in Fig. 9A zijn deze voor gezond) en ziek (TBV) beide 0.5; in Fig. 9B 0.6 en 0.4. Daarmee kun je dus keuze maken waar je de drempel kunt leggen.

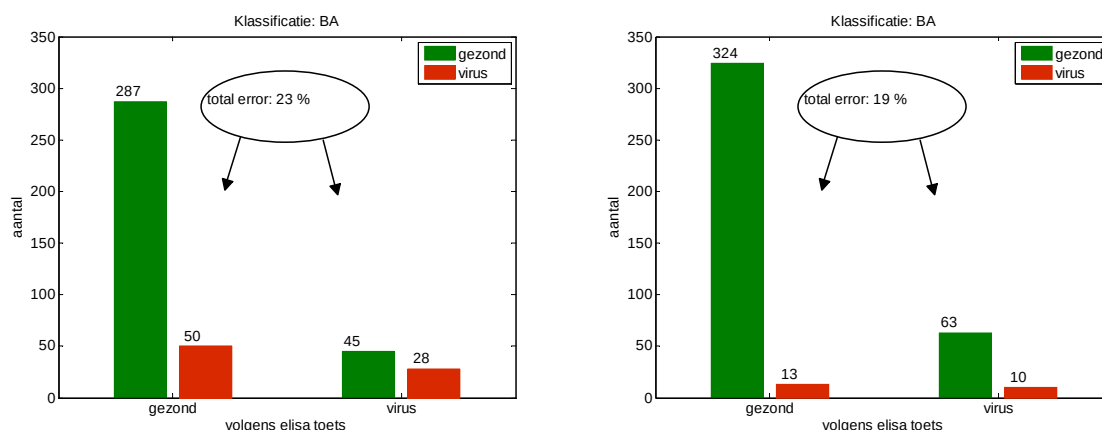


Fig.9. Classificatie van de resultaten bij andere parameters (A en B).

Als er minder planten onterecht ziek gescoord worden zal het aantal gemiste planten toenemen en andersom. In Fig. 10 staat vier fotovoorbeelden.



Fig. 10. Voorbeelden van zieke/gezonde planten volgens de ziekzoekkar en ELISA.

Op de foto's is via een rode omranding en blauwe tekening via de computeranalyse aangegeven dat hier mogelijk virussymptomen aanwezig zijn. Wanneer je de analyse strakker afstelt, wordt een niet-zieke plant toch als ziek gescoord door de computer (rechtsboven); het omgekeerde gebeurt linksonder: TBV-positief

in ELISA, maar gezond volgens de computeranalyse.

De vergelijking tussen de ziekzoekkar en de ziekzoeker is ook gemaakt. Hiervoor zijn de ziekzoekscores genomen van één specifieke dag voor de metingen met de ziekzoekkar. Van Barcelona zijn toen de helft van de planten gescoord. De resultaten staan in Tabel 4 A en B.

Tabel 4A en B geven de vergelijking van het percentage fouten in waarneming van ziekzoekers en ziekzoekkar weer, gerelateerd aan de ELISA-uitslag (cultivar Barcelona). Tabel A geeft de percentages van het totaal aantal tulpen, in tabel B (zie Fig. 7 en 8) is dit uitgesplitst naar gezonde en zieke tulpen. De waarnemingen zijn aan verschillende aantallen tulpen verricht (410 door de ziekzoekkar; 156 door de ziekzoekers) en op twee verschillende data (15 en 16 april 2009).

Tabel 4A en 4 B. Vergelijking percentage fouten van ziekzoekers en ziekzoekkar.

uitslag	% ziekzoeker	aantallen tulpen	percentage kar	aantallen tulpen
Terecht gezond	72%	113	77%	314
Terecht ziek	10%	15	4%	18
Onterecht gezond	15%	23	13%	55
Onterecht ziek	3%	5	6%	23
<i>Totaal</i>	<i>100%</i>	<i>156</i>	<i>100%</i>	<i>410</i>

Tabel 4B.

Gezonde tulpen	% ziekzoeker	aantallen tulpen	percentage kar	aantallen tulpen
Gevonden	96%	113	93%	314
Niet gevonden	4%	5	7%	23
<i>Totaal</i>	<i>100%</i>	<i>118</i>	<i>100%</i>	<i>337</i>

Zieke tulpen	% ziekzoeker	aantallen tulpen	percentage kar	aantallen tulpen
Gevonden	39%	15	25%	55
Niet gevonden	61%	23	75%	18
<i>Totaal</i>	<i>100%</i>	<i>38</i>	<i>100%</i>	<i>73</i>

Men kan concluderen, dat de ziekzoekers beter presteren dan de ziekzoekrobot; meegenomen moet worden dat er niet alleen een fout gemaakt kan worden in het onterecht ziek verklaren van tulpen, maar ook het onterecht gezond verklaren. Het onterecht ziek verklaren is minder schadelijk dan onterecht gezond verklaren van een tulp, maar dit gaat wel over grotere aantallen (percentage gezond is veel groter). Elke ondernemer zal dit voor zijn eigen bedrijfssituatie moeten inschatten. Het economisch rendement is van belang; wat is acceptabel qua aantallen verwijderde gezonde tulpen?

4 Discussie

De opzet van de veldproef was, om de correlatie vast te stellen tussen de data, gemeten aan TBV-zieke tulpen van drie verschillende tulpencultivars door ziekzoekers, de ziekzoekrobot met beeldtechnieken en serologische analyses middels ELISA. In 2008 bleek op laboratoriumschaal een goede overeenkomst te bestaan tussen symptoomanalyse en beeldtechnieken. Voor 2009 was de opdracht om dit experiment uit te voeren onder condities die de veldsituatie benaderde. Dit bleek (technisch) niet eenvoudig te zijn; de verwachtingen waren te hoog gespannen.

Overgang van laboratorium naar het veld

De overgang van in het laboratorium opgenomen beeldopnames met diverse typen camera's naar een veldsituatie is groot. Er was nog geen sprake van een uitontwikkelde beeldverwerkingstechniek; er moesten verschillende meethoeken en lichtsoorten gebruikt worden per opname. Daarnaast was het lichtdicht maken van de opstelling niet gemakkelijk. Gekozen is voor een kleurencamera met 6 verschillende kleurenfilters: een goed maar langzaam systeem. Voor een kwalitatief goede opname dienden verschillende filterstanden gebruikt te worden, evenals twee typen licht. Dit resulteerde in een gemiddelde opnameduur per opnamegebied van 50x30 cm van ongeveer 20-30 seconden. Voor een bed van een meter breed betekende dit dat er twee maal gemeten diende te worden, om ook de andere 50 cm van het bed te kunnen meten.

De kar was zwaar en niet uitgerust met draaibare wielen; het bleek dat de wielen het gewicht niet goed aankonden. Door de slechte wendbaarheid van de kar was bovendien een bemensing van twee personen noodzakelijk.

De opstelling met computer en belichting bleek redelijk robuust en goed bruikbaar. Voor de opnames bleek strooilicht van onderen aanvankelijk een storende invloed te hebben; dit is met zwart plastic opgelost. De gebruikte QR-labels waren handig voor het terugvinden van de opnames; lastig bleek uiteindelijk wel de lichtweerkaatsing op het plastic van de labels, zodat ze niet voor automatische herkenning gebruikt konden worden.

De overgang van laboratorium naar het veld was groot. Kinderziektes in het systeem waren o.a. de aanwezigheid van leklicht in de beelden, de geringe wendbaarheid van de kar, de kwetsbaarheid van de kar (wielen), de traagheid van de opnames en de onzekerheid over de gekozen meethoek en type belichting. Hierdoor was de opnametijd erg lang en konden er relatief weinig goede beelden worden verzameld. Daarom is ervoor gekozen de beeldanalyse niet uitputtend uit te voeren in 2009 maar budget te reserveren voor een nieuwe proef in 2010, waarbij de belangrijkste kinderziektes zijn verholpen op basis van de ervaringen uit 2009. Dit zal o.a. bestaan uit het voorkomen van leklicht bij de opnames door met flitsers te werken en kleurencamera's te gebruiken, die op zowel 45 als 90 graden worden gemonteerd. Ook zal er aandacht moeten zijn voor de wendbaarheid van de ziekzoekkar. De focus van het vervolgonderzoek zal nog niet gericht zijn op de verhoging van de meetsnelheid, of op het verwijderingssysteem van virusverdachte tulpen. Dit aspect zal na 2010 worden bekeken.

De veldproef

De opplant (cultivars Monte Carlo, Barcelona en Yokohama) kwam onverwacht snel op in begin april (Pasen) na een langdurige koude periode in het vroege voorjaar. Een belangrijk punt bleek het juiste moment van meten; de gemiddelde ziekzoeker bekijkt het gewas tulp op virus wanneer de knop nog laag in het blad zit. Voor de cv's Yokohama en Monte Carlo bleek het juiste stadium om visueel door ziekzoekers symptomen te laten beoordelen net gepasseerd door de snelle opkomst van het gewas. Het relatief zeer snel opschieten van de tulpen gaf de ziekzoekers weinig tijd om onder optimale omstandigheden de genummerde planten te beoordelen. Aan de andere kant is het waardevol om vast te stellen of men ook na deze (voor visuele beoordeling optimale) periode virussymptomen kan vaststellen via de ziekzoekrobot.

Gevaar van virusoverdracht

Een vraag binnen het ziekzoekproject lag op het gebied van het gevaar van virusoverdracht in de ziekzoekproef. Kan men TBV meten dat tijdens het teeltseizoen 2009 door luizen wordt overgedragen aan de tulpenopplant?

De veldexperimenten in het kader van het testen van een prototype ziekzoekrobot betroffen drie cultivars met 10-20% TBV (Tulpenmozaïekvirus). Wanneer virussymptomen zichtbaar zijn, dan zijn deze veroorzaakt door virus dat tijdens het bewaarstadium al in de bol aanwezig was. De bladeren met virussymptomen kwamen voort uit deze bollen. Het gevaar bestond dat (ondanks bespuitingen tegen virusoverdracht) er toch beperkte virusoverdracht door luizen heeft plaats gevonden. Is dit storend in bv. ELISA die in een later stadium heeft plaatsgevonden in het blad? Deze vraag is voorgelegd aan (externe) deskundigen.

1. Er werd tweemaal per week gespoten tegen luizen (Decis). Dit beperkte de kans op virusoverdracht aanzienlijk (er zijn ook geen luizen waargenomen, voor zover hier op gelet werd).
2. Als luizen toch wat TBV over zouden brengen op gezonde tulpen, dan was dit zo weinig, dat in een bladmonster van deze planten de ELISA hoogstens een zwak positieve uitslag zou geven. De drempelwaarde van deze toets houdt hier rekening mee en deze waarden vallen weg tegen de hoge uitslagen, die de van oorsprong TBV-zieke tulpen geven.

Na de bloei van tulpen, is het TBV in de gehele plant aanwezig, inclusief de bloem. Er zijn echter wel concentratieverschillen wat betreft hoeveelheden virus en die kunnen leiden tot af en toe een misser met een ELISA toets (extinctiewaarde net te laag om te kunnen meetellen). Hier kan ook het effect van het meten aan mengmonsters een rol bij spelen. Door het mengen van bv. gezonde plantenmonsters met licht virusaangetaste monsters kan je onder de detectiedrempel geraken. Men mag echter concluderen dat de ELISA op TBV een betrouwbare toets is. Voor toekomstig onderzoek kan het zinvol zijn om aan (een deel van) de op te planten tulpenbollen van tevoren individueel de viruslading te laten vaststellen. Dit kan door een stukje bol van de bodem te nemen; dit zal de vitaliteit van de bol niet aantasten. Overigens blijft het onduidelijk waarom in bv. cv Yokohama een percentage van 9% TBV werd vastgesteld in de bladtoets met ELISA, terwijl de bollen in het najaar van 2008 een percentage van 22 % TBV werd vastgesteld. Nader onderzoek naar de verschillen tussen een bladtoets en een boltoets is wenselijk.

Effectiviteit van de ziekzoeker

Een opvallend resultaat was, dat de ziekzoekers (in totaal ongeveer 10 meetmomenten door 6 verschillende personen) in vergelijking met de ELISA-toets slechts ongeveer 60% van het aantal TBV-zieke tulpen van cv Barcelona wisten op te sporen. Mogelijk speelde de opzet van het proefveld de ziekzoekers parten; de opplant was niet conform de praktijk: de dichtheid was slechts 25 per m² en het percentage ziek een stuk hoger (18%) in vergelijking wat men in de praktijk ziet (meestal 1-2%). Toch mag men zich afvragen wat nu de efficiëntie is van een geoefende ziekzoeker. De ziekzoekers beoordeelden dezelfde planten ook verschillend; dit kan komen doordat zij niet op hetzelfde moment (dus onder dezelfde omstandigheden) de planten beoordeelden. Door deze proef te herhalen onder optimale omstandigheden, en een aantal ziekzoekers op hetzelfde moment te laten beoordelen, kan de relatieve efficiëntie van visuele beoordeling worden vastgesteld. In een eventuele nieuwe proef in 2010 zal hier aandacht aan worden gegeven.

Focus op Barcelona-gegevens

Aangegeven is reeds dat in overleg met de begeleidingscommissie besloten is om te focussen op de data verkregen voor cv Barcelona betreffende visuele observaties, ziekzoekbare digitale beeldinformatie en ELISA-gegevens (bladtoets). De doelstelling was namelijk om alle metingen optimaal op elkaar af te stemmen. Overigens zijn de opnames na het optimale ziekzoekmoment volgens de ziekzoekers waardevol voor latere analyse. Hoe breder het tijdsinterval is dat via beeldanalyse virussymptomen kunnen worden waargenomen, des te meer meetmomenten een ziekzoekrobot in de toekomst heeft.

De computeranalyse was beduidend slechter dan de prestatie van de ziekzoekers. Maar ook de ziekzoekers bleken individueel nogal te verschillen. De beelden bleken voor computeranalyse vaak lastig te beoordelen door overlap van bladeren in het beeld, en de soms storende reflectie van de labels. Daarom is een meer solitaire opplant van de tulpen voor vervolgonderzoek noodzakelijk.

De grote afstand is nu vooral nodig in de experimentele situatie, zodat duidelijk is wel blad bij welke plant hoort en er een goede eenduidige relatie gelegd kan worden om het systeem te trainen. In een latere situatie (praktijk) speelt dit een beduidend kleinere rol.

Vervolgtraject

Als aanbevelingen voor verbetering van de ziekzoekrobot en de opzet van de experimenten zijn de volgende punten relevant:

A. Proefveld:

- Grotere afstand tussen de individuele tulpen om overlap van bladeren te voorkomen; toetsen van een aantal bollen vooraf op TBV. Hiermee wordt een stapje teruggezet in de proefopzet richting praktijksituatie, maar zal betere beelden opleveren.

B. Ziekzoekrobot aanpassingen:

- Belichting
 - Effect van leklicht verhelpen: ander type camera met korte sluitertijd (geen rolling shutter principe), sterkere flitsers
 - Betere segmentatie door uniformere belichting
- Snelheid
 - Meer en frequenter meten.
 - Meer overlap in de lengte, minder planten op de rand van het beeld
 - Naast spectraal camera ook gebruik van kleurencamera: hoge resolutie, snel, goed uitgelijnd principe.
- Field of view, meer camera's tegelijk (90° en 45°)
 - Snelheid
 - Overlap in de breedte

Door de grotere hoeveelheid beelden kan de beeldanalyse beter worden getraind. Details over een verbeterde proefopzet staan in een nieuw projectvoorstel.

5 Output

5.1 Begeleidingscommissievergaderingen

Bijeenkomsten zijn geweest met de begeleidingscommissie als geheel en met een afvaardiging uit de grote groep (werkgroep).

De begeleidingscommissie bestond uit:

Begeleidingsgroep
S.Schouten en Zn
Karel Bolbloemen BV
Fa. Th. Apeldoorn
Horizon Flowers
Leek bloembollen
Boon Bloembollen
G. Oud
Poel Bloembollen
Wit Flowerbulbs
Syntens
Agrifirm B.V.

De werkgroep bestond uit:

- P. Apeldoorn
- N. Wit
- L. Poel
- R. van Mechelen

De bijeenkomsten staan vermeld in onderstaande tabel:

Wanneer	Wie	Doel
November 2008	Begeleidingscie	Projectplan en financiering
Januari 2009	Begeleidingscie	Start projectjaar, werkzaamheden
Maart 2009	Begeleidingscie	Bespreken voortgang, werkplan
Mei 2009	Begeleidingscie	Evaluatie veldonderzoek, consortiumvorming
Juni 2009	Werkgroep	Voortgang onderzoek
Juli 2009	Werkgroep	Veldonderzoek en analyse
Juli 2009	Werkgroep	Uitvoering onderzoek
September 2009	Begeleidingscie	Resultaten en go/nogo
December 2009	Werkgroep	Aanpak 2010

5.2 Communicatie

In onderstaande tabel staan de communicatie uitingen vermeld.

Medium	Onderwerp	Soort output
Vakbladartikel Bloembollenvisie	Machinale detectie tulp	Artikel
Open dag Lisse 13 februari	Machinale detectie tulp	Poster en kar
TV west en TV-NH	Machinale detectie tulp	Film
Radio west 20 febr	Machinale detectie tulp	Interview
Artikel Agraaf 9 mei	Ziekzoekkar maakt testritten	Artikel
Vakbladen: Artikel Agri Holland, nieuwe oogst	Machinale detectie tulp	Artikelen
Diverse dagbladen in de regio (Haarlems, Noor Hollands, Leidsch, Duin- en Bollenstreek	Ziekzoekkar	Artikelen
Lezing en publicatie JAC Congres juli	Detection of the Tulip Breaking Virus (TBV) in tulip using spectral and vision sensors	Presentatie, powerpoint
Publicatie internet, website van de Telegraaf		Fimpje via You Tube
Open dag Zwaagdijk	Ziekzoekkar	Beurs, kar, poster
KOL	Robot spoort Tulpenmozaïekvirus op	Artikel
Presentaties begeleidingsgroep	Voortgang project en resultaten machinale detectie	Presentatie
Presentatie jaarvergadering tulp KAVB 13 februari 2009	Machinale detectie tulp	Presentatie
Kort artikel	Made in Holland (uitgave ministerie van EZ)	Artikel
Lezing themadag KNPV precisielandbouw en gewasbescherming	Precisielandbouw	Presentatie en artikel in Gewasbescherming
Gepland artikel bloembollenvisie	Voorjaar 2010 in BloembollenVisie: ziekzoeken: lastig voor mens en robot.	planning

Websites

- <http://bloembollen.groenweb.nl/content/mechanisch-ziekzoeken-beproefd>

6 Literatuur

- Agrarisch Kennis Centrum Noord-Holland, 2003. Haalbaarheidsonderzoek Detectie Mozaïekvirus in tulpen. AKC-Noord-Holland, Zwaagdijk. 13 pp + bijlagen.
- Dwarswaard, A. 2008. Robotisering ziekzoeken past in high tech landbouw. BloembollenVisie 154: 28-29.
- Nieuwenhuizen, A.T. Automated detection and control of volunteer potato plants, dissertation. 2009. Wageningen University.
- Van der Heijden, Gerie; Gerrit Polder, Henk Jalink en Jan Snel 2008. Inventarisatie mogelijkheden voor automatische non-destructieve detectie van tulpmozaïekvirus. PRI Rapport 140208.
- Sato H. et al. 2002. A comparison of sensitive and specific methods for the detection of Lily Mottle Viruses in lily plants. J. Phytopathol.150: 20-24.
- Van Doorn J. T. Baltissen, R. Schreuder, G. Polder, R van der Schoor en G. van der Heijden 2008. Haalbaarheidstudie automatisch ziekzoeken in tulp. PPO eindrapportage project 3234050300 (PT12997).
- Polder G, G. W. A. M. van der Heijden, J. van Doorn , J. G. P. W. Clevers, R. van der Schoor, and A. H. M. C. Baltissen. 2010. Detection of the tulip breaking virus (TBV) in tulips using optical sensors. Precision Agric. 11: 397-412.
(<http://www.springerlink.com/content/dq3584263h007019/>)

Bijlage 1. Ruwe dataset

<u>Plantnummer</u>	<u>Elisa score</u>	<u>Ziekzoek score</u>	<u>Kar score</u>	<u>plantnummer</u>	<u>Elisa score</u>	<u>ziekzoekscore</u>	<u>karscore</u>
'2003'	'tbv'	'-'	'geen tbv'	'2401'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2005'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2401'	'geen tbv'	'geen tbv'	'tbv'
'2006'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2402'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2009'	'tbv'	'-'	'geen tbv'	'2403'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2011'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2404'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2013'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2407'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2015'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2411'	'tbv'	'tbv'	'tbv'
'2016'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2412'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2017'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2416'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2018'	'tbv'	'-'	'geen tbv'	'2419'	'geen tbv'	'geen tbv'	'tbv'
'2019'	'tbv'	'-'	'geen tbv'	'2420'	'tbv'	'tbv'	'tbv'
'2020'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2421'	'tbv'	'tbv'	'geen tbv'
'2021'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2427'	'tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2021'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2428'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2022'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2432'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2023'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2435'	'tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2024'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2443'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2025'	'tbv'	'-'	'geen tbv'	'2448'	'tbv'	'tbv'	'tbv'
'2027'	'geen tbv'	'-'	'tbv'	'2451'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2029'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2453'	'geen tbv'	'geen tbv'	'tbv'
'2032'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2455'	'tbv'	'geen tbv'	'tbv'
'2033'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2456'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2035'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2459'	'tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2037'	'tbv'	'-'	'geen tbv'	'2464'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2039'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2465'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2040'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2468'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2041'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2469'	'geen tbv'	'geen tbv'	'tbv'
'2043'	'tbv'	'-'	'geen tbv'	'2473'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2043'	'tbv'	'-'	'geen tbv'	'2474'	'geen tbv'	'geen tbv'	'tbv'
'2044'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2477'	'tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2046'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2484'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2047'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2487'	'geen tbv'	'geen tbv'	'tbv'
'2047'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2488'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2048'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2488'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2049'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2491'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2050'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2494'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2050'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2495'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2051'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2499'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2052'	'tbv'	'-'	'geen tbv'	'2500'	'tbv'	'tbv'	'tbv'
'2053'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2503'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2055'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2511'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2056'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2514'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2056'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2518'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2059'	'tbv'	'-'	'geen tbv'	'2521'	'geen tbv'	'geen tbv'	'tbv'
'2060'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2522'	'geen tbv'	'geen tbv'	'tbv'
'2061'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2525'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2062'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2526'	'tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2064'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2527'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2064'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2529'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2065'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2530'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2066'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2531'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2067'	'tbv'	'-'	'geen tbv'	'2537'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2069'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2539'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2073'	'tbv'	'-'	'geen tbv'	'2541'	'geen tbv'	'tbv'	'geen tbv'
'2076'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2542'	'tbv'	'geen tbv'	'tbv'
'2078'	'tbv'	'-'	'geen tbv'	'2544'	'geen tbv'	'geen tbv'	'tbv'
'2079'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2547'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2084'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2548'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2085'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2550'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2086'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2553'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2087'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2559'	'geen tbv'	'geen tbv'	'tbv'
'2088'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2565'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2091'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2568'	'geen tbv'	'geen tbv'	'tbv'
'2093'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2569'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2094'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2570'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2095'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2573'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2095'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2574'	'tbv'	'tbv'	'tbv'
'2096'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2575'	'geen tbv'	'geen tbv'	'geen tbv'
'2096'	'geen tbv'	'-'	'geen tbv'	'2579'	'geen tbv'	'geen tbv'	'tbv'
'2097'	'tbv'	'-'	'geen tbv'	'2584'	'tbv'	'tbv'	'tbv'

Ruwe dataset van metingen aan Barcelona (ELISA-score, ziekzoekscore (tot zover uitgevoerd) en ziekzoekkarscore. De dataset 2207-2815 (alleen ELISA-data) ontbreken.

Agrarisch dagblad5mei2009pag9

Ziekzoekrobot voor tulpen om tekort aan mankracht op te vangen

Lisse – pipo Bloembollen, onder
deel van Wageningen UR, werkt
testritten uit met de zielezoeker-
bot in proefvelden met tulpenaan-
bevelius besmette tulpen. Die is
de eerste stap om het zielezoeken,
dat nu nog door bollentelers en
hun medewerkers wordt gedaan,
te mechaniseren.

Het voorstel om onderzoek te doen naar de invloed van de fysieke omgeving op de gezondheid van de bevolking is een van de belangrijkste uitdagingen van de komende jaren. Het is belangrijk dat we hierin samenwerken met de private sector, met name met de bouwsector. Het is belangrijk dat we hierin samenwerken met de private sector, met name met de bouwsector.

De menselijke zoektocht staat uit, vertelt Van Boorn. "Er zijn er veel te weinig om in zes weken doot het gewas te jagen. Voor goed ziektebestand is de kundigheid nodig." Als een machine dit werk overneemt, wordt een personeelsprobleem het hoofd geboden.

Het initiatief voor de robot kwam jaren geleden van teleci Plac Apeldoorn uit Eindhoven. "Teleci hebben een voorafstaande rol in dit project", zegt Van Doorn.

De onderzoeksvraag, die hij nu onontbeerd inzichtelijk maakt, is: "Vereenvoudig de kindertijd, maar speciale foto's van het gewas. Deze foto's worden na computeranalyse vergeleken met praktijkwaarnemingen en laboratoriumgegevens. Aan het eind van het jaar wil PPO de resultaten bekendmaken.



De microscopische afbeelding van het PRO-profiel werd in percentages met 10 tot 20 procent tulpenmosaïkvirus

Photo: Henrik Baumgartner

Bijlage 3. Communicatie

Maaien voorkomt onkruidschade

Grondbeheerders in Noord-Holland moeten onkruid op tijd maaien om uitzaai naar aangrenzende landbouwpercelen te voorkomen. Zo nodig wordt actie ondernomen en worden de schadeveroorzakers aansprakelijk gesteld.

LTO Noord-Noord-Holland doet met een brief een dringend beroep op alle grondbezitters en terreinbeheerders waaronder de provincie, Rijkswaterstaat, ProRail, waterschappen en gemeenten. „De preventieve maatregel waar we drie jaar geleden mee startten levert absoluut resultaat”, meent Ard Mooij, secretaris LTO Noord-Noord-Holland. „Elk jaar komt een tiental meldingen binnen. Over het algemeen worden met de betreffende beheerders redelijke afspraken gemaakt. Bij onoplosbare situaties stappen we naar de rechter.”

Boeren zijn de dupe van terreinbeheerders die niet omlijkken naar onkruid op hun grond en het zaadversprekende onkruid niet op tijd maaien. Het gaat om brandnetels, distels, fluitkruid,

krulzuring en berenklauwen en ook het voor vee dodelijke Jacobekruiskruid. Ze moeten extra bestrijdingsmiddelen gebruiken en kiezen willen het niet meer eten. „Regelmatig zijn grote stukken weiland in de buurt van spoorlijnen, snelwegen en braakliggend bouwgrond overwoekerd. Dit loopt bij de gedoemde ondernemers behoorlijk in de papieren”, aldus de secretaris.

Ook levert hoog groeiend onkruid verkeersveilige situaties op. Vooral bij voet- en fietsoversteekplaatsen en uitritten van percelen naar de openbare weg.

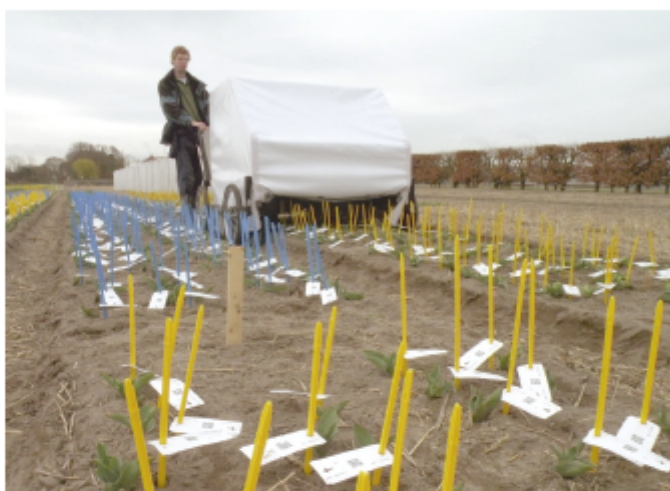
Diverse Noord-Hollandse gemeenten doen mee aan de APV (Algemene Plaatselijke Verordening). Op grond daarvan worden grondgebruikers gedwongen de verspreiding van distels aan te pakken door barmen op tijd en meerdere keren te maaien: voor de bloei en daarna nog minimaal een keer. LTO Noord roept alle leden op om overlast door uitzaaiend onkruid te melden bij het LTO Noord informatiecentrum (telefoon 085-3866844).

Nieuwe stap voor Caring Dairy

Cono Kaasmakers en Ben & Jerry's gaan samenwerken met Solidaridad, Stichting Natuur en Milieu en het Wereld Natuur Fonds. Woensdag tekenden de partijen het samenwerkingsovereenkomst.

Deze zomer schakelen Cono kaasmakers en Ben & Jerry's over op duurzame soja als voer voor. Deze gecertificeerde soja komt van landbouwgronden waarvoor geen kostbare tropische bossen

verwoest zijn. Het project Caring Dairy is gericht op het verduurzamen van de productie van melk op boerderijniveau. In het project worden de ondernemers ondersteund om voortdurend te verbeteren. De zelf deelneemende melkveebedrijven werken met groene energie, nemen waterbesparende maatregelen en stimuleren duurzame landbouwpraktijken. Met het gebruik van groene soja zetten ze een nieuwe stap in het duurzaamheidsprogramma.



Het prototype van de ziekzoekkar maakte deze week de eerste proefritten in Lisse.

Foto: PPO

Ziekzoekkar maakt testrit in tulpen

REPORTAGE Op zoek naar tulpen besmet met het mozaïk-virus lopen ziekzoekers door de tulpenvelden. Bij PPO Bloembollen (Wageningen UR) in Lisse is de eerste stap naar volledig automatisch ziek zoeken gezet. Daar beweegt de eerste ziekzoekkar zich langzaam voort.

De ziekzoekrobot maakte deze week zijn eerste testritten. Beeld- en meetapparatuur, accu, licht en pc zijn op het voertuig geplaatst. Op het scherm zijn beelden en gegevens zichtbaar. De software is ontwikkeld door PRI Biomatrix van Wageningen UR. Op het veld wordt bekeken in hoeverre de technologie symptomen aan tulpen waarmaakt. „We hebben drie tulpencultivars met 10 tot 20 procent tulpenmozaïkvirus in perceeltjes opgeplant. Alle tulpen

zijn individueel met een nummer geregistreerd”, vertelt PPO-onderzoeker Joop van Doorn.

Ook gaafende ziekzoekers spoorden zieke tulpen op waarbij ze de nummers noteerden. Na het rooien van de tulpen wordt in het laboratorium via een serologische test, de ELISA test, vastgesteld in welke planten het virus aanwezig was. De resultaten van de drie onderzoeken worden vergeleken.

„Het idee bloeide bij tulpenteler Piet Apeldoorn”, aldus Van Doorn die verheugd is over de samenwerking met PPO, Plant Research International (PRI) en telers in de praktijk.

„Het is nog maar een prototype, maar er lijken goede mogelijkheden te zijn om virus symptomen met cameratechniek op te sporen”, constateert hij. Zodra de ca-

mera in de praktijk goed werkt, volgt stap twee. De machine moet namelijk ook zieke tulpen markeren, of zelfs afdoden en verwijderen.

Van Doorn hoopt dat het onderzoeksproject tot een werkbaar apparaat leidt. „In een tijdsbestek van 6 tot 8 weken moet veel gebeuren. Het vinden van virusbesmette tulpen is moeilijk, tijdrovend en ervaren ziekzoekers zijn schaars. Het ziek zoeken in tulpen is één van de moeilijkste telerswerkzaamheden.” Hij ziet dan ook mogelijkheden voor andere gewassen. Zo is de ontwikkeling van een robot die zuuring in het grasveld opzoekt al in volle gang, laat hij weten. „De ziekzoekrobot zou wel eens een doorbraak kunnen worden al is er nog jarenlang ontwikkeling nodig”, besluit Van Doorn.

Bijlage 4. Poster Kennisdag PPO 2009



Proefmodel ziekzoekrobot gaat het veld in!

Ton Baltissen¹, Gerrit Polder², Gerie van der Heijden³ en Joop van Doorn¹
¹PPO Bloembollen, Boomkweek & Fruit, Lisse; ²Plant Research International, Wageningen
 email: ton.baltissen@wur.nl

Kunnen camera's ziekzoekers vervangen?

Probleem:

- vaststellen van Tulpenmosaikvirus (TMV)-symptomen bij vooral gele en witte cv's van tulp moeilijk;
- deskundige en ervaren ziekzoekers worden schaars; arbeid wordt duur.

Vraag: Is een geautomatiseerd en gerobotiseerd ziekzoekersysteem mogelijk?

Consortium

Een consortium bestaande uit:

- Fa. Apeldoorn, S. Schouten en Zn, Karel Bobbloemen BV, Horizon Flowers, Leek
- bloembollen, Boon Bloembollen, G. Oud, Poel Bloembollen, Wit Flowerbolls
- Syntens
- PPO en PRI

zijn een project gestart om de haalbaarheid van een automatisch ziekzoekersysteem te onderzoeken.

Haalbaarheidsstudie 2008

Aanpak In 2008: het vergelijken van

- ziekzoekers van TMV in tulpen door ervaren ziekzoekers
- met metingen met 4 verschillende cameratechnieken (Fig. 1) in het laboratorium
- en vergelijking met de laboratoriumtest op TMV (ELISA).

Conclusie: een speciale kleurencamera kan het TMV bij cultivar Monte Carlo en Yokohama (bijna) zo goed waarnemen als een ziekzoeker! Zie tabel 1.

Vervolgonderzoek 2009

Praktijkproef bij PPO met een rijdende cameraopstelling, de zg. ziekzoekkar (Fig. 2) in de buitenteelt met als doel de ziekzoekkar te vergelijken met ziekzoekers en ELISA.

Vervolgonderzoek 2010?

Ontwikkelen verwijdersysteem van zieke tulpen. Uiteindelijk: doel: een commercieel systeem dat zelfstandig zieke tulpen kan herkennen en verwijderen.

Tabel 1. Foutpercentages van de verschillende videotechiniken (100% = alles fout)

cv	Monitorscherm	Goed	Slecht	Goed	Slecht
13	23	23	18	19	
26	22	27	29	22	
9	14	11	9	10	

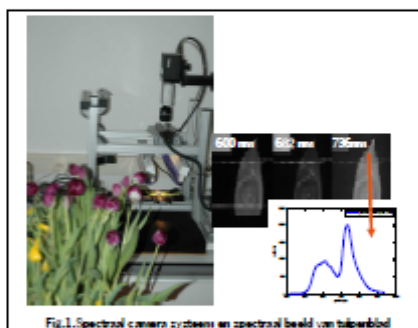


Fig. 1. Spectraal camera systeem en spectraal beeld van tulpenblad

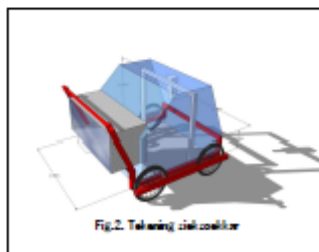


Fig. 2. Tekening ziekzoekkar

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
 Prof. van Stigtingweg 2
 2261 DM Lisse
 Tel.: 070452121
 Email: info.ppo@wur.nl
 Internet: www.ppo.wur.nl

Plant Research International B.V.
 Postbus 16, 6700 AA Wageningen
 Tel: 0317 460751 - Fax: 0317 41 00 94
 Email: Gerrit.polder@wur.nl

Financiering:

- PT, Florus and Food
- Wageningen UR
- LNV
- Teleconsortium

NB: de tabel in bijlage 4 (Vakbladartikel) is niet juist (zie voor de juiste Tabel 4A in dit rapport).