



UC6 Gezonde Plant fundamentals

KV1604-025-WP4

Carolien Zijlstra¹, Els Verstappen¹, Theo van der Lee¹, Dirk de Hoog² en Jan van de Zande²

Rapport WPR-1114

1. Wageningen University & Research, Biointeracties en Plantgezondheid,
2. Wageningen University & Research, Agrosysteemkunde



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH



TOPSECTOR
TUINBOUW & UITGANGSMATERIALEN

Om bij te dragen aan de realisatie van het toekomstbeeld van een autonome spuitrobot die door de kas rijdt en die op de juiste momenten en locaties, gericht de juiste middelen toedient tegen ziekten en plagen, is in het project Gezonde Plant Fundamentals onderzocht of innovatieve camerasystemen kunnen helpen bij vroegtijdige detectie van ziekten en plagen. Belangrijkste vragen in dit onderzoek waren: Kunnen chlorofyl fluorescentie Fv/Fm metingen, die stress meten, bijdragen aan een eerdere detectie van ziekten en plagen dan de huidige symptoomwaarnemingen met het blote oog? Hoeveel eerder kan door een ziekte veroorzaakte stress worden aangetoond dan de door de ziekte veroorzaakte symptomen? Bij bladinoculaties van Botrytis op tomaat bleek dit aan de hand van Fv/Fm metingen ongeveer 1 tot 2 dagen te zijn. Naast camera's die Fv/Fm metingen konden verrichten zijn ook goedkopere sensoren getest die chlorofyl fluorescentie kunnen meten. Deze namen echter pas iets waar als symptomen al zichtbaar waren. Wanneer de behandeling van een blad met fungicide werd ingezet zodra stress aan de hand van Fv/Fm gemeten was in plaats van als symptomen zichtbaar waren, werd het blad beter beschermd tegen schade. Bij kasexperimenten met Botrytis inoculaties van wonden bij de stengel waar bladeren waren verwijderd, de zogenaamde bladstompjes, werden uitsluitend lokale symptomen waargenomen aan de bladstompjes. De infectie leek niet door te zetten richting de stengel en er kon ook geen duidelijke Botrytis gerelateerde stress worden waargenomen in de stengel.

Onderzoek aan met *F. solani* besmet plantmateriaal uit een praktijkkas met tomaat heeft uitgewezen dat de schimmel uitsluitend aantoonbaar was op plekken waar wondweefsel aanwezig was. In een experiment met tomatenplanten in een experimentele kas, was lichte stress soms wel 5 dagen voordat symptomen zichtbaar waren, waar te nemen. De stress was echter niet heel duidelijk zichtbaar en verbetering in het camerasysteem of meetprotocol zou hier wellicht verbetering in kunnen brengen.

Innovatieve camera's zijn ook ingezet voor directe detectie van plaaginsecten. Fv/Fm metingen bleken niet geschikt als hulp bij directe detectie van insecten op blaadjes. Waarnemingen via andere fluorescente beelden (zoals GFP en RFG) maakten het mogelijk niet de stress van planten maar juist de tomatengalmijt, trips en witte vlieg direct te detecteren.

Rapportgegevens

Rapport WPR-1114

Projectnummer: 3742710000

DOI: <https://doi.org/10.18174/566549>

Thema: Geavanceerde systemen en robotica

Disclaimer

© 2022 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Glastuinbouw, Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk T 0317 48 56 06, www.wur.nl/plant-research.

Kamer van Koophandel nr.: 09098104

BTW nr.: NL 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. 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 Stichting Wageningen Research.

Stichting Wageningen Research aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Adresgegevens

Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk

Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk

T +31 (0)317 48 56 06

Inhoud

	Woord vooraf	5
	Samenvatting	7
1	Inleiding	11
1.1	Aanleiding, doel en beoogd resultaat van het onderzoek	11
1.2	Achtergrond gebruikte camera systemen en sensoren	12
2	Vroege detectie van <i>Botrytis cinerea</i>	15
2.1	Inleiding	15
2.2	Bladinoculaties	15
2.2.1	Bladinoculaties aan plant	15
2.2.1.1	Inleiding	15
2.2.1.2	Uitvoering onderzoek	16
2.2.1.3	Resultaten	18
2.2.1.4	Discussie	21
2.2.2	Inoculaties van blaadjes van tomaat in petrischaal	22
2.2.2.1	Inleiding	22
2.2.2.2	Uitvoering onderzoek	22
2.2.2.3	Resultaten	23
2.2.2.4	Discussie	25
2.3	Stengelinoculaties	26
2.3.1	Inleiding	26
2.3.2	Uitvoering onderzoek	27
2.3.3	Resultaten	31
2.3.4	Discussie	35
3	Vroege detectie van <i>Fusarium solani</i>	37
3.1	Inleiding	37
3.2	Inoculaties via de wortel	37
3.2.1	Inleiding	37
3.2.2	Uitvoering onderzoek	37
3.2.3	Resultaten	39
3.2.4	Discussie	41
3.3	Besmettingen via wonden aan de stengel	41
3.3.1	Analyse van een vermoedelijk met <i>F. solani</i> besmette plant uit een praktijkkas	41
3.3.1.1	Inleiding	41
3.3.1.2	Uitvoering onderzoek	42
3.3.1.3	Resultaten	42
3.3.1.4	Discussie	44
3.3.2	Inoculaties in experimentele kas	44
3.3.2.1	Inleiding	44
3.3.2.2	Uitvoering onderzoek	45
3.3.2.3	Resultaten	45
3.3.2.4	Discussie	46

4	Vroege detectie van insecten	47
4.1	Inleiding	47
4.2	Uitvoering onderzoek	47
4.3	Resultaten en discussie	48
5	Synthese en conclusies	53
5.1	Vroege detectie van ziekten en plagen nog voor symptomen zichtbaar zijn	53
5.1.1	Experimenten met <i>Botrytis</i>	53
5.1.2	Experimenten met <i>F. solani</i>	54
5.1.3	Experimenten met insecten	54
5.2	Algemene conclusies en aanbevelingen voor verder onderzoek	55
	Literatuur	57
Bijlage 1	De scores voor de klassen van stress en symptomen waargenomen aan plant van de verschillende behandelingen van bladinoculaties aan plant van paragraaf 2.2.1	59
Bijlage 2	Overzicht van waarnemingen van het experiment van 29 juli 2019 beschreven in paragraaf 2.2.2	63
Bijlage 3	Overzicht van waarnemingen van het experiment van 12 augustus 2019 beschreven in paragraaf 2.2.2	71
Bijlage 4	Overzicht van waarnemingen van het experiment van 27 augustus 2019 beschreven in paragraaf 2.2.2	81
Bijlage 5	Waarnemingen van symptomen, Fv/Fm van experiment met stengelinoculaties als beschreven in paragraaf 2.3	85
Bijlage 6	Waarnemingen van Fusarium uitgroei uit plantmateriaal, Fv/Fm en resultaten van DNA analyses van experiment beschreven in paragraaf 3.2	89
Bijlage 7	Fv/Fm beelden en RGB beelden van met <i>F. solani</i> geïnfecteerde plant en van controle	93
Bijlage 8	Behandelschema, waarnemingen van Fv/Fm (stress) en symptomen van experiment beschreven in paragraaf 3.3.2	99
Bijlage 9	Fv/Fm beelden, RGB beelden, en symptomen waargenomen met het blote oog van 5 planten met symptoomvorming en van 2 watercontroles van experiment beschreven in paragraaf 3.3.2	103
Bijlage 10	Verslag van experiment uitgevoerd met camera van Andre Otten, op verzoek van partner Holland Green Machine	107

Woord vooraf

In dit rapport worden de onderzoeksresultaten uit het project 'Gezonde Plant Fundamentals' (KV1604-025-WP4) beschreven. Dit project liep van 2017 tot eind 2020 en is een publiek private samenwerking (PPS) binnen de Topsector Agri & Food als onderdeel van het PPS Precisie tuinbouw. Het onderzoek had een fundamenteel karakter. Het onderzoek is door Wageningen University & Research uitgevoerd in samenwerking met een aantal partijen, namelijk Glastuinbouw Nederland, Rometron, Van Iperen BV, Bayer, Phenovation en Holland Green Machine. Deze partijen zorgden voor verbinding met de praktijk en droegen bij aan stimulerende discussies.

We willen een aantal medewerkers binnen Wageningen University & Research bedanken voor hun bijdragen, omdat zonder hen de resultaten niet verkregen zouden zijn: Jürgen Köhl voor advies bij het opzetten van de kasexperimenten, Jan van Kan voor zijn adviezen voor de *Botrytis* inoculaties en voor het verstrekken van inoculum, Ben Vosman voor het verstrekken van trips en witte vlieg, de kasmedewerkers van Unifarm te Wageningen voor de goede zorg voor onze tomatenplanten, Wendy van 't Westende, Jean Marie Michiels, Frank Hollewand, Trudy van den Bosch en Stefan Aanstoot voor hun hulp bij het uitvoeren van experimenten.

Met de kennis uit dit onderzoek hopen we bij te dragen aan de kennis over de mogelijkheden en onmogelijkheden van de inzet van camerasystemen in de kas voor vroegtijdige detectie van ziekten en plagen.

Samenvatting

Om het toekomstbeeld van een autonome spuitrobot die door de kas rijdt en die op de juiste momenten en locaties gericht de juiste middelen toedient tegen ziekten en plagen te kunnen realiseren, is nog veel onderzoek nodig. Het project Gezonde Plant Fundamentals was er op gericht daar aan bij te dragen. Onderzocht is, of innovatieve camerasystemen kunnen bijdragen aan het eerder aantonen van ziekten en plagen dan mogelijk is via visuele waarnemingen van symptomen. Uitgangsprincipe was dat infecties stress veroorzaken in planten die via Fv/Fm metingen, waarbij fotosynthese activiteit gemeten wordt, wellicht eerder aantoonbaar is dan de door de infectie veroorzaakte symptomen, die vermoedelijk later optreden. De gemeten stress kan hierbij een indicator zijn voor ziekte. Deze dient vervolgens geïdentificeerd te worden, bijvoorbeeld via DNA/RNA analyses. In dit onderzoek werd de vraag onderzocht hoeveel eerder die stress kan worden aangetoond met een camera dan de symptomen met het blote oog. Daarnaast is gekeken hoe fotosynthese efficiëntie beïnvloed wordt door ingrijpen met een gewasbeschermingsmiddel en hoe die reacties zich uiteten in mate van ziektebeeldvorming. Ook was het de bedoeling te onderzoeken of goedkopere sensoren die chlorofyl fluorescentie (CF) kunnen meten een voordeliger alternatief kunnen bieden voor de camera systemen die fotosynthese efficiëntie kunnen meten. Verder is in dit onderzoek ook gewerkt aan de inzet van innovatieve camera's voor directe detectie van plaaginsecten.

Botrytis tomaat

Er zijn experimenten uitgevoerd met *Botrytis* en tomaat. Eerst met bladinoculaties bij jonge potplanten en aan blaadjes in petrischalen aangezien in het begin van het onderzoek slechts toegang was tot een innovatieve camera die uitsluitend opnames van bovenaf kon maken. Later ook met stengelinoculaties bij volwassen planten in de kas. Hiervoor is een camera systeem zodanig omgebouwd dat deze in de kas zijanten van planten kon waarnemen. Opzet van de experimenten was dat na inoculatie de fotosynthese efficiëntie (Fv/Fm) werd gevolgd waarbij de mate van stress kon worden waargenomen. Een behandeling bestond er uit dat zodra stress werd waargenomen er behandeld werd met een fungicide. Bij een andere behandeling werd fungicide pas toegediend wanneer symptomen zichtbaar waren met het blote oog. Bij de kunstmatige bladinoculaties kon via Fv/Fm metingen de eerste stress worden waargenomen rond 21 uur na inoculatie (hpi) bij de experimenten met jonge planten en rond 26 hpi bij experimenten in petrischalen. Aan de blaadjes in petrischalen is ook CF gemeten met 3 sensoren; UV, rood en blauw. Bij de UV sensor was het verschil tussen de gestreste en de gezonde blaadjes het grootst. Met deze CF sensoren werd ongeveer een dag nadat de Fv/Fm metingen de eerste stress waarnamen, iets waargenomen aan de blaadjes in petrischalen. Als je op grond van de Fv/Fm beelden weet waar je de symptomen moet gaan verwachten zie je in de petrischalen met het blote oog na vanaf ongeveer 7 uur nadat je eerste stress hebt gemeten lichte verkleuring verschijnen bij de inoculatieplek. Bij de jonge planten zag je ongeveer vanaf 3 uur nadat je eerste stress had waargenomen de eerste lichte, nauwelijks zichtbare verkleuringen optreden op de inoculatie plekken waarvan je wist dat je ze kon verwachten. Het is de vraag of je ze dan al gezien had als dat niet het geval was geweest. Bij de jonge planten zag je ongeveer 1 tot 2 dagen nadat de eerste stress was gedetecteerd, voor de praktijk waarneembare symptomen optreden. Veel belangrijker was dat met Fv/Fm metingen de stress veel duidelijker waar te nemen was dan de symptomen met het blote oog waren. Behandeling met fungicide leverde geen extra waarneembare stress op. Bij de experimenten met petrischalen was in de blaadjes die vlak na de eerste zichtbare stress (26 hpi) met fungicide bespoten waren, 8 dagen na inoculatie nog ongeveer bij 40% van het bladoppervlak nog lichte fotosynthese activiteit aanwezig, terwijl er bij de blaadjes die bespoten waren vlak na de eerste symptoomvorming (50 hpi), toen geen fotosynthese activiteit meer aanwezig was. Behandelen met fungicide zodra je stress meet in plaats van als pas symptomen zichtbaar zijn, lijkt interessant aangezien de plant dan uiteindelijk minder beschadigd is. Het inzetten van een camera die Fv/Fm metingen kan verrichten, kan in dat verband zinvol zijn.

In de proef met jonge planten kon een fungicide sporenvorming voorkomen als het toegediend werd op het tijdstip waarop de eerste stress zichtbaar was, en ook als het in een later stadium werd toegediend wanneer symptomen heel goed zichtbaar waren. Van biologische middelen is bekend dat ze niet altijd goed werken bij een hoge ziektedruk, waardoor het zinvol is te bestuderen of deze wel goed inzetbaar zijn op het moment dat eerste stress gemeten wordt, als er nog geen grote ziektedruk is. Voor het efficiënt inzetten van alternatieve middelen zou toepassing van Fv/Fm metingen dan dus zeer zinvol zijn.

Bovengenoemd onderzoek is noodgedwongen uitgevoerd aan bladeren aangezien uitsluitend camera's beschikbaar waren die van bovenaf waarnemingen kunnen doen. Echter, aangezien in de praktijk *Botrytis* infecties bij tomaat vooral voorkomen aan de stengel, daar waar de bladeren verwijderd zijn, was het van belang om ook een experiment uit te voeren waarbij de praktijksituatie zo goed mogelijk wordt nabootst. Daartoe is een verrijdbaar camerasysteem ontwikkeld dat Fv/Fm en RGB beelden kan maken van de zijkanten van planten in een kas. Deze zogenaamde GreenhouseExplorer is samengesteld door een combinatie van de CropReporter, een spiegel en een onderstel dat over het buisrailsysteem van de kas kan rijden. Voorwaarde om door *Botrytis* veroorzaakte stress met dit camerasysteem in de kas waar te nemen op plekken aan de plant waar *Botrytis* in de praktijk vooral infecteert, was dat de planten succesvol geïnfecteerd konden worden. Kunstmatige infectie van tomaat met *Botrytis* is niet altijd eenvoudig aangezien benodigde omstandigheden daarvoor, zoals bijvoorbeeld een hoge luchtvochtigheid, niet altijd aanwezig zijn. Voor dit onderzoek is een inoculatiemethode ontwikkeld gebruikmakend van bewerkte plastic doorzichtige flesjes. Eerst werd een blad van de stengel geknipt waardoor er een klein bladstompje over bleef. Na inoculatie van dit bladstompje werd er een bewerkt plastic doorzichtig flesje om de stengel met daaraan het bladstompje gebracht. Samen met tevens aangebrachte natte watten en tissues zorgde dit voor een hoge luchtvochtigheid rondom het geïnoculeerde bladstompje. Deze inoculatiemethode zorgde ervoor dat symptomen werden gevormd. Ontwikkeling daarvan kon door het bewerkte flesje gevolgd worden. Bijkomend voordeel van deze methode is dat er nauwelijks sporenverspreiding kan optreden vanwege de afscherming door de flesjes waardoor het naburige planten beschermt voor eventuele besmetting met *Botrytis*.

Op de wondvlakken van bladstompjes ontstonden ongeveer 45 hpi de eerste bruinverkleuringen aan de rand van het bladstompje, symptoomklasse 1. Vanaf ongeveer 67 hpi verschenen de eerste symptomen klasse 2: bruinverkleuring met een beetje zwart. Vanaf ongeveer 93 hpi kon flinke zwartkeuring ontstaan, symptoomklasse 3. Na ongeveer 5 dagen verscheen in sommige gevallen ook mycelium op het wondvlak. Controles die met water waren behandeld vertoonden geen symptomen evenmin als met *Botrytis* bespoten wonden waar geen bewerkte flesjes omheen waren gedaan. Vanaf 33 hpi zijn (in de avonden als het donker was) Fv/Fm metingen verricht tot het moment dat bij alle met *Botrytis* behandelde bladstompjes bruin en/of zwartkeuring goed zichtbaar was. Daarna is ook gestopt met het nathouden van de watten en tissues bij het aangebrachte bewerkte flesje om het bladstompje. Het beoordelen van de Fv/Fm beelden concentreerde zich op de locaties waar de wonden waren geïnoculeerd, de bladstompjes waar ook de symptomen verschenen. In tegenstelling tot bij de eerder experimenten met bladnecroses, lieten de Fv/Fm metingen in dit experiment na inoculatie van bladstompjes met *Botrytis* bij tomatenplanten in de kas geen aan *Botrytis* gerelateerde presymptomatische stress zien. Lichte stress, in de vorm van verhoogde concentratie rode pixels verspreid op en rondom het bladstompje, werd zowel waargenomen bij planten met symptomen aan bladstompjes als bij bladstompjes zonder symptomen. Fv/Fm metingen konden geen stress aantonen aan de stengel rond de inoculatieplek voordat symptomen op het bladstompje zichtbaar werden. Wellicht kan stress wel duidelijk gemeten worden bij stengelinfecties, wanneer de schimmel de stengel binnen dringt. Het stengeloppervlak bevat meer chlorofyl dan het wondoppervlak van het bladstompje. Telers zijn vooral geïnteresseerd in *Botrytis* infecties die de stengel inschieten. Die willen ze voor zijn. In dit experiment vertoonden bladstompjes die niet met *Botrytis* geïnoculeerd waren geen bruin- of zwartkeuring. Hypothese van dit experiment was dat stress eerder kon worden aangetoond dan *Botrytis* gerelateerde symptomen die met het blote oog waarneembaar zijn, de bruin en zwartkeuring van de bladstompjes. Deze hypothese kon hier niet bewezen worden. Het is onduidelijk bij welke van de met *Botrytis* geïnoculeerde stompjes die wel bruin of zwartkeuring vertoonden, uiteindelijk een naar binnen schietende infectie zou zijn ontstaan en of die gevallen wél vooraf zouden zijn gegaan met waarneembare stressverhoging. Indien niet gestopt was met het nathouden van de watten en tissues toen alle met *Botrytis* behandelde bladstompjes verkleurd waren had wellicht waargenomen kunnen worden dat *Botrytis* infectie in de stengel was geschoten. Nu is dat niet waargenomen, waarschijnlijk omdat de luchtvochtigheid rondom het bladstompje afnam toen gestopt werd met het nathouden van de watten en tissues. Vervolgonderzoek zou moeten uitwijzen of (presymptomatische) *Botrytis* gerelateerde stress wordt waargenomen bij stengelinfecties. Dit kan in praktijkkassen waar stengelinfecties op dat moment spelen of in onderzoekskassen indien we stengelinfecties kunnen bewerkstelligen. De ontwikkelde GreenhouseExplorer kan hiervoor worden ingezet. Technische beperkingen zijn dat het systeem handmatig moet worden voortgeduwd, dat er geen mogelijkheid tot scherpstellen op zit en dat er slechts van één kant gezien opnames gemaakt kunnen worden. Een andere beperking is dat er bij metingen in het donker bij de GreenhouseExplorer geen RGB beelden gemaakt worden. Voor onderzoeksdoeleinden is het systeem toereikend maar de meeste van deze beperkingen dienen te worden opgelost om het systeem geschikt te krijgen voor de praktijk.

Uit het onderzoek met blad-inoculaties is gebleken dat in Fv/Fm beelden de door *Botrytis* veroorzaakte stress veel beter zichtbaar is dan dat de met het blote oog of camera waargenomen *Botrytis* symptomen. Zelfs niet presymptomatische stress waarneming via Fv/Fm metingen gerelateerd aan *Botrytis* infecties zou de teler daarom helpen met het vroegtijdig detecteren van deze ziekte.

***Fusarium solani* tomaat**

Nadat tomatenplanten bij de wortels waren geïnoculeerd met *Fusarium solani* kon de schimmel bij een deel van de planten via uitplaatexperimenten en DNA analyse worden gedetecteerd in de wortelbasis en in de stengelbasis 0 en 2 cm boven de grond. Resultaten gaven aan dat bovengrondse delen van de plant niet noodzakelijkerwijs worden besmet via verspreiding door de plant vanuit ondergrondse delen. Waarschijnlijk omdat een ras was gebruikt dat vatbaar is voor veel ziekten en plagen konden weinig verschillen worden waargenomen tussen gemeten stress (Fv/Fm) of symptomen van planten die wel of geen *F. solani* bevatten.

Daarom is voor een vervolgonderzoek in een professionele tomatenkas plantmateriaal verzameld dat op grond van hun uiterlijk verwacht werd al dan niet besmet te zijn met *F. solani*. Vermoedelijk besmette planten vertoonden veel bladnecrose bestaande uit gele vlekken, gele vlekken met daarin bruine vlekjes en bruine vlekken. De necrose in de bladeren werd waarschijnlijk niet door *F. solani* veroorzaakt want in geen van de geanalyseerde necrotische bladeren werd na uitplaten *F. solani* aangetoond. De enige plekken waar *F. solani* werd aangetoond na uitplaten en DNA analyse was in een stengeldeel van een plant 150 cm boven de grond en in de stengelbasis van die plant. Op beide plekken was wondweefsel aanwezig. Dit lijkt er op te duiden dat *F. solani* in de Nederlandse kassen bovengronds via wonden de plant kan infecteren. Visuele symptomen worden door telers doorgaans het eerst gezien bij de stengelbasis, daar waar de plant in tweeën gesplitst wordt, waarschijnlijk als daar wond gevormd wordt. Voor een zo vroeg mogelijke detectie is het derhalve zinvol juist die plek te monitoren met de camera en om waar te nemen of met Fv/Fm beelden de veroorzaakte stress eerder is waar te nemen dan de necrose die door de infectie ontstaat. Daartoe is een experiment opgezet waarbij wonden geïnoculeerd zijn met *F. solani* waarna met de GreenhouseExplorer geobserveerd is of een stress effect van de wonden was waar te nemen, of er symptomen werden gevormd en of er bij de geïnoculeerde wond stress te zien was veroorzaakt door de *F. solani* infectie nog voordat symptomen zichtbaar waren.

Het verwonden van de stengelbasis resulteerde niet in zichtbare stress op de Fv/Fm beelden. In een ander experiment zijn bij stengels met een mesje kruisvormige wonden aangebracht die in Fv/Fm beelden zo veel stress weergaven, dat de mogelijk door *F. solani* veroorzaakte stress daardoor niet waargenomen zou kunnen worden (data niet getoond).

Niet alle inoculaties resulteerden in infectie. Het lijkt er op dat de infectiekans groter is naarmate de wonden jonger zijn. Er zijn uitsluitend symptomen gevormd na inoculatie van verse wonden en een keer op een 1 week oude wond. Inoculatie van 2 en 3 weken oude wonden resulteerde niet in symptoomvorming. Vijf inoculaties hebben geresulteerd in *F. solani* symptomen. In de veronderstelling dat deze 5 inoculaties geresulteerd hebben in *F. solani* besmetting, zijn de gemaakte Fv/Fm beelden in de tijd van deze planten nauwkeurig bekeken. Uitsluitend lokale stress werd hierbij waargenomen. Nooit was zichtbaar dat de stress zich verder over de stengel verspreidde dan de symptomen. Stress werd in Fv/Fm beelden waargenomen in de vorm van rode verkleuring (verlaagde fotosynthese activiteit) of blauwe verkleuring (geen fotosynthese activiteit). Blauwe verkleuring werd waargenomen in Fv/Fm beelden ter plaatse van necrotische symptomen en op plaatsen waar geen plantmateriaal aanwezig was, bijvoorbeeld ter plaatse van een scheur. Zo was bij een watercontrole blauwverkleuring zichtbaar in Fv/Fm beeld op de plek waar de wond was gaan scheuren. Dit kan tot misinterpretaties leiden. Echter, wanneer necrose plekken blauw worden weergegeven in het Fv/Fm beeld dan resulteert dat vaak in een abnormale onderbreking in de omtrek van het beeld van de stengel. Via machine learning zou dit herkend moeten kunnen gaan worden waardoor blauwverkleuring veroorzaakt door scheuren of diepe wonden onderscheiden kan worden van blauwverkleuring veroorzaakt door necrotisch weefsel.

In dit experiment kon lichte stress 5 dagen tot 1 dag voordat symptomen zichtbaar werden worden waargenomen. Echter, pas als de symptomen goed zichtbaar waren met het oog was de stress ook goed waarneembaar met de GreenhouseExplorer. Voor het inzetten van de camera in de praktijk voor presymptomatische detectie van *F. solani* in tomaat zouden de Fv/Fm beelden onderscheidender moeten worden. Dit zou kunnen door de opnames van dichterbij te kunnen maken, de scherptediepte en/of de focus te vergroten, metingen in het donker uit te voeren of wellicht kan door het plaatsen van de spiegel in een andere hoek beter van bovenaf op de wond bij de splitsing van de stengelvoet worden gekeken in plaats van aan de zijkant.

Insecten

Aanleiding voor de inzet van innovatieve camera's om mogelijkheden voor vroege detectie van insecten te onderzoeken was, dat bij aanvang van het project in 2017, tomatengalmijt een groot probleem vormde in de Nederlandse tomatenteelt. Dat leidde tot het volgende: Terwijl tomatengalmijten met het blote oog doorgaans pas worden waargenomen op een plant wanneer ze in tientallen aanwezig zijn, kon de Pathoscreen camera, red fluorescent protein (RFP) beelden maken (met gefilterde blauwe LEDs), waarmee slechts één enkele tomatengalmijt gedetecteerd kon worden als een "ster in de nacht". Hoewel de telers hierover enthousiast waren, zagen ze een meerwaarde in een camera die naast tomatengalmijt ook andere plagen van tomaat zou kunnen detecteren. Vervolgens is bestudeerd, of een camera ontwikkeld kon worden die ook trips, witte vlieg en tomatenmineermot goed kon detecteren.

Fv/Fm metingen lijken niet geschikt als hulp bij directe detectie van insecten op blaadjes. Aangezien verschillende ontwikkelingsstadia van insecten over het blad bewegen zal de stress die er door veroorzaakt wordt ook nog zichtbaar kunnen zijn als de beesten alweer ergens anders zitten. Waarnemingen via GFP en RFP beelden daarentegen kunnen sommige insecten direct lokaliseren. Een RFP filter kan ingezet worden voor de directe detectie van tomatengalmijt en trips terwijl een GFP filter kan worden gebruikt voor detectie van witte vlieg. Tomatenmineermot kon door allebei de filters niet worden aangetoond. De gangen veroorzaakt door de larven van tomaten mineermot zijn echter goed waarneembaar met het blote oog.

Een toekomstbeeld kan zijn dat voor detectie van insecten in de praktijk een camera met een RFP en een GFP filter wordt ingezet door deze 's nachts door de kas te laten rijden. Fluorescentie opnames dienen in het donker dienen te worden uitgevoerd. De volgende morgen zou aan de hand van de geanalyseerde data moeten kunnen worden vastgesteld waar in de kas verdachte plekken zitten met betrekking tot besmettingen met tomatengalmijt, trips en witte vlieg. Nadere inspectie kan dan zorgen voor zeer vroege detectie en identificatie van de plaag. Dit zal zorgen voor een veel vroegere detectie van deze insecten dan dat mogelijk is via observaties met het blote oog.

1 Inleiding

1.1 Aanleiding, doel en beoogd resultaat van het onderzoek

De Nederlandse glastuinbouw heeft zich de laatste decennia enorm ontwikkeld. De daarmee samenhangende schaalvergroting, automatisering, veranderingen in het productie proces en de inzet van minder specialistisch geschoold personeel maken het lastig problemen tijdig visueel waar te nemen. Zo is het bijvoorbeeld van belang ziekten en plagen, die een belangrijke bron van zorg en kosten vormen binnen de Nederlandse glastuinbouw, vroegtijdig op te sporen om zo ook de verdere verspreiding tegen te gaan. Met name ziekteverwekkers en plaagorganismen die zich makkelijk via lucht of water verspreiden kunnen snel grote oppervlakten infecteren. Daarnaast worden tijdens de productie veel handelingen verricht door medewerkers die tot mechanische overdracht van virussen, bacteriën schimmels en insecten kunnen leiden.

Binnen het project Gezonde Kas (www.gezondekas.eu), dat liep van 2011 tot 2015, is een prototype van een innovatief gewasbeschermingssysteem ontwikkeld. Het Gezonde Kas systeem is een hulpmiddel dat de teler tijdig attendeert op de aanwezigheid van ziekten en plagen, helpt bij het nemen van beslissingen en bij het toepassen van maatregelen. Het maakt onder meer gebruik van DNA- en sensortechnieken, geautomatiseerde beeldverwerking, softwaretools, biologische beheers strategieën en precisiespuittechnologie.

Het Gezonde Kas project heeft onderstaande conclusies opgeleverd na onderzoek in een demonstratiekas waar tomaten werden geteeld en waar gericht gezocht werd naar *Botrytis* aantasting:

- Een 2-staps monitoring aanpak, gebruikmakend van fotosynthese efficiëntie metingen en DNA analyses, maakt het mogelijk ziekten aan te tonen nog voor symptomen met het blote oog zichtbaar zijn.
- Vanwege de vroege detectie zullen biologische of andere alternatieve maatregelen effectief kunnen worden toegepast wat niet altijd mogelijk is wanneer een ziekte in een verder gevorderd stadium is.
- Met behulp van chlorofyl sensoren kan bij spuiten van alleen de groene, respectievelijk de gestreste delen, een reductie van 30-55%, respectievelijk meer dan 50% van het gebruikte middel verkregen worden.

Aanleiding voor het project Gezonde Plant Fundamentals was dat nog onbekend is hoeveel eerder we via de 2-staps monitoring *Botrytis* kunnen aantonen alvorens er symptomen zichtbaar zijn. Ook is niet bekend of alle ziekten in een vroeg stadium de fotosynthese activiteit verminderen en of ze op soortgelijke wijze met de 2-staps monitoring presymptomatisch kunnen worden aangetoond. Evenmin is onderzocht hoe de fotosynthese activiteit beïnvloed wordt door toegepaste maatregelen. Wat gebeurt er in de besmette plant wanneer al dan niet preventief of curatief wordt ingegrepen? Ook ligt er een vraag of het mogelijk is een spuitrobot te ontwikkelen die zelfstandig tussen alle rijen tomaten door kan rijden met een spuitboom waarop een kleinere en goedkopere sensor voor fotosynthese activiteit gemonteerd kan worden die in staat is stress in planten waar te nemen. Het project was in de afgelopen jaren ook bekend onder de naam Healthy Plant Fundamentals, verwijzend naar het project Gezonde Kas en het fundamentele karakter van het project.

In dit project werd beoogd meer inzicht te verkrijgen omtrent hoe de fotosynthese van de plant beïnvloed wordt door ziekte-infecties en hoe ziekten en de plant reageren op preventieve of curatieve maatregelen. Dit moest meer inzicht geven in plantfysiologische processen met betrekking tot ziekteafweer.

Er is gekozen voor het gewas tomaat. Met dit gewas zijn al ervaringen opgedaan binnen het project Gezonde Kas en betrokken partners geven de voorkeur aan dit gewas. De door het consortium gekozen ziekten en plagen zijn, *Botrytis*, *Fusarium solani*, tomatengalmijt, witte vlieg, trips, en tomatenmineermot.

Beoogde resultaten waren:

1. Inzicht in hoeveel eerder via 2-staps monitoring ziekten en plagen kunnen worden aangetoond in tomaat alvorens er symptomen met het blote oog zichtbaar zijn.
2. Kennis over hoe en wanneer de fotosyntheseactiviteit van de plant reageert na besmettingen met verschillende ziekten.
3. Kennis over hoe de fotosynthese activiteit beïnvloed wordt door toegepaste maatregelen. Wat gebeurt er in de besmette plant wanneer er met een middel curatief wordt ingegrepen? En hoe uiten die reacties zich in mate van ziektebeeldvorming?
4. Een spuitboom met een betaalbare sensor voor fotosynthese activiteit die effectief stress kan meten in tomatenplanten wanneer deze gemonteerd is op een spuitrobot.

Visie

Het uiteindelijk doel was dat het project er toe bij zou dragen dat er een autonome spuitrobot door de kas gaat rijden die op de juiste momenten en locaties gericht de juiste middelen toedient die ziekten en plagen beheersen, liefst nog voor symptomen zichtbaar zijn. Als sensoren voor de stress meting in planten om te lokaliseren waar gespoten moet worden, kunnen camera systemen die Fv/Fm kunnen meten gebruikt worden. Een dergelijk camerasysteem van Phenovation heeft zich al bewezen in Gezonde Kas maar dergelijke camerasystemen zijn vrij prijzig. Op chlorofyl fluorescentie metingen gebaseerde systemen, zoals verkocht door Rometron, zouden een voordeliger alternatief kunnen bieden.

Camera systemen van Phenovation geven stress weer in de vorm van Fv/Fm (een maat voor fotosynthese efficiëntie) beelden waarop de mate van stress gelokaliseerd in de plant te zien is. Bij een gezonde plant hebben alle delen van een plant een hoge waarde van de efficiëntie van fotosynthese, Fv/Fm. Dit wordt in beeld weergegeven met een groene kleur. Is daarentegen de fotosynthese in de plant verlaagd, dan resulteert dat op die plekken in een lagere Fv/Fm, weergegeven in beeld in een andere kleur. De door Rometron geleverde sensoren zijn veel kleiner en goedkoper dan de Phenovation camera. De Rometron sensoren meten chlorofyl fluorescentie en geven de signaalsterkte weer in de vorm van een piekenpatroon.

Het was de bedoeling dat in zieke of gestreste planten stress door zowel de Rometron sensoren als de Phenovation camera gemeten werd waarna de signalen gemeten door de Rometron sensoren werden geïnterpreteerd aan de hand van de Fv/Fm beelden verkregen met de Phenovation camera. Zo zou moeten worden bepaald welke sensoren van Rometron het meest geschikt zijn en hoe de signalen die ermee verkregen worden dienen te worden geïnterpreteerd in relatie tot gemeten stress in de plant. Er zou worden uitgezocht wat de mogelijkheden zijn.

1.2 Achtergrond gebruikte camera systemen en sensoren

De camera systemen van Phenovation maken gebruik van door LED (light emitting diode) geïnduceerde directe fluorescentie beeldverwerking technologie om de gezondheids/stress status van een plant weer te geven door berekening van Fv/Fm (variabele fluorescentie gedeeld door het verzadigingsnivo van fluorescentie). Binnen een periode van ongeveer 88 ms worden meerdere beelden gemaakt. Voor iedere pixel van het fluorescentie beeld wordt Fv/Fm berekend. Fv/Fm bepaalt de maximum kwantumefficiëntie van de fotochemie van fotosysteem II. Hoe lager Fv/Fm, hoe meer stress de plant ervaart. Het voordeel is dat deze technologie op deze wijze eerder stress kan waarnemen in de plant dan dat de mens dat kan met het blote oog.



Figuur 1 Links de CropReporter, in het midden de PlantExplorer, beide camerasystemen van Phenovation; rechts de sensor van Rometron.

Sensoren van Rometron

Rometron gebruikt chlorofyl fluorescentie (CF) sensoren met een vaste verhouding van uitgezonden en ontvangen golflengte voor het detecteren van groene planten voor onkruidbestrijding door plantspecifieke precisie bespuiting. Een piek in de signaalsterkte van de sensor geeft aan dat een groene plant gedetecteerd is. In 2018 heeft Rometron 3 typen verbeterde sensoren ontwikkeld die ieder licht uitzenden op verschillende golflengtes en die ieder 2 golflengtes terug vangen. In analogie met groen detectie wordt van de sensoren met specifieke golflengte combinaties verwacht dat een piek in de signaalsterkte een maat is voor de stress van de plant, bijvoorbeeld veroorzaakt door aanwezige ziekte. In welke mate de drie sensoren stress kunnen meten werd in dit project onderzocht.

2 Vroege detectie van *Botrytis cinerea*

2.1 Inleiding

Botrytis is een schimmel die op verschillende manieren aanwezig kan zijn in een tomatengewas. De sporen, die zich makkelijk door de lucht verspreiden komen bijna overal voor. Zo kan *Botrytis* via luchtwegen van buitenaf of via beluchting de kas binnen komen. Sporen kunnen vervolgens bij voldoende vochtige condities gaan kiemen op bladeren, deze binnendringen en vervolgens hele plantendelen doen afsterven. De meeste infecties met *Botrytis* bij tomaat in de kas geschieden via wonden die ontstaan zijn nadat de bladeren verwijderd zijn.

De eerste zichtbare symptomen bestaan uit lesies en sporenvorming. Behandeling is dan al veelal te laat omdat de schimmel dan al diep in het weefsel is binnen gedrongen en moeilijk meer te bereiken is door de meeste middelen. Door de afscheiding van verschillende verteringsenzymen worden de vaatbundels langzaam afgebroken. De sapstroom wordt hierdoor geblokkeerd, de plant stopt met produceren en sterft helemaal af (Hofland-Zijlstra *et al.*, 2009).

De sporen van *Botrytis* kunnen kiemen bij lage temperaturen van 2 C tot aan maximum temperaturen van 30 C. Aanwezigheid van sporen hoeft echter niet altijd te leiden tot aangetaste planten. *Botrytis* sporen hebben als belangrijke voorwaarde voor kiemen dat er een hoge relatieve vochtigheid van het microklimaat rondom de plant van minstens 87% aanwezig is (Sallinas & Verhoeff, 1995). Tevens hebben ze de suiker die aanwezig is in het vocht dat uit de plant naar de wondvlakken stroomt nodig (Kohl, mondelinge mededeling).

2.2 Bladinoculaties

In het begin van het project waren er slechts Phenovation camera systemen beschikbaar die van bovenaf opnames konden maken aan planten met een maximale hoogte van ongeveer 70 cm. Deze waren geschikt om Fv/Fm te meten in bladeren van potplanten nadat ze geïnoculeerd waren met *Botrytis*. Zodoende kon de daardoor ontstane stress gevolgd worden in het blad als onderdeel van de plant in zijn geheel. Later zijn ook Fv/Fm metingen verricht aan afzonderlijke blaadjes in petrischalen nadat ze geïnoculeerd werden met *Botrytis*.

2.2.1 Bladinoculaties aan plant

2.2.1.1 Inleiding

In het project Gezonde Kas is succesvol stress waargenomen in de stengel van tomaat veroorzaakt door *Botrytis* infectie. In het hier beschreven onderzoek werd onderzocht wanneer stress, Fv/Fm, veroorzaakt door *Botrytis* in tomaat waarneembaar is ten opzichte van het moment dat de eerste symptomen zichtbaar zijn met het blote oog. Aangezien in het begin van het onderzoek uitsluitend Fv/Fm camera systemen die planten van de bovenkant kunnen meten beschikbaar waren, is besloten om stressontwikkeling en symptoomvorming te volgen na infectie van bladeren van tomaat met *Botrytis*. Meer dan 10 jaar geleden is er al eens gekeken naar stressontwikkeling in een blad van tomaat na infectie met *Botrytis*, maar daarbij is niet de symptoomvorming gevolgd en bovendien is dat gedaan met 1 blad in een petrischaal. Wij wilden in hele planten volgen hoe de stress en symptoomvorming zich ontwikkelden. Na overleg met diverse onderzoekers (Jan van Kan, Luc Stevens en Jurgen Kohl) is eerst getest wat de beste inoculatiemethode was, onder welke omstandigheden de planten ziek werden en welk camera systeem het beste gebruikt kon worden. Met deze vergaarde kennis is onderstaand experiment uitgevoerd.

Doel was om te testen of inzet van stress metingen interessant kan zijn voor een teler voor het effectief toedienen van een curatief middel. Is het aantrekkelijker om al een curatief middel toe te dienen zodra je stress ziet in plaats van later, als je met het blote oog symptomen duidelijk ziet?

Vragen die beantwoord dienden te worden:

1. Hoe verspreidt de stress zich door de plant na inoculatie?
2. Wat gebeurt er in de plant met betrekking tot stress na spuiten?
3. Hoe verhoudt zich de schade door infectie na spuiten zodra je stress ziet ten opzichte van spuiten als je symptomen ziet?
4. Wanneer treedt sporevorming op bij de verschillende behandelingen A-D (zie behandelingen onder proefopzet)?

2.2.1.2 Uitvoering onderzoek

Plantmateriaal

Tomatenplanten, cv Moneymaker, werden door de kassendienst van WUR vanuit zaad in potgrond opgekweekt en verpot in 12 cm potten met een inhoud van 0.75 liter. Als planten 3 weken oud waren werden ze in Wageningen in een kascompartiment van WUR op tafels geplaatst bij een constante temperatuur van 20 C en een RH van 90%.

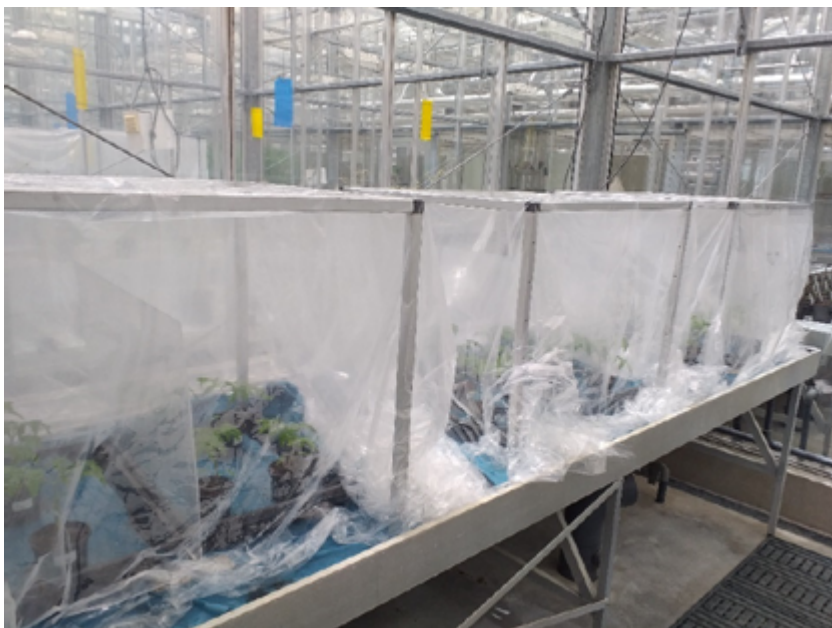
Inoculatie met Botrytis

Botrytis sporensuspensies (10^6 kve/ml) van *B. cinerea* isolaat B05.10 (Cuesta Arenas *et al.*, 2010) in (12 g/l) Difco™ Potato Dextrose Broth (PDB) medium (Becton, Dickinson and Company), werden beschikbaar gesteld door Jan van Kan van Wageningen Universiteit. De sporensuspensie werden met het PDB medium op een concentratie van 1.10^5 kve/ml gebracht. Op het 3^e en het 4^e blad van 4 weken oude planten werden per blad, op 4 blaadjes, per blaadje 2 of 4 druppels van 2 ul van de sporensuspensie (1.10^5 kve/ml) aangebracht (zie Figuur 2). Bij controle planten werd de PDB buffer medium de sporensuspensie was gemaakt gebruikt.



Figuur 2 Met *Botrytis* geïnoculeerde 4 weken oude planten. De druppeltjes met *Botrytis* suspensie die op blaadjes van het 3^e en 4^e blad zijn aangebracht zijn zichtbaar.

Na inoculatie zijn de planten weggezet in met plastic omgeven raamwerken om luchtvochtigheid zo groot mogelijk te houden (zie Figuur 3).



Figuur 3 Met *Botrytis* geïnoculeerde tomatenplanten werden weggezet op een tafel in de kas onder met plastic omgeven raamwerken om de luchtvochtigheid te verhogen.

Proefopzet

Om te testen wat de effecten waren wanneer met *Botrytis* geïnoculeerde planten bespoten werden met een fungicide, Luna (Bayer), voor dit onderzoek beschikbaar gesteld door Bayer, zodra stress gemeten werd rond de inoculatieplek in vergelijking met bespuiting van planten wanneer symptomen duidelijk zichtbaar waren met het blote oog, werden de volgende behandelingen toegepast:

- a. Planten worden geïnoculeerd met *Botrytis* en zodra stress gemeten is worden ze behandeld met Luna.
- b. Planten worden geïnoculeerd met *Botrytis* en zodra symptomen met het blote oog zichtbaar worden ze behandeld met Luna.
- c. Planten worden geïnoculeerd met *Botrytis* en niet behandeld met Luna.
- d. Planten worden niet geïnoculeerd met *Botrytis* en niet behandeld met Luna.

Er waren 5 planten per behandeling. Behandelingen zijn getest in 2 herhalingen. De eerste keer werden de planten geïnoculeerd op 1 juli 2019, de tweede keer op 8 juli 2019.

Voor de behandeling met een curatief middel werd Luna (Bayer) ingezet. Luna is een systemisch werkend middel met een brede fungicide werking. Behandeling met het fungicide Luna was als volgt: de te behandelen plant werd in een spuitcabine geplaatst op een draaiplatform. Terwijl de plant werd gedraaid werd deze beneveld met de volgens de gebruiksaanwijzing gemaakte 0.05% Luna oplossing in water in een plantenspuit, zodanig dat het bladoppervlak vochtig werd maar niet druipnat.

Waarnemingen

Er zijn Fv/Fm en RGB (rood groen blauw) metingen verricht met het Plant Explorer camera systeem van Phenovation. Een half uur voor een meting werden de planten naar de meetruimte gebracht waar ze donker gezet werden. Na een half uur werden ze na deze donkeradaptatie gemeten in de Plant Explorer. De planten werden van bovenaf gemeten. Fv/Fm vertegenwoordigt de fotosynthese efficiëntie. Hoe lager Fv/Fm, hoe meer stress de plant ervaart.

Symptoomvorming werd gevolgd via RGB beelden waargenomen door de Plant Explorer of door visuele waarneming met het blote oog. De Fv/Fm en RGB beelden zijn geanalyseerd met beeldanalyse software (Data analysis software van Phenovation, version 5.4.7 beta-64b). Fv/Fm waarden worden daardoor met een kleur aangeduid waardoor gezonde delen zich onderscheiden van gestreste delen. RGB beelden geven een beeld dat lijkt op wat wij met het blote oog zien.

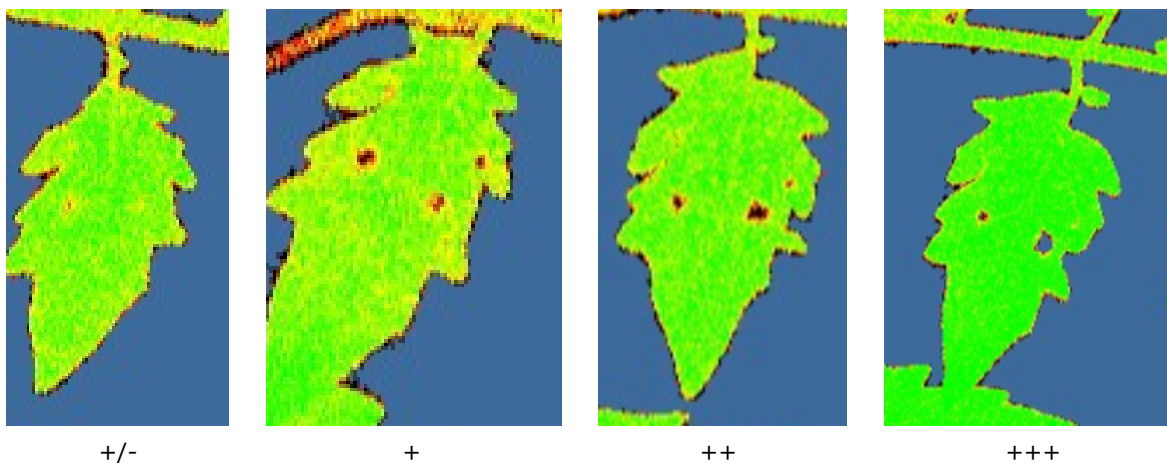
2.2.1.3 Resultaten

Er zijn RGB en Fv/Fm metingen verricht met de Plant Explorer van Phenovation 21, 25, 28, 44, 51, 75 en 100 uur na inoculatie (hpi).

Fv/Fm beelden gaven de mate van stress weer. Fv/Fm is een maat voor de efficiëntie van de fotosynthese. Bij een gezonde plant hebben alle delen van de plant een hoge waarde van Fv/Fm. Dit wordt in het beeld weergegeven met een groene kleur. Op plaatsen waar stress is, bijvoorbeeld veroorzaakt door *Botrytis* aantasting, is de fotosynthese efficiëntie lager en is de Fv/Fm lager, weergegeven met een rode kleur. Voor dit onderzoek werd de waargenomen stress in onderstaande klassen ingedeeld:

- (-) Groene kleur op de locatie van de inoculatie.
- (+/-) Gele kleur, soms met beetje rood, op locatie van inoculatie.
- (+) Rode kleur, soms met beetje geel, op locatie van inoculatie.
- (++) Dieprode kleur op locatie van inoculatie.
- (+++) Blauwe kleur (geen fotosynthese activiteit) op locatie van inoculatie.

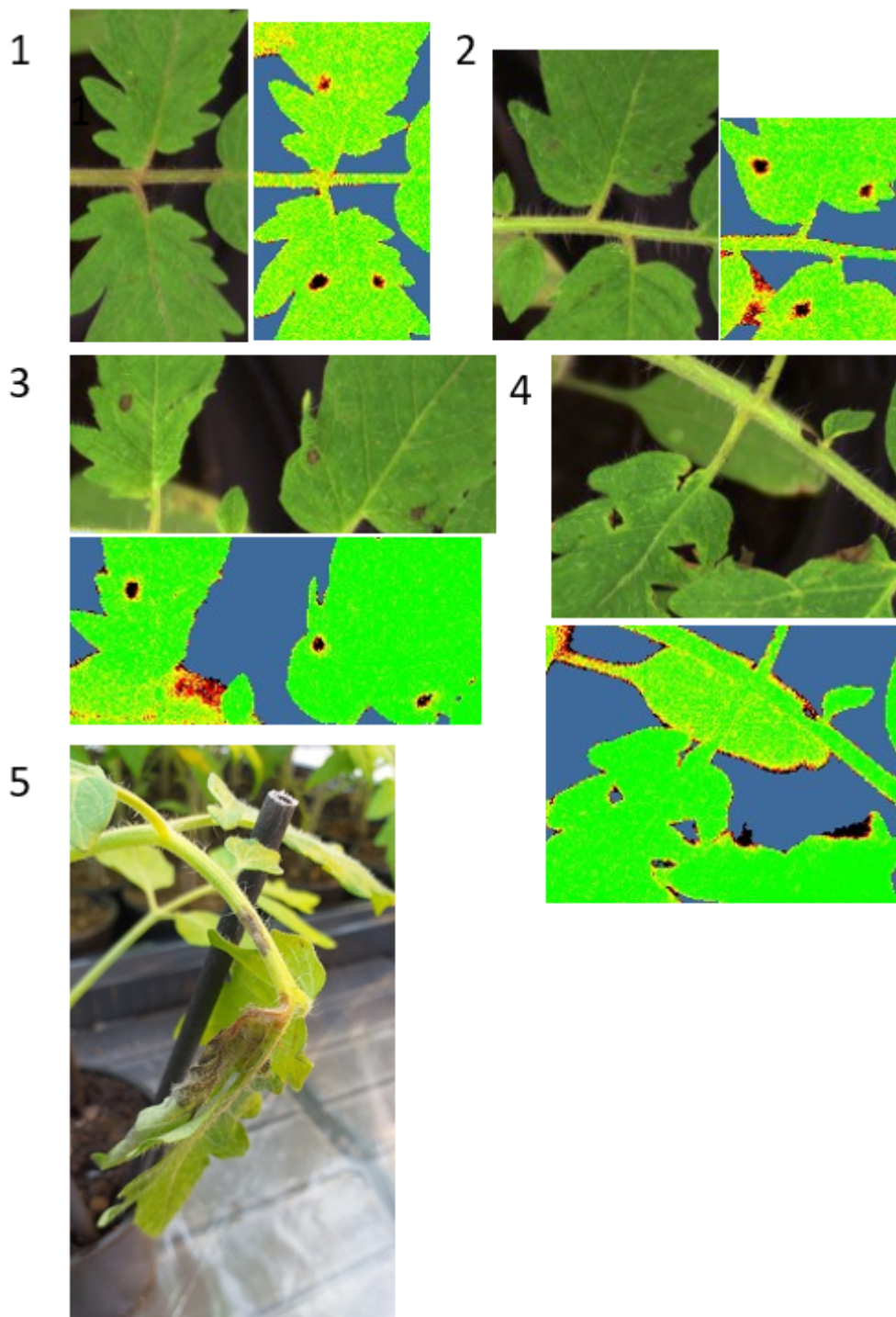
Representatieve voorbeelden van de laatste vier klassen zijn hieronder weergegeven in Figuur 4 voor een blaadje van plant 73, gemeten op 21, 25, 51 en 75 hpi:



Figuur 4 Representatieve voorbeelden van de klassen +/-, +, ++ en +++ van waargenomen stress. Blauwe vlek bij +++ werd doorgans veroorzaakt door aanwezigheid van een gat.

De RGB beelden van de Plant Explorer¹ gaven de symptoomvorming weer. Voor dit onderzoek werden de symptomen in de onderstaande klassen ingedeeld, geïllustreerd aan de hand van representatieve voorbeelden vergezeld van de bijbehorende Fv/Fm beelden in Figuur 5. De symptoomklasse indeling was als volgt:

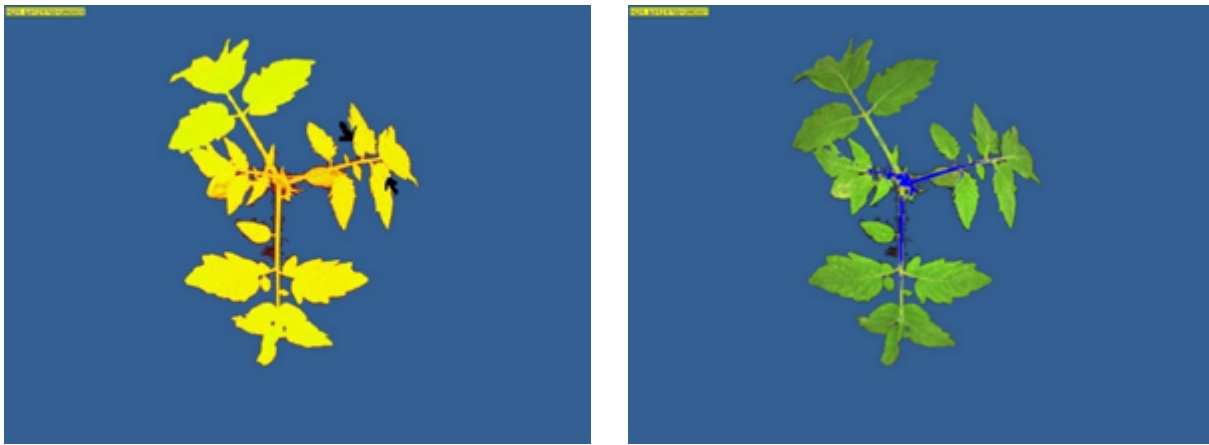
- 0= Niets afwijkends te zien.
- 1= Zeer lichte verkleuring net zichtbaar als lichte lichtbruin verkleuring in het blad als je weet waar geïnoculeerd is.
- 2= Lichte necrose zichtbaar als lichtbruin vlekje ter grootte van inoculatieplek.
- 3= Necrose duidelijk zichtbaar als bruine vlek met een rand om de lesie.
- 4= Necroseplek met aan de binnenkant een gat.
- 5= Necroseplek die veel groter is dan de inoculatiedruppel die zich uitbreidt en waarbij ook sporen zichtbaar zijn.



Figuur 5 RGB opnames die typische voorbeelden van symptoomklassen 1, 2, 3, 4 en 5 weergeven met daarnaast bijbehorende beelden van de Fv/Fm opnames die op hetzelfde moment genomen zijn.

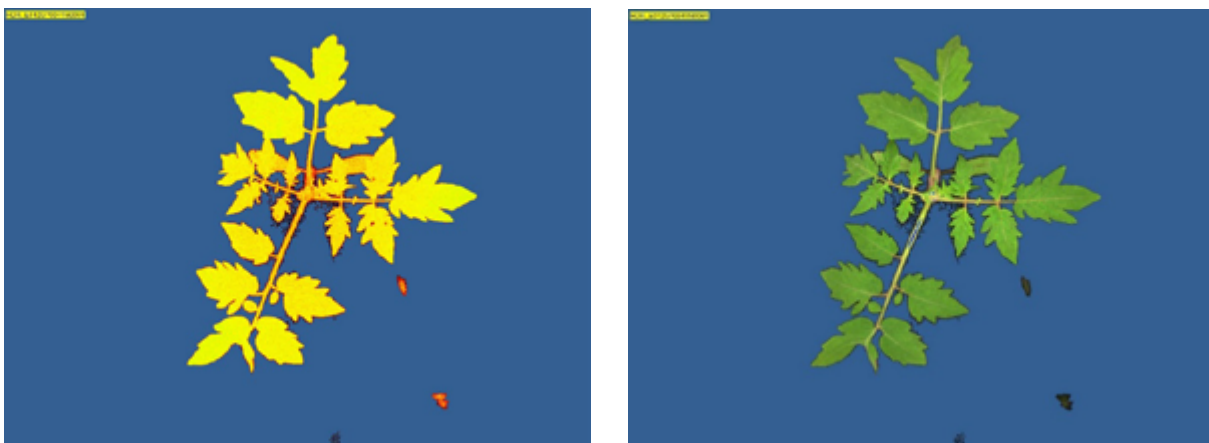
De scores voor de klassen van stress en symptomen waargenomen aan de planten van de verschillende behandelingen gemeten 21, 25, 28, 44, 51, 75 en 100 uur hpi staan weergegeven in Bijlage 1.

Op 21 hpi werd bij 13 van de 30 met *Botrytis* geïnoculeerde planten stress waargenomen op de inoculatieplekken. Bij 2 planten werden stress plekjes klasse + waargenomen en bij 11 planten waren de stress plekjes net zichtbaar (klasse +/-). Van deze 13 planten met stress waren er slechts 2 met beginnende necrose (klasse 1). Deze 2 planten vertoonden beginnende stress (klasse +/-). Bij 2 planten waren nog geen symptomen te zien toen stress al goed zichtbaar was (klasse +). In Figuur 6 plant 43 21 hpi als voorbeeld van plant met beginnende stress (klasse +/-) en nog geen zichtbare symptomen (klasse 0). Bij de planten zonder waarneembare stress werden ook geen symptomen waargenomen op 21 hpi.



Figuur 6 Fv/Fm beeld (links) en RGB beeld (rechts) van een plant (plant 43) zonder symptomen (klasse 0) met beginnende stress klasse +/-, aangegeven door pijlen.

Op 25 hpi was bij alle 30 met *Botrytis* geïnoculeerde planten stress waarneembaar. Er was 1 plant met beginnende stress, bij de overige 30 was de stress zeer goed zichtbaar. 21 Planten hadden stress klasse + en 8 planten stress klasse ++. Alle 30 met *Botrytis* geïnoculeerde planten hadden lichte necrose, klasse 1 en 2 (zie Bijlage 1) die veel minder goed waarneembaar was dan de stress. In Figuur 7 plant 41 25 hpi als voorbeeld van plant met goed zichtbare stress plekjes klasse ++ en symptomen klasse 2.



Figuur 7 Fv/Fm beeld (links) en RGB beeld (rechts) van een plant met symptomen klasse 2 met stress klasse ++. De stress is veel beter zichtbaar dan de symptomen.

Aangezien de stress bij alle planten van behandeling A op 25 hpi voor het eerst goed zichtbaar was (+ of ++), zijn deze planten op 26 hpi bespoten met Luna.

Planten van behandeling B zouden worden bespoten met Luna als de symptomen met het oog goed zichtbaar zouden zijn. Het was lastig vast te stellen wanneer symptomen goed genoeg zichtbaar waren dat ze opgemerkt zouden worden als je niet wist waar geïnoculeerd was. In dit experiment hebben we als keuzemoment genomen het meettijdstip waarop de planten van behandeling B ieder minstens 1 symptoom categorie 4 hadden (zwarte necroseplek met gat). Dat was op 75 hpi. De planten van behandeling B zijn op 76 hpi bespoten met Luna.

Zowel bij planten die 26 hpi als 75 hpi bespoten zijn werd geen verandering in stress gemeten na de bespuiting.

Globaal genomen was het verloop van de symptoomontwikkeling tot 100 hpi vergelijkbaar bij behandelingen A, B en C (zie Bijlage 1). Grofweg was symptoomontwikkeling van categorie 1 zichtbaar op 21 hpi tot en met categorie 4 op 100 hpi. Bij behandeling C, inoculatie met *Botrytis* en geen behandeling met Luna, werden goed zichtbare symptomen klasse 3 waargenomen rond 51 hpi. Bij behandeling D, de watercontrole, werden geen symptomen gevormd. Het eerstvolgende observatiemoment na 100 hpi was 8 dagen na inoculatie (dpi), ongeveer 166 hpi. Toen werden bij behandeling C symptomen categorie 5 waargenomen terwijl de symptomen in de andere behandelingen niet veranderd waren. Dit beeld was nog steeds zo op 10 dpi. Symptoomplekken werden bij A en B, de planten die behandeld zijn met Luna, niet veel groter dan het oppervlak van de inoculatiedruppel. Sporenvorming trad uitsluitend op bij de planten die niet behandeld waren met Luna (behandeling C), en wel tussen 100 en 166 hpi. Ook werden daar grotere symptoomplekken aangetoond.

2.2.1.4 Discussie

Alle met *Botrytis* geïnoculeerde planten van behandelingen A, B en C, hebben symptomen gevormd. Symptoomplekken werden bij A en B, de planten die behandeld zijn met Luna, niet veel groter dan het oppervlak van de inoculatiedruppel. Sporenvorming trad uitsluitend op bij de planten die niet behandeld waren met Luna (behandeling C) tussen 100 en 166 hpi. Ook werden daar grotere symptoomplekken aangetoond.

Er waren ook een paar geïnoculeerde planten die niet gemeten zijn in de Plant Explorer. Deze bleven dus voortdurend in de vochtige en lichte omgeving van de kas terwijl de planten van behandelingen A-D er regelmatig voor perioden van een uur uit gehaald werden voor de metingen. De planten die niet gemeten werden, vertoonden al veel sneller symptomen van categorie 3, 4 en 5. Tussen 50 en 75 hpi trad bij die planten al de eerste sporenvorming op en symptoomplekken breidden bij die planten veel meer uit dan bij de andere planten die gemeten werden. Dit geeft aan dat het meten, waarbij de planten per meting minstens een uur uit de vochtige en lichte omgeving werden weggehaald, de ziektevorming vertraagde en beperkte. Stressplekken die waargenomen werden waren bij symptoomklassen 1-4 qua oppervlak niet groter dan de symptoomplekken die waargenomen werden. Dit was tegen de verwachting in. Bij symptoomklasse 5 werd wel stress gemeten bij weefsel aangrenzend aan het symptomatische weefsel.

Opmerkelijk was dat de waargenomen stress via het camera systeem, zeker in het begin van de infectie, veel beter zichtbaar was dan de met het blote oog waargenomen necrose. In sommige gevallen was de stress eerder zichtbaar dan de symptomen. Stress was in enkele gevallen 3 uur eerder te zien dan dat de eerste verkleuringen zichtbaar waren met het blote oog op de inoculatieplekken. We moeten ons wel realiseren dat er in dit experiment kunstmatig infecties werden geïnduceerd met een grotere sporendruk dan in de kas waarschijnlijk is. Elke inoculatiedruppel bevatte ongeveer 200 sporen. Daarnaast bevatte het inoculum ook nog suiker om de infectie mogelijk te maken. Normaliter gebruikt *Botrytis* de suiker die aanwezig is in het weefselvocht van de wond die de schimmel binnendringt. Deze omstandigheden zorgen er waarschijnlijk voor dat het infectieproces onder deze kunstmatige omstandigheden veel sneller verloopt dan onder praktijkomstandigheden in de kas. Onder praktijkomstandigheden zit er wellicht meer tijd tussen de eerste stress waarneming en de eerste symptoomvorming.

In onze proef wisten we precies waar we de symptomen moesten verwachten terwijl dat in de praktijk niet zo is. Het is onwaarschijnlijk dat in de praktijk symptomen van klassen 1 en 2 met het blote oog waargenomen worden. Waarschijnlijker is dat symptomen pas waargenomen worden vanaf klasse 3, wanneer necrose duidelijk zichtbaar is als bruine vlek met een rand om de lesie. In dit experiment zagen we dat bij de meeste planten verschijnen tussen 44 en 51 hpi.

Bovenstaande redeneringen volgend zouden stress metingen in de praktijk de stress op bladeren veroorzaakt door *Botrytis* minstens 1 tot 2 dagen eerder moeten kunnen aantonen dan met het blote oog waarnemingen van goed zichtbare symptomen. Veel belangrijker echter is het feit dat middels de camera systemen de stress veel duidelijker waar te nemen is dan de symptomen met het blote oog zijn. Dit zou de toepassing van een dergelijk camera systeem voor vroege detectie van *Botrytis* op bladeren in tomatenplanten rechtvaardigen.

In deze proef met jonge planten kon Luna sporenvorming voorkomen als het toegediend werd op het tijdstip waarop eerste stress zichtbaar was (26 hpi), en ook als het in een later stadium (76 hpi) werd toegediend wanneer symptomen heel goed zichtbaar waren. Van biologische middelen is bekend dat ze niet altijd goed werken bij een hoge ziektedruk, waardoor het zinvol is te bestuderen of deze effectief inzetbaar zijn op het moment dat eerste stress gemeten wordt als er nog geen grote ziektedruk is.

2.2.2 Inoculaties van blaadjes van tomaat in petrischaal

2.2.2.1 Inleiding

In het vorige experiment waarbij bladeren die zich aan tomatenplanten bevonden werden geïnoculeerd bleek dat een voortdurende vochtige omgeving de infectie van de bladeren bevorderde. Planten die voor de metingen uit de vochtige omgeving werden gehaald vertoonden later en minder symptomen dan planten die niet uit de vochtige omgeving werden gehaald. Dit bracht ons er toe een experiment uit te voeren met dezelfde behandelingen als uit het vorige experiment maar dan met blaadjes van tomaat in een continu vochtige omgeving van een petrischaal waarbij de *Botrytis* ontwikkeling bevorderd wordt. De doelstelling zou met deze aanpak beter bereikt moeten kunnen worden. We hebben immers al gezien dat de stress in eerste instantie optreedt op de plek van de inoculatie en niet ver daarbuiten uitbreidt door de plant. Aangezien de *Botrytis* zich continue zal kunnen ontwikkelen doordat de luchtvochtigheid continue hoog zal blijven zouden de volgende vragen uit de doelstelling nu beter beantwoord moeten kunnen worden:

- Hoe verhoudt zich de schade door infectie na spuiten zodra je stress ziet tov spuiten als je symptomen ziet?
- Wanneer treedt sporenvorming op bij de verschillende behandelingen A-D (zie behandelingen)?

2.2.2.2 Uitvoering onderzoek

Plantmateriaal

Tomatenplanten, cv Moneymaker, werden door de kassendienst van WUR vanuit zaad in potgrond opgekweekt en verpot in 12 cm potten met een inhoud van 0.75 l. Als planten 3 weken oud waren werden ze in Wageningen in een kascompartiment van WUR op tafels geplaatst bij een constante temperatuur van 20 C en een RH van 90%.

Inoculatie met Botrytis

Botrytis sporensuspensies (10^6 kve/ml) van *B. cinerea* isolaat B05.10 (Cuesta Arenas *et al.*, 2010) in (12 g/l) Difco™ Potato Dextrose Broth (PDB) medium (Becton, Dickinson and Company), werden beschikbaar gesteld door Jan van Kan van Wageningen Universiteit. De sporensuspensie werden met PDB op een concentratie van 1.10^5 kve/ml gebracht. Blaadjes van het 3^e blad van ongeveer 4 weken oude planten werden op een 1.5% wateragarlaag in een vierkante petrischaal van 12 cm (Greiner Bio-One) gelegd. Per blaadje werden 2 of 4 druppels van 2 ul van de sporensuspensie (1.10^5 kve/ml) aangebracht. Bij controle blaadjes werd de PDB buffer waarin de sporensuspensie was gemaakt gebruikt.

Proefopzet

Om te testen wat de effecten waren wanneer met *Botrytis* geïnoculeerde blaadjes bespoten werden met een fungicide, Luna (Bayer), voor dit onderzoek beschikbaar gesteld door Bayer, zodra stress gemeten werd rond de inoculatieplek in vergelijking met bespuiting van blaadjes wanneer symptomen net zichtbaar waren met het blote oog, werden de volgende behandelingen toegepast:

- a. Blaadjes worden geïnoculeerd met *Botrytis* en zodra stress gemeten is worden ze behandeld met LUNA.
- b. Blaadjes worden geïnoculeerd met *Botrytis* en zodra symptomen met het blote oog zichtbaar worden ze behandeld met LUNA.
- c. Blaadjes worden geïnoculeerd met *Botrytis* en niet behandeld met LUNA.
- d. Blaadjes worden niet geïnoculeerd met *Botrytis* en niet behandeld met LUNA.

Behandeling met het fungicide Luna was als volgt: de te behandelen petrischaal werd in een spuitcabine geplaatst op een draaiplateau. Terwijl de petrischaal werd gedraaid werd deze beneveld met de volgens de gebruiksaanwijzing gemaakte 0.05% Luna oplossing in water in een plantenspuit, zodanig dat het bladoppervlak vochtig was maar niet druipnat.

Waarnemingen

Er zijn metingen verricht met het Plant Explorer camera systeem van Phenovation. De petrischalen werden een beetje schuin onder de camera geplaatst om reflectie van de deksel te voorkomen. De petrischalen bevonden zich in het donker. Iedere 15 minuten werd een opname gemaakt.

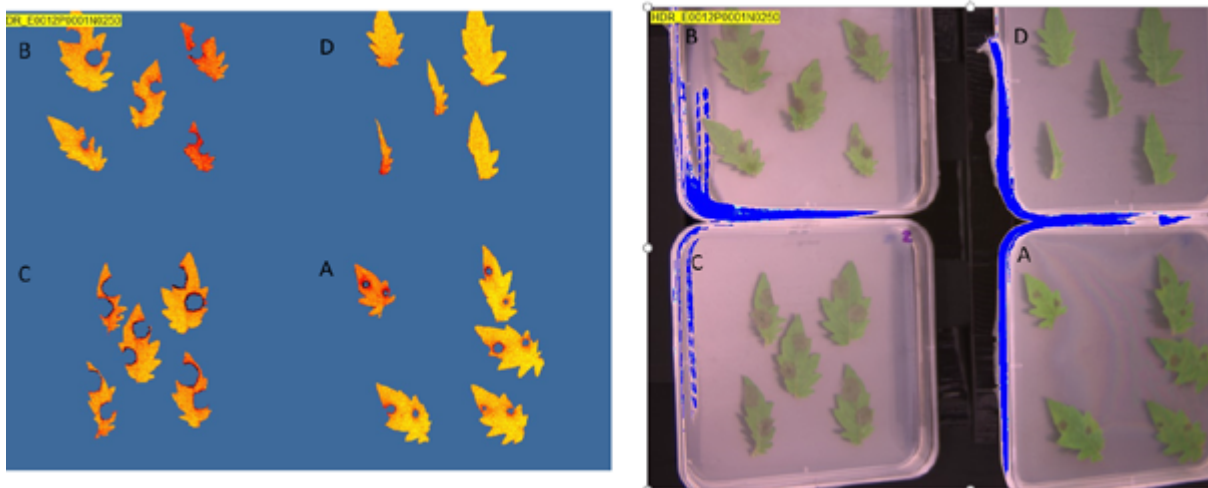
Stress en symptoomvorming werden respectievelijk gevolgd via Fv/Fm en RGB beelden waargenomen door de Plant Explorer. De Fv/Fm en RGB beelden zijn geanalyseerd met beeldanalyse software (Data analysis software van Phenovation, version 5.4.7 beta-64b).

Bij de Rometron CF metingen aan de blaadjes in petrischalen is gebruik gemaakt van 3 sensoren; UV, rood en blauw. Elk blad is apart gemeten door een sjabloon over de hele schaal te leggen. Het sjabloon is steeds even groot, de grootte van het blad is verschillend. Voor de metingen is het belangrijk dat de positie van het blad en de afstand tot de camera steeds hetzelfde is.

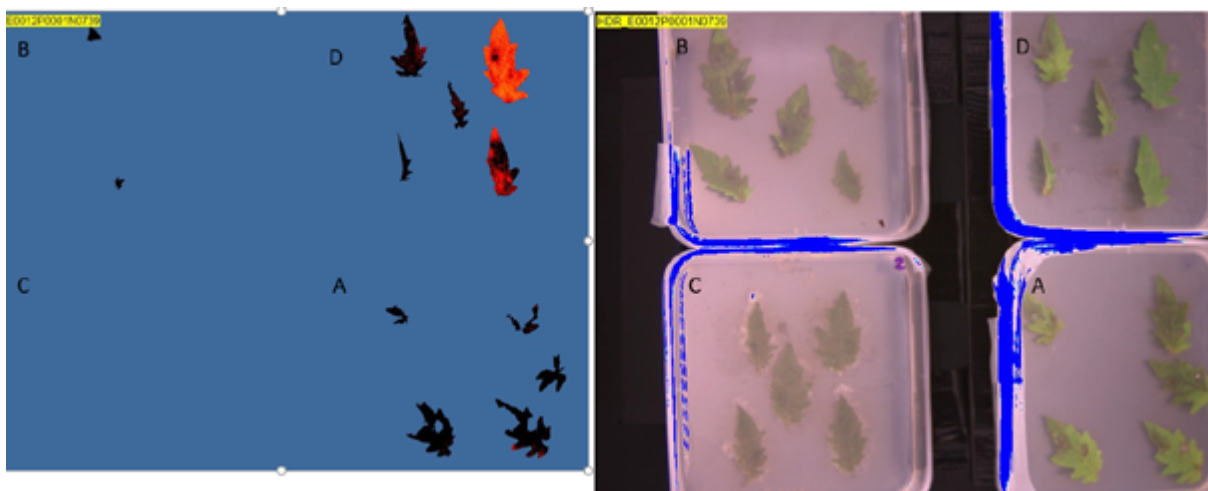
2.2.2.3 Resultaten

Op 29 juli 2019 werden per behandeling 5 blaadjes in een petrischaal gebracht. Waarnemingen zijn weergegeven in Bijlage 2. Bij aanvang van het experiment was al stress te zien die niet gerelateerd is aan *Botrytis* infecties. Deze moet als achtergrond beschouwd worden. Rond 23 hpi werd de eerste stress zichtbaar bij behandelingen A, B en C. De eerste verkleuringen op de inoculatieplekken bij A, B en C werden zichtbaar rond 30 hpi. Deze werd voor het experiment niet aangemerkt als eerst zichtbare symptoomtijdstip aangezien deze niet gescoord zou worden wanneer je niet wist waar de verkleuring verwacht moest worden. Behandeling A, bespuiten zodra stress gemeten wordt, had rond 23 hpi uitgevoerd moeten worden maar werd echter pas veel later op 43 hpi uitgevoerd. De tweede bespuiting van behandeling B werd uitgevoerd 92 hpi. Er was nog geen mycelium zichtbaar maar al zo veel bruinkleuring aanwezig bij B en C dat nog langer wachten niet zinvol leek. Het effect van de eerdere bespuiting van behandeling A was toen al goed zichtbaar aangezien er bij A veel minder bruinkleuring te zien was. Op 138 hpi waren de blaadjes van A volledig bruin gekleurd en kon geen fotosynthese activiteit meer gemeten worden, terwijl die van behandeling C en D nog wel enige fotosynthese activiteit lieten zien. Na beide bespuitingen werd geen stress reactie waargenomen in de Fv/Fm beelden.

Op 12 augustus 2019 werden per behandeling 5 blaadjes in een petrischaal gebracht. Waarnemingen zijn weergegeven in Bijlage 3. Rond 26 hpi was de eerste stress zichtbaar bij behandelingen A, B en C en werden de blaadjes van behandeling A bespoten met Luna. Op dat moment waren er met het blote oog heel lichte vlekjes zichtbaar op de inoculatieplekken die 36 hpi iets beter zichtbaar waren als lichte plekken. Vanaf 40 hpi werden de plekken duidelijker zichtbaar en op 50 hpi waren bruinverkleuringen op de inoculatieplekken goed zichtbaar bij A, B en C en werden de blaadjes van B bespoten met Luna. Vanaf 65 hpi begint het effect van de eerste bespuiting van behandeling A goed zichtbaar te worden. Blaadjes van A vertonen dan meer fotosynthese activiteit dan die van B en C (zie Figuur 8). Op 192 hpi is geen fotosyntheseactiviteit meer zichtbaar in blaadjes van behandelingen B en C en is uitsluitend nog wat fotosynthese activiteit aanwezig in blaadjes van behandeling A die behandeld zijn met Luna toen de eerste stress verscheen en in de controle blaadjes van behandeling D die niet geïnoculeerd zijn met *Botrytis* (zie Figuur 9). Na beide bespuitingen werd geen stress reactie waargenomen in de Fv/Fm beelden.



Figuur 8 Fv/Fm en RGB beelden van blaadjes van behandelingen A, B, C en D van experiment 12 augustus 2019, 65 hpi. Met *Botrytis* geïnoculeerde blaadjes van behandeling A die behandeld zijn met fungicide Luna toen stress zichtbaar werd vertonen meer fotosynthese activiteit dan de met *Botrytis* geïnoculeerde blaadjes van behandelingen B en C.

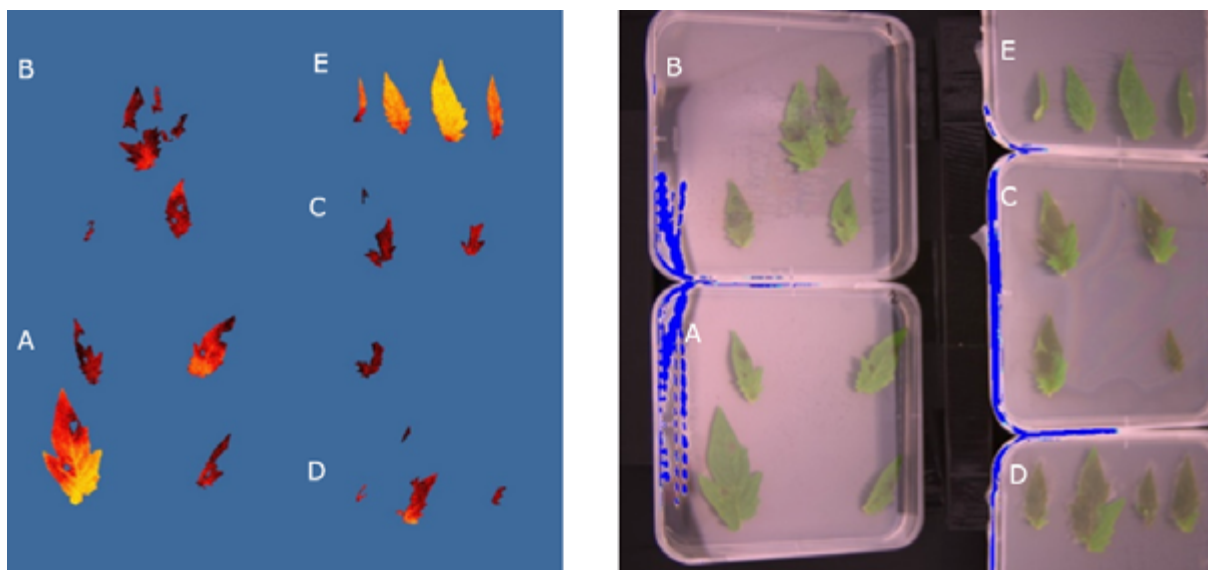


Figuur 9 Fv/Fm en RGB beelden van blaadjes van behandelingen A, B, C en D van experiment van 12 augustus 2019, 192 hpi. Er is geen fotosyntheseactiviteit meer zichtbaar in met *Botrytis* geïnoculeerde blaadjes van behandelingen B en C en is uitsluitend nog wat fotosynthese activiteit aanwezig in blaadjes van behandeling A die behandeld zijn met Luna toen de eerste stress verscheen en in de controle blaadjes van behandeling D die niet geïnoculeerd zijn met *Botrytis*.

Op 27 augustus 2019 werden per behandeling 5 blaadjes in een petrischaal gebracht. Er werd in dit experiment een extra behandeling toegevoegd waarmee de behandelingen als volgt waren:

- Blaadjes worden geïnoculeerd met *Botrytis* en zodra stress gemeten is worden ze behandeld met LUNA.
- Blaadjes worden geïnoculeerd met *Botrytis* en zodra eerste symptomen zichtbaar zijn worden ze behandeld met LUNA.
- Blaadjes worden geïnoculeerd met *Botrytis* en zodra eerste sporulatie zichtbaar is worden ze behandeld met LUNA.
- Blaadjes worden geïnoculeerd met *Botrytis* en niet behandeld met LUNA.
- Blaadjes worden niet geïnoculeerd met *Botrytis* en niet behandeld met LUNA.

Waarnemingen zijn weergegeven in Bijlage 4. Rond 27 hpi was de eerste stress zichtbaar bij behandelingen A, B, C en D en werden de blaadjes van A behandeld met Luna. Op 46 hpi, toen de eerste symptomen goed zichtbaar waren als bruine vlekjes, werden de blaadjes van B bespoten met Luna. Op 79 hpi, toen sporulatie zichtbaar was bij blaadjes van C en D werden de blaadjes van C bespoten. Het beeld van 104 hpi is weergegeven in Figuur 10. De niet met *Botrytis* geïnoculeerde blaadjes van E zien er nog groen uit en vertonen een beetje stress. De blaadjes van A die behandeld zijn met Luna op 27 hpi toen de 1^e stress zichtbaar was zien er vergelijkbaar uit afgezien van het feit dat ze een paar kleine bruine vlekjes vertonen. Met *Botrytis* geïnoculeerde blaadjes D die niet behandeld zijn met Luna zijn grotendeels bruin en vertonen nog weinig fotosyntheseactiviteit. De blaadjes van B, die 46 hpi behandeld zijn met Luna toen ze bruine vlekjes vertoonden zien er nog redelijk groen uit maar ze vertonen veel minder fotosyntheseactiviteit dan de blaadjes van A die behandeld zijn toen ze stress vertoonden.



Figuur 10 Fv/Fm en RGB beelden van blaadjes van behandelingen A, B, C, D en E van experiment van 27 augustus 2019, 104 hpi. De met *Botrytis* geïnoculeerde blaadjes die behandeld zijn met fungicide Luna toen eerste stress zichtbaar was zijn nog relatief fris en groen en vertonen meer fotosynthese activiteit dan de andere met *Botrytis* geïnoculeerde blaadjes die pas behandeld zijn met Luna toen symptomen zichtbaar waren.

Beknopt de resultaten van de 3 Rometron sensoren.

De Rometron CF sensor met UV signaal geeft het grootste verschil tussen gezonde en gestreste blaadjes. Bij de rood en blauw sensoren was het verschil in signaal minder of was er geen verschil. Bij eerdere metingen aan blaadjes die nog aan de plant vastzaten was er het zelfde beeld, de uv sensor gaf duidelijk verschil in signaal tussen gezonde en zieke plant (3 dagen na inoculatie). Ziek geeft een hogere fluorescentie (bij zelfde hoeveelheid chlorofyl en afstand). De Rometron CF sensoren toonden de stress in dit experiment 1 dag later aan dan de PlantExplorer. De symptomen op het blad waren dan al zichtbaar (als je weet waar je moet kijken).

2.2.2.4 Discussie

Bij de blaadjes in de petrischalen was de eerste stress zichtbaar ongeveer 26 hpi en eerste lichte verkleuringen waren met het blote oog ongeveer 7 uur daarna zichtbaar, vooral omdat de Fv/Fm metingen hadden uitgewezen waar je ze kon verwachten. De Rometron sensoren konden pas iets afwijkends aantonen rond 48 tot 50 hpi, dus ongeveer een dag nadat de Fv/Fm metingen stress hadden aangetoond. Evenals bij de jonge planten waren necroseplekken goed waarneembaar ongeveer een dag nadat Fv/Fm metingen de eerste stress waarnamen. De Rometron sensoren zagen dus voor het eerst iets afwijkends als dat met het blote oog ook net te zien was. Het is de vraag of de Rometron sensoren, die weliswaar rond dezelfde tijd als dat de symptomen zichtbaar zijn iets afwijkends waarnemen, wellicht veel duidelijker aangeven dat er iets afwijkends te zien is dan dat het met het blote oog waar te nemen is in de kas door scouts, waardoor inzet ervan interessant zou zijn indien de sensoren op een robot de kas kunnen scannen.

Conclusies van de experimenten aan bladinoculaties:

- Met Phenovation camera's (Plant Explorer, Crop Reporter en Pathoscreen) is 1^e stress waar te nemen ongeveer 21 hpi bij plant in kas en rond 26 hpi bij blad in petrischaal.
- Als je weet waar je in een plant symptomen kunt verwachten zie je daar ongeveer vanaf 3 uur nadat je daar stress hebt gemeten lichte verkleuringen verschijnen. Bij blaadjes in petrischaal ongeveer vanaf 7 uur nadat je stress hebt gemeten.
- Ongeveer een tot twee dagen na de 1^e stress zijn necrosevlekken goed waarneembaar in planten. Rometron sensoren meten ongeveer een dag na de eerste stress waarneming via Fv/Fm meting iets afwijkends.
- Behandeling met Luna levert geen extra stress op in tomaat.
- In petrischalen is 8 dpi geen fotosyntheseactiviteit meer in de bladeren die 50 hpi bespoten zijn terwijl bij bladeren die 26 hpi zijn bespoten nog ongeveer 40% van het bladoppervlak lichte fotosynthese activiteit vertoont.
- Spuiten zodra je stress meet in plaats van als je pas symptomen waarneemt lijkt perspectief te bieden.
- Teler ziet veelal pas *Botrytis* symptomen in het sporulatie stadium (en dan ook meestal op stengel, niet op bladeren). Teler zal dus veel later dan in onze experimenten curatief spuiten waardoor het effect nog groter zal zijn dan in onze experimenten.
- Uitwerking voor de praktijk zal zich moeten richten op *Botrytis* infecties in stengel.
- Een aantal Rometron sensoren detecteren ongeveer een dag nadat de Plant Explorer, Crop Reporter of Pathoscreen stress waarnemen iets afwijkends in met *Botrytis* geïnfecteerde blaadjes.

Het onderzoek beschreven in 2.2 is noodgedwongen uitgevoerd met geïnfecteerde blaadjes aangezien slechts camera's beschikbaar waren die Fv/Fm opnames konden maken vanaf de bovenkant van de plant. Weliswaar is aangetoond dat met behulp van Fv/Fm metingen *Botrytis* infecties eerder en beter waargenomen kunnen worden aan met *Botrytis* geïnfecteerde blaadjes dan via visuele waarnemingen met het blote oog maar in de praktijk komen bladaantastingen door *Botrytis* in tomaat niet zo veel voor. Gezonde bladeren worden al helemaal niet aangetast. De teler wordt alert als hij droge bladpunten ziet. Daar is dan te weinig Calcium en de cellen gaan daar kapot. *Botrytis* zal als zwakteparasiet daar aangrijpen en het blad aantasten en zich van daaruit verspreiden. Stengelaantastingen ontstaan vaak op de plekken waar bladeren zijn verwijderd. Die plekken houdt teler in de gaten. Het was dus belangrijk dat ook soortgelijk onderzoek werd uitgevoerd met camera's die de stengel van de zijkant kunnen observeren.

2.3 Stengelinoculaties

2.3.1 Inleiding

Aangezien in de praktijk *Botrytis* infecties bij tomaat vooral voorkomen aan de stengel, daar waar de bladeren verwijderd zijn, was het van belang om ook een experiment uit te voeren dat de praktijksituatie zo goed mogelijk nabootst. Daarvoor was het belangrijk dat we de beschikking zouden hebben over een camera die Fv/Fm metingen kan doen in de kas aan stengels van tomatenplanten die, net als in de praktijk, op steenwol geteeld worden. Phenovation bood aan om hun CropReporter speciaal voor dit doel om te bouwen zodat er een camerasysteem ontstond, dat voortgeduwd kon worden op een buisrail systeem en waarmee opnames gemaakt konden worden van de zijkant van planten.

Een andere voorwaarde voor een dergelijk experiment was dat de planten in de kas succesvol geïnfecteerd zouden kunnen worden. Het experiment uit 2.2.1 gaf aan dat het niet eenvoudig was om bladinfecties bij potplanten te verkrijgen in de kas aangezien een hoge luchtvochtigheid daarvoor vereist is. Collega onderzoekers hadden geen ervaringen met het succesvol inoculeren van stengelwonden aan grote tomatenplanten op steenwol in de kas waardoor het nodig was om een geschikte inoculatiemethode hiervoor te ontwikkelen. Om de praktijksituatie zo goed mogelijk te benaderen werd daarbij ook gekozen om inoculum te gebruiken dat geen suiker bevat welke het infectieproces bevordert. De suiker die vrijkomt na verwonding zou net als in de praktijk ook in dit experiment toereikend moeten zijn.

Net als bij het onderzoek met de bladinoculaties was bij het onderzoek met stengelinoculaties het doel te testen of inzet van stress metingen interessant kan zijn voor een teler voor het effectief toedienen van een curatief middel. Is het aantrekkelijker om al een curatief middel toe te dienen zodra je stress ziet ipv later, als je met het blote oog symptomen duidelijk ziet? Aangezien we hiervoor het beste met een tomatenras konden werken dat ook duidelijk symptomen van *Botrytis* toont is op aangeven van tomatentelers gekozen voor het ras Sevance.

2.3.2 Uitvoering onderzoek

Planten

Tomatenplanten, cv Sevance, werden gezaaid en opgekweekt door de kassendienst van WUR. Zaden werden beschikbaar gesteld door de Ruiter. Als planten ongeveer 8 weken oud waren werden ze in de periode februari tot april 2020 naar het kascompartiment gebracht en geteeld met een hogedraadsysteem, op steenwol. De planten werden automatisch van voedingsoplossing voorzien. De luchtvochtigheid (RV) in de kas werd op 90% ingesteld. Om *Botrytis* infecties te bevorderen werd een tot drie keer daags de vloer nat gespoten.

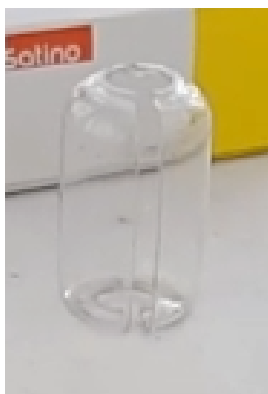
Er werden 30 planten in een rij van ongeveer 6m geplaatst. De planten werden om en om via de draad naar links en naar rechts getrokken.



Figuur 11 Tomaten planten, ras Sevance, in onderzoekskas.

Inoculatie van stengel van tomatenplanten in de kas met Botrytis

Botrytis sporensuspensies van *B. cinerea* isolaat B05.10 (10^6 kve/ml) in Difco™ Potato Dextrose Broth (PDB) medium (12 g/l) (Becton, Dickinson and Company), werden beschikbaar gesteld door Jan van Kan van Wageningen Universiteit (Cuesta Arenas *et al.*, 2010). De sporensuspensie werden met water op een concentratie van 1.10^5 kve/ml gebracht. Van een 50 ml glashelder PET flesje (Fles 50 ml PET glashelder BOSTON-R 20-410 7GR, (Nipak.nl), zie Figuur 12A) werd de hals en de onderkant verwijderd waarna het van boven tot onderen werd doorgesneden (zie Figuur 12B). Een Kleenex tissue werd doormidden geknipt (Figuur 12C) en opgevouwen tot een 0.5 cm breed bandje (Figuur 12D). Vervolgens werd het natgespoten en ongeveer 1 cm onder het af te snijden blad om de stengel gedraaid (Figuur 12E). Een blad, ongeveer ter hoogte van 20 tot 60 cm boven de grond, werd van de stengel afgeknipt met een snoeischaar, zodanig dat er een klein bladstompje over bleef (Figuur 12F). De wond werd vervolgens een keer bespoten met de *Botrytis* suspensie (1.10^5 kve/ml). Controles werden bespoten met water. Het bewerkte flesje werd om de stengel gebracht, zodanig dat de onderkant van het flesje om de tissue kwam te zitten waardoor het zich een beetje vastklemde. De opening aan de zijkant werd gedicht met natte watten. Zie Figuur 12G voor het eindresultaat. Er werd gezorgd dat de watten en de tissue aan het flesje voortdurend vochtig waren door ze nat te spuiten indien nodig.



Figuur 12 Inoculatieprocedure.

Camera

Ten einde een mogelijkheid te verkrijgen om met een camera die Fv/Fm beelden en RGB beelden kan maken van de zijkant van planten in de kas, is het camerablok van de CropReporter op een onderstel geplaatst waarin een vierkante spiegel geplaatst was die in een diagonale stand gezet kon worden, zodanig dat middels spiegelreflectie de verticale opname omgezet werd in een horizontale. Het geheel werd op een onderstel geplaatst dat geschikt is om op een buisrailsysteem in de kas te rijden. Het eindresultaat werd de GreenhouseExplorer genoemd en is te zien in Figuur 13. In Figuur 13B is in de spiegel de camera die zich in het camerablok bevindt goed zichtbaar.



Figuur 13 De tot GreenhouseExplorer omgebouwde CropReporter camera. Middels de spiegel kan de camera die zich boven de spiegel in het huis bevindt en naar beneden gericht is, opnames maken van de zijkant van een plant.

Proefopzet

Om te testen wat de effecten waren wanneer met *Botrytis* geïnoculeerde bladstompjes bespoten werden met een lokaal werkend fungicide zodra stress gemeten werd rond de inoculatieplek in vergelijking met bespuiting van bladstompjes wanneer symptomen net zichtbaar waren met het blote oog, werden de volgende behandelingen opgezet:

- B sp str +*Botrytis* en middel toedienen als eerste stress zichtbaar (t=1), 5 planten.
- B sp symp +*Botrytis* en middel toedienen als symptomen zichtbaar (t=2), 5 planten.
- B niet sp +*Botrytis* en geen middel, 5 planten.
- W sp str -*Botrytis* en middel toedienen op t=1, 4 planten.
- B sp symp -*Botrytis* en middel toedienen op t=2, 5 planten.
- W niet sp -*Botrytis* en geen middel, 5 planten.

Zie Bijlage 5 voor welke planten welke behandeling hebben gekregen.

Als middel was gekozen voor Teldor (Bayer), dat beschikbaar was gesteld door Bayer.

Er werden per experiment 29 planten, verdeeld over 2 rijen gebruikt. Van de ene rij werden 15 planten gebruikt die naar 1 kant getrokken werden door de draden en van de ander rij werden 14 planten gebruikt die naar 1 kant getrokken werden door de draden. De behandelingen waren gerandomiseerd verdeeld over de 29 planten.

Waarnemingen

Metingen met de GreenhouseExplorer werden 's avonds laat in het donker uitgevoerd om zeker te zijn dat alle planten een goede donkeradaptatie hadden gehad. De GreenhouseExplorer werd op de buisrailsysteem getild en voor de plant met het te fotograferen bladstompje geduwd. Het bewerkte flesje om het bladstompje werd voorzichtig van de stengel verwijderd. Een stuk karton werd tussen de te fotograferen plant en de plant erna geplaatst zodat tijdens de opname de nog te fotograferen buurplanten niet belicht werden.

Symptomen werden vastgelegd via RGB beelden van de GreenhouseExplorer of via foto's gemaakt met de mobiele telefoon. Na de waarnemingen werden de bewerkte flesjes weer om de bladstompjes teruggeplaatst. De Fv/Fm en RGB beelden zijn geanalyseerd met beeldanalyse software (Data analysis software van Phenovation, version 5.4.7 beta-64b).

2.3.3 Resultaten

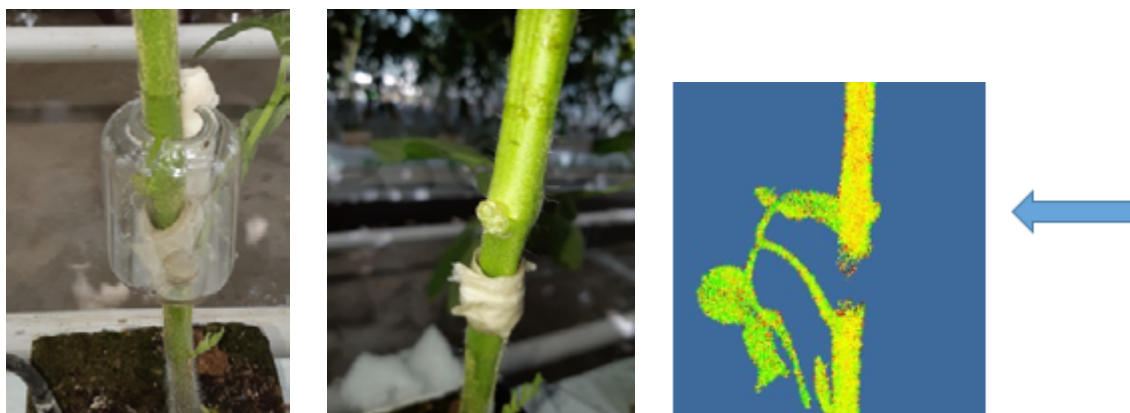
De inoculatiemethode resulteerde in *Botrytis* infecties. Op de wondvlakken zonder symptomen, symptoomklasse 0 (Figuur 14A) ontstonden ongeveer 45 hpi de eerste bruinverkleuringen aan de rand van het bladstompje, symptoomklasse 1 (Figuur 14B). Vanaf ongeveer 67 hpi verschenen de eerste symptomen klasse 2: bruinverkleuring met een beetje zwart. Vanaf ongeveer 93 hpi kon flinke zwartkeuring ontstaan, symptoomklasse 3 (Figuur 14D). Na ongeveer 5 dagen verscheen in sommige gevallen ook mycelium op het wondvlak (Figuren 14E en 14F). Controles die met water waren behandeld vertoonden geen symptomen evenmin als met *Botrytis* bespoten wonden waar geen bewerkte flesjes omheen waren gedaan.



Figuur 14 Foto's gemaakt met mobiele telefoon van typische voorbeelden van symptoomklassen bij wondoppervlakten van bladstompjes: A. klasse 0; B. klasse 1; C. klasse 2; D. klasse 3; E en F mycelium.

Op 24 mei 2020 werden bladstompjes van 7 weken oude planten geïnoculeerd. Op 4 achtereenvolgende avonden werden, toen het al donker was, metingen verricht met de GreenhouseExplorer. Als het licht was werden de bladstompjes gefotografeerd met de mobiele telefoon om symptomen vast te leggen. Waarnemingen op 25, 26, 27, 28 en 29 april 2020 van symptomen en Fv/Fm zijn weergegeven in Bijlage 5. Daarbij zijn de symptomen weergegeven volgens de klasse indeling zoals hierboven beschreven.

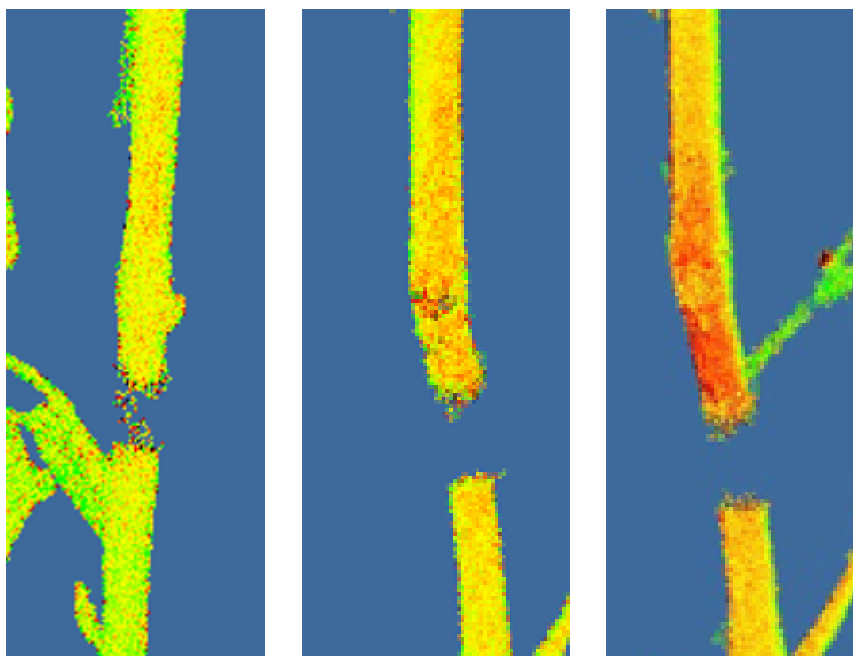
Het beoordelen van de Fv/Fm beelden concentreerde zich op de locaties waar de wonden waren geïnoculeerd, de bladstompjes waar ook de symptomen verschenen. De geïnoculeerde bladstompjes bevonden zich steeds boven het tissue bandje dat om de stengel was gewikkeld, in de Fv/Fm opname zichtbaar als een blauwe onderbreking van de stengel. In Figuur 15 is de locatie van het geïnoculeerde bladstompje op het Fv/Fm beeld aangegeven met de pijl.



Figuur 15 Links de situatie van een stengel met bladstompje dat geïnoculeerd is met *Botrytis*. In het midden de stengel voor de opname nadat het bewerkte flesje verwijderd is. Onder het bladstompje is het tissuereepje zichtbaar. Recht een voorbeeld van een Fv/Fm opname. De blauwe onderbreking in de stengel is markering voor waar de tissue zit. Daarboven kan het geïnoculeerde bladstompje gevonden worden, hier aangegeven met pijl.

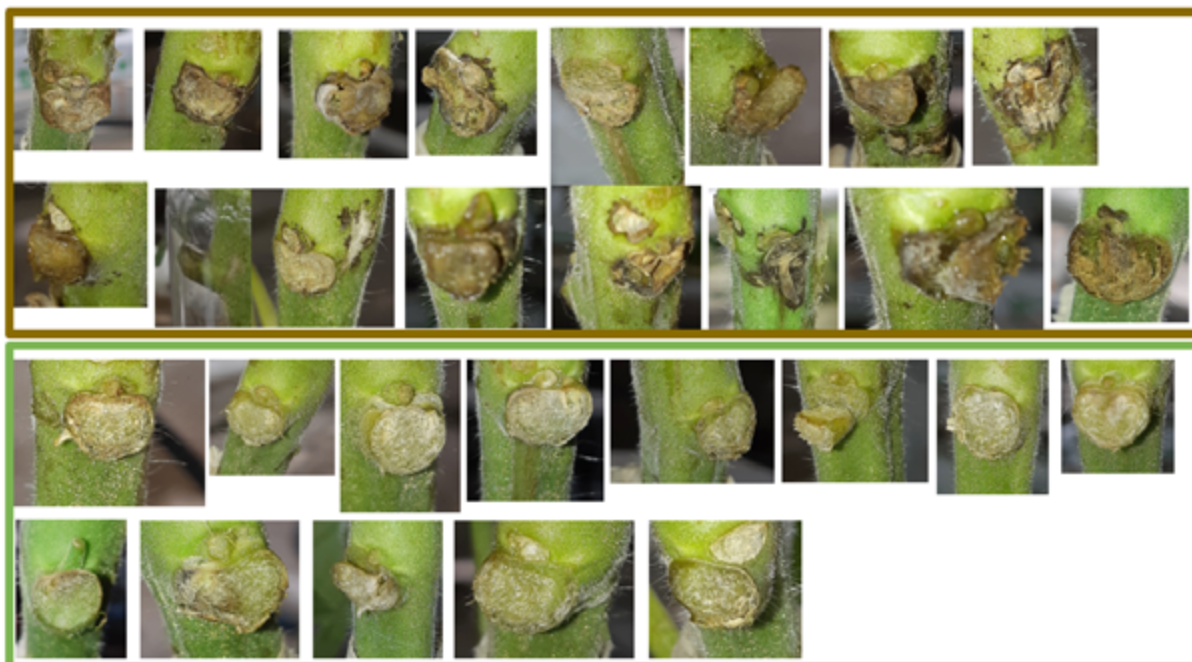
De gehanteerde klassenindeling voor de Fv/Fm waarnemingen waren als volgt:

0, geen afwijking ten opzichte van omringend gezond weefsel; 1, zichtbare concentratie rode pixels; 2, duidelijke rode vlek (zie Figuur 16).



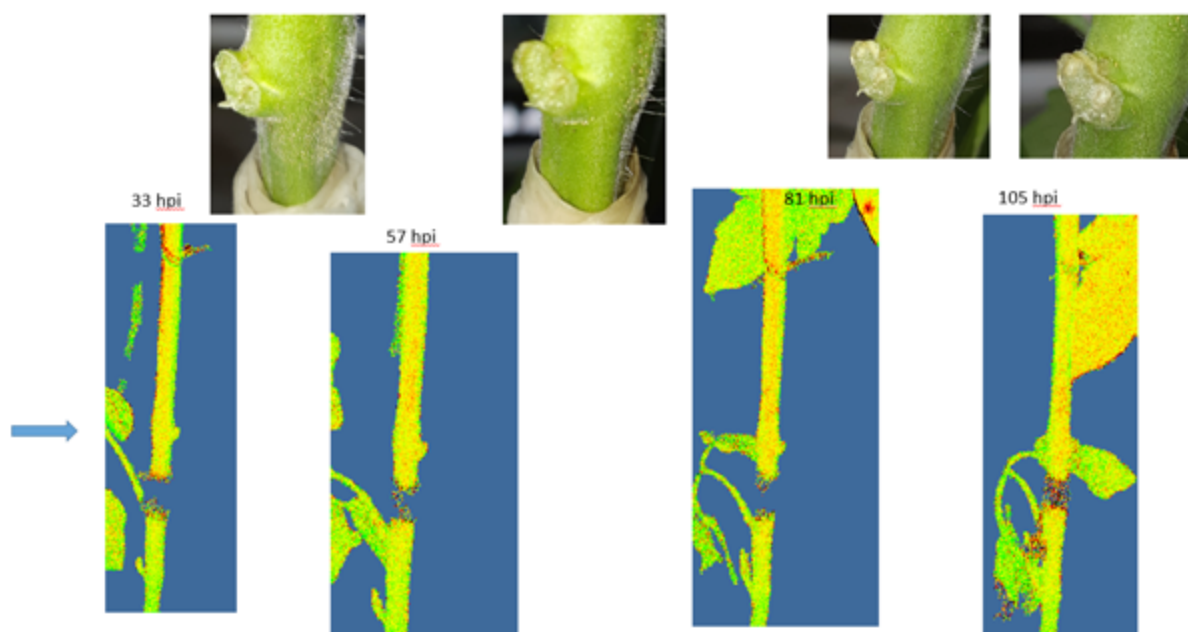
Figuur 16 Typische voorbeelden van Fv/Fm klassen gebruikt in dit experiment. Klasse 0, geen kleurverschil ter plaatse en rondom het bladstompje zichtbaar (links); klasse 1, verhoogde concentratie rode pixels verspreid op en rondom het bladstompje (midden); klasse 2, rode vlek op en/of rondom het bladstompje.

Figuur 17 toont foto's die 9 dagen na inoculatie gemaakt zijn met de mobiele telefoon van de 15 bladstompjes die met water bespoten zijn en van de 15 bladstompjes die met *Botrytis* geïnoculeerd zijn.

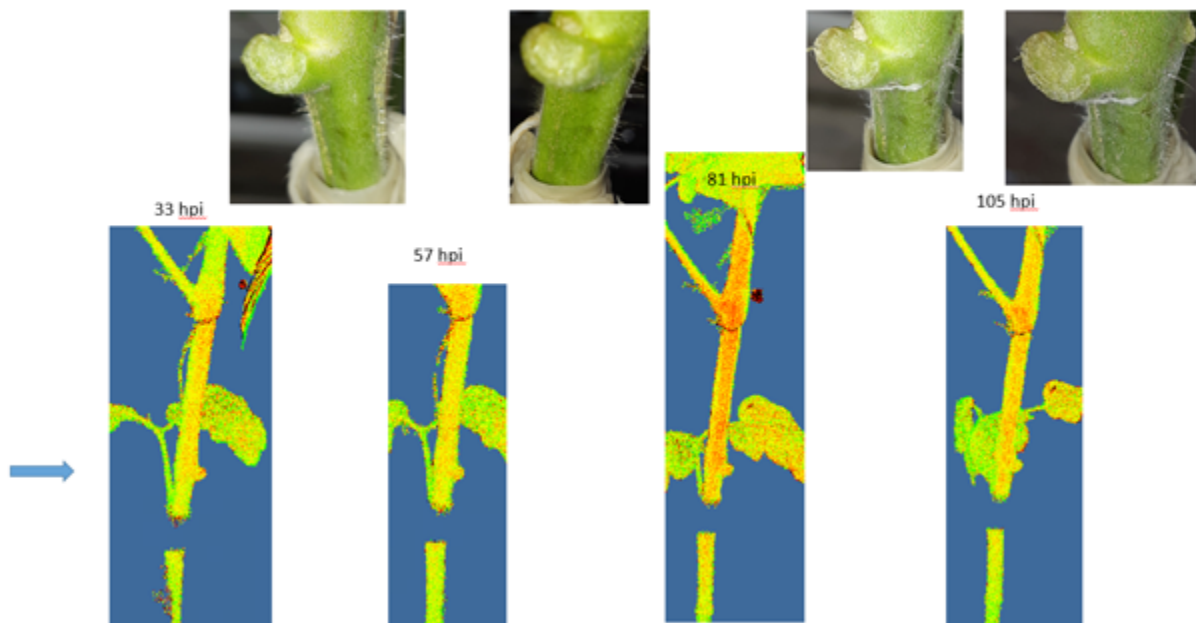


Figuur 17 Bladstompjes 9 dagen nadat ze verwond en geïnoculeerd zijn met *Botrytis* (bovenste deel, van links naar rechts nummers 2, 12, 16, 18, 26, 5, 7, 9, 11, 12, 21, 23, 25, 27, 29) of zijn bespoten met water (onderste deel, van links naar rechts nummers 4, 6, 8, 10, 14, 20, 22, 24, 28, 3, 15, 17, 19. Van nummer 3 was geen geschikte foto). Zie voor nummering Bijlage 5. Van de 15 met *Botrytis* geïnoculeerde bladstompjes vertonen er 13 duidelijk symptomen. De controles vertonen geen van allen symptomen.

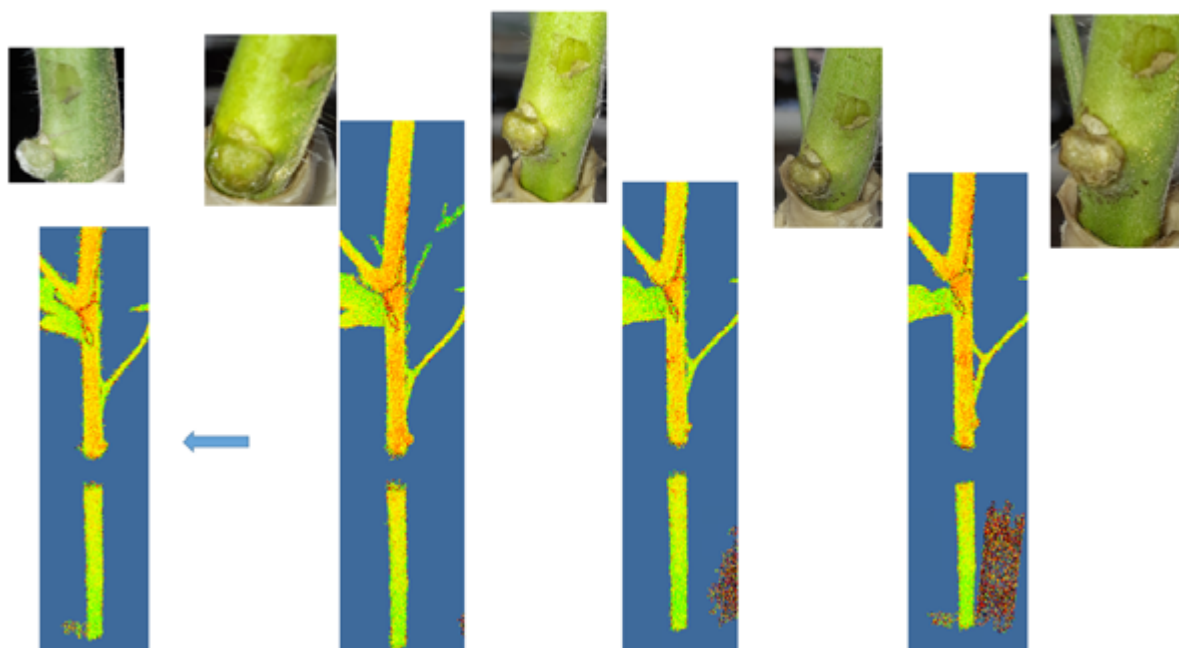
Ter illustratie in Figuren 18, 19, 20 en 21 voorbeelden van waarnemingen aan 2 met water behandelde bladstompjes en van 2 met *Botrytis* geïnoculeerde bladstompjes. De Fv/Fm beelden worden in spiegelbeeld vertoond. Zie Bijlage 5 voor alle waarnemingen aan alle planten.



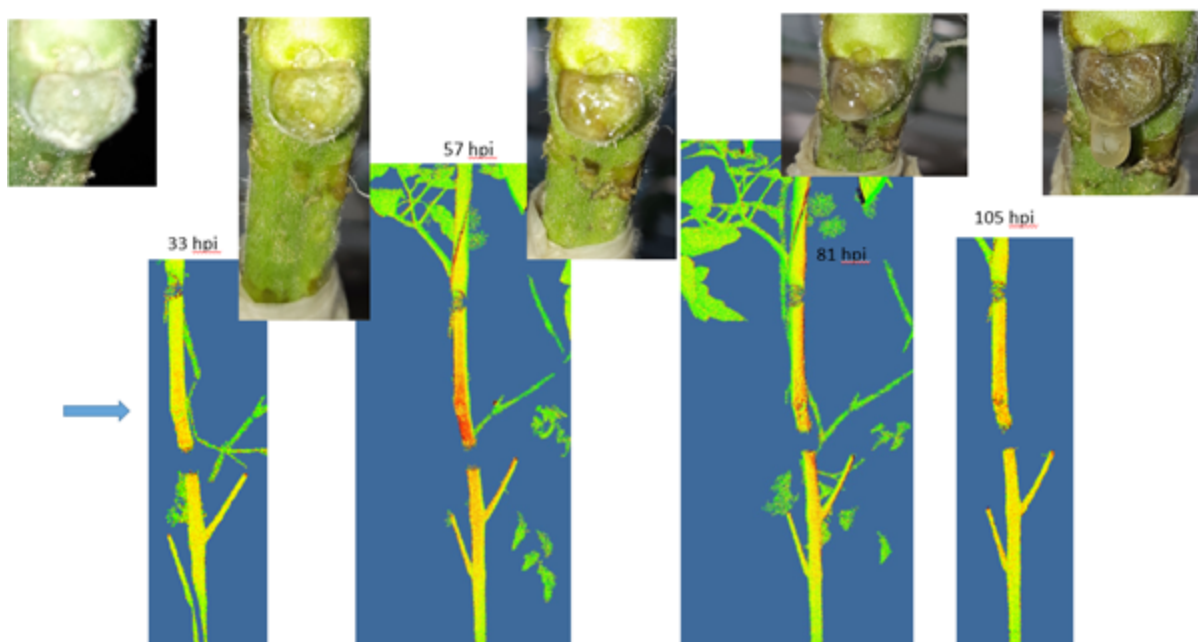
Figuur 18 Waarnemingen aan plant 15, watercontrole. Boven van links naar rechts foto's 45, 67, 93 en 117 hpi. Onder Fv/Fm beelden van 33, 57, 81 en 105 hpi (avonden 26-29 mei 2020).



Figuur 19 Waarnemingen aan plant 17, watercontrole. Boven van links naar rechts foto's 45, 67, 93 en 117 hpi. Onder Fv/Fm beelden van 33, 57, 81 en 105 hpi (avonden 26-29 mei 2020).



Figuur 20 Waarnemingen aan plant 11, met *Botrytis* geïnoculeerd. Boven van links naar rechts foto's 32, 45, 67, 93 en 117 hpi. Onder Fv/Fm beelden van 33, 57, 81 en 105 hpi (avonden 26-29 mei 2020).



Figuur 21 Waarnemingen aan plant 7, met *Botrytis* geïnoculeerd. Boven van links naar rechts foto's 32, 45, 67, 93 en 117 hpi. Onder Fv/Fm beelden van 33, 57, 81 en 105 hpi (avonden 26-29 mei 2020).

Aangezien bij geen van de planten stress werd waargenomen nog voor symptomen duidelijk zichtbaar aanwezig waren, zijn de behandelingen met Teldor niet uitgevoerd.

2.3.4 Discussie

De inoculatiemethode gebruikmakend van de bewerkte flesjes maakt het mogelijk *Botrytis* infecties te krijgen na inoculatie van bladstompjes op stengels van tomatenplanten op steenwol in de kas. Symptoomontwikkeling kan daarbij met het blote oog door de bewerkte flesjes heen gevolgd worden. Bijkomend voordeel is dat er nauwelijks sporenverspreiding kan optreden vanwege de afscherming door de flesjes waardoor het naburige planten beschermt voor eventuele besmetting met *Botrytis*. De luchtvochtigheid rondom de bladstompjes wordt door de omhulling van het bewerkte flesje extra hoog gehouden, wat nog eens versterkt wordt door de natte tissue die zich in de opening van de onderkant van het bewerkte flesje bevindt en de natte watten in de laterale opening van het bewerkte flesje. Het is ook mogelijk om eveneens natte watten te doen in de opening van de bovenkant van het flesje. In onze experimenten bleek echter dat dit tot een enorme stress reactie leidde op het stukje stengel onder het natte watje tijdens de Fv/Fm opnames wat de interpretatie van de waarnemingen troefleerde (beelden niet getoond). Voor waarnemingen van symptomen met het blote oog hoeft dit echter geen belemmering te vormen.

De ontwikkelde inoculatiemethode resulteerde in duidelijke symptoomontwikkeling op de bladstompjes. Er werden echter nauwelijks symptomen op de stengel waargenomen. Aangezien er in het onderzoek vooral gekeken werd naar stressvorming in relatie tot symptoomvorming zijn de experimenten vaak gestopt zodra de eerste symptomen, die op de bladstompjes, duidelijk zichtbaar waren. Wellicht ontstaat stengelinfectie wel wanneer watjes langer vochtig gehouden worden.

De door Phenovation ontwikkelde GreenhouseExplorer met spiegel werkt goed. Technische beperkingen die zijn dat het systeem handmatig moet worden voortgeduwd, dat er geen mogelijkheid tot scherpstellen op zit en dat er slechts van één kant gezien opnames gemaakt kunnen worden. Een andere beperking is dat er bij metingen in het donker bij de GreenhouseExplorer geen RGB beelden gemaakt worden. De meeste van deze beperkingen dienen te worden opgelost om het systeem geschikt te krijgen voor de praktijk.

Het maken van Fv/Fm beelden kan het beste in het donker gedaan worden. Fv/Fm metingen verricht in het licht, en met name die tijdens zonnige dagen, gaven veel stress te zien. Planten die in de zon stonden vertoonden meer stress dan anderen, wat de resultaten troebleerde (resultaten niet getoond).

Aangezien voor iedere Fv/Fm meting in feite een donkeradaptatie de beste resultaten geeft, werden voor iedere Fv/Fm meting de volgende planten in de rij door het plaatsen van een stuk karton afgeschermd van de lichtflits tijdens de meting. In de praktijk, waar de camera in grote kassen bij voorkeur in het donker planten zou moeten waarnemen, zou dit vereenvoudigd kunnen worden door steeds slechts planten te meten die op voldoende afstand van elkaar staan waardoor ze geen last ondervinden van de lichtflits.

Ondanks het feit dat uit eerdere experimenten bleek dat Fv/Fm metingen presymptomatische stress duidelijk lieten zien bij bladinoculaties met *Botrytis* bij tomaten in pot of bij tomatenbladeren in petrischalen, lieten Fv/Fm metingen geen presymptomatische stress zien na inoculatie van bladstompjes met *Botrytis* bij tomatenplanten op steenwol in de kas zoals is af te leiden uit Bijlage 5 en Figuren 18, 19, 20 en 21. Lichte stress (Fv/Fm klasse 1), in de vorm van verhoogde concentratie rode pixels verspreid op en rondom het bladstompje, werd zowel waargenomen bij planten met symptomen aan bladstompjes als bij bladstompjes zonder symptomen. Fv/Fm metingen konden geen stress aantonen aan de stengel rond de inoculatieplek voordat symptomen op het bladstompje zichtbaar werden. Wellicht kan stress wel duidelijk gemeten worden bij stengelinfecties, wanneer de schimmel de stengel binnen dringt. Het stengeloppervlak bevat meer chlorofyl dan het wondoppervlak van het bladstompje. Door de luchtvochtigheid in de bewerkte flesjes rond de bladstompjes langer hoog te houden zou dit wellicht in vervolgonderzoek aangetoond kunnen worden. Telers zijn vooral geïnteresseerd in *Botrytis* infecties die de stengel inschieten. Die willen ze voor zijn. In dit experiment vertoonden bladstompjes die niet met *Botrytis* geïnoculeerd waren geen bruin- of zwartkleuring. De hypothese van dit experiment was dat stress eerder kon worden aangetoond dan *Botrytis* gerelateerde symptomen die met het blote oog waarneembaar zijn, de bruin en zwartkleuring van de bladstompjes. Deze hypothese kon hier niet bewezen worden. Het is onduidelijk bij welke van de met *Botrytis* geïnoculeerde stompjes die wel bruin of zwartkleuring vertoonden uiteindelijk een naar binnen schietende infectie zou zijn ontstaan en of die gevallen wél vooraf zouden zijn gegaan met waarneembare stressverhoging. Indien niet gestopt was met het nathouden van de watten en tissues toen alle met *Botrytis* behandelde bladstompjes verkleurd waren had wellicht waargenomen kunnen worden dat *Botrytis* infectie in de stengel was geschoten. Nu is dat niet waargenomen, waarschijnlijk omdat de luchtvochtigheid rondom het bladstompje afnam toen gestopt werd met het nathouden van de watjes en tissues. Vervolgonderzoek zou moeten uitwijzen of (presymptomatische) *Botrytis* gerelateerde stress wordt waargenomen bij stengelinfecties. Dit kan in praktijkkassen waar stengelinfecties op dat moment spelen of in onderzoekskassen indien we stengelinfecties kunnen bewerkstelligen.

Uit het onderzoek met bladinoculaties is gebleken dat in Fv/Fm beelden de door *Botrytis* veroorzaakte stress veel beter zichtbaar is dan dat de met het blote oog of camera waargenomen *Botrytis* symptomen. Zelfs niet presymptomatische stress waarneming via Fv/Fm metingen gerelateerd aan *Botrytis* infecties zou de teler daarom helpen met het vroegtijdig detecteren van deze ziekte.

3 Vroege detectie van *Fusarium solani*

3.1 Inleiding

Fusarium solani veroorzaakt in de Nederlandse kassen problemen in tomaat. Er bestaan geen tomatenrassen met resistentie tegen deze soort. Tomatentelers geven aan dat ze de eerste symptomen zien verschijnen onder aan de stengelvoet, daar waar de stengel gesplitst wordt ten einde 2 koppige tomatenplanten te creëren. De stengelvoet vertoont necrose. Na een tijdje kunnen de bladeren bruin worden waarna ze inzakken en de hele plant kan dood gaan.

In Onder Glas, nummer 2, februari 2011 schrijft Pim Paternotte dat de schimmel verschillende typen sporen produceert, dat niet duidelijk is waar de aantasting vandaan komt en door welke type spore die wordt veroorzaakt. Uit wortelmilieu via recirculatiewater? In en op aangetast plantweefsel vormt de schimmel 2 soorten sporen: grote banaanvormige (macroconidien) en kleinere sporen (microconidien). Verder maakt de schimmel in aangetast weefsel sporen waarmee de schimmel ook jarenlang zonder waardplant kan overleven (chlamydosporen). De sporen kiemen op de wortels en stengelvoet en groeien via de schors in de plant. In en op zwaar aangetast weefsel worden weer nieuwe sporen gemaakt die na het afsterven van de plant weer voor verdere verspreiding kunnen zorgen. De schimmel verspreidt zich ook door de lucht via ascosporen die in de rode vruchtlichamen op het aangetaste plantweefsel worden gevormd. Als laatste kan de schimmel zich ook via water en door de lucht met behulp van ongeslachtelijke sporen verspreiden. Deze sporen worden in enorme aantallen op aangetast plantweefsel en soms op teeltsubstraat gevormd. Zo is een secundaire infectie hoger op in het gewas van stengels en vruchten mogelijk. Sporen kiemen alleen bij voldoende vocht door langdurig hoge RV, vrij water of op wonden aan de plant.

Romberg & Davis (2007) inoculeerden tomatenplanten bij de wortels met *F. solani*. De tomatenplanten werden 90 dagen na inoculatie gescoord op symptomen aan blad en wortel. Symptomen bestonden uit necrose tussen de nerven en necrose van de bladeren, kleine, onregelmatige bronskleurige vlekjes op de bladeren, inwendige vasculaire verkleuring en lesies op de penwortel.

In dit project is eerst een experiment uitgevoerd door potplanten te inoculeren via de wortels om de beschrijvingen in Romberg & Davis (2007) te volgen met de CropReporter en met het blote oog (zie 3.2). In een tweede experiment is een vermoedelijk met *F. solani* besmette plant uit een praktijkkas bestudeerd middels Fv/Fm metingen aan delen van de plant. Een derde experiment is uitgevoerd met op steenwol geteelde tomatenplanten in de onderzoekskas. In alledrie de gevallen was het doel om *F. solani* gerelateerde stress te meten voor vroege detectie van de schimmel.

3.2 Inoculaties via de wortel

3.2.1 Inleiding

Om inzicht te krijgen in het infectieproces zijn allereerst wortels van potplanten geïnoculeerd met *F. solani* om de beschrijvingen in Romberg & Davis (2007) te volgen met de CropReporter en met het blote oog. Doel was om vroegtijdig bovengronds *F. solani* gerelateerde stress waar te nemen veroorzaakt door een ondergrondse infectie.

3.2.2 Uitvoering onderzoek

Tomatenplanten, cv Moneymaker, werden door de kassendienst van WUR vanuit zaad in potgrond opgekweekt en verpot in 12 cm potten met een inhoud van 0.75 liter. Als planten 3 weken oud waren werden ze in Wageningen in een kascompartiment van WUR op tafels geplaatst bij een constante temperatuur van 20 C en een RH van 90%.

Inoculatie met F. solani

CBS stam 8427 van *F. solani* is aangeënt in 500 ml Mungbean medium (20 minuten geautoclaveerde suspensie van 2 g mungbonen in 500 ml kraanwater) en 7 dagen geïncubeerd in een schud-incubator bij 25°C. Vervolgens is de suspensie gefiltreerd door een dubbele laag kaasdoek. De sporen werden geteld en op de juiste concentratie gebracht. Er werden 4 inoculatiemethodes toegepast (zie proefopzet). Een deel van de sporensuspensie werd gebruikt om te mengen met potgrond, zodanig dat er een concentratie van $5 \cdot 10^8$ sporen/kg grond ontstond. Deze grond werd in 12 cm potten gebracht waarna er een 3 weken oude plant in werd gezet, al dan niet nadat er eerst een stukje van de wortels was afgeknipt. Een ander deel van de suspensie werd met Mungbean medium op een concentratie van $5 \cdot 10^6$ sporen/ml gebracht. Voordat 3 weken oude planten in een 12 cm pot met potgrond werden geplant, werden de wortels gedurende 30 s in de sporensuspensie gedipt, al dan niet nadat er eerst een stukje van de wortels was afgeknipt. Bij controle planten werd Mungbean medium gebruikt in plaats van sporensuspensie.

Isolatie van F. solani uit wortels en stengbasis

Wortels en stengelbasis werden grondig afgespoeld met water. Van de wortels werden de zijwortels verwijderd. De plantendelen werden gesteriliseerd door ze in 70% alcohol te dopen en vervolgens door een vlam te halen. Er werden kleine schijfjes gesneden van het ontsmette materiaal dat op Komada medium (Sun *et al.*, 1978) in petrischalen werd uitgelegd.

Soortidentificatie door vaststellen van DNA sequentie van elongatiefactor (EF)

DNA werd geïsoleerd van op Komada medium uitgegroeide schimmel met de Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food kit (Promega). Met het DNA werd een Elongatie Factor 1-alpha (EF) PCR uitgevoerd, gebruikmakend van primers EF1 (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') en EF2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3'). Via gelelectroforese werd vastgesteld of er een PCR product aanwezig was. PCR producten werden gesequenced via de Sanger methode door Magcrogen Europe. Sequenties werden geanalyseerd met de CLC Main-Workbench en gecontroleerd in de NCBI blastn.

Proefopzet

Doel van de proef was om te onderzoeken waar in de plant *F. solani* gerelateerde stress waargenomen kon worden via Fv/Fm metingen. Voorwaarde daarvoor was dat planten besmet zouden worden met *F. solani*. Om de kans daarop te vergroten zijn 4 verschillende inoculatiemethodes uitgevoerd aangezien hiervoor nog geen beproefd inoculatie protocol beschikbaar was.

Behandelingen A – H zijn toegepast zoals in onderstaande Tabel 1 is toegelicht.

Tabel 1

Behandelingen tomaat F. solani wortelinoculatieproef. - = niet uitgevoerd; + = wel uitgevoerd.

Behandeling	A	B	C	D	E	F	G	H
Onderkant wortels er af knippen	-	+	-	+	-	+	-	+
In inoculum dippen	+	+	-	-	-	-	-	-
In medium dippen	-	-	+	+	-	-	-	-
Potgrond mengen met inoculum en water	-	-	-	-	+	+	-	-
Potgrond mengen met medium en water	-	-	-	-	-	-	+	+
Aantal planten	6	6	6	6	6	6	6	6
Plantnummer	1001 tot 1006	1007 tot 1012	1013 tot 1018	1019 tot 1024	1025 tot 1030	1031 tot 1036	1037 tot 1042	1043 tot 1048

Waarnemingen

Er zijn metingen verricht met de CropReporter van Phenovation. Voorafgaand aan een meting werden de planten voor minstens een half uur in een donkere container geplaatst. Om het licht in de omgeving van de CropReporter te temperen werd er met behulp van lichtwerend plastic een soort tent om de CropReporter gebouwd (zie Figuur 22). De planten werden van bovenaf gemeten. De fluorescentie beelden zijn geanalyseerd met in-huis geschreven beeldanalyse software (Data analysis software van Phenovation, version 5.4.7 beta-64b) speciaal voor fluorescentie beelden.



Figuur 22 Links de CropReporter met de lichtwerende "plastic tent". Op de voorgrond de donkere container waarin de planten hun donkeradaptatie kregen. Rechts de CropReporter met daarin een plant.

Symptoomvorming werd gevolgd via RGB beelden waargenomen door de Plant Explorer of door visuele waarneming met het blote oog. De Fv/Fm en RGB beelden zijn geanalyseerd met beeldanalyse software (Data analysis software van Phenovation, version 5.4.7 beta-64b).

Plantmateriaal werd uitgeplaat op Komada medium.

3.2.3 Resultaten

Nadat de planten geïnoculeerd waren, zijn er een paar keer per week Fv/Fm en RGB metingen verricht. Tot 43 dpi zijn de planten vanaf de bovenkant gemeten. Daarna waren planten daarvoor te groot en werden planten van de zijkant gemeten voor zover dat kon. De data van de metingen werden opgeslagen. Voordat deze geanalyseerd werden, werd eerst onderzocht welke planten daadwerkelijk geïnfecteerd waren en welke niet. Vervolgens werden data geanalyseerd van uitsluitend die planten waarvan was aangetoond dat ze *F. solani* bevatten en van diegene die aantoonbaar geen *F. solani* bevatten.

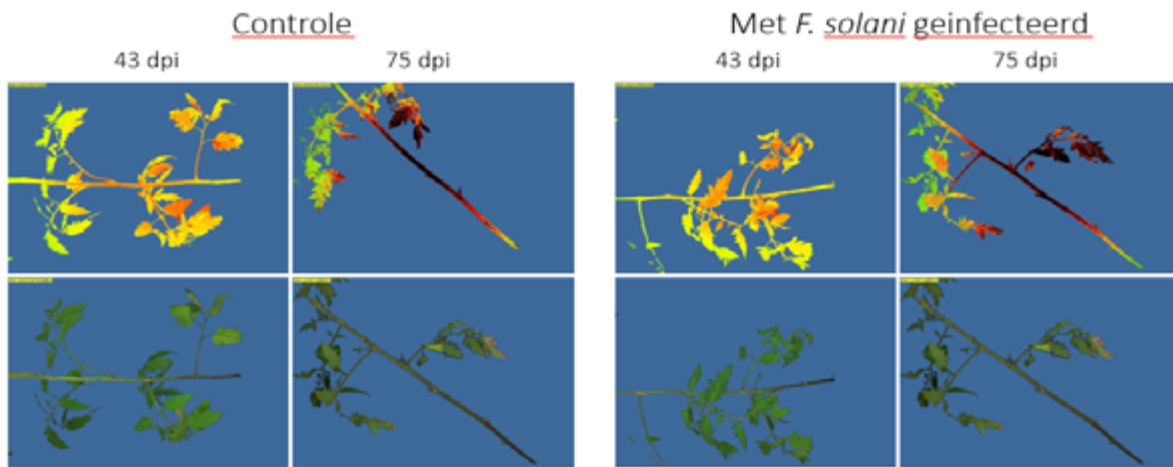
Er werden met het blote oog geen verschillen waargenomen tussen geïnoculeerde en controle planten. Om aan te tonen of inoculaties succesvol waren geweest zijn op Komada medium stukjes wortel uitgelegd (19, 54 en 78 dpi) en stukjes stengel van 0 cm en van 2 cm boven het grond oppervlak (78 dpi. Zie Bijlage 6). *F. solani* werd gedetecteerd in wortel geïnoculeerde tomaten in stukjes van wortel of in stukjes stengel 0 en 2 cm boven de grond. Na uitplaten en DNA analyse werd van de planten weergegeven in Tabel 2 vastgesteld dat ze wel of niet besmet waren met *F. solani*. Planten werden als besmet aangemerkt als zowel *Fusarium* uitgroei was waargenomen na uitleggen van wortelstukje en/of stengelstukje op Komada medium en EF sequenties verkregen met zowel de Forward als de Reverse primer *F. solani* identificeerden. Planten werden als niet besmet aangemerkt als geen *Fusarium* uitgroei was waargenomen na uitleggen van alle uitgelegde wortelstukjes en/of stengelstukjes op Komada medium.

Tabel 2

Planten waarvan is vastgesteld of ze wel of niet besmet waren met F. solani.

Behandeling	Inoculatie methode	Plant	Conclusie: besmet met F. solani	dpi uitgelegd
A	Dip in inoculum	1001	Ja	78
A	Dip in inoculum	1003	Ja	78
A	Dip in inoculum	1005	Ja	78
A	Dip in inoculum	1006	Ja	78
B	Dip in inoculum na knippen	1007	Ja	78
B	Dip in inoculum na knippen	1009	Ja	78
B	Dip in inoculum na knippen	1010	Ja	78
B	Dip in inoculum na knippen	1011	Ja	78
C	Dip in medium	1015	Nee	78
C	Dip in medium	1016	Nee	78
D	Dip in medium na knippen	1019	Nee	54
D	Dip in medium na knippen	1021	Nee	78
D	Dip in medium na knippen	1023	Nee	78
E	In grond met inoculum	1025	Ja	78
E	In grond met inoculum	1026	Ja	78
E	In grond met inoculum	1027	Ja	78
E	In grond met inoculum	1029	Ja	78
F	In grond met inoculum na knippen	1031	Ja	54
F	In grond met inoculum na knippen	1032	Ja	78
F	In grond met inoculum na knippen	1034	Ja	78
F	In grond met inoculum na knippen	1035	Ja	78
F	In grond met inoculum na knippen	1036	Ja	78
G	In grond met medium	1038	Nee	78
H	In grond met medium na knippen	1048	Nee	78

Van de planten uit Tabel 2, waarvan we zeker wisten dat ze besmet of niet besmet waren, werden de met de CropReporter verkregen beelden vergeleken. Analyse van Fv/Fm beelden toonden geen duidelijke verschillen in stress patronen of -niveaus tussen geïnfecteerde en controle planten. Observatie met het blote oog kon ook geen onderscheid maken tussen geïnfecteerde en controle planten. De algemene conditie van de planten verslechterde toen ze ongeveer 10 weken oud waren. Vanaf dat moment werd er in alle planten relatief veel stress gemeten. In Figuur 23 een indruk van hoe de beelden er uit zagen. Voor een uitgebreider overzicht zijn in Bijlage 7 Fv/Fm en RGB beelden weergegeven van geïnfecteerde plant 1009 en controle plant 1021 op 4, 8, 11, 13, 15, 19, 26, 32, 40, 43 en 75 dpi.



Figuur 23 Fv/Fm beelden (boven) en RGB beelden (onder) van niet met *F. solani* besmette plant 1021 (links) en met *F. solani* geïnfecteerde plant 1009 (rechts) 43 en 75 dagen na inoculatie (dpi). Veel van de stress die zichtbaar is bij de Fv/Fm beelden is niet zichtbaar als verkleuringen in de RGB beelden.

3.2.4 Discussie

We zijn in staat gebleken planten te infecteren met *F. solani* via wortel inoculaties. Romberg & Davis (2007) toonden 90 dagen na inoculatie symptomen aan bij de wortels met *F. solani* geïnoculeerde tomatenplanten. De symptomen die zij waarnamen bestaande uit necrose tussen de nerven en necrose van de bladeren, kleine, onregelmatige bronskleurige vlekjes op de bladeren zijn door ons niet waargenomen als onderscheid tussen geïnfecteerde en controle planten. Waargenomen werd dat de algehele conditie van alle planten verslechterde toen ze 10 weken oud werden. Het feit dat Moneymaker een erg vatbaar ras is voor veel ziekten en plagen kan hierbij een rol spelen. Zo was bijvoorbeeld in 1 van de geteste controle planten *F. oxysporum* aangetoond. Dit zou het relatief hoge stress niveau kunnen verklaren dat zowel in de geïnfecteerde als de controle planten werd waargenomen bij planten ouder dan 10 weken. Het zou kunnen dat deze stress de stress veroorzaakt door *F. solani* maskeert.

Opmerkelijk was dat in een voorbereidend experiment met *F. solani* wortelinoculaties bij tomaat (resultaten niet getoond), bij 1 plant *F. solani* werd aangetoond in een (bovengronds) diefje terwijl geen *F. solani* was aangetoond in wortel- of stengelbasis van die plant. Ook werd daar in een controle plant *F. solani* aangetoond in een diefje maar niet in wortel- of stengelbasis. Deze resultaten geven aan dat bovengrondse delen van de plant niet noodzakelijkerwijs worden besmet via verspreiding door de plant vanuit ondergrondse delen.

3.3 Besmettingen via wonden aan de stengel

3.3.1 Analyse van een vermoedelijk met *F. solani* besmette plant uit een praktijkkas

3.3.1.1 Inleiding

Aangezien in het vorige experiment geen *F. solani* symptomen konden worden waargenomen was het onmogelijk om iets te zeggen over mogelijkheden de ziekte te detecteren nog voor symptomen zichtbaar zijn. Verdachte, door professionele tomatenteler aangemerkt vermoedelijk met *F. solani* besmette planten, zouden betere studieobjecten zijn.

3.3.1.2 Uitvoering onderzoek

In een professionele tomatenkas is materiaal verzameld van 3 bladeren van vermoedelijk met *F. solani* besmette plant, 3 bladeren van vermoedelijk niet met *F. solani* besmette plant, dieven van verschillende planten, 1 hele vermoedelijk met *F. solani* besmette plant. De hele vermoedelijk met *F. solani* besmette plant is in 12 stukken verdeeld.

Van verzamelde bladeren, dieven en de 12 stukken van de hele plant zijn metingen verricht met de CropReporter van Phenovation die zich in een donkere ruimte bevond. Voorafgaand aan een meting werd het plantmateriaal voor minstens een half uur in een donker gehouden. De fluorescentie beelden zijn geanalyseerd met in-huis geschreven beeldanalyse software (Data analysis software van Phenovation, version 5.4.7 beta-64b) speciaal voor fluorescentie beelden.

Isolatie van *F. solani* uit plantmateriaal door uitplaten en daaropvolgende soortidentificatie via DNA analyse vond plaats zoals beschreven in 3.2.2.

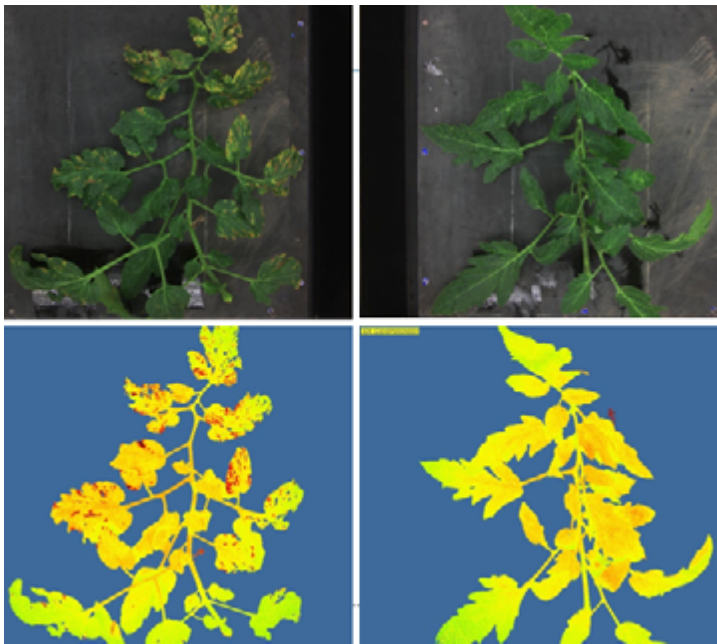
3.3.1.3 Resultaten

De vermoedelijk met *F. solani* besmette planten bij de professionele tomatenteler onderscheidden zich van de vermoedelijk niet met *F. solani* besmette planten doordat ze bladeren hadden met veel bladnecrose. Deze bestond uit gele vlekken, gele vlekken met daarin bruine vlekjes en bruine vlekken. Meer waarde hechtte de teler aan de bruinkleuring bij de stengelvoet, op de plek waar de tweekoppige plant splitst (zie Figuur 24).



Figuur 24 Tomaten in professionele tomatenkas. Links bruinvorming bij stengelvoet; midden en rechts bladeren met necrose.

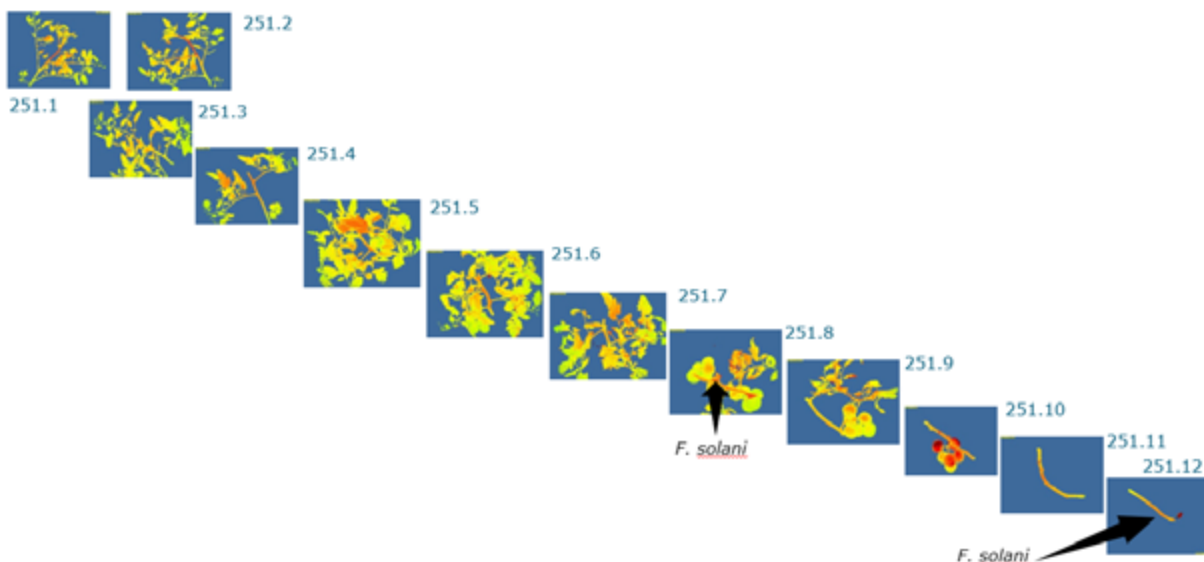
Fv/Fm beelden van het plantmateriaal uit de praktijkkas vertoonden in het algemeen veel minder stress dan in het vorige experiment beschreven in 3.3.1. De Fv/Fm beelden van bladeren met necrose vertoonden duidelijk stress op die plaatsen waar de necrose zichtbaar was. Bladeren zonder necrose vertoonden veel minder stress. Zie Figuur 25.



Figuur 25 Typische RGB (boven) en Fv/Fm (beneden) beelden van een blad met (links) en zonder (rechts) necrose.

Uitplaten van plantmateriaal van de verzamelde bladeren en driefjes resulteerde in geen van de gevallen in isolatie van *F. solani*, ook niet uit de necrotische plekken van de bladeren.

Fv/Fm beelden van de 12 stukken van de hele plant uit de kas zijn weergegeven in Figuur 26. In plantendelen waarin stress was aangetoond is gezocht naar aanwezigheid *F. solani* middels uitplaten en DNA analyse.



Figuur 26 Fv/Fm beelden van in 12 stukken gesneden plant uit praktijkkas. De stukken zijn van boven (top) naar beneden (stengelvoet) genummerd van 251.1 tot en met 251.12. Op plaatsen gemarkeerd met een pijl is *F. solani* aangetoond.

In geen van de plantendelen werd na uitplaten en DNA analyse *F. solani* aangetoond, behalve in plantendelen 251.8, een stengeldeel ongeveer 150 cm boven de grond en 251.12, de stengelbasis (Figuur 26). *F. solani* werd in die plantendelen aangetoond waar ook wondweefsel zichtbaar was. In Figuur 27 is het wondweefsel zichtbaar.



Figuur 27 Wondweefsel zichtbaar in plantendeel 251.8 (links) en 251.12 (rechts). Ter plaatse van het wondweefsel werd *F. solani* aangetoond.

3.3.1.4 Discussie

De conditie van de planten uit de praktijkkas was beter dan die van de planten uit het experiment beschreven in 3.3.1. De planten zaten beter in het blad en er werd nauwelijks stress gemeten in plantendelen zonder necrose. De commerciële cultivar uit de praktijkkas zal meer resistent zijn tegen ziekten en plagen dan het ras Moneymaker uit het vorige experiment en de teeltomstandigheden in de praktijkkas zullen beter zijn dan die in de experimentele kas. De bruine necrose in de bladeren wordt waarschijnlijk niet veroorzaakt door *F. solani*, aangezien er geen *F. solani* geïsoleerd werd uit bladeren met necrose. Het lijkt erop dat *F. solani* in Nederlandse kassen bovengronds via wonden de plant kan infecteren. Visuele symptomen worden door telers doorgaans het eerst gezien bij de stengelbasis, daar waar de plant in tweeën gesplitst wordt, waarschijnlijk als daar wond gevormd wordt. Vervolgonderzoek gericht op vroege detectie van *F. solani* in tomaat via twee-staps monitoring kan zich waarschijnlijk het beste op die plek richten.

3.3.2 Inoculaties in experimentele kas

3.3.2.1 Inleiding

Uit onderzoek beschreven in 3.3.1 is gebleken dat in Nederlandse kassen *F. solani* de tomatenplant bovengronds via wonden in de plant kan infecteren. Telers zien visuele symptomen doorgaans het eerste bij de stengelbasis waar de plant in tweeën wordt gesplitst. Voor een zo vroeg mogelijke detectie is het derhalve zinvol juist die plek te monitoren met de camera en om waar te nemen of met Fv/Fm beelden de veroorzaakte stress eerder is waar te nemen dan de necrose die door de infectie ontstaat. Daartoe is een experiment opgezet waarbij wonden geïnoculeerd zijn met *F. solani* waarna geobserveerd is of een stress effect van de wonden was waar te nemen, of er symptomen werden gevormd en of er bij de geïnoculeerde wond stress te zien was veroorzaakt door de *F. solani* infectie nog voordat symptomen zichtbaar waren.

3.3.2.2 Uitvoering onderzoek

Inoculatie

2 Koppige tomatenplanten ras Merlice (opgekweekt door kassendienst WUR, zaden werden beschikbaar gesteld door de Ruiter) werden verwond bij splitsing bij stengelvoet middels een inkeping aangebracht door een mesje en vervolgens direct, na 1, 2 of 3 weken middels 4 sprays met pompsprayer geïnoculeerd met een 1.10^7 sporen/ml suspensie van *F. solani* CBS stam 8427 (zie 3.2.2). Volume van 1 spray was ongeveer 160 ul.

Proefopzet

Om te testen wat het effect was van de leeftijd van de wond op succes voor infectie met *F. solani*, werden inoculaties 1, 2 of 3 weken na verwonding uitgevoerd. Om effecten van verwonding op stress vorming te meten werden een aantal planten niet verwond. De volgende behandelingen werden opgezet:

- S1 + inoculum, 0 weken na verwonding (5 planten).
- S2 + inoculum, 1 week na verwonding (5 planten).
- S3 + inoculum, 2 weken na verwonding (5 planten).
- S4 + inoculum, 3 weken na verwonding (5 planten).
- S5 + water, 0 weken na verwonding (5 planten).
- S6 + water, geen verwonding (5 planten).
- S7 + inoculum, 0 weken na verwonding (5 planten).

Planten van behandeling S7 waren dezelfde planten als van behandeling S4 die geen symptomen hadden gegeven. Deze waren ten tijde van de verwonding voor S7 2 weken ouder dan bij S1.

Zie Bijlage 8 voor welke planten welke behandeling hebben gekregen en op welke leeftijd.

Waarnemingen

Metingen werden uitgevoerd met de GreenhouseExplorer. Deze werd op de buisrailsysteem getild en zodanig voor de te meten plant gepositioneerd dat de splitsing van de stengelvoet gemeten kon worden. Een stuk karton werd tussen de te fotograferen plant en de plant erna geplaatst zodat tijdens de opname de nog te fotograferen buurplanten niet belicht werden.

Symptomen werden vastgelegd via RGB beelden van de GreenhouseExplorer of via foto's gemaakt met de mobiele telefoon. De Fv/Fm en RGB beelden zijn geanalyseerd met beeldanalyse software (Data analysis software van Phenovation, version 5.4.7 beta-64b).

3.3.2.3 Resultaten

Waarnemingen van symptomen en stress (Fv/Fm) zijn weergegeven in Bijlage 8. Een belangrijke waarneming was dat er vlak na het verwonden van de planten geen zichtbare stress waar te nemen was in de Fv/Fm beelden ter plaatse van de wond, die door infectie veroorzaakte stress zou maskeren. In Bijlage 8 zijn de symptomen weergegeven als volgt: 0=geen afwijkingen; 1=grijze streep zichtbaar bij snijwond; 2=zwart verkleuring net zichtbaar; 3=er is een zwart oppervlak zichtbaar. De 60 inoculaties met *F. solani* op verwonde splitsingen van stengelvoeten resulteerde in 5 gevallen in symptoomvorming. Vier keer na inoculatie van verse wonden (2 keer bij behandeling S1, 2 keer bij behandeling S7) en 1 keer na inoculatie van een 1 week oude wond (S2). Eerste zwartverkleuring was bij deze planten zichtbaar tussen 3 en 7 dagen na inoculatie (Bijlage 9).



Figuur 28 De *F. solani* symptomen gevormd na inoculatie met *F. solani* op verse wonden (eerste 4 foto's van links naar rechts S1_1, S1_5, S7_19, S7_20) en op een 1 week oude wond (laatste foto, S2_7). Symptomen op de foto's zijn, van links naar rechts, waargenomen op 26, 26, 12, 12 en 19 dagen na inoculatie.

In de wetenschap dat deze 5 inoculaties geresulteerd hebben in *F. solani* besmetting, zijn de gemaakte Fv/Fm beelden in de tijd van deze planten nauwkeurig bekeken. Bij S1-1 is lokale stress in Fv/Fm beeld direct na inoculatie zichtbaar als rode verkleuring bij inoculatieplek terwijl eerste symptomen 4 dpi ontstaan, bij S1_5 zie je 6 dpi een dun blauw streepje in Fv/Fm beeld bij inoculatieplek terwijl eerste symptomen 7 dpi ontstaan, bij S7_19 is 1 dpi rode verkleuring zichtbaar bij inoculatieplek die vanaf 2 dpi blauw wordt terwijl eerste symptomen zichtbaar zijn 3 dpi, bij S7_20 is 1 dpi rode verkleuring zichtbaar bij inoculatieplek die vanaf 2 dpi blauw wordt terwijl eerste symptomen zichtbaar zijn 6 dpi (zie Bijlage 8 en 9).

3.3.2.4 Discussie

De gebruikte methode maakt het mogelijk om tomaat te infecteren met *F. solani*. Niet alle inoculaties resulteerden in infectie. Het lijkt er op dat de infectiekans groter is naarmate de wonden jonger zijn. Er zijn uitsluitend symptomen gevormd na inoculatie van verse wonden en een keer op een 1 week oude wond. Inoculatie van 2 en 3 weken oude wonden resulteerde niet in symptoomvorming. Dit is in tegenspraak met Oosting (2017) die beschrijft dat op een oudere wond de aantasting gemakkelijker lijkt te ontwikkelen dan op een verse wond.

Het verwonden van de stengelbasis resulteerde niet in zichtbare stress op de Fv/Fm beelden. In een ander experiment zijn bij stengels met een mesje kruisvormige wonden aangebracht die in Fv/Fm beelden zo veel stress weergaven, dat de mogelijk door *F. solani* veroorzaakte stress daardoor niet waargenomen zou kunnen worden (data niet getoond). Deze planten zijn ook gebruikt voor het testen van een camera gemaakt door Andre Otten op verzoek van partner Holland Green Machine. Het verslag van dit experiment is op eigen verantwoordelijkheid van Andre Otten toegevoegd als Bijlage 10.

Bij de 5 inoculaties die geresulteerd hebben in symptomen werd uitsluitend lokale stress waargenomen. Nooit was zichtbaar dat de stress zich verder over de stengel verspreidde dan de symptomen. Stress werd in Fv/Fm beelden waargenomen in de vorm van rode verkleuring (verlaagde fotosynthese activiteit) of blauwe verkleuring (geen fotosynthese activiteit). Blauwe verkleuring werd waargenomen in Fv/Fm beelden ter plaatse van necrose en op plaatsen waar geen plantmateriaal aanwezig was, bijvoorbeeld ter plaatse van een scheur. Zo was bij watercontrole S5_21 blauwkleuring zichtbaar in Fv/Fm beeld op de plek waar de wond was gaan scheuren (zie Bijlage 9). Dit kan tot misinterpretaties leiden. Echter, wanneer necrose vlekken blauw worden weergegeven in het Fv/Fm beeld dan resulteert dat vaak in een abnormale onderbreking in de omtrek van het beeld van de stengel (zie Bijlage 9). Via machine learning zou dit herkend moeten kunnen gaan worden waardoor blauwkleuring veroorzaakt door scheuren of diepe wonden onderscheiden kan worden van blauwkleuring veroorzaakt door necrotisch weefsel. In dit experiment kon stress 5 dagen tot 1 dag voordat symptomen zichtbaar werden worden waargenomen. Echter, pas als de symptomen goed zichtbaar waren met het oog was de stress ook goed waarneembaar met de camera. Voor het inzetten van de camera in de praktijk voor presymptomatische detectie van *F. solani* in tomaat zouden de Fv/Fm beelden onderscheidender moeten worden. Dit zou kunnen door de opnames van dichterbij te kunnen maken, de scherptediepte en/of de focus te vergroten, metingen in het donker uit te voeren of wellicht kan door het plaatsen van de spiegel in een andere hoek beter van bovenaf op de wond bij de splitsing van de stengelvoet worden gekeken in plaats van aan de zijkant.

4 Vroege detectie van insecten

4.1 Inleiding

Bij aanvang van dit project in 2017 was er een groot probleem met tomatengalmijt (*Aculops lycopersici*) in de Nederlandse tomatenteelt. Tomatengalmijt is een mijt die afzonderlijk met het blote oog niet zichtbaar is maar pas goed met het blote oog te detecteren is als ze met tientallen aanwezig zijn. Symptomen worden het eerst zichtbaar als bruin verkleuring op de stengel van de tomatenplant. In een verder gevorderd stadium verkleuren ook de bladeren, evenals de trossstengels. Vruchten kunnen verkleuren en verkurken. Uiteindelijk verdorren de bladeren en sterft de hele plant af (zie Figuur 29).



Figuur 29 Afstervende door tomatengalmijt aangetaste tomatenplant.

De telers hadden er sterke behoefte aan deze tomatengalmijt zo snel mogelijk te kunnen detecteren want ze zijn met het blote oog nauwelijks te detecteren en wanneer symptomen optraden was het te laat om in te kunnen grijpen. Binnen dit project is toen onderzoek gedaan of deze plaag goed te detecteren was met de Pathoscreen. De resultaten daarvan waren veelbelovend maar de telers gaven aan dat ze de camera te duur vonden om er alleen maar tomatengalmijt mee te kunnen detecteren. Daarom is er vervolgens ook gekeken of met de Pathoscreen ook nog de andere belangrijke plaaginsecten in de Nederlandse tomatenteelt, te weten trips (*Thrips palmi* en *Frankliniella occidentalis*), witte vlieg (*Bemissia tabaci* en *Trialeurodes vaporariorum*) en tomatenmineermot (*Tuta absoluta*) aangetoond konden worden.

4.2 Uitvoering onderzoek

Insecten

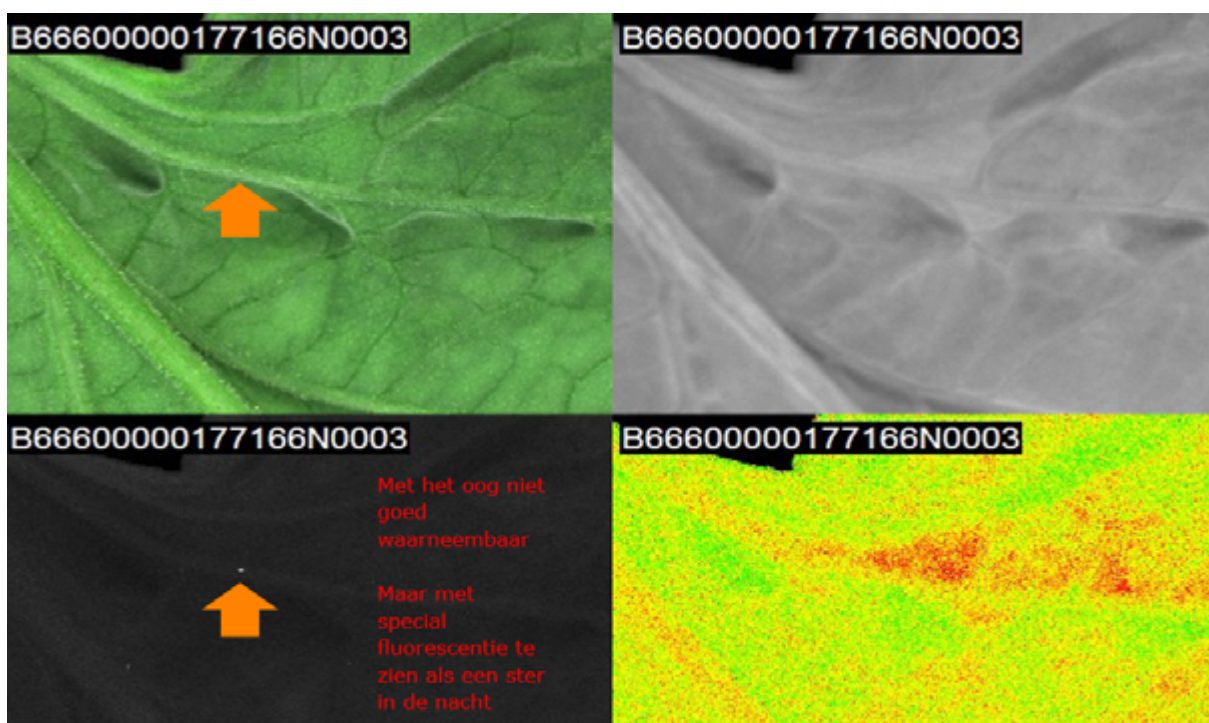
Een tomatenteler uit het westen van het land heeft een met tomatengalmijt besmette plant beschikbaar gesteld. Een andere tomatenteler uit het westen van Nederland heeft blaadjes van tomaat besmet met tomaten mineermot beschikbaar gesteld. Besmette blaadjes zijn gebruikt om nieuwe besmettingen te veroorzaken op jonge tomatenplanten. Deze planten werden in insectenkooien geplaatst waarna met tomatengalmijt besmette blaadjes of met tomatenmineermot besmette blaadjes op bladeren van de jonge tomatenplant werden gelegd. De Business Unit Plantenveredeling van Wageningen Research heeft petrischalen met daarin tomatenbladeren besmet met trips of witte vlieg beschikbaar gesteld.

Waarnemingen

Petrischalen met daarin met insecten besmette tomatenblaadjes werden onder de Pathoscreen van Phenovation gelegd. Hiervan zijn kleuren beelden (RGB, rood groen blauw) en fluorescente beelden gemaakt (Fv/Fm en/of chlorofyl en/of gemaakt met gefilterde blauwe LEDs (RFP) en/of gemaakt met gefilterde groene LEDs (GFP). De beelden zijn geanalyseerd met beeldanalyse software (Data analysis software van Phenovation, version 5.4.7 beta-64b).

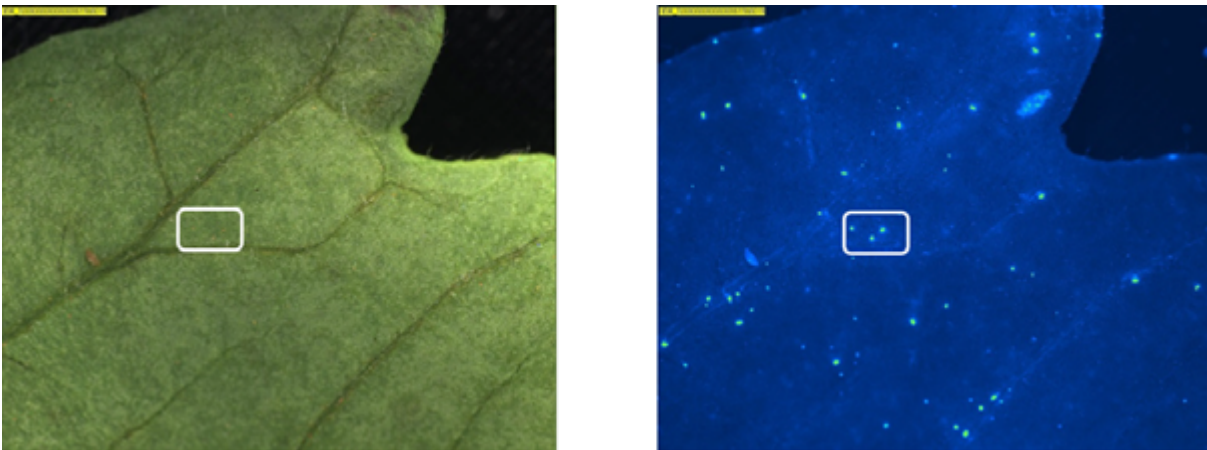
4.3 Resultaten en discussie

Figuur 30 toont een deel van de onderkant van een tomatenblaadje met daarop 1 tomatengalmijt. Met het blote oog is deze niet te detecteren (RGB beeld) terwijl deze in het RFP beeld helder oplicht als een ster in de nacht. Het Fv/Fm beeld toont wel stress in de vorm van roodkleuring maar deze is op een veel groter oppervlak van het blaadje aanwezig dan daar waar de tomatengalmijt zicht bevindt. Het is mogelijk dat de stress ontstaan is door de tomatengalmijt terwijl deze zich over het blad bewogen heeft op de locatie waar de stress zichtbaar is. Het Fv/Fm beeld kan echter niet gebruikt worden voor directe detectie van de tomatengalmijt.



Figuur 30 Beelden van een deel van de onderkant van een tomatenblaadje met daarop 1 tomatengalmijt. Linksboven RGB, rechtsboven chlorofyl beeld, links onder RFP, rechts onder Fv/Fm.

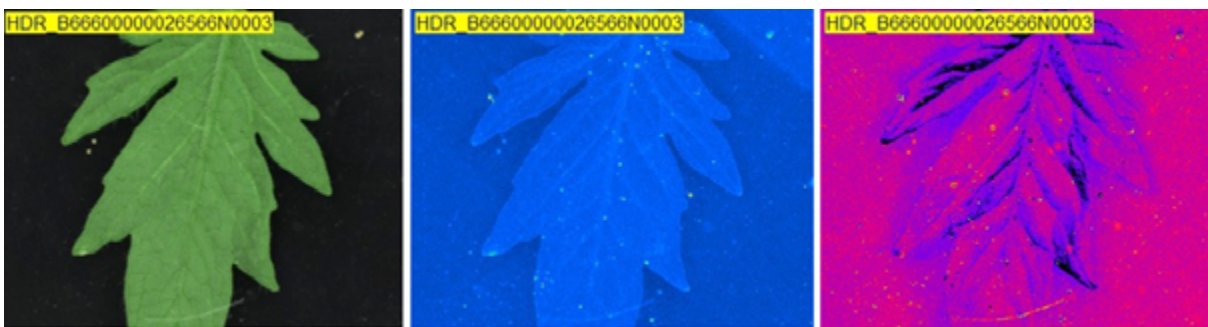
Ook Figuur 31 geeft aan hoe duidelijk de tomatengalmijten te detecteren zijn met het RFP filter.



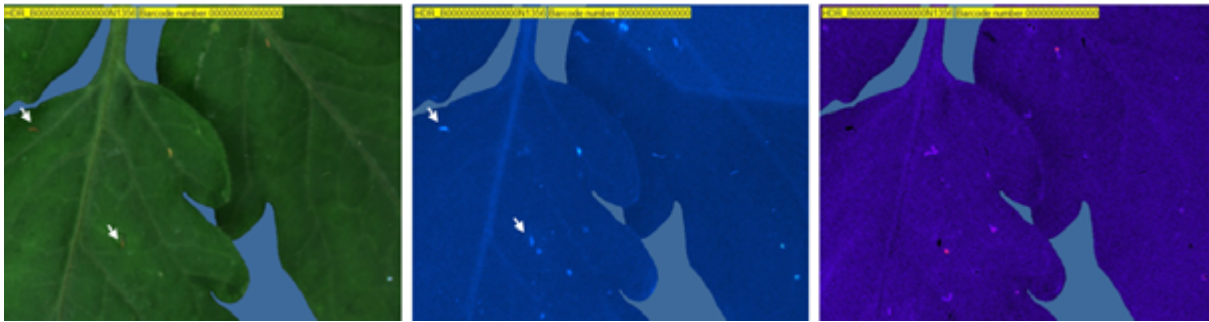
Figuur 31 Deel van een onderkant van een tomatenblaadje besmet met tomatengalmijten. Links het RGB beeld, zoals de mens het met zijn blote oog waarneemt, en rechts het RFP beeld waarbij de tomatengalmijten duidelijk te detecteren zijn.

Telers waren onder de indruk van de detectie van de tomatengalmijt met het RFP filter. Waar tomatengalmijten met het blote oog doorgaans pas worden waargenomen op een plant wanneer ze in tientallen aanwezig zijn, kon een camera met een fluorescentiefilter slechts één enkele tomatengalmijt detecteren als een "ster in de nacht". Toen ze vernamen dat een praktijkgerichte camera uitgerust met een RFP filter rond de 40.000 euro zou moeten kosten vonden ze dat te duur. Indien een dergelijke camera ook mogelijkheden bood andere plagen aan te tonen, zou het voor hen interessanter worden.

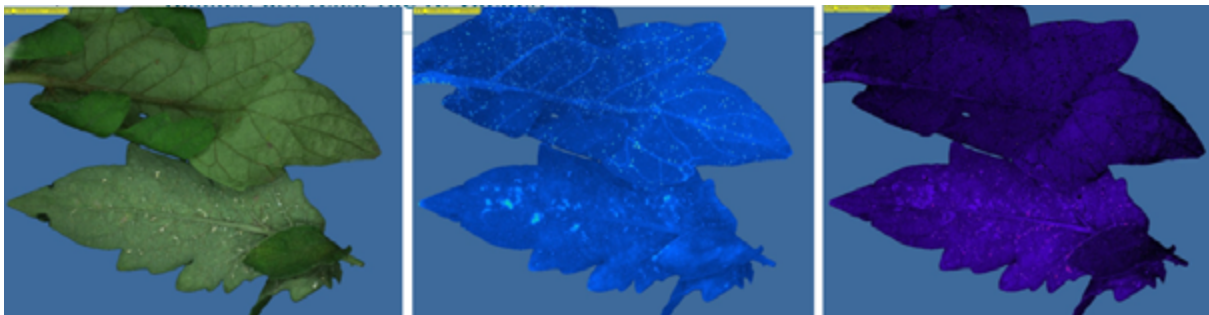
Daarom is vervolgens bestudeerd of, eventueel in combinatie met andere filters, ook trips, witte vlieg en tomatenmineermot goed te detecteren waren met een camera. Figuren 32 tot en met 36 tonen RGB en/of RFP en/of GFP en/of Fv/Fm beelden van (delen van) tomatenblaadjes met tomatengalmijt en/of trips en/of witte vlieg en/of tomatenmineermot.



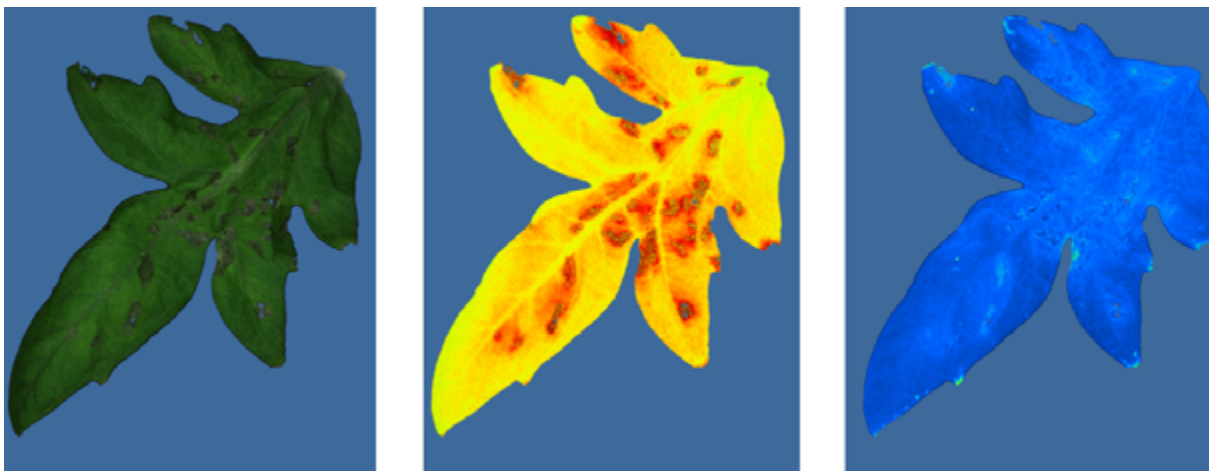
Figuur 32 Deel van een onderkant van een tomatenblaadje besmet met tomatengalmijten. Links het RGB beeld, midden het RFP beeld en rechts het GFP beeld.



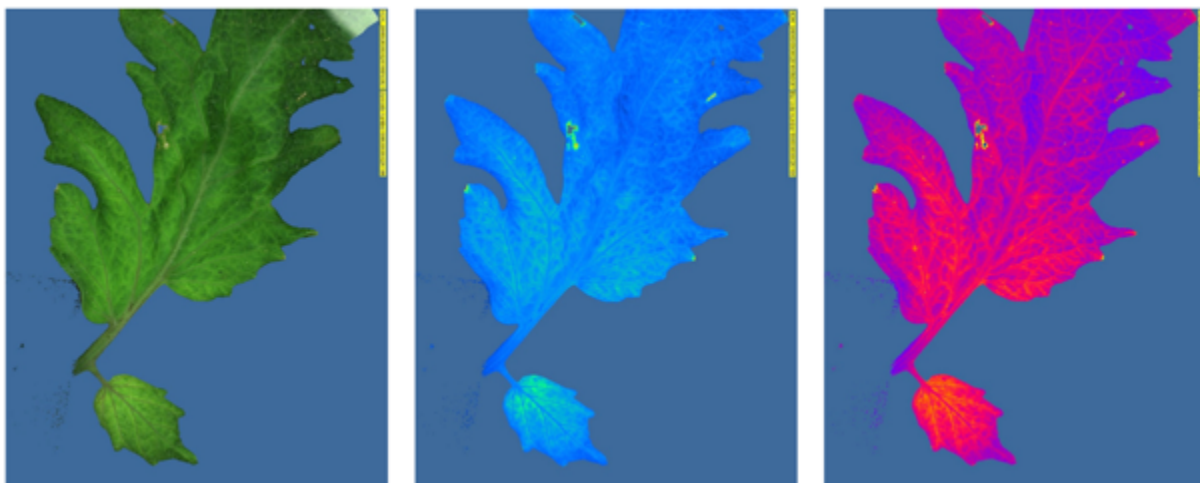
Figuur 33 Deel van een blaadje met daarop adulten en larven van trips. Links het RGB beeld, midden het RFP beeld en rechts het GFP beeld. Adulten (er zijn er 2 aangeduid met pijltjes) zijn vaak donkerder dan de larven (eentje duidelijk zichtbaar ongeveer in het midden van het RGB beeld en het RFP beeld).



Figuur 34 Twee onderkanten van blaadjes van tomaat. Het bovenste blaadje is besmet met tomaten galmijt, het onderste met larven en adulten van witte vlieg. Links het RGB beeld, midden het RFP beeld en rechts het GFP beeld.



Figuur 35 Tomatenblaadje met zichtbare schade veroorzaakt door larven van de tomaten mineermot die zich via tunnels door het blad heen eet. Links RGB, midden Fv/Fm en rechts RFP.



Figuur 36 Tomatenblaadje met eieren van tomaten mineermot. Links RGB, midden RFP, rechts GFP. In het RGB beeld zijn onder andere in het midden en rechts boven onder het bovenste gaatje van het blaadje eieren goed zichtbaar terwijl ze niet zichtbaar zijn in de andere 2 beelden.

Tomatengalmijten die zeer goed oplichtten bij het RFP beeld lichtten niet op bij het GFP beeld. Adulten en larven van trips lichtten eveneens op bij RFP beeld en niet bij het GFP beeld. De trips larven lichtten wel intenser op bij het RFP beeld dan de trips adulten. Larven en adulten van witte vlieg worden niet waargenomen met RFP filter maar wel met GFP filter. Van tomaten mineermot zijn geen van de ontwikkelingsstadia larve, adult en ei alledrie zichtbaar met het RFP en GFP filter. Het detecteren van insecten op blaadjes via Fv/Fm beelden zal niet snel tot directe detectie van de insecten leiden. Aangezien verschillende ontwikkelingsstadia van insecten over het blad bewegen zal de stress die er door veroorzaakt wordt ook nog zichtbaar zijn als de beesten alweer ergens anders zitten. Waarnemingen via GFP en RFG beelden daarentegen lokaliseren de beesten direct. Een RFP filter kan ingezet worden voor de directe detectie van tomatengalmijt en trips terwijl een GFP filter kan worden gebruikt voor detectie van witte vlieg. Tomatenmineermot kon door allebei de filters niet worden aangetoond. De gangen veroorzaakt door de larven van tomaten mineermot zijn echter goed waarneembaar met het blote oog.

In de praktijk zou een camera met een RFP en een GFP filter kunnen worden ingezet door deze 's nachts door de kas te laten rijden aangezien de fluorescentie opnames in het donker dienen te worden uitgevoerd. De volgende morgen zou aan de hand van de geanalyseerde data moeten kunnen worden vastgesteld waar in de kas verdachte plekken zitten met betrekking tot besmettingen met tomatengalmijt, trips en witte vlieg. Nadere inspectie kan dan zorgen voor zeer vroege detectie van de plaag. Echter, een jaar na dit onderzoek waren de problemen met tomatengalmijt die voor zulke enorme schade zorgden in 2017 sterk verminderd waardoor er geen behoefte meer was vanuit de praktijk voor deze vorm van detectie die het mogelijk maakt een enkele tomatengalmijt te detecteren terwijl tomatengalmijten met het blote oog doorgaans pas worden waargenomen als ze in tientallen aanwezig zijn. Larven en adulten van trips en witte vlieg zijn met een geoefend oog wel afzonderlijk waar te nemen. De inzet van een camera met RFP en GFP filters zou de detectie wel enorm vergemakkelijken.

5 Synthese en conclusies

5.1 Vroege detectie van ziekten en plagen nog voor symptomen zichtbaar zijn

Het is belangrijk om in de kas zo vroeg mogelijk ziekten en plagen te detecteren zodat zo snel mogelijk ingegrepen kan worden de schade te beperken. Belangrijkste vragen in dit onderzoek waren: Kunnen stress metingen bijdragen aan een eerdere detectie van ziekten en plagen dan symptoomwaarnemingen? Hoeveel eerder kan door een ziekte veroorzaakte stress worden aangetoond dan de door de ziekte veroorzaakte symptomen? Hiertoe zijn experimenten uitgevoerd met tomatenplanten die geïnoculeerd werden met *Botrytis* of *F. solani* waarna middels Fv/Fm metingen met camera's stress ontwikkeling is gevolgd en waarbij tevens symptoomvorming is gevolgd. Gekeken werd naar het effect van fungicidetoediening wanneer de eerste stress werd waargenomen of op het moment dat symptomen goed zichtbaar werden. In de experimenten waarbij inoculaties werden uitgevoerd was het aannemelijk dat de door de ziekte veroorzaakte stress zou verschijnen bij de inoculatieplekken. De rond die plekken ontstane stress werd dan ook verondersteld veroorzaakt te zijn door de daar aangebrachte schimmel. Voor definitieve detectie van de ziekte dient echter na de stress meting de ziekte nog geïdentificeerd te worden, bijvoorbeeld door DNA analyses. Naast camera's die Fv/Fm metingen konden verrichten zijn ook goedkopere sensoren getest die chlorofyl fluorescentie kunnen meten die eventueel een voordeliger alternatief zouden bieden. Tijdens het onderzoek zijn ook innovatieve camera's ingezet voor directe detectie van plaaginsecten.

5.1.1 Experimenten met *Botrytis*

Bij de bladinoculatie experimenten met *Botrytis*, werd bij jonge planten en bij de experimenten in petrischalen, ongeveer 1 tot 2 dagen voordat de eerste symptomen duidelijk zichtbaar waren de eerste stress gemeten via Fv/Fm metingen. De chlorofyl fluorescentie metingen met goedkopere sensoren namen pas iets afwijkends waar als de symptomen al zichtbaar waren. De experimenten in petrischalen bleken aan te geven dat, wanneer de behandeling van een blaadje met fungicide werd uitgevoerd zodra stress aan de hand van Fv/Fm gemeten was, in plaats van pas als symptomen zichtbaar waren, het blad beter beschermd werd tegen schade. Blaadjes die op het eerdere tijdstip waren behandeld vertoonden meer fotosyntheseactiviteit dan blaadjes die op het latere tijdstip waren behandeld. Reden kan zijn dat wanneer in een dergelijk vroeg stadium de ziekte wordt bestreden, nog voor symptomen zichtbaar zijn, de schimmel weinig kans krijgt om het blad aan te tasten. Het inzetten van een camera die Fv/Fm metingen kan verrichten kan in dat verband zinvol zijn. Denkbaar is ook dat de inzet van een dergelijke camera de inzet van alternatieve middelen, waarvan bekend is dat ze pas efficiënt werken wanneer ze worden toegediend als de ziektedruk niet te hoog is, zeer zinvol kan zijn.

Het feit dat de camera met de stresswaarneming slechts 1 tot 2 dagen eerder aangaf dat de plant vermoedelijk ziek was dan wanneer dat via symptoomwaarneming werd vastgesteld, stemt in eerste instantie wellicht niet erg hoopvol dat dit de teler veel voorsprong geeft om eerder in te grijpen. Echter, aangezien de experimenten zijn uitgevoerd met kunstmatige inoculaties met hoge sporenconcentraties en onder andere omstandigheden als die van de tomatenteelt in de praktijk, kan worden verondersteld dat onder natuurlijke omstandigheden in een praktijkkas het infectieproces veel langzamer zal verlopen waarbij stress waarneming wellicht veel eerder plaats vindt dan wanneer symptomen waargenomen kunnen worden. Om dit goed te onderzoeken zou je de beschikking moeten hebben over een praktijkkas waarin een beginnende *Botrytis* besmetting optreedt en waar je dan met een camera Fv/Fm metingen verricht. Metingen zouden dan vooral gedaan moeten worden op die plekken waar bladeren van de stengel zijn verwijderd, die plekken waar *Botrytis* infecties in de kas doorgaans beginnen.

Tijdens de resterende looptijd van het onderzoek was dat niet te realiseren. Om tijdens het onderzoek toch dergelijke Fv/Fm metingen te kunnen verrichten, is zo goed mogelijk een praktijksituatie nagebootst in een experimentele kas. Op deze wijze kon een omgebouwde camera hiervoor getest worden, ervaring worden opgedaan met de interpretatie van de beelden en uiteraard onderzocht worden hoeveel eerder stress kon worden waargenomen dan symptoomvorming. Echter, de omstandigheden voor kunstmatige inoculatie met *Botrytis* die hierbij noodzakelijk waren om binnen een beperkte tijdspanne *Botrytis* infecties te realiseren hebben weliswaar geresulteerd in symptoomvorming op de bladstompjes maar in geen van de gevallen in *Botrytis* infecties die de stengel zijn ingeschoten. De infectie zette niet door naar de stengel. Wellicht dat dan wel stress waargenomen had kunnen worden in de stengel. In het bladstompje zit ook relatief weinig chlorofyl wat de stresswaarneming (verminderde fotosynthese) bemoeilijkt.

Mogelijke oorzaak is dat de planten te jong waren aangezien *Botrytis* infecties in de praktijk vooral plaatsvinden bij oudere planten. Op jonge sterke cellen zie je in de praktijk vaker een oppervlakkige aantasting die niet zo snel naar binnen schiet. Het gebruikte *Botrytis* isolaat is een referentieisolaat dat al jaren in Nederland en internationaal gebruikt wordt, ook voor virulentie proeven, dus dat kan geen beperkende factor zijn geweest.

5.1.2 Experimenten met *F. solani*

De eerste experimenten met *F. solani* gaven duidelijk aan dat aanwezigheid van stress niet altijd gecorreleerd is met aanwezigheid van de te detecteren ziekte. In geen van de geteste verdachte bladeren met necrose werd *F. solani* aangetoond terwijl de gemeten stress duidelijk zichtbaar was op Fv/Fm beelden. Mochten de stress en symptomen toch een gevolg van de ziekte zijn, dan was deze in deze plantendelen in ieder geval niet aan te tonen, wat de detectie van de schimmel op deze wijze onmogelijk maakt. Het onderzoek heeft wel uitgewezen dat de schimmel uitsluitend aantoonbaar was op plekken waar wondweefsel aanwezig was. Derhalve dient de detectie ervan zich op die plaatsen te richten.

Tijdens het experiment met planten in de experimentele kas, waarbij het onderzoek zich richtte op de plek waar het infectieproces in de praktijk vermoedelijk het eerst plaats vindt, te weten aan de wond bij de stengelbasis waar de plant gesplitst wordt, was lichte stress soms wel 5 dagen voordat symptomen zichtbaar waren, waar te nemen. Hier zou waarschijnlijk veel winst te halen zijn indien de camera hiervoor verbeterd wordt. Opvallend was dat uitsluitend lokale stress werd waargenomen. Nooit was zichtbaar dat de stress zich verder over de stengel verspreide dan de symptomen. Lastig voor de interpretatie was dat blauwe verkleuring werd waargenomen in Fv/Fm beelden ter plaatse van necrose en op plaatsen waar geen plantmateriaal aanwezig was, bijvoorbeeld ter plaatse van een scheur. Blauwe kleur in Fv/Fm beeld staat voor geen fotosyntheseactiviteit. Op een plek waar geen plantmateriaal aanwezig is, zoals bij een scheur, is dat te verwachten. Bij de necrotische plekken in dit onderzoek betrof het waarschijnlijk cellen die dood waren gegaan waardoor geen fotosyntheseactiviteit meer gemeten kon worden.

5.1.3 Experimenten met insecten

Fv/Fm metingen lijken niet geschikt als hulp bij directe detectie van insecten op blaadjes. Aangezien verschillende ontwikkelingsstadia van insecten over het blad bewegen zal de stress die er door veroorzaakt wordt ook nog zichtbaar kunnen zijn als de beesten alweer ergens anders zitten. Waarnemingen via GFP en RFP beelden daarentegen kunnen sommige insecten direct lokaliseren. Een RFP filter kan ingezet worden voor de directe detectie van tomatengalmijt en trips terwijl een GFP filter kan worden gebruikt voor detectie van witte vlieg.

Een toekomstbeeld kan zijn dat voor detectie van insecten in de praktijk een camera met een RFP en een GFP filter wordt ingezet door deze 's nachts door de kas te laten rijden. Fluorescentie opnames dienen in het donker dienen te worden uitgevoerd. De volgende morgen zou aan de hand van de geanalyseerde data moeten kunnen worden vastgesteld waar in de kas verdachte plekken zitten met betrekking tot besmettingen met tomatengalmijt, trips en witte vlieg. Nadere inspectie kan dan zorgen voor zeer vroege detectie en identificatie van de plaag. Dit zal zorgen voor een veel vroegere detectie van deze insecten dan dat mogelijk is via observaties met het blote oog.

5.2 Algemene conclusies en aanbevelingen voor verder onderzoek

De onderzoeksvraag hoeveel eerder door ziekte veroorzaakte stress waargenomen kan worden dan dat ziektesymptomen zichtbaar zijn is onderzocht. Dat het niet zo makkelijk blijkt hierover een uitspraak te kunnen doen is ook een resultaat. Het antwoord op die vraag zal ook niet eenduidig zijn want deze zal mede beïnvloed worden door verschillende factoren zoals luchtvochtigheid, daglengte, temperatuur, ouderdom van de plant, de virulentie van een pathogeen, de vatbaarheid van het ras, etc.

Wellicht moet het ambitieniveau bijgesteld worden. Het zou natuurlijk mooi zijn wanneer een camera veel eerder door ziekte veroorzaakte stress kan waarnemen dan de mens door ziekte veroorzaakte symptomen, maar het kan ook al enorme winst opleveren als de camera zijn stress waarnemingen ongeveer gelijktijdig doet als de mens zijn symptoomwaarnemingen, ze beter weergeeft en als de camera het verloop en herstel in tijd in kaart kan brengen. De beelden van *Botrytis* infecties op blad waren met Fv/Fm beelden bijvoorbeeld eerder en vooral veel beter zichtbaar dan met het blote oog.

Belangrijk in dit type onderzoek is dat bekend is waar Fv/Fm metingen aan de plant moeten worden uitgevoerd. Wanneer stress waargenomen wordt in een plant, kan dat een indicatie zijn van besmetting met een of meerdere ziekten, maar het kan ook veroorzaakt worden door abiotische factoren. Om stress metingen in te zetten voor vroege ziektedetectie in de praktijk is het noodzakelijk te weten waar de verschillende ziekten in de plant het eerst zullen optreden. In het geval van *Botrytis* infectie is dat daar waar de bladeren van de stengel zijn verwijderd, bij *F. solani* onderaan de plant op de wond bij de splitsing van de stengelhoof. Het is belangrijk om de Fv/Fm metingen dan ook op die plekken te doen omdat daar de eerste door de te detecteren ziekte geïnduceerde stress zal worden waargenomen. DNA analyses kunnen ingezet worden om definitief uitsluitel te geven over de aard en/of aanwezigheid van de ziekte.

Enkele opties voor vervolgonderzoek zijn hieronder weergegeven.

- Voer de experimenten uit dit onderzoek die zijn uitgevoerd in de experimentele kas uit in een praktijkkas waarin beginnende natuurlijke infecties van *Botrytis* of *F. solani* optreden. Er kan dan waarschijnlijk ook waargenomen worden of stress wordt waargenomen als *Botrytis* de stengel in schiet.
- Onderzoek of het in de praktijk ontstaan van wonden of scheuren in planten, alvorens deze geïnfecteerd worden door een ziekteverwekker, tot stressvorming leidt. Indien dit het geval is zal deze wondstress de stress veroorzaakt door de ziekte maskeren. In het experiment waarbij een wond werd aangebracht bij de splitsing van de stengelvoet werd geen wondstress waargenomen. Onduidelijk is of bij het scheuren van het plantweefsel ter plaatse van de splitsing van de plant bij de stengelbasis in de praktijk wel wondstress optreedt en of deze de eventueel door de ziekte ontstane stress verhuult.
- Indien blauwkleuring in Fv/Fm beelden veroorzaakt door necrose in het weefsel, zorgt voor een abnormale onderbreking in de omtrek van het beeld van waargenomen plantendelen (zoals in dit onderzoek het geval was bij door *F. solani* veroorzaakte necroseplekken in de stengel) zou onderzocht kunnen worden hoe dit via machine learning beter te interpreteren valt: betreft het necroseweefsel zonder fotosyntheseactiviteit of het ontbreken van plantenweefsel, bijvoorbeeld vanwege een scheur?
- Onderzoek hoe een camerasysteem verbeterd kan worden zodanig dat Fv/Fm beelden onderscheidender worden. Het camerasysteem zou het mogelijk moeten maken opnames van dichterbij te kunnen maken, de scherptediepte en/of de focus te vergroten, of wellicht kan door het plaatsen van de spiegel in een andere hoek.
- Ontwerp van een meetprotocol voor het doen van Fv/Fm metingen in het donker in de kas. Resultaten van Fv/Fm metingen zijn aanzienlijk beter wanneer deze worden voorafgegaan door een donkeradaptatie. Metingen kunnen in de kas derhalve het beste 's nachts worden uitgevoerd, als het donker is. Echter, tijdens een meting worden omringende planten sterk belicht door de opname. Om toch in een bepaalde periode zo veel mogelijk planten in een kas te kunnen meten dient te worden uitgezocht wat de afstand tussen 2 opeenvolgende te meten planten dient te zijn zodanig dat een plant geen hinder ondervindt van het licht van een eerdere meting.
- Van biologische gewasbeschermingsmiddelen is bekend dat ze niet altijd goed werken bij een hoge ziektedruk, waardoor het zinvol is te bestuderen of deze goed inzetbaar zijn op het moment dat eerste stress gemeten wordt als er nog geen grote ziektedruk is. Is inzet biologische middelen effectiever gebruikmakend van Fv/Fm metingen?
- Uit het onderzoek bleek dat voor detectie van insecten verschillende sensoren konden worden ingezet. Zoek voor de verschillende ziekten en plagen naar de meest optimale (combinatie van) sensoren voor vroege detectie.

Literatuur

Cuesta Arenas, Y., E.R.I.C. Kalkman, A. Schouten, M. Dieho, P. Vredenburg, B. Uwumukiza, M. Osés Ruiz & J.A.L. van Kan, 2010.

Functional analysis and mode of action of phytotoxic Nep1-like proteins of *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74: 376-386. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2010.06.003>

Hofland-Zijlstra, J., J. Kohl & S. Böhne, 2009.

Preventieve en curatieve bestrijding van *Botrytis* stengelaanstasting in tomaat met chemische en niet-chemische middelen. Rapport Wageningen UR Glastuinbouw 232.

Oostingh, C., 2017.

Fusarium solani in tomaat. Projectverslag 161282 van Proeftuin Zwaagdijk.

Paternotte, S.J., 2011.

Vooraf paprika, maar ook tomaat, komkommer, courgette en aubergine: *Fusarium solani* veroorzaakt wortel-, voet- en stengelrot. *Onder Glas*, 8(2), 24-24. <https://edepot.wur.nl/164835>

Romberg, M.K. & R.M. Davis, 2007.

Host range and phylogeny of *Fusarium solani* f.sp. *eumartii* from potato and tomato in California. *Plant Disease* 91:585-592.

J. Salinas & K. Verhoeff, 1995.

Microscopical studies of the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* volume 101, pages377-386(1995)

Sun, E.J., Su, H.J. and Ko, W.H., 1978.

Identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4 from soil of host tissue by cultural characters. *Phytopathology* 68: 1672-1673

Bijlage 1 De scores voor de klassen van stress en symptomen waargenomen aan plant van de verschillende behandelingen van bladinoculaties aan plant van paragraaf 2.2.1

- (-) groene kleur op de lokatie van de inoculatie

0 = niets afwijkends te zien
- (+/-) gele kleur, soms met beetje rood, op lokatie van inoculatie

1 = zeer lichte verkleuring net zichtbaar als lichte lichtbruin verkleuring in het blad als je weet waar geïnoculeerd is
- (+)

rode kleur, soms met beetje geel, op lokatie van inoculatie

2 = lichte necrose zichtbaar als lichtbruin vlekje ter grootte van inoculatiedruppel
- (++)

dieprode kleur op lokatie van inoculatie

3 = necrose duidelijk zichtbaar als bruine vlek met een rand om de lesie
- (+++)

blauwe kleur (gat) op lokatie van inoculatie

4 = necroseplek met aan de binnenkant een gat
- 5 = necroseplek die veel groter is dan de inoculatiedruppel die zich uitbreidt en waarbij ook sporen zichtbaar zijn

Plant	Behandeling	Tijdstip inoculatie	Fv/Fm										Symptomen						
			21 hpi	25 hpi	28 hpi	44 hpi	51hpi	75hpi	100hpi	7d	21 hpi	25 hpi	28 hpi	44 hpi	51hpi	75hpi	100hpi	7d	
1	A: Bc en Luna als stress	1-7-2019 12.30h	-	+	+						0	1							
2		1-7-2019 12.30h	+/-	+	++	++	++	++	++	++	0	1	2	2					
3		1-7-2019 12.30h	-	+	++						0	1							
4		1-7-2019 12.30h	+	++	++						0	1							
5		1-7-2019 12.30h	+/-	++	++						0	1							
41		8-7-2019 12.00h	+/-	++	++	++	++	++	++	++	1	2	2	3	3	3	4	4	
42		8-7-2019 12.00h	-	++	++	++	++ en +++				0	2	2.5	3	3.5	3.5	4	4	
43		8-7-2019 12.00h	+/-	++	++	++	++	++	++	++	0	2	3	3	3	3.5	4	4	
44		8-7-2019 12.00h	-	++	++	++	++	++	++	++	0	1	2	3	3	3	3	4	
45		8-7-2019 12.00h	-	++	++	++	++	++	++	++	0	1	2	3	3.5	3.5	4	4	
A gemiddeld											0.1	1.3	2.25	2.83	3.2	3.3	3.8	4	

Plant	Behandeling	Tijdstip inoculatie	Fv/Fm										Symptomen					
			21 hpi	25 hpi	28 hpi	44 hpi	51hpi	75hpi	100hpi	7d	21 hpi	25 hpi	28 hpi	44 hpi	51hpi	75hpi	100hpi	7d
11	B: Bc en Luna	1-7-2019 12.30h	-	+	+						0	1	1					
	als sympt																	
12		1-7-2019 12.30h	-	+							0	1	1					
13		1-7-2019 12.30h	-	+							0	1	1					
14		1-7-2019 12.30h	-	+							0	1	1					
15		1-7-2019 12.30h	+/-	+	+	++	++				0	1	1	2				
51		8-7-2019 12.00h	-	+	+	+					0	2	1.5	3	4	4	4	4
52		8-7-2019 12.00h	-	+	+	+					0	2	3	3	3	4	4	4
53		8-7-2019 12.00h	-	+	++	++					0	2	3	3	4	4	4	4
54		8-7-2019 12.00h	-	+	+	+					0	2	2	3	3	4	4	4
55		8-7-2019 12.00h	-	+	++	++					0	2	3	3	3	4	4	4
B gemiddeld											0	1.5	1.75	2.83	3.4	4	4	4
31	C: Bc en geen Luna	1-7-2019 12.30h	+/-	+							0	1						
32		1-7-2019 12.30h	-	+/-	+/-						0	1						
33		1-7-2019 12.30h	+/-	+							0	1						
34		1-7-2019 12.30h	+/-	+							0	1						
35		1-7-2019 12.30h	+	+	++	++	++				0	1	1	2				
71		8-7-2019 12.00h	+/-	++	nt						0	2	3	3	4	4	4	5
72		8-7-2019 12.00h	+/-	+	+	++	++				1	2.5	3	3	3	4	4	5
73		8-7-2019 12.00h	+/-	+	+	++	++	+++			0	2	2	3	3	4	4	4
74		8-7-2019 12.00h	-	+	+						0	1.5	2	3	3	3	3	5
75		8-7-2019 12.00h	-	+	+						0	2	2	3	3	3	4	4
C gemiddeld											0.1	1.6	2	2.83	3.2	3.6	3.8	4.2
21	D: W en geen Luna	1-7-2019 12.30h	-	-	-	-					0	0	0	0	0	0	0	0

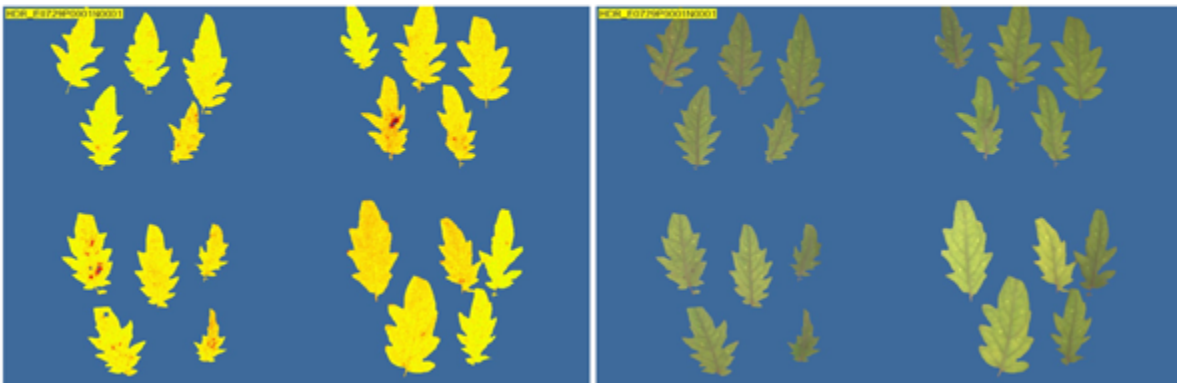
Plant	Behandeling	Tijdstip inoculatie	Fv/Fm							Symptomen								
			21 hpi	25 hpi	28 hpi	44 hpi	51hpi	75hpi	100hpi	7d	21 hpi	25 hpi	28 hpi	44 hpi	51hpi	75hpi	100hpi	7d
22		1-7-2019 12.30h	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23		1-7-2019 12.30h	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24		1-7-2019 12.30h	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25		1-7-2019 12.30h	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61		8-7-2019 12.00h	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62		8-7-2019 12.00h	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63		8-7-2019 12.00h	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64		8-7-2019 12.00h	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65		8-7-2019 12.00h	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D gemiddeld									0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A gemiddeld A: Bc en Luna als stress									0.1	1.3	2.25	2.83	3.2	3.3	3.8	3.8	4	4
B gemiddeld B: Bc en Luna als sympt									0	1.5	1.75	2.83	3.4	4	4	4	4	4
C gemiddeld C: Bc en geen Luna									0.1	1.6	2	2.83	3.2	3.6	3.8	3.8	4.2	4.2
D gemiddeld D: W en geen Luna									0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Bijlage 2 Overzicht van waarnemingen van het experiment van 29 juli 2019 beschreven in paragraaf 2.2.2

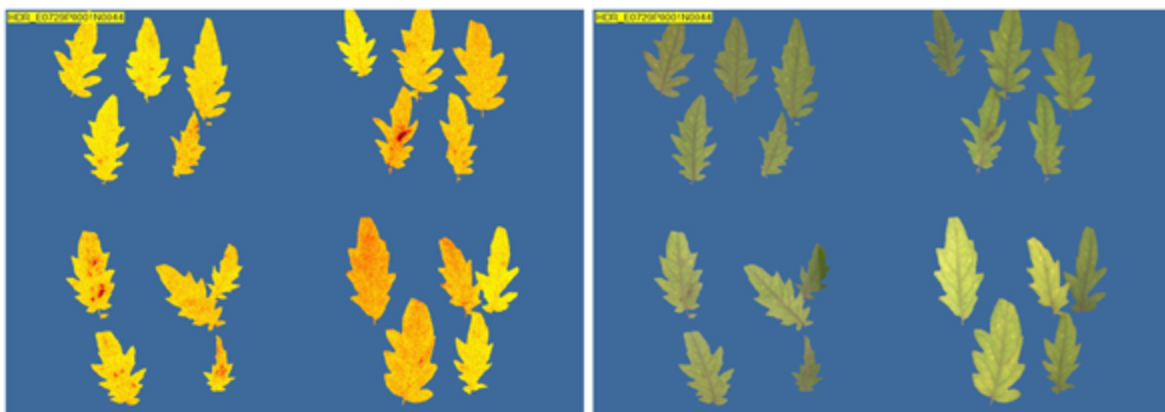
In de volgende figuren, bestaande uit 2 panelen met ieder 4 groepjes van 5 blaadjes, staan steeds afbeeldingen van Fv/Fm en RGB metingen. Er boven staat steeds aangegeven hoeveel uur na inoculatie (hpi) de opnames genomen zijn. Per paneel zie je steeds:

- Links onder: A. Blaadjes worden geïnoculeerd met Botrytis en zodra stress gemeten is worden ze behandeld met LUNA.
- Rechts boven: B. Blaadjes worden geïnoculeerd met Botrytis en zodra symptomen met het blote oog zichtbaar worden ze behandeld met LUNA.
- Links boven: C. Blaadjes worden geïnoculeerd met Botrytis en niet behandeld met LUNA.
- Rechts onder: D. Blaadjes worden niet geïnoculeerd met Botrytis en niet behandeld met LUNA.

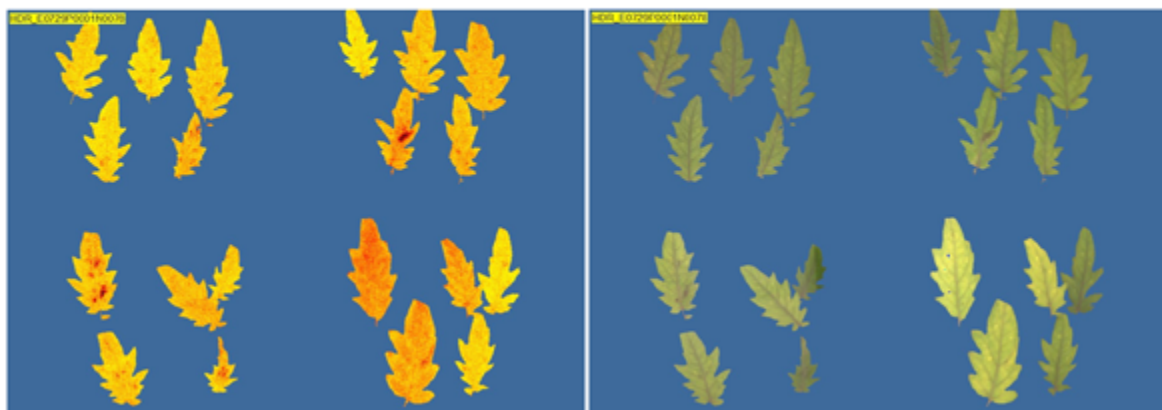
1 hpi



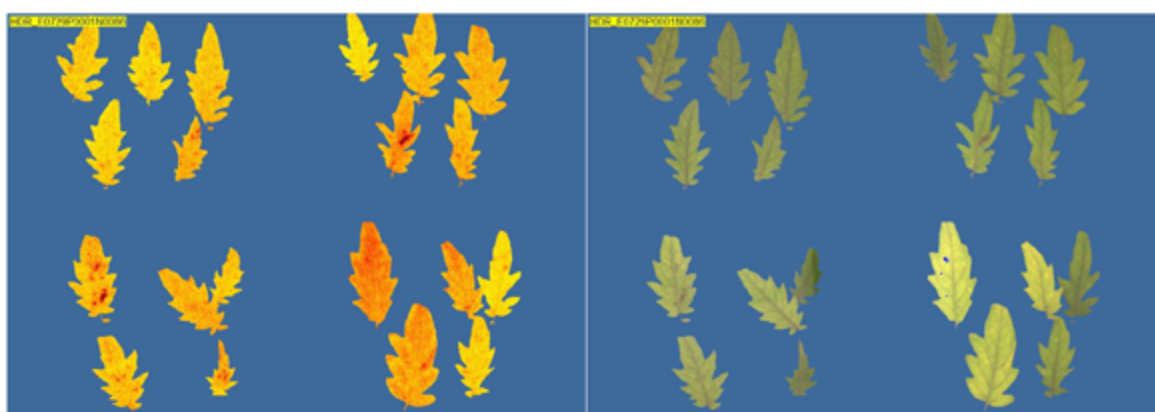
12 hpi



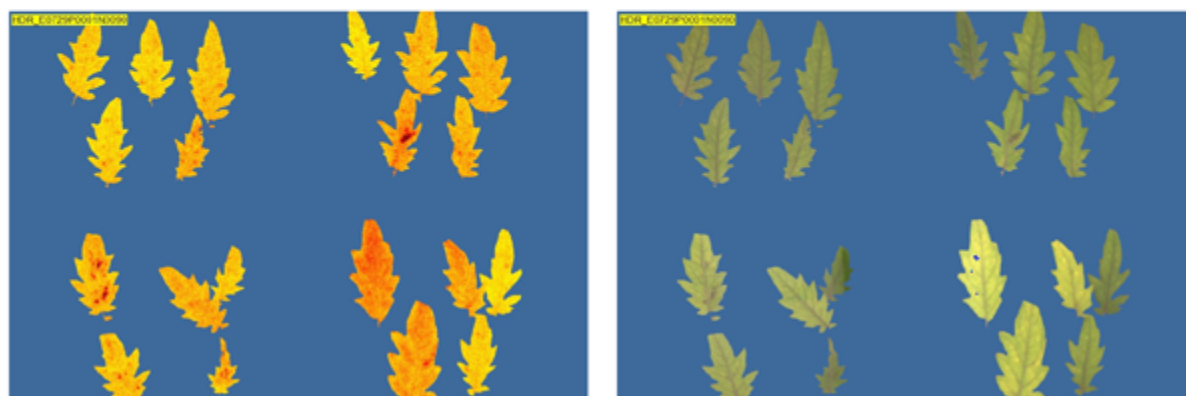
21 hpi



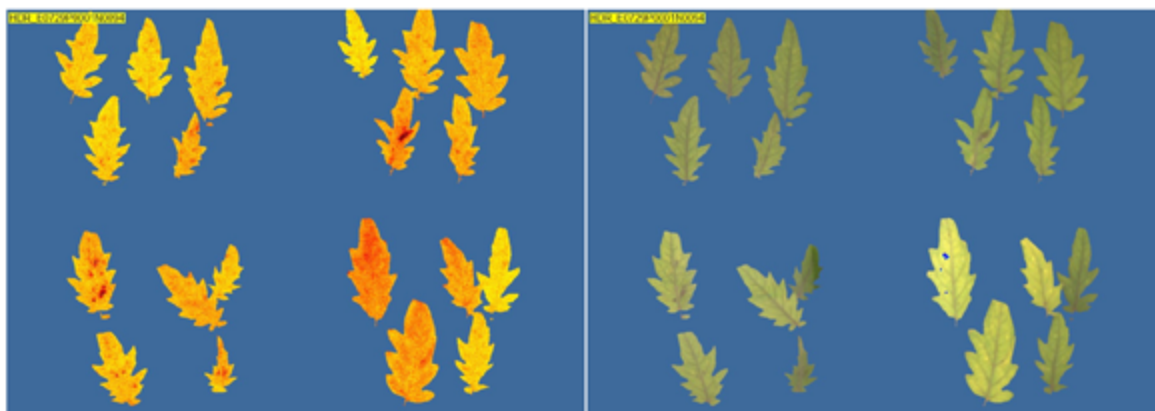
23 hpi



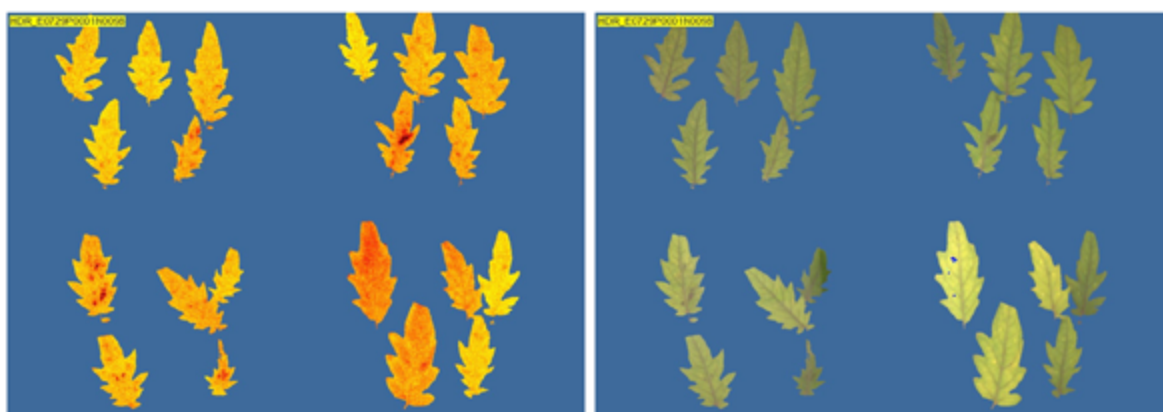
24 hpi



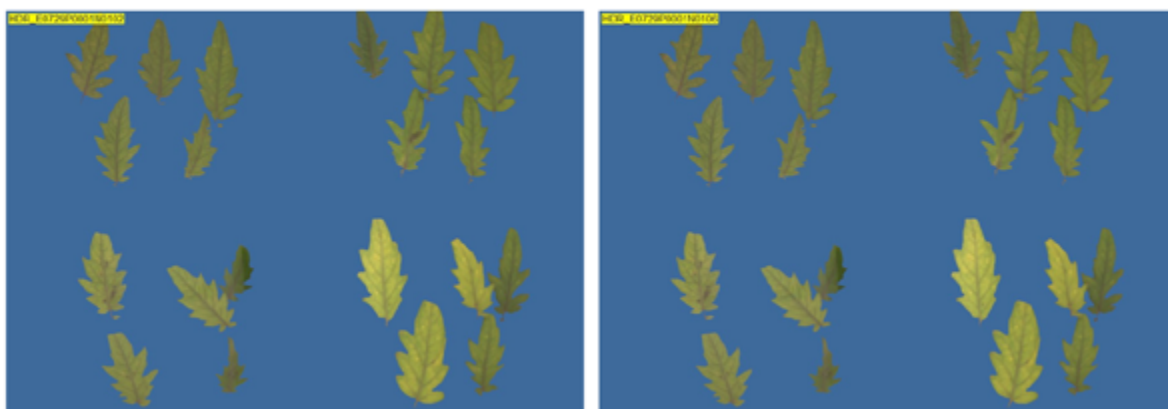
25 hpi



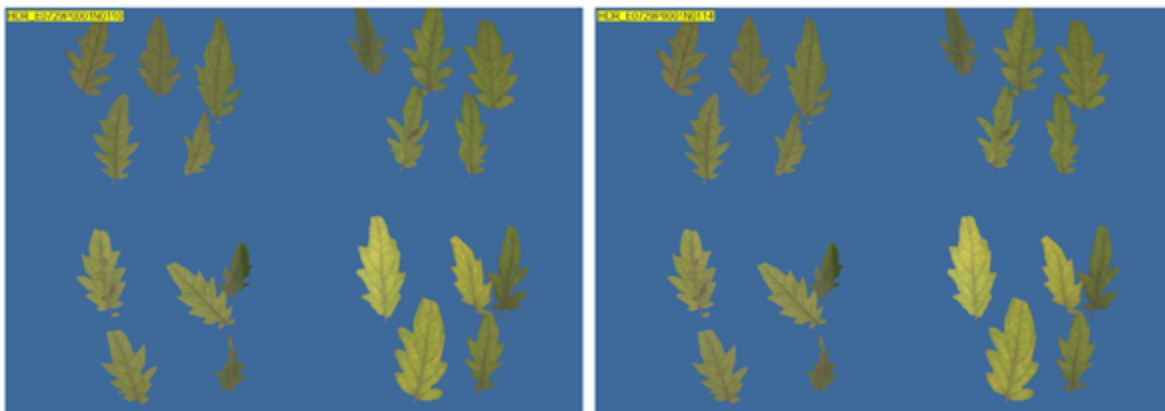
26 hpi



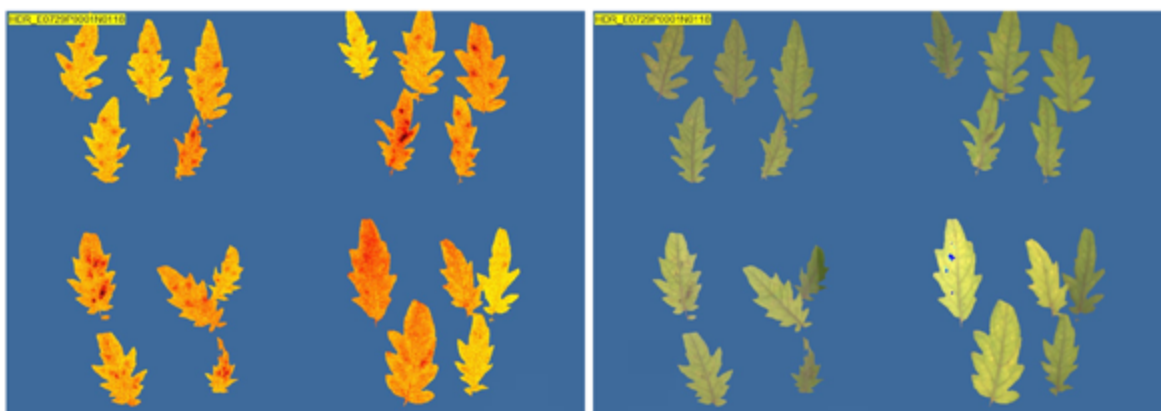
27 en 28 hpi



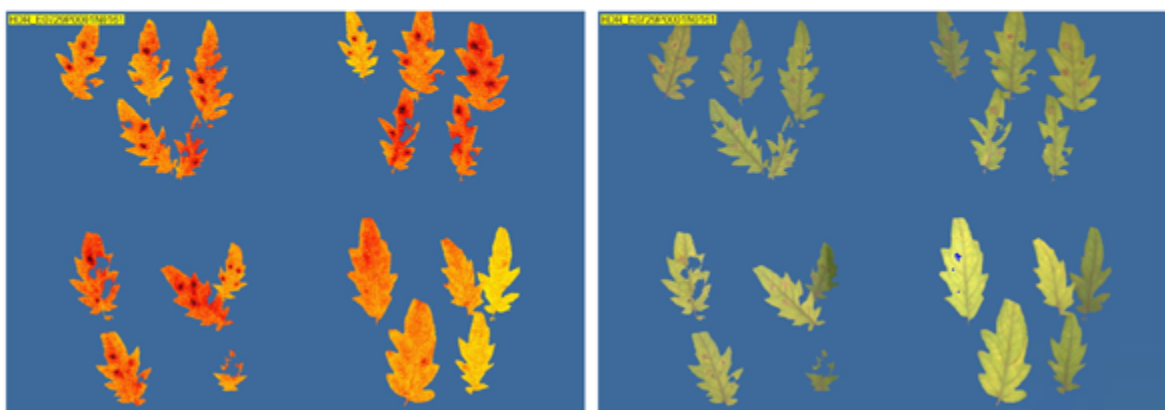
29 en 30 hpi



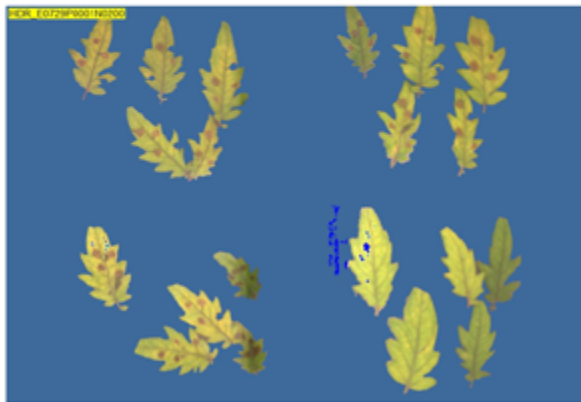
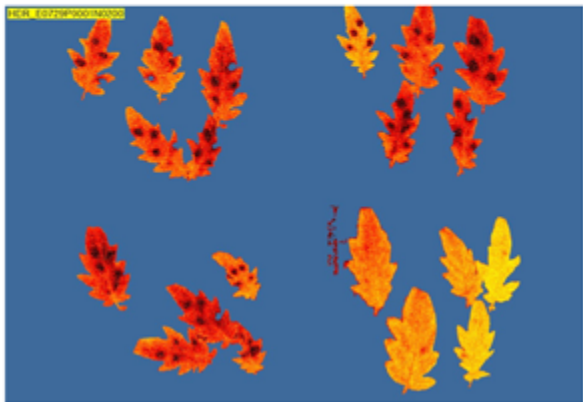
31 hpi



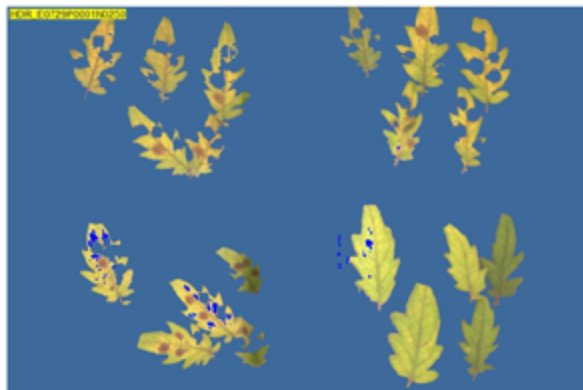
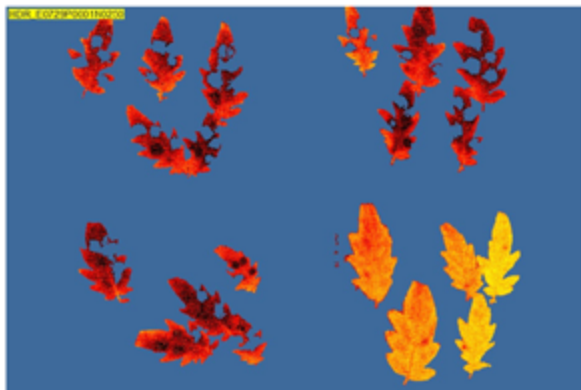
43 hpi, bespuiting links onder



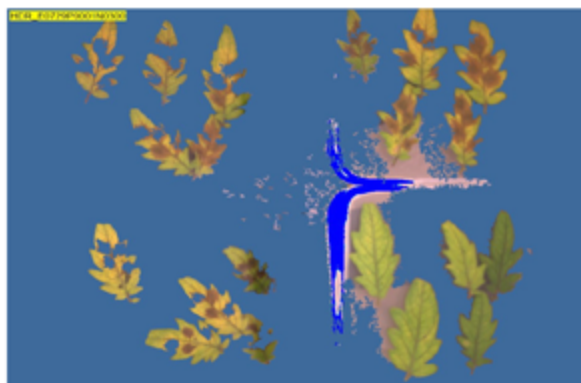
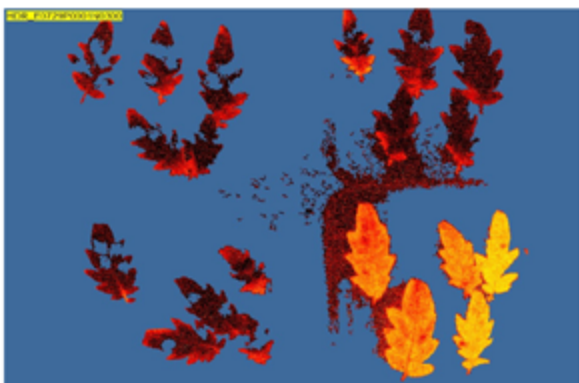
53 hpi



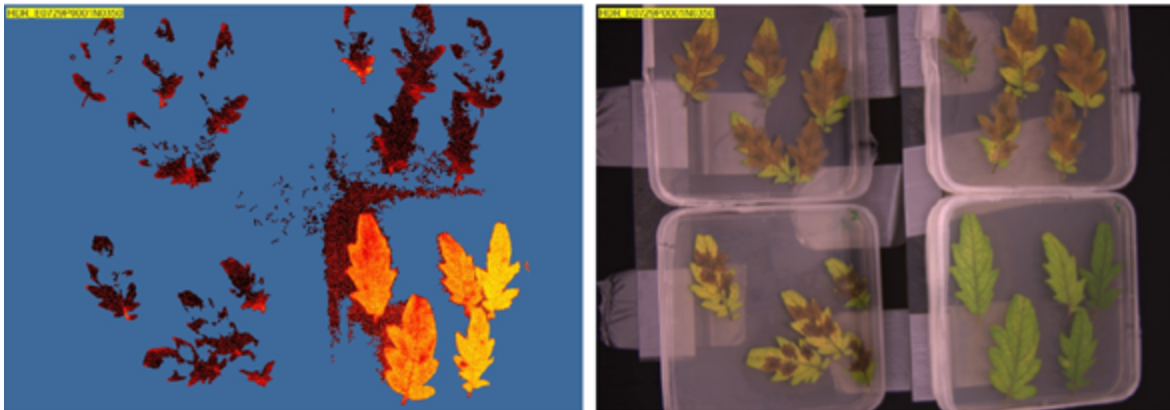
66 hpi



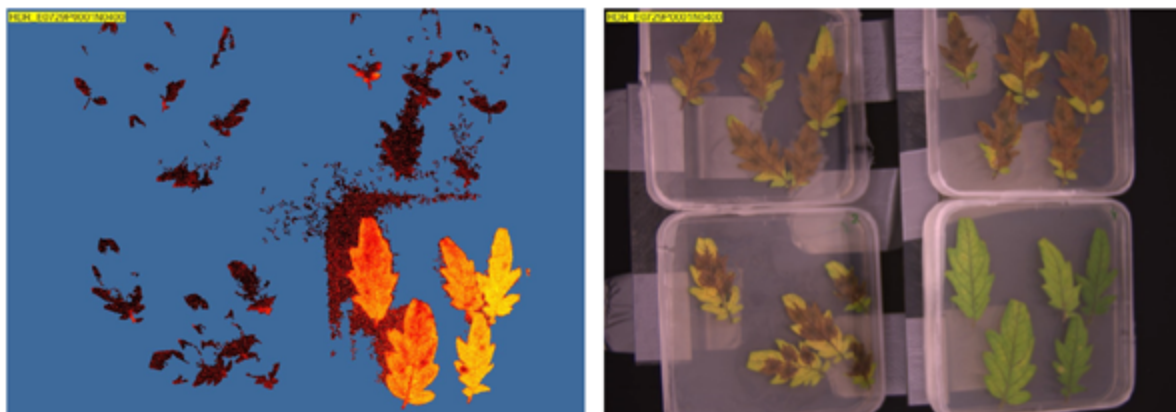
79 hpi



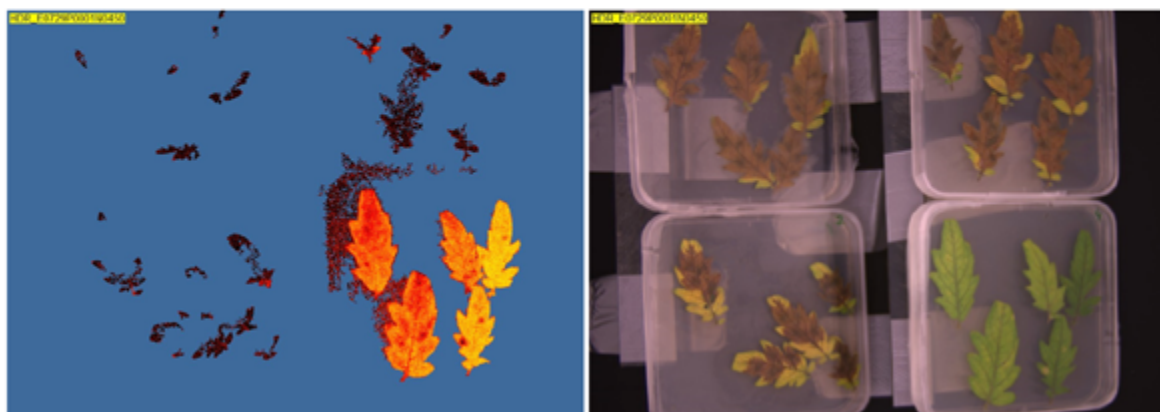
92 hpi, bespuiting rechts boven



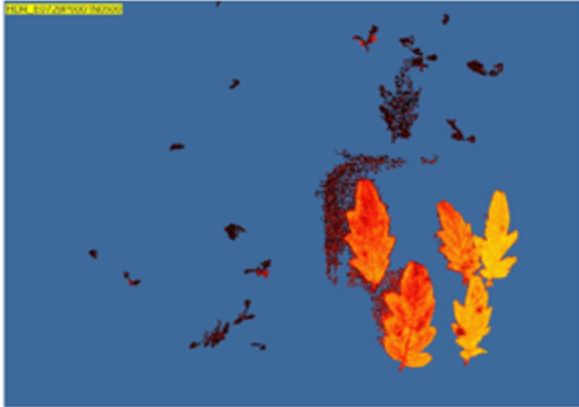
105 hpi



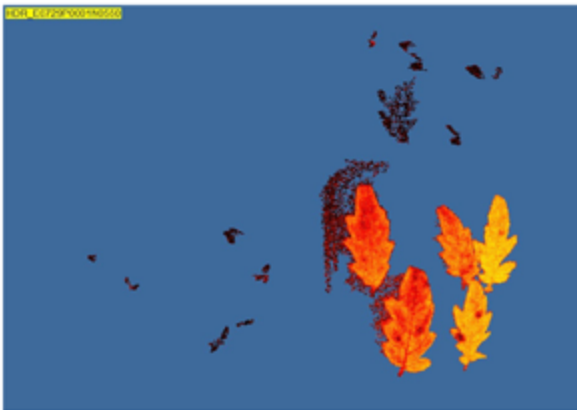
112 hpi



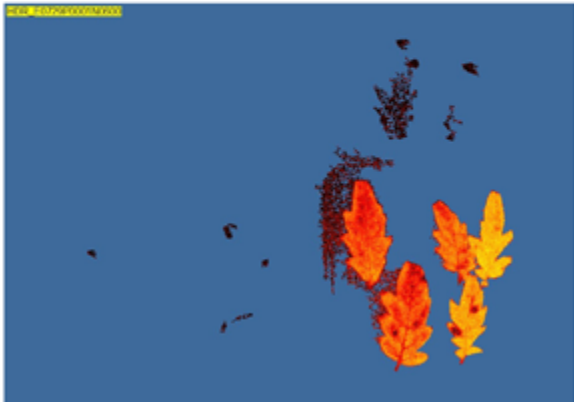
125 hpi



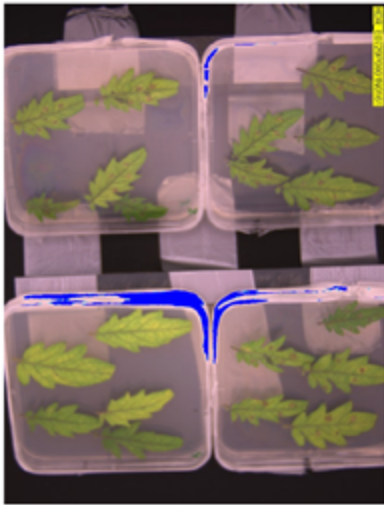
138 hpi



150 hpi



43,



92,



159 hpi

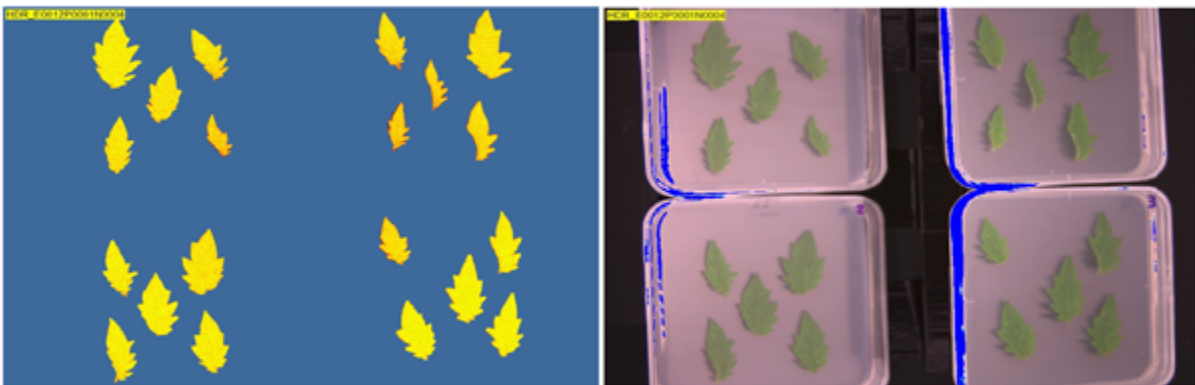


Bijlage 3 Overzicht van waarnemingen van het experiment van 12 augustus 2019 beschreven in paragraaf 2.2.2

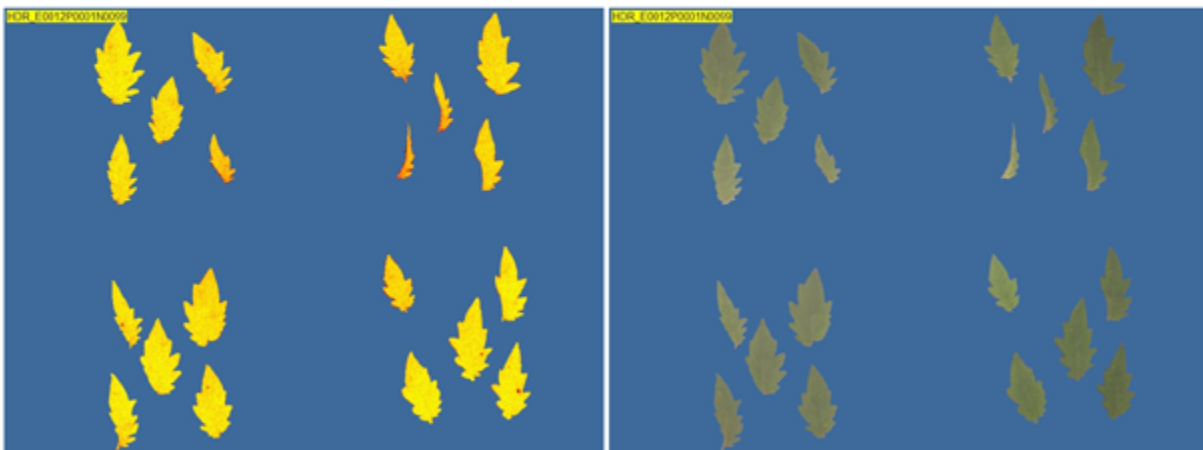
In de volgende figuren, bestaande uit 2 panelen met ieder 4 groepjes van 5 blaadjes, staan steeds afbeeldingen van Fv/Fm en RGB metingen. Er boven staat steeds aangegeven hoeveel uur na inoculatie (hpi) de opnames genomen zijn. Per paneel zie je steeds:

- Rechts onder: A. Blaadjes worden geïnoculeerd met Botrytis en zodra stress gemeten is worden ze behandeld met LUNA.
- Links boven: B. Blaadjes worden geïnoculeerd met Botrytis en zodra symptomen met het blote oog zichtbaar worden ze behandeld met LUNA.
- Links onder: C. Blaadjes worden geïnoculeerd met Botrytis en niet behandeld met LUNA.
- Rechts boven: D. Blaadjes worden niet geïnoculeerd met Botrytis en niet behandeld met LUNA.

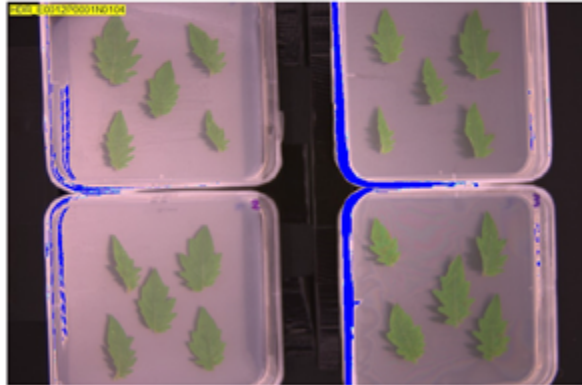
1 hpi



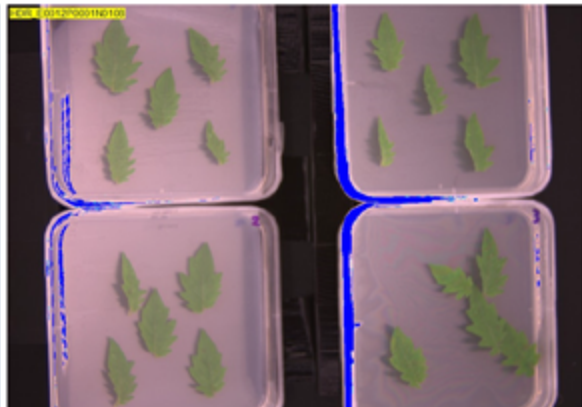
26 hpi bespuiting rechts onder



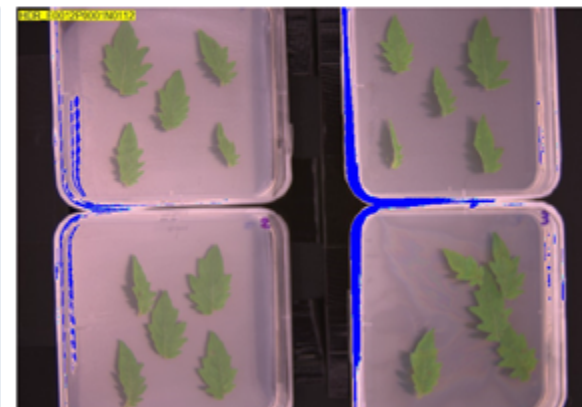
27 hpi



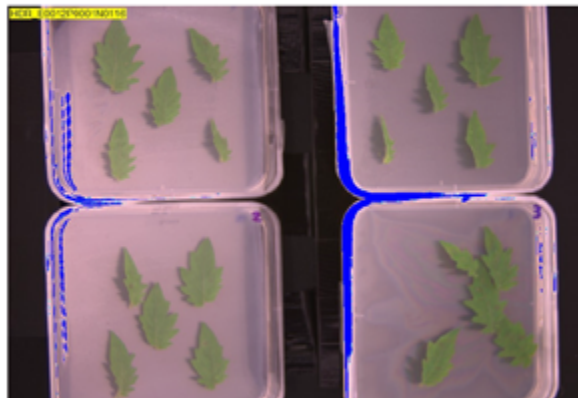
28 hpi



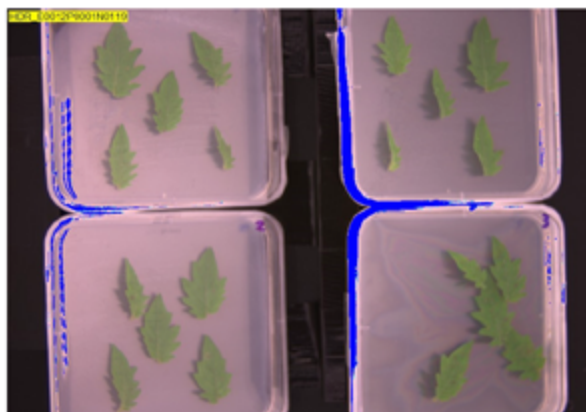
29 hpi



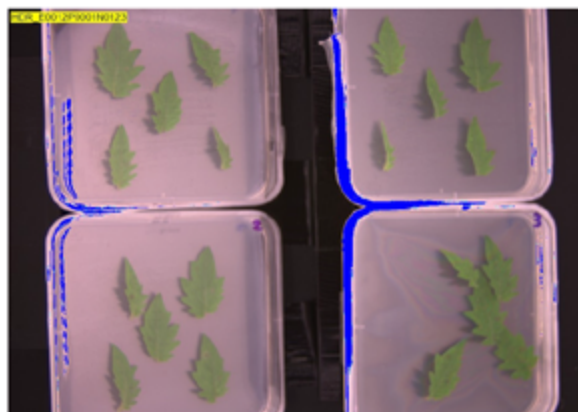
30 hpi



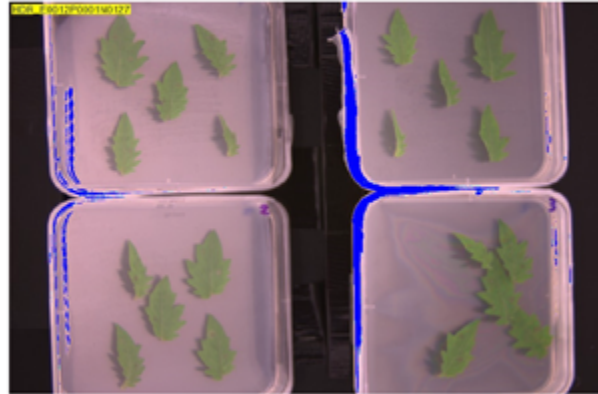
31 hpi



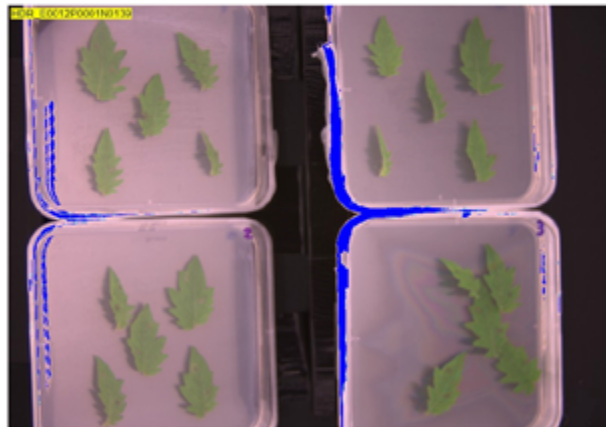
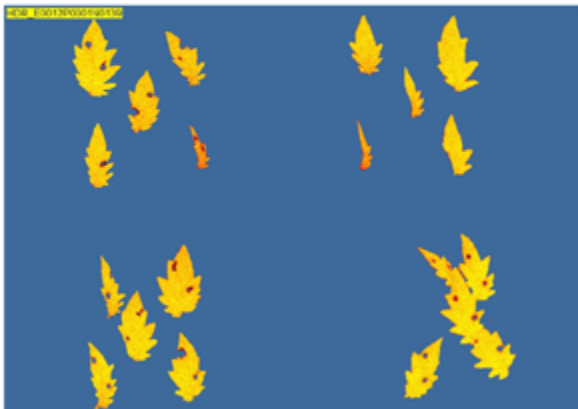
32 hpi



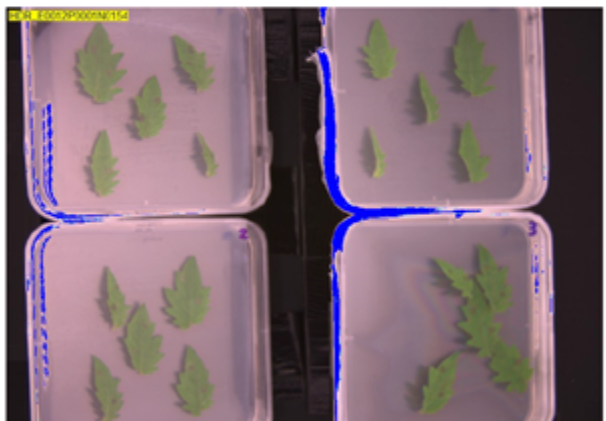
33 hpi



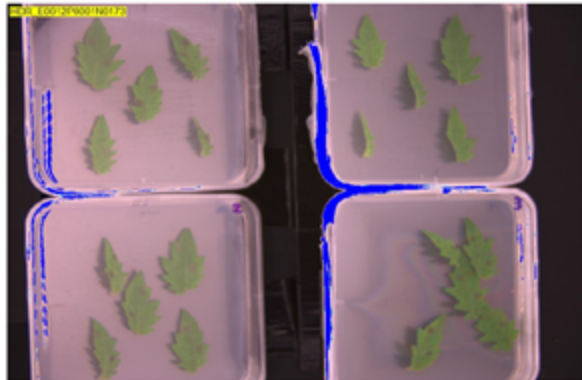
36 hpi



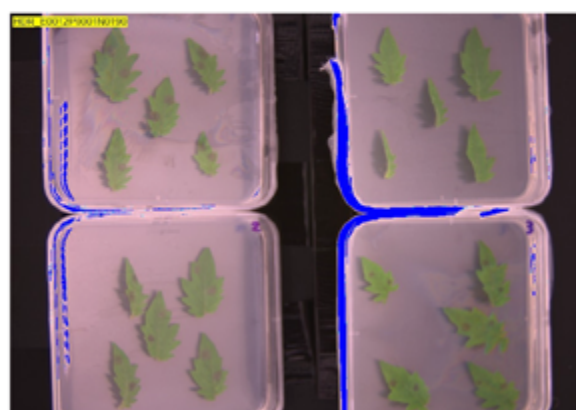
40 hpi



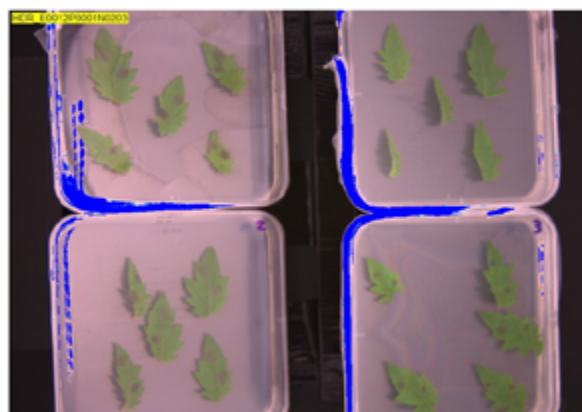
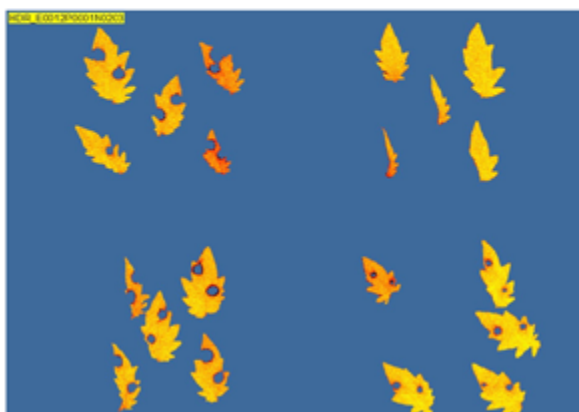
45 hpi



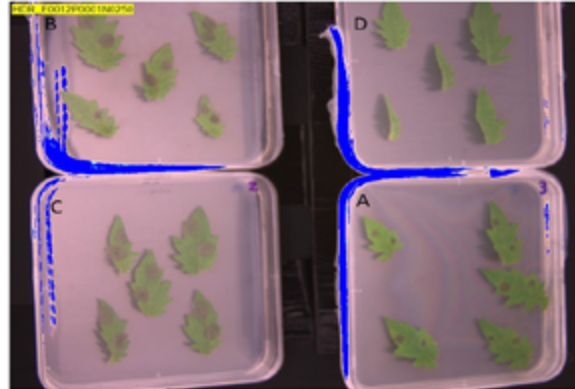
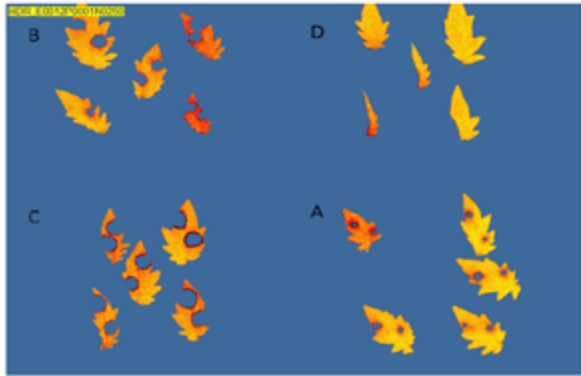
50 hpi bespuiting links boven



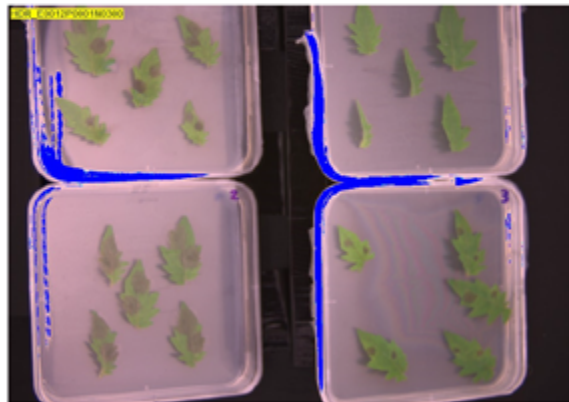
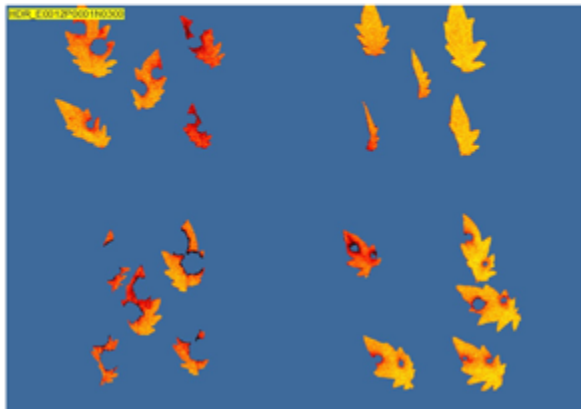
53 hpi



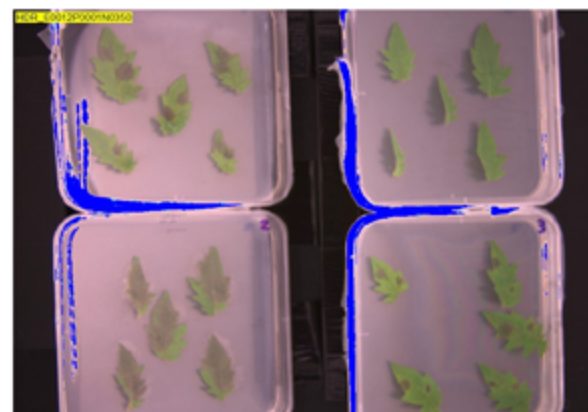
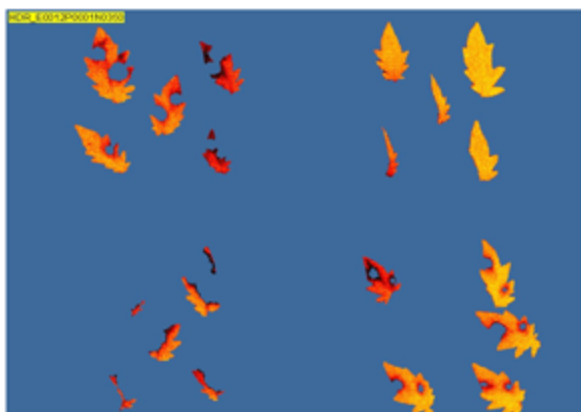
65 hpi



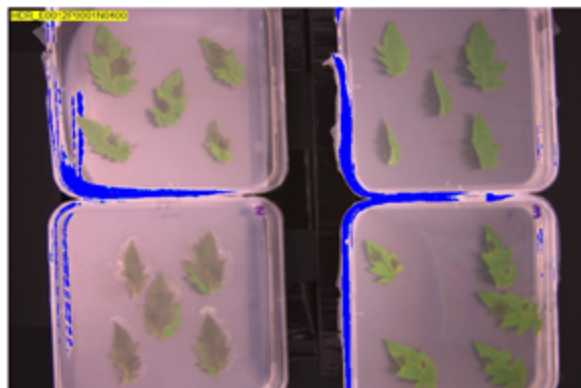
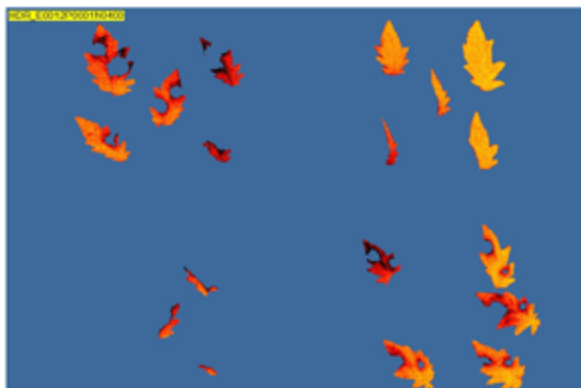
78 hpi



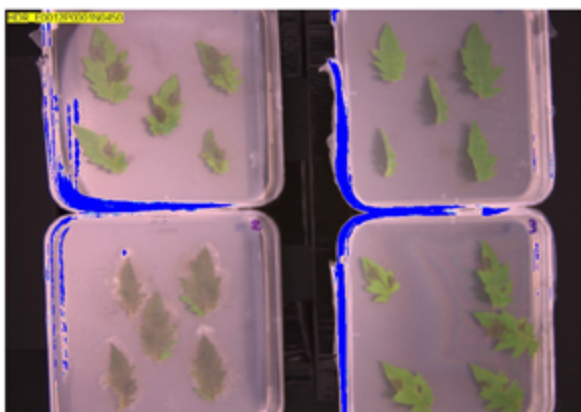
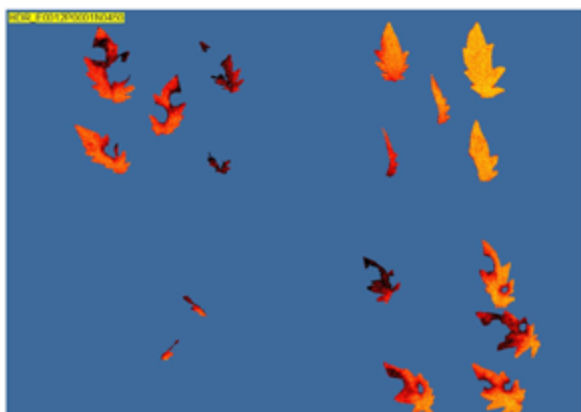
91 hpi



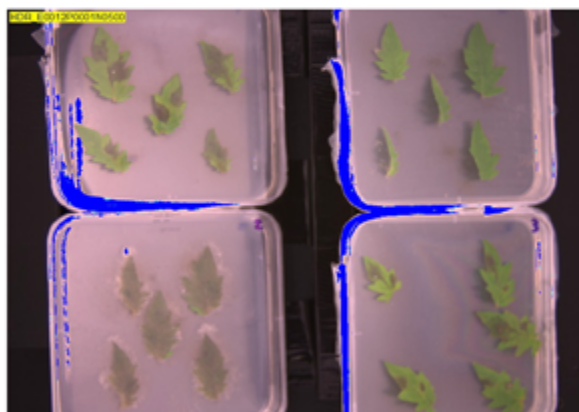
104 hpi



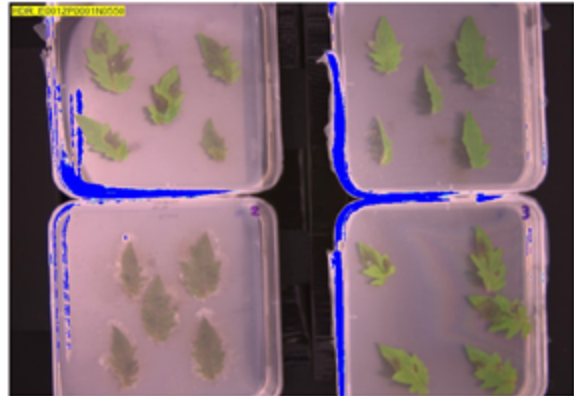
117 hpi



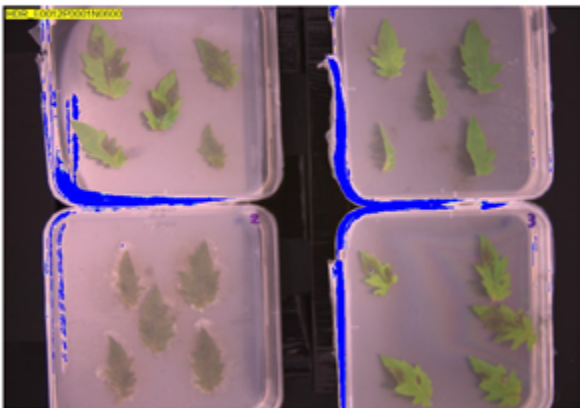
130 hpi



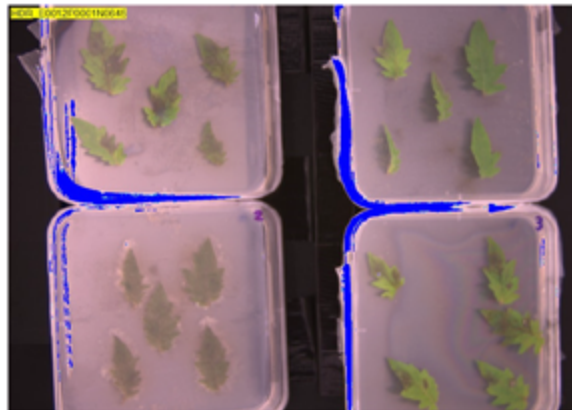
143 hpi



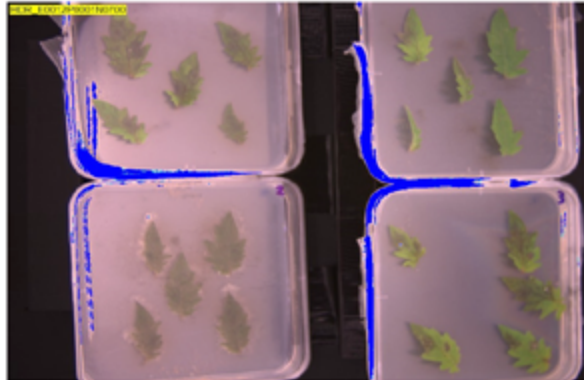
156 hpi



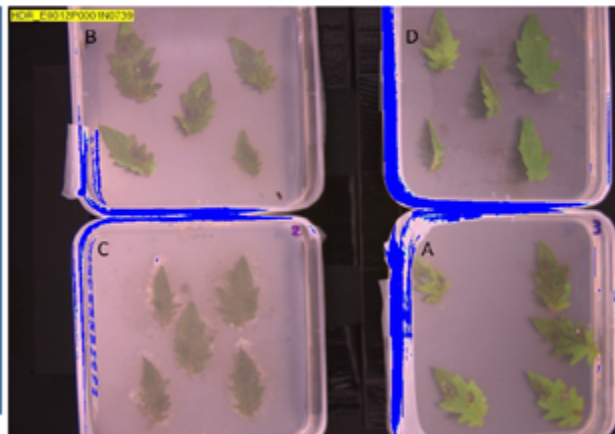
167 hpi



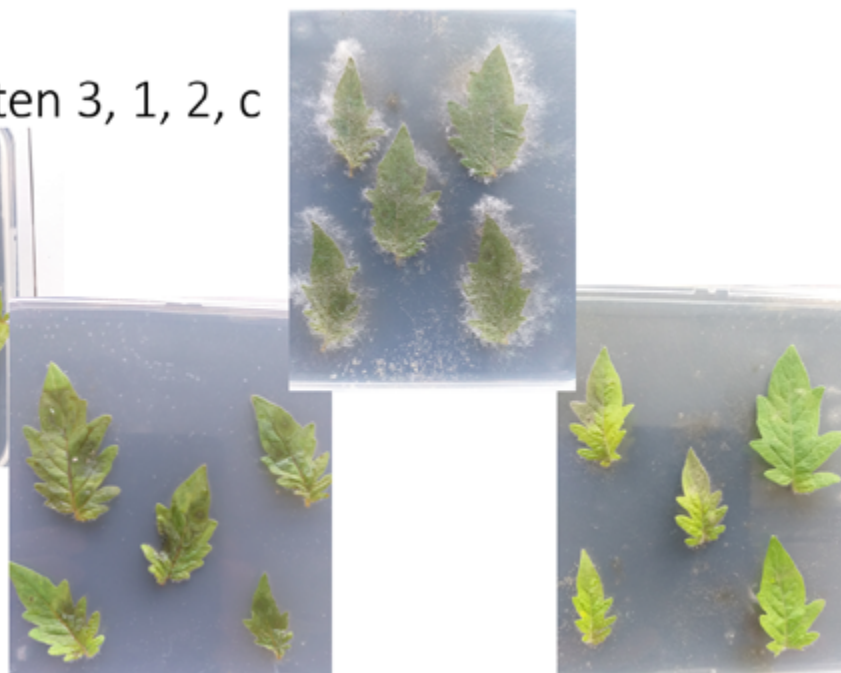
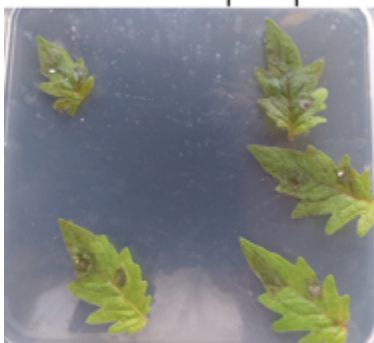
174 hpi



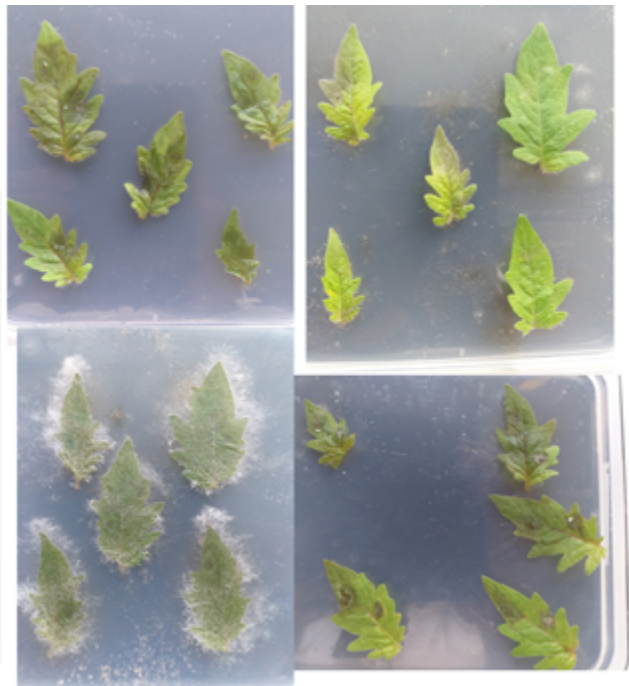
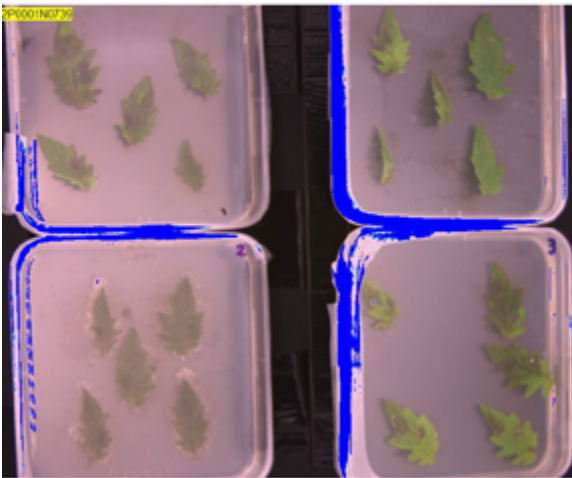
192 hpi



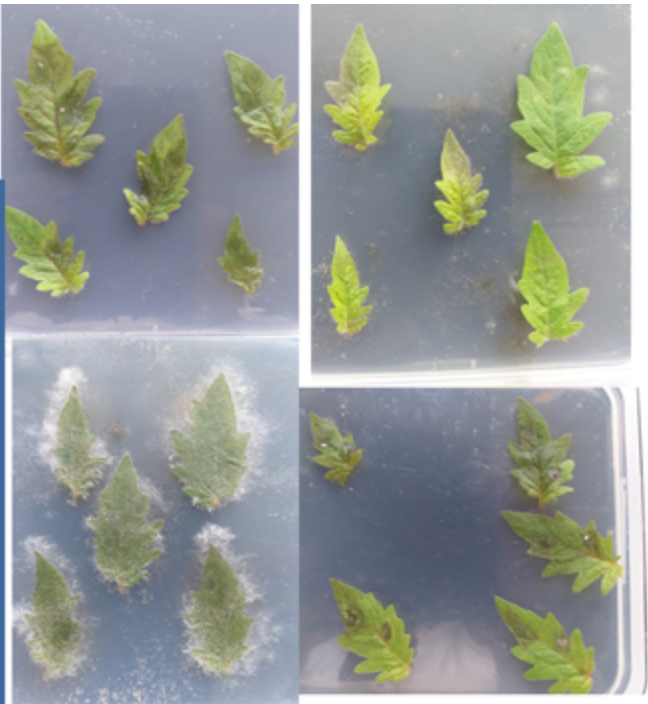
192 hpi: platen 3, 1, 2, c



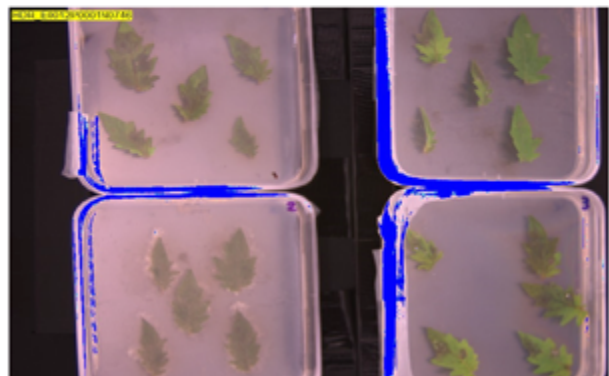
192 hpi



192 hpi



194 hpi

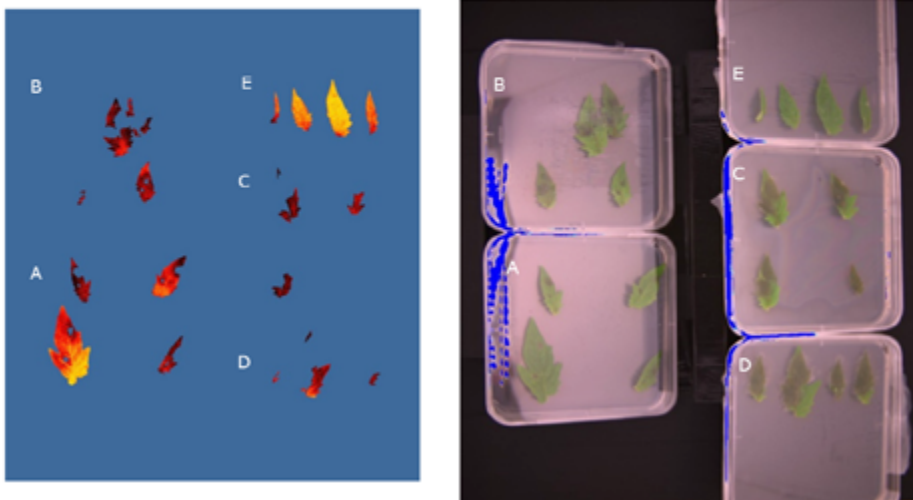


Bijlage 4 Overzicht van waarnemingen van het experiment van 27 augustus 2019 beschreven in paragraaf 2.2.2

In de volgende figuren staan steeds afbeeldingen van Fv/Fm en RGB metingen. Er boven staat steeds aangegeven hoeveel uur na inoculatie (hpi) de opnames genomen zijn. Behandelingen waren:

- Blaadjes worden geïnoculeerd met Botrytis en zodra stress gemeten is worden ze behandeld met LUNA
- Blaadjes worden geïnoculeerd met Botrytis en zodra eerste symptomen zichtbaar zijn worden ze behandeld met LUNA
- Blaadjes worden geïnoculeerd met Botrytis en zodra eerste sporulatie zichtbaar is worden ze behandeld met LUNA
- Blaadjes worden geïnoculeerd met Botrytis en niet behandeld met LUNA
- Blaadjes worden niet geïnoculeerd met Botrytis en niet behandeld met LUNA

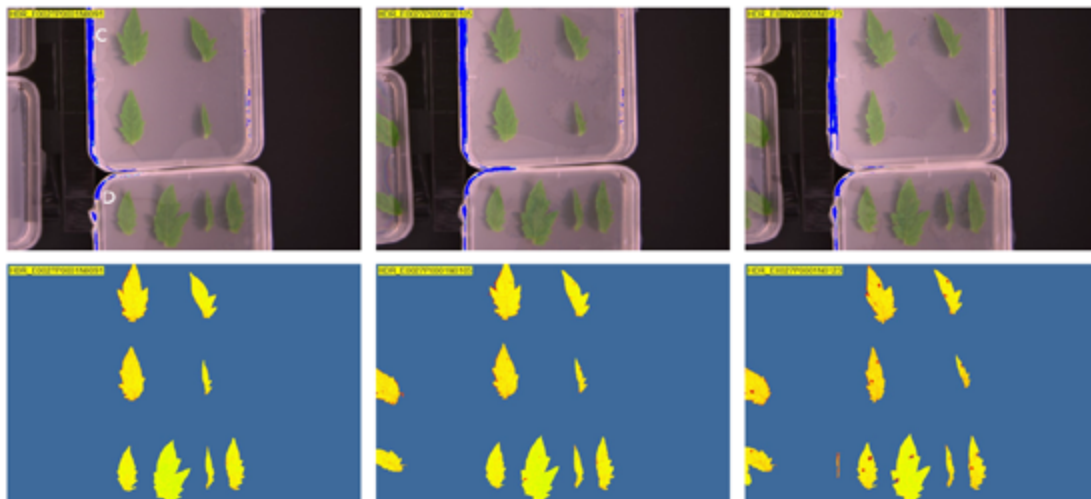
104 hpi



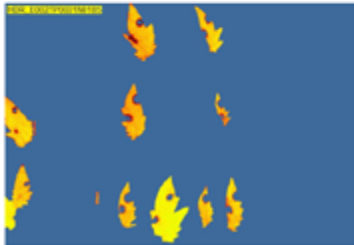
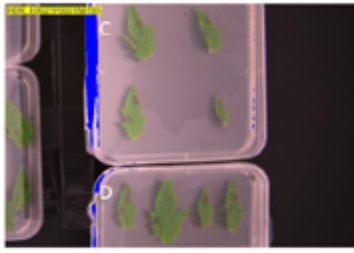
23 hpi

27 hpi

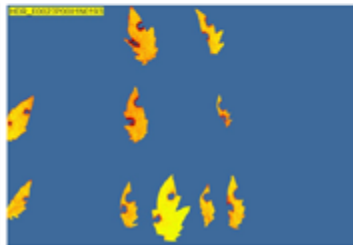
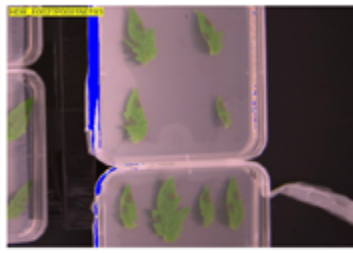
32 hpi



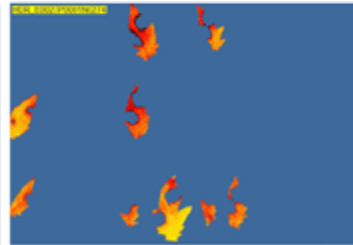
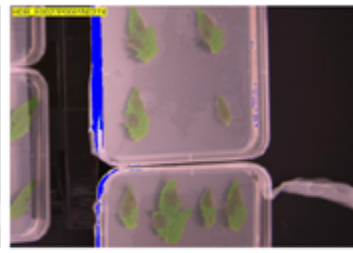
48 hpi



50 hpi

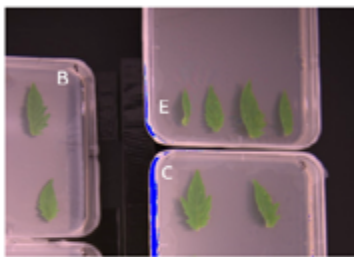


71 hpi

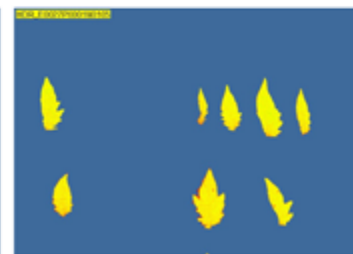
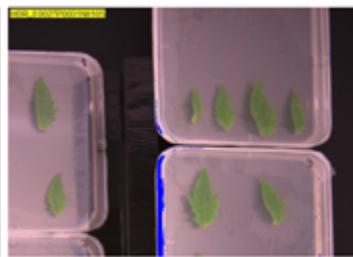


4

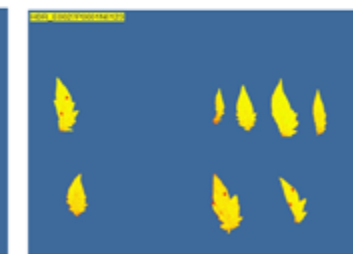
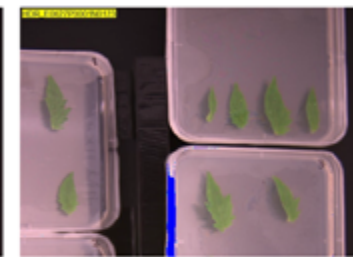
23 hpi



27 hpi

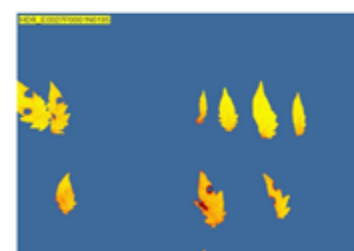
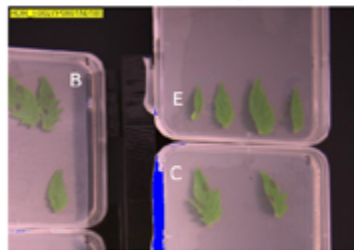


32 hpi

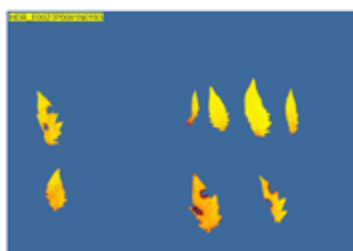
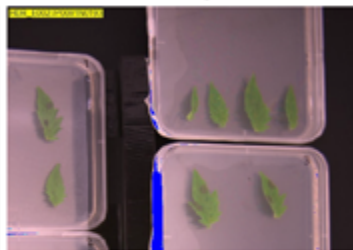


5

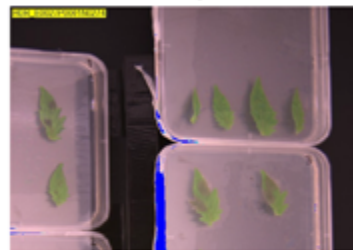
48 hpi



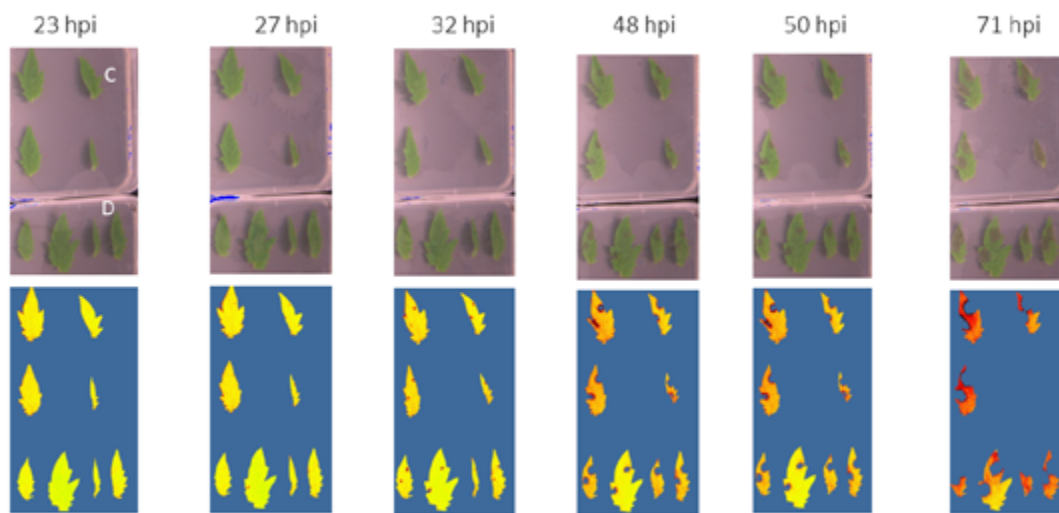
50 hpi



71 hpi



6



7

Bijlage 5 Waarnemingen van symptomen, Fv/Fm van experiment met stengelinoctulaties als beschreven in paragraaf 2.3

sympt 0 = geen symptomen	B sp str = +Botrytis en middel toedienen als eerste stress zichtbaar (t=1)	Fv/Fm 0 = geen afwijking tov omringend gezond weefsel	ntz=niet te zien
sympt 1 = bruinverkleuringen aan de rand van het bladstompje	B sp symp = +Botrytis en middel toedienen als symptomen zichtbaar (t=2)	Fv/Fm 1 = zichtbare concentratie rode pixels	nt=niet bekeken
sympt 2 = bruinverkleuring met een beetje zwart	B niet sp = +Botrytis en geen middel	Fv/Fm 2 = duidelijke plek rode pixels/vlek	
sympt 3 = flink zwarte verkleuring	W sp str = -Botrytis en middel toedienen op t=1	Fv/Fm 5 = blauw	
sympt 5 = met mycelium	B sp symp = -Botrytis en middel toedienen op t=2	Fv/Fm nt = not tested	
	W niet sp = -Botrytis en geen middel		

Plant		Code Behandeling	Behandeling	Inoculum	Inoculatie	Tijdstip inoculatie	Verwonding	Symptomen 25/5 22.00	Fv/Fm 25/5 23.00	Opmerkingen	Symptomen 26/5 11.00	Sympt 26/5 16.00	Fv/Fm 26/5 23.00	Opmerkingen	Symptomen 27/5 9.00	Sympt 27/5 16.00	Fv/Fm 27/5 23.00	Opmerkingen	Sympt 28/5 11.00	Fv/Fm 28/5 23.00	Opmerkingen	Sympt 29/5 11.00
ma																						
		0 hpi			32hpi	33hpi	45hpi	50hpi	57hpi	67hpi	74hpi	81hpi	93hpi	105hpi	117hpi							
1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2	B10	B sp	Botrytis	24/5 14.00 h snijden	0	0	0-1	1	0	0	1	1-2	0	2	0	2	0	0	0	0	0	2
3	B15	W	Water	24/5 14.00 h snijden	1	overbelicht, lange rode streep	0	0	0-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	rode uitstraling	0-1
4	B14	W sp	Water	24/5 14.00 h snijden	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	rode uitstraling?	1	0	1

Plant	Code Behandeling	Behandeling	Inoculum	Inoculatie	Tijdstip inoculatie	Verandering	Symtomen 25/5 22.00	Fv/Fm 25/5 23.00	Opmerkingen	Symptomen 26/5 11.00	Sympt 26/5 16.00	Fv/Fm 26/5 23.00	Opmerkingen	Symptomen 27/5 9.00	Sympt 27/5 16.00	Fv/Fm 27/5 23.00	Opmerkingen	Sympt 28/5 11.00	Fv/Fm 28/5 23.00	Opmerkingen	Sympt 29/5 11.00	
5	B10	B sp	Botrytis	24/5	14.00 h	snijden	0	0	0-1	0-1	0	0	0	1	0-1	0	0	0-1	0	0	0-1	
6	B13	W sp	Water	24/5	14.00 h	snijden	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	beetje rode zijkant in flesje	0	1	rode uitstraling	0
7	B11	B sp	Botrytis	24/5	14.00 h	snijden	0	0	0-1	1	2	0	0	1-2	1-2	0-1	0	rode uitstraling onder flesje	2	3/b1	rode uitstraling	3
8	B14	W sp	Water	24/5	14.00 h	snijden	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	rode uitstraling	0	1	rode uitstraling	0
9	B12	B niet sp	Botrytis	24/5	14.00 h	snijden	0-1	0-1	1	1	1	1	1	1	1-2	0	0	2-3	2	overbelicht rood	3	
10	B15	W niet sp	Water	24/5	14.00 h	snijden	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11	B11	B sp	Botrytis	24/5	14.00 h	snijden	0	0	0-1	1	0-1	0	0	2	1-2	0-1	0	beetje rode uitstraling	0-1	1	rode uitstraling	1-2
12	B10	B sp	Botrytis	24/5	14.00 h	snijden	1	1	0-1	1	1	1	rood onder flesje	1-2	1-2	2	2	2	2	erg rode uitstraling	2	
13	B12	B niet sp	Botrytis	24/5	14.00 h	snijden	0	0	0-1	1	1	1		1-2	1-2	1	1	beetje rode uitstraling er af	stompje 0	0	Fm nu 0 door stomje er af	2
14	B14	W sp	Water+	24/5	14.00 h	snijden	0	0	0	0	0	0	overbelicht	0	0	0	0	rode uitsraling	0	0	rode uitstraling	0
15	B15	W niet sp	Water	24/5	14.00 h	snijden	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	beetje rode uitstraling	0	0	0	0

Plant	Code Behandeling	Behandeling	Inoculum	Inoculatie	Tijdstip inoculatie	Verandering	Symptomen 25/5 22.00	Fv/Fm 25/5 23.00	Opmerkingen	Symptomen 26/5 11.00	Sympt 26/5 16.00	Fv/Fm 26/5 23.00	Opmerkingen	Symptomen 27/5 9.00	Sympt 27/5 16.00	Fv/Fm 27/5 23.00	Opmerkingen	Sympt 28/5 11.00	Fv/Fm 28/5 23.00	Opmerkingen	Sympt 29/5 11.00
16 B10	B sp	Botrytis str	Water	24/5	14.00 h snijden		0	0	0-1	1	0	0		2	2	0	beetje rode uitstraling in en onder flesje	1-2	0		2
17 B13	W sp	Water str	Water	24/5	14.00 h snijden		0	0	0	0	0	0	0	0-1	0	0	overbelicht	0	1	rode uitstraling	0
18 B11	B sp	Botrytis symp	Water	24/5	14.00 h snijden		1	5 cm beetje rood	0-1	0-1	1	0-1	5 cm beetje rood	1-2	1-2	0-1	beetje rood in flesje	2	2	overbelicht? rode uitstraling	2
19 B13	W sp	Water str	Water	24/5	14.00 h snijden		0	mooi	0	0	0	0	overbelicht, veel rode uitstraling	0	0-1	0	rode uitstraling?	0-1	0		0
20 B13	W sp	Water str	Water	24/5	14.00 h snijden		0		0	0	0	0		0	ntz	ntz	flesje er niet goed om	0	0		0
21 B12	B niet sp	Botrytis	Water	24/5	14.00 h snijden		0		0-1	1	0	0		1-2	1-2	1	beetje rode uitstraling	2-3	0		3
22 B15	W niet sp	Water	Water	24/5	14.00 h snijden		0	overbelicht? zwarte streep achterkant.	0	0	0	0		0	0	0	1-2	0	1	rode uitstraling	0
23 B10	B sp	Botrytis str	Water	24/5	14.00 h snijden		0		1	1	1	1	rood boven en onder wond	1-2	0-1	0-1	beetje rode uitstraling aan stengel achterkant wond	1-2	ntz		3
24 B14	W sp	Water symp	Water	24/5	14.00 h snijden		0		0	0	0	0		0	0-1	ntz	flesje er nog om	0	0		0

Plant	Code Behandeling	Behandeling	Inoculum	Inoculatie	Tijdstip inoculatie	Verwording	Symptomen 25/5 22.00	Fv/Fm 25/5 23.00	Opmerkingen	Symptomen 26/5 11.00	Sympt 26/5 16.00	Fv/Fm 26/5 23.00	Opmerkingen	Symptomen 27/5 9.00	Sympt 27/5 16.00	Fv/Fm 27/5 23.00	Opmerkingen	Sympt 28/5 11.00	Fv/Fm 28/5 23.00	Opmerkingen	Sympt 29/5 11.00
25 B11	B sp	Botrytis symp	Water	24/5	14.00 h	snijden	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26 B12	B niet sp	Botrytis	24/5	14.00 h	snijden	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
27 B11	B sp	Botrytis symp	24/5	14.00 h	snijden	0	1	1	0	1	2	0-1	middelste plant, beetje rode uitstraling	2	2	0-1	0-1	2	1	rode uitstraling	2
28 B14	W sp	Water symp	24/5	14.00 h	snijden	nt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29 B12	B niet sp	Botrytis	24/5	14.00 h	snijden	nt	0-1	1	nt	nt	2	1-2	1-2	2	2	nt	nt	1-2	1-2	2	2

Bijlage 6 Waarnemingen van Fusarium uitgroei uit plantmateriaal, Fv/Fm en resultaten van DNA analyses van experiment beschreven in paragraaf 3.2

Forw=volgens sequentie na reactie met Forward primer wel

Rev = volgens sequentie na reactie met Reverse primer wel

nt = niet getest

W = wortel

0 = stengelstukje 0 cm boven grondoppervlak

2 = stengelstukje 2 cm boven grondoppervlak

EF = elongatie factor

0/4 = 0 van de 4

dpi = dagen na inoculatie

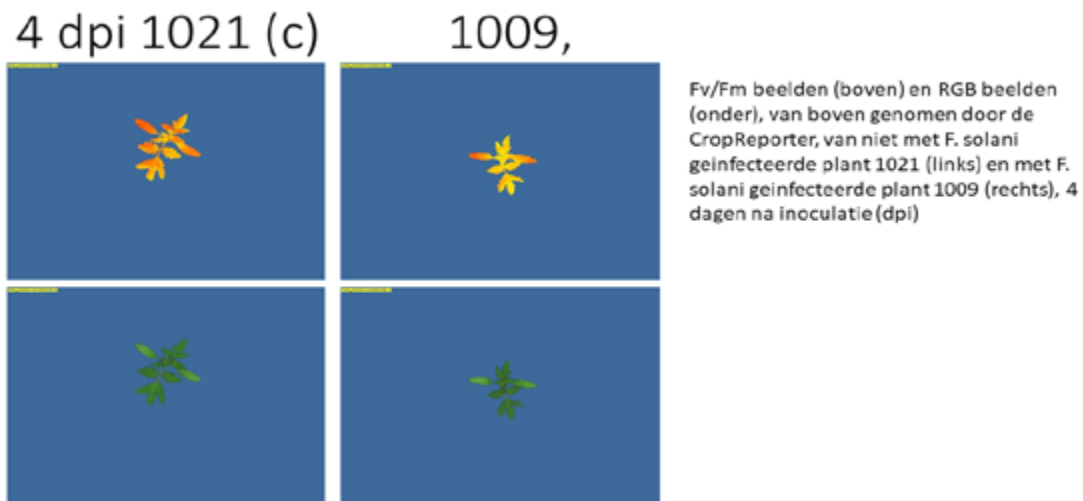
Behandeling	Inoculatie op 3/5/2018	Plantnummer	Conclusie: besmet met F. solani	A										B										Infected with F. solani					
				Dip in inoculum					1001 ja					1002 Forw					1003 ja										
				22/5/18 W uitgelegd 19 dpi	Fus uitgroei W 19dpi	EF PCR W 19dpi	23/5/18 Fv/Fm stengels (1=geel, 5=rood) 20 dpi	15/6/18 Fv/Fm stengels (1=geel, 5 is rood) 43 dpi	26/6/18 W uitgelegd 54 dpi	Fus uitgroei W 54 dpi	EF PCR W fragment 54 dpi	Identificatie op grond van sequencing	4	28/6/18 Fv/Fm stengels (1=geel, 5 is rood) 56 dpi	29/6/18 Fv/Fm stengels (1=geel, 5 is rood) 57 dpi	30/7/18 W, 0 en 2 op Komada 78 dpi	W Fus uitgroei 78 dpi	EF PCR W fragment 78 dpi	Identificatie op grond van sequencing	nee	0 Fus uitgroei 78 dpi	EF PCR 0 fragment 78 dpi	Identificatie op grond van sequencing	2 Fus uitgroei 78 dpi	EF PCR 2 fragment 78 dpi	Identificatie op grond van sequencing	Hernieuwde kweek in week 44 2018	ja	
																													ja
																													ja
																													ja

Behandeling	Inoculatie op 3/5/2018	Plantnummer	Conclusie: besmet met F. solani	22/5/18 W uitgeleegd 19 dpi	Fus uitgroei W 19dpi	EF PCR W 19dpi	23/5/18 Fv/Fm stengels (1=geel; 5=rood) 20 dpi	15/6/18 Fv/Fm stengels (1=geel; 5 is rood) 43 dpi	26/6/18 W uitgeleegd 54 dpi	Fus uitgroei W 54 dpi	EF PCR W fragment 54 dpi	Identificatie op grond van sequencing	28/6/18 Fv/Fm stengels (1=geel; 5 is rood) 56 dpi	29/6/18 Fv/Fm stengels (1=geel; 5 is rood) 57 dpi	30/7/18 W, 0 en 2 op Komada 78 dpi	W Fus uitgroei 78 dpi	EF PCR W fragment 78 dpi	Identificatie op grond van sequencing	0 Fus uitgroei 78 dpi	EF PCR 0 fragment 78 dpi	Identificatie op grond van sequencing	2 Fus uitgroei 78 dpi	EF PCR 2 fragment 78 dpi	Identificatie op grond van sequencing	Hernieuwde kweek in week 44 2018	?
		1004	Forw	nt	nt	nt	nt	nt	1004	nee	nee	Aspergillus	nee	nee												
		1005	ja	nt	3	nt	3	nt	1005	ja	ja	F. solani	nee	nee												ja
		1006	ja	nt	3	nt	3	nt	1006	ja	ja	F. solani	nee	nee												ja
B	Dip in inoculum na knippen	1007	ja	3	nt	3	nt	3	1007	ja	ja	F. solani	nee	nee												ja
		1008	nee	nt	nt	1008	nee	niets	weg			F. solani														?
		1009	ja	nt	2	nt	2	nt	1009	ja	ja	F. solani	nee	nee												ja
		1010	ja	nt	3	nt	3	nt	1010	ja	ja	F. solani	nee	nee												ja
		1011	ja	nt	3	nt	3	nt	1011	ja	ja	F. solani	nee	nee												ja
		1012	Forw	nt	nt	nt	nt	nt	1012	ja	nee	Forw F. solani	nee	nee												?
C	Dip in medium	1013	nt	nt	nt	nt	nt	nt																		nt
		1014	nt	nt	nt	nt	nt	nt																		nt
		1015	nee	nt	3	nt	3	nt	3	1015	nee	nee	nothing	nee	nee											nee
		1016	nee	nt	3	nt	3	nt	1016	nee	nee	Forw Pandoraea	nee	nee												nee
		1017	Forw	nt	nt	nt	nt	nt	1017	nee	nee	Forw F. solani	nee	nee												?
		1018	nt	nt	nt	nt	nt	nt																		nt
D	Dip in medium na knippen	1019	nee	4	nt	1019	nee	niets	weg																	not 56 dpi

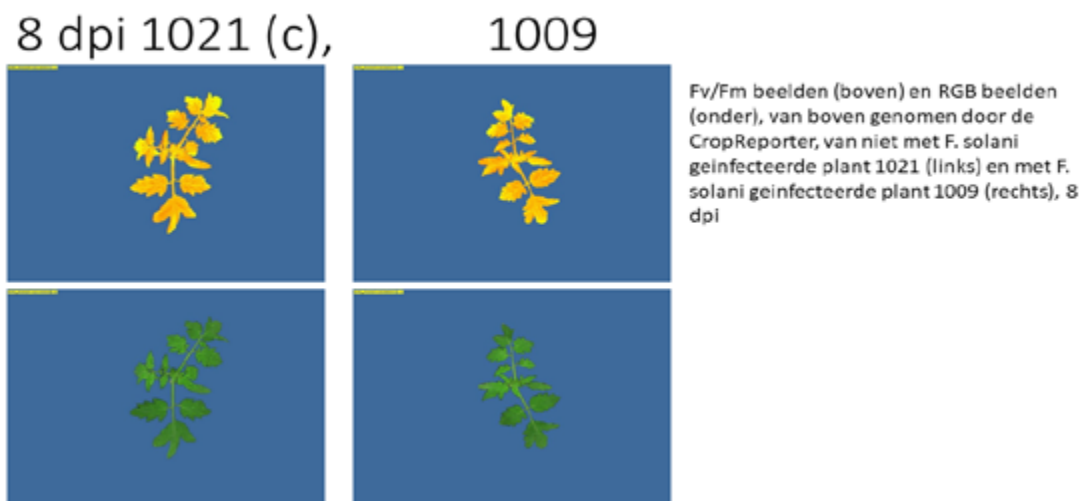
Behandeling	Inoculatie op 3/5/2018	Plantnummer	Conclusie: besmet met F. solani	22/5/18 W uitgelegd 19 dpi	Fus uitgroei W 19dpi	EF PCR W 19dpi	23/5/18 Fv/Fm stengels (1=geel; 5=rood) 20 dpi	15/6/18 Fv/Fm stengels (1=geel; 5 is rood) 43 dpi	26/6/18 W uitgelegd 54 dpi	Fus uitgroei W 54 dpi	EF PCR W fragment 54 dpi	Identificatie op grond van sequencing	28/6/18 Fv/Fm stengels (1=geel; 5 is rood) 56 dpi	29/6/18 Fv/Fm stengels (1=geel; 5 is rood) 57 dpi	30/7/18 W, 0 en 2 op Komada 78 dpi	W Fus uitgroei 78 dpi	EF PCR W fragment 78 dpi	Identificatie op grond van sequencing	0 Fus uitgroei 78 dpi	EF PCR 0 fragment 78 dpi	Identificatie op grond van sequencing	2 Fus uitgroei 78 dpi	EF PCR 2 fragment 78 dpi	Identificatie op grond van sequencing	Hernieuwde kweek in week 44 2018	nt
		1020	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	4	nt	1021	nee	nt	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nt	
		1021	nee	nt	3	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1021	nee	nt	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nee	
		1022	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1023	nee	nt	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nt	
		1023	nee	nt	2	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1023	nee	nt	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nee	
		1024	Forw	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1024	nee	nee	Forw F. solani	nee	nee	nee	nee	nee	nee	?	
E	In grond met inoculum	1025	ja	3	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	4	4	1025	ja	ja	F. solani	nee	nee	nee	nee	nee	nee	ja	
		1026	ja	4	3	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	5	5	1026	ja	ja	F. solani	ja	ja	ja	nee	nee	nee	2-1026	yes
		1027	ja	nt	3	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1027	ja	ja	F. solani	nee	nee	nee	nee	nee	nee	yes	
		1028	?	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	F. solani	nt	nt	nt	nt	nt	nt	?	
		1029	ja	nt	3	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1029	ja	ja	F. solani	nee	nee	nee	nee	nee	nee	ja	
		1030	Forw	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	F. solani	nt	nt	nt	nt	nt	nt	?	
F	In grond met inoculum na knippen	1031	ja	3	nt	1031	ja	ja	F. solani	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	F. solani	nt	nt	nt	nt	nt	nt	ja	
		1032	ja	nt	3	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	F. solani	nt	nt	nt	nt	nt	nt	ja	
		1033	nee	1033	nee	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	F. solani	nt	nt	nt	nt	nt	nt	not 19 dpi	
		1034	ja	nt	3	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	F. solani	nt	nt	nt	nt	nt	nt	ja	
		1035	ja	nt	2	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	F. solani	nt	nt	nt	nt	nt	nt	ja	

Behandeling	Inoculatie op 3/5/2018	Plantnummer	Conclusie: besmet met F. solani	22/5/18 W uitgelegd 19 dpi	Fus uitgroei W 19dpi	EF PCR W 19dpi	23/5/18 Fv/Fm stengels (1=geel; 5=rood) 20 dpi	15/6/18 Fv/Fm stengels (1=geel; 5 is rood) 43 dpi	26/6/18 W uitgelegd 54 dpi	Fus uitgroei W 54 dpi	EF PCR W fragment 54 dpi	Identificatie op grond van sequencing	28/6/18 Fv/Fm stengels (1=geel; 5 is rood) 56 dpi	29/6/18 Fv/Fm stengels (1=geel; 5 is rood) 57 dpi	30/7/18 W, 0 en 2 op Komada 78 dpi	W Fus uitgroei 78 dpi	EF PCR W fragment 78 dpi	Identificatie op grond van sequencing	0 Fus uitgroei 78 dpi	EF PCR 0 fragment 78 dpi	Identificatie op grond van sequencing	2 Fus uitgroei 78 dpi	EF PCR 2 fragment 78 dpi	Identificatie op grond van sequencing	Hernieuwde kweek in week 44 2018	Infected with F. solani
G	In grond met medium	1036 ja	nt	3	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1036 ja	ja	ja	Forw F. solani	ja	ja	F. solani	nee	no	F. solani	2-1036 ja	nt
		1037 nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1038 nee	nt	nt	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nee	nt	
		1039 nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1040 nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
		1041 ja	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1041 ja	niet bij oververdunde	F. solani	nee	nee	nee	nee	nee	nee	ja	ja	
H	In grond met medium na knippen	1042 nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1042 nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
		1043 Forw	nt	nt	nt	1043 nee	beetje?	Forw F. solani; Rev niets	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1044 nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
		1044 nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1044 nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
		1045 nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1045 nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	
	1046 nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1046 nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt		
	1047 Rev	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1047 Rev	ja	niet bij oververdunde	F. solani; profleratum	nee	nee	nee	nee	nee	nee	?	?	
	1048 nee	nt	3	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1048 nee	ja	niet bij oververdunde	nothing	nee	nee	nee	nee	nee	nee	?	?	

Bijlage 7 Fv/Fm beelden en RGB beelden van met *F. solani* geïnfecteerde plant en van controle

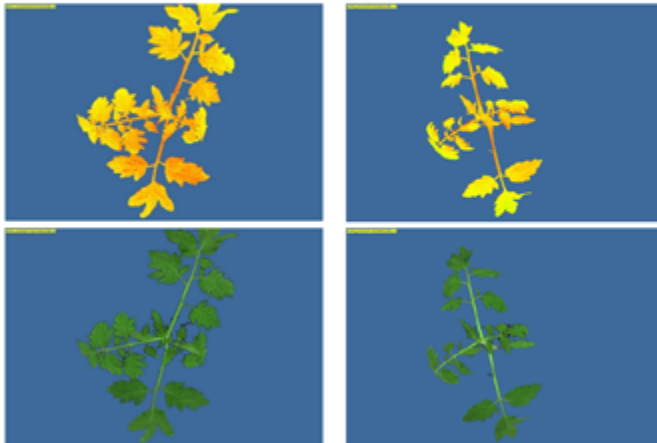


2



3

11 dpi 1021 (c), 1009



Fv/Fm beelden (boven) en RGB beelden (onder), van boven genomen door de CropReporter, van niet met *F. solani* geïnfecteerde plant 1021 (links) en met *F. solani* geïnfecteerde plant 1009 (rechts), 11 dpi

4

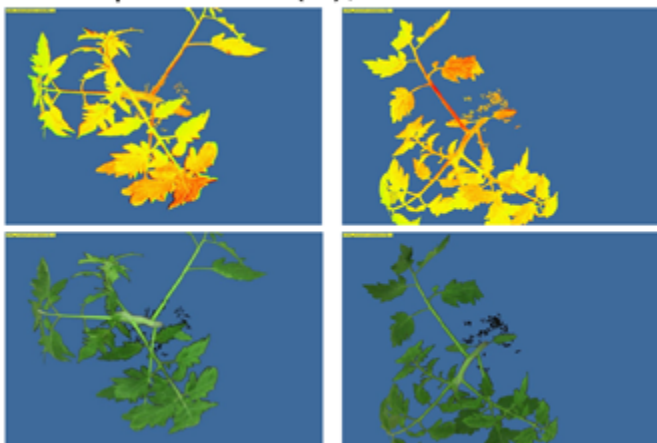
13 dpi 1021 (c), 1009



Fv/Fm beelden (boven) en RGB beelden (onder), van boven genomen door de CropReporter, van niet met *F. solani* geïnfecteerde plant 1021 (links) en met *F. solani* geïnfecteerde plant 1009 (rechts), 13 dpi

5

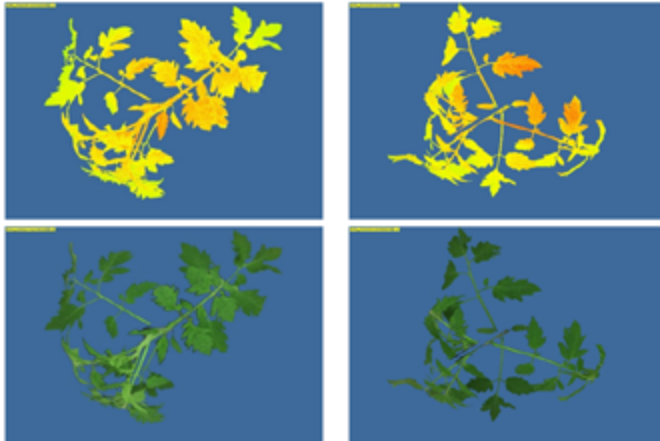
15 dpi 1021 (c), 1009



Fv/Fm beelden (boven) en RGB beelden (onder), van boven genomen door de CropReporter, van niet met *F. solani* geïnfecteerde plant 1021 (links) en met *F. solani* geïnfecteerde plant 1009 (rechts), 15 dpi

6

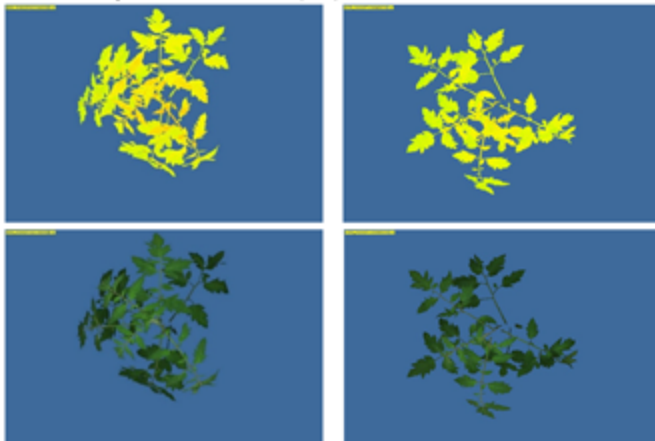
19 dpi 1021 (c), 1009



Fv/Fm beelden (boven) en RGB beelden (onder), van boven genomen door de CropReporter, van niet met *F. solani* geïnfecteerde plant 1021 (links) en met *F. solani* geïnfecteerde plant 1009 (rechts), 19 dpi

7

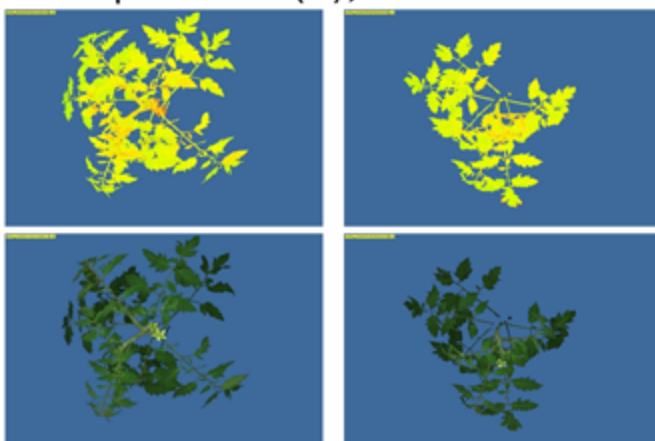
26 dpi 1021 (c), 1009



Fv/Fm beelden (boven) en RGB beelden (onder), van boven genomen door de CropReporter, van niet met *F. solani* geïnfecteerde plant 1021 (links) en met *F. solani* geïnfecteerde plant 1009 (rechts), 26 dpi

8

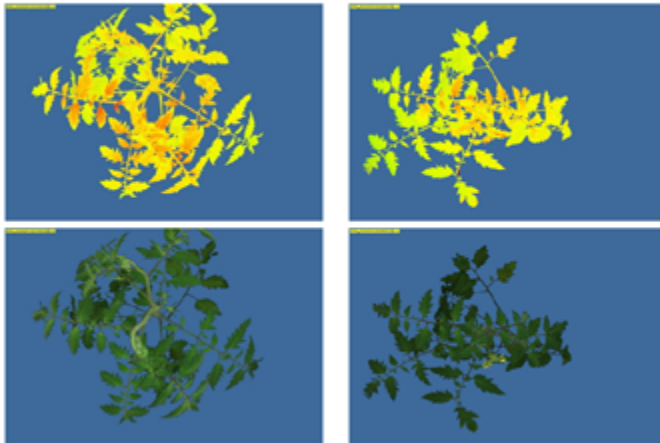
32 dpi 1021 (c), 1009



Fv/Fm beelden (boven) en RGB beelden (onder), van boven genomen door de CropReporter, van niet met *F. solani* geïnfecteerde plant 1021 (links) en met *F. solani* geïnfecteerde plant 1009 (rechts), 32 dpi

9

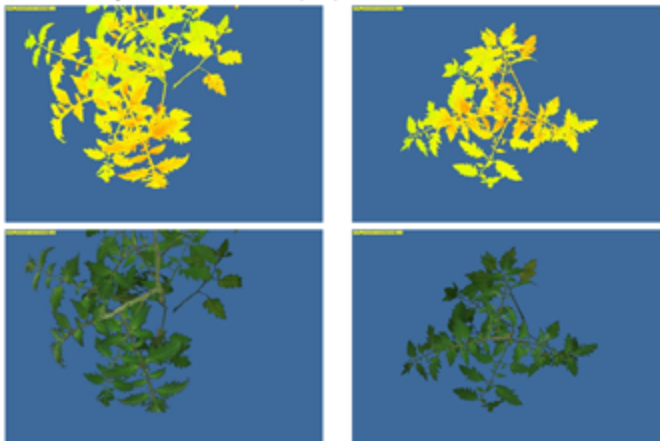
40 dpi 1021 (c), 1009



Fv/Fm beelden (boven) en RGB beelden (onder), van boven genomen door de CropReporter, van niet met *F. solani* geïnfecteerde plant 1021 (links) en met *F. solani* geïnfecteerde plant 1009 (rechts), 40 dpi

10

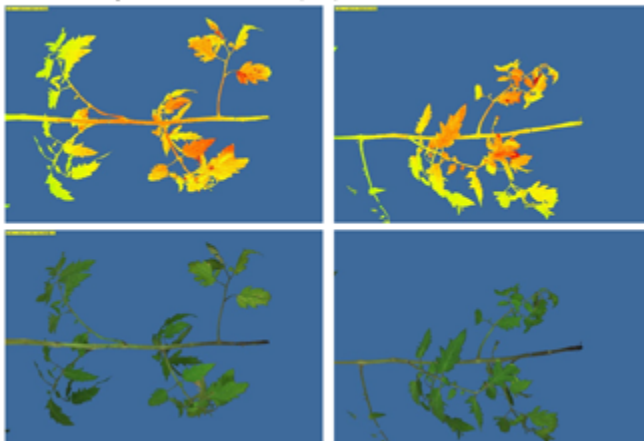
43 dpi 1021 (c), 1009



Fv/Fm beelden (boven) en RGB beelden (onder), van boven genomen door de CropReporter, van niet met *F. solani* geïnfecteerde plant 1021 (links) en met *F. solani* geïnfecteerde plant 1009 (rechts), 43 dpi

11

43 dpi 1021 (c), 1009

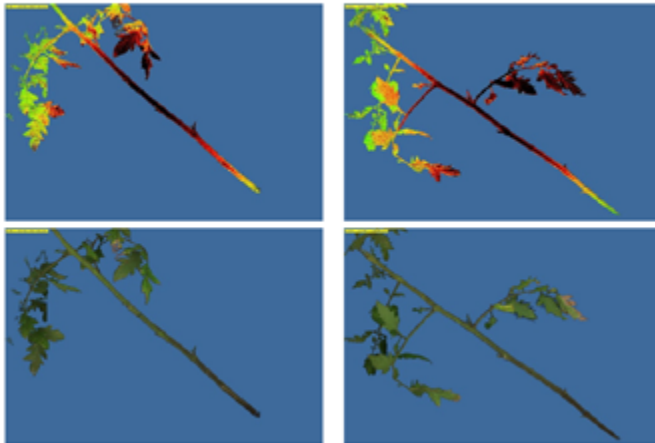


Fv/Fm beelden (boven) en RGB beelden (onder), van de zijkant genomen door de CropReporter, van niet met *F. solani* geïnfecteerde plant 1021 (links) en met *F. solani* geïnfecteerde plant 1009 (rechts), 43 dpi

12

75 dpi 1021 (c),

1009



Fv/Fm beelden (boven) en RGB beelden (onder), van de zijkant genomen door de CropReporter, van niet met *F. solani* geïnfecteerde plant 1021 (links) en met *F. solani* geïnfecteerde plant 1009 (rechts), 75 dpi

13

Bijlage 8 Behandelschema, waarnemingen van Fv/Fm (stress) en symptomen van experiment beschreven in paragraaf 3.3.2

symptomen 0 = niets te zien	stress 0 = niets	ntz = niet te zien
symptomen 1 = grijze streep langs snijwond	stress 1 = rood bij wond	nvt = niet van toepassing
symptomen 2 = zwartkleuring net zichtbaar	stress 2: grotere rode vlek bij wond	nt = niet getest
symptomen 3 = zwart oppervlak goed zichtbaar	stress blue = blauwe vlek, geen chlorofyl meer aanwezig	
	stress 1 blue = kleine blauwe vlek	
	stress 2 blue = grotere blauwe vlek	
	stress 3 blue = grote blauwe vlek	
	nt=not tested	

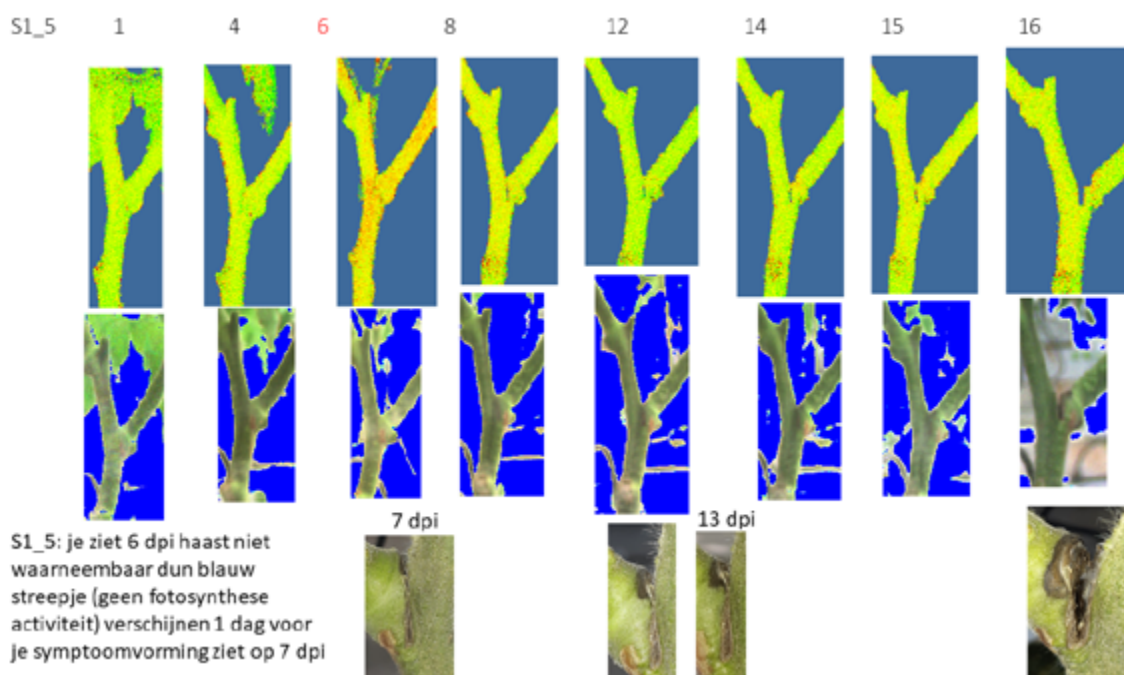
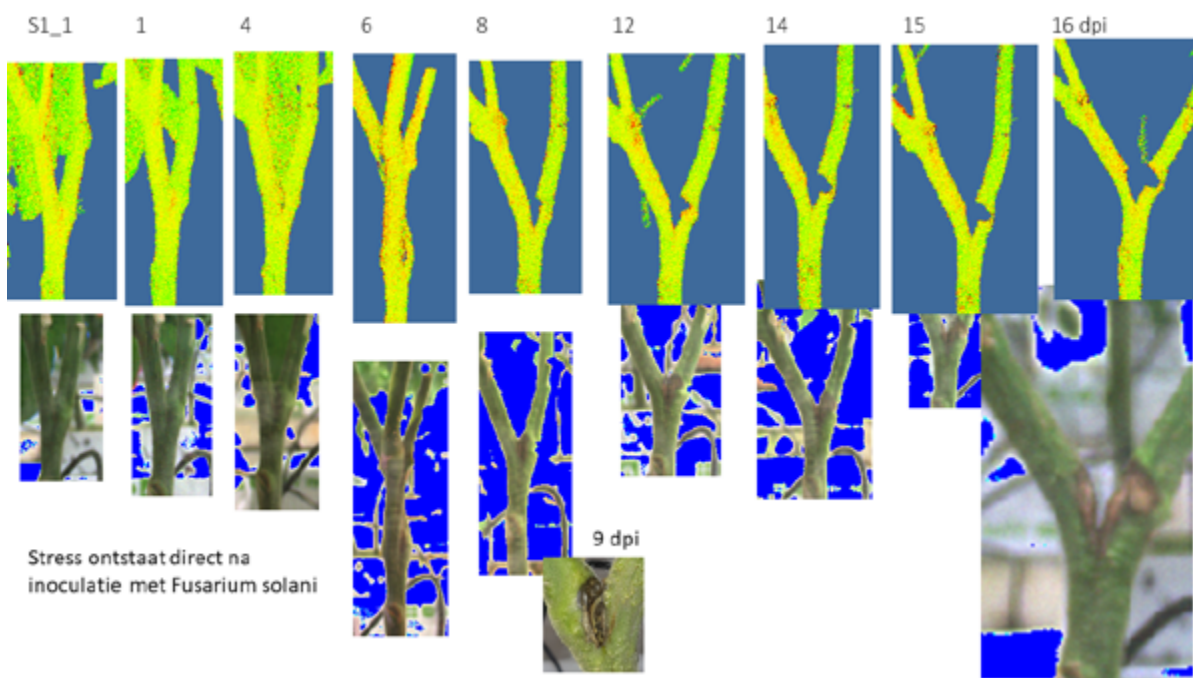
[illegible]

[illegible]

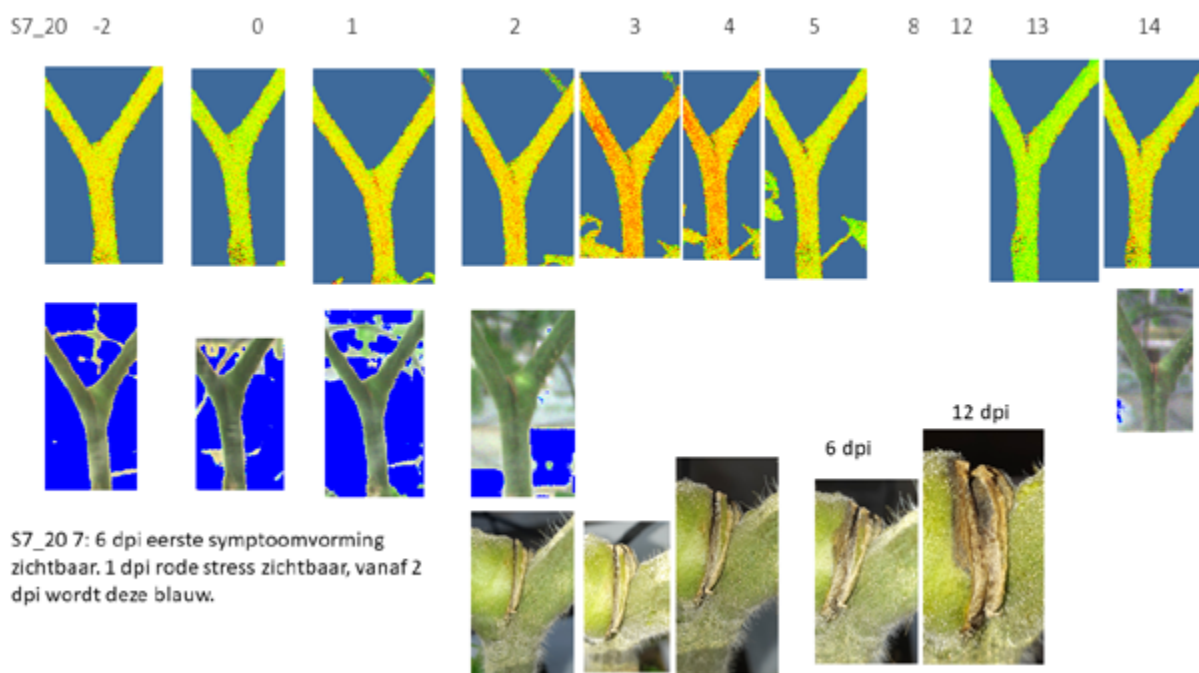
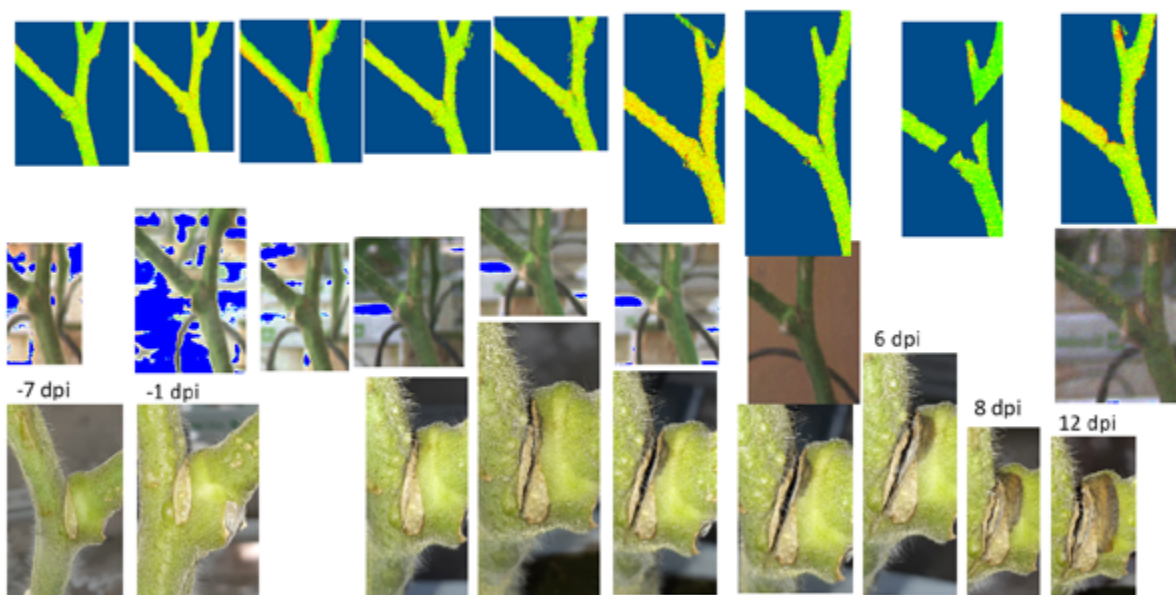
[illegible]

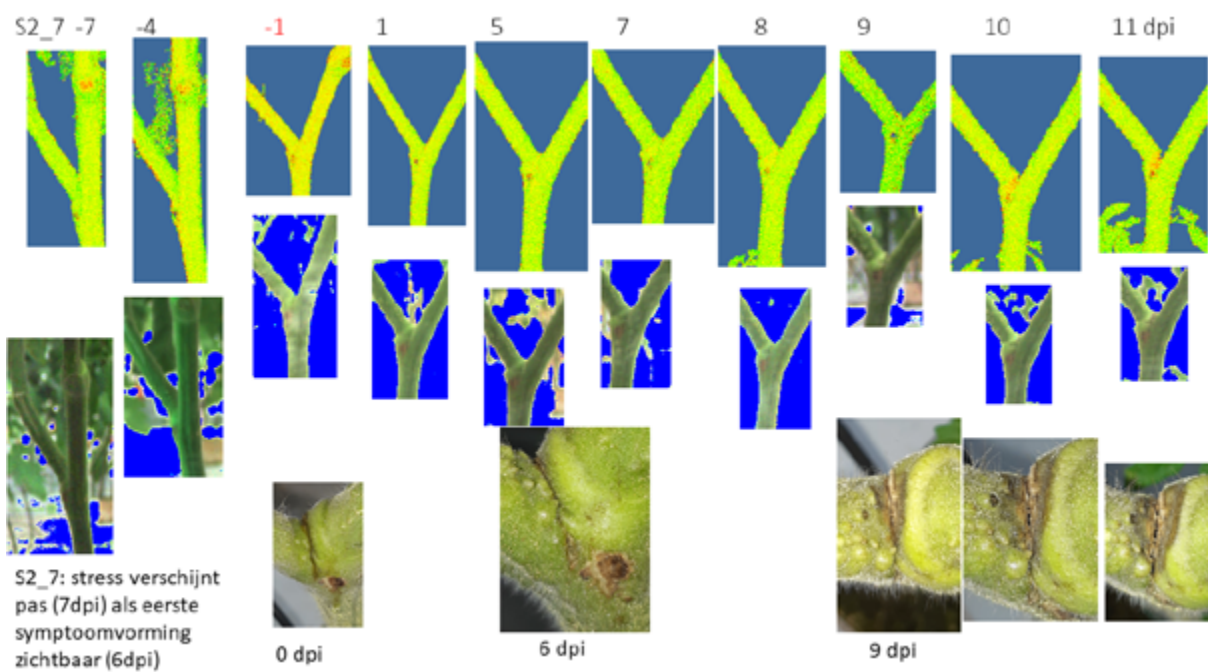
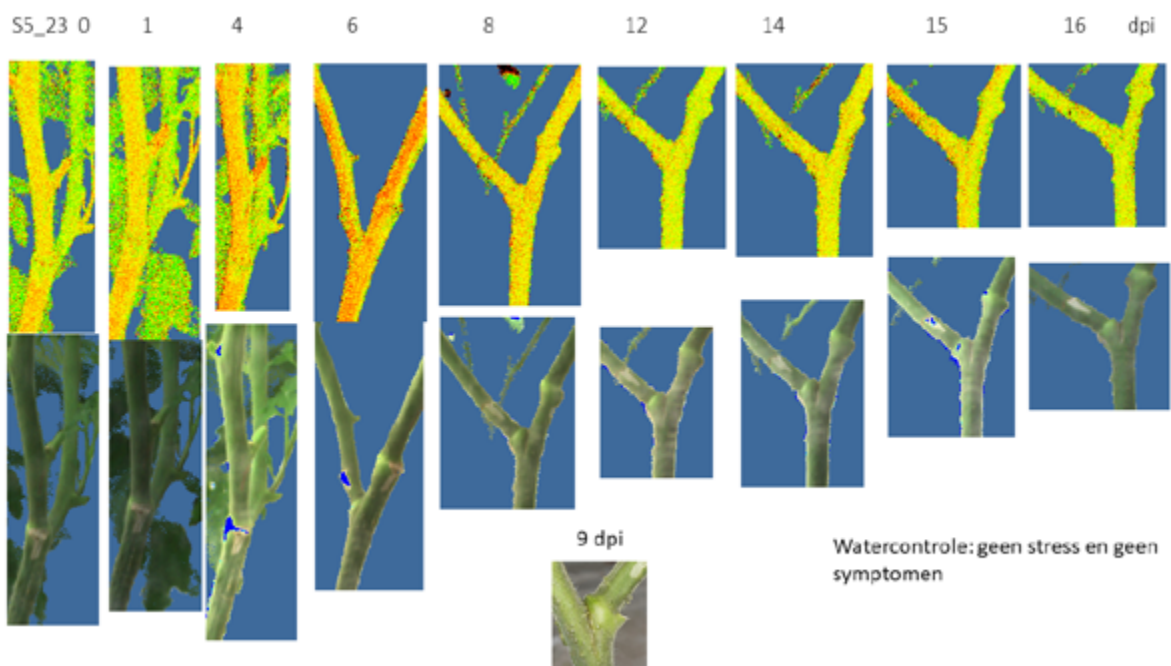
[illegible]

Bijlage 9 Fv/Fm beelden, RGB beelden, en symptomen waargenomen met het blote oog van 5 planten met symptoomvorming en van 2 watercontroles van experiment beschreven in paragraaf 3.3.2

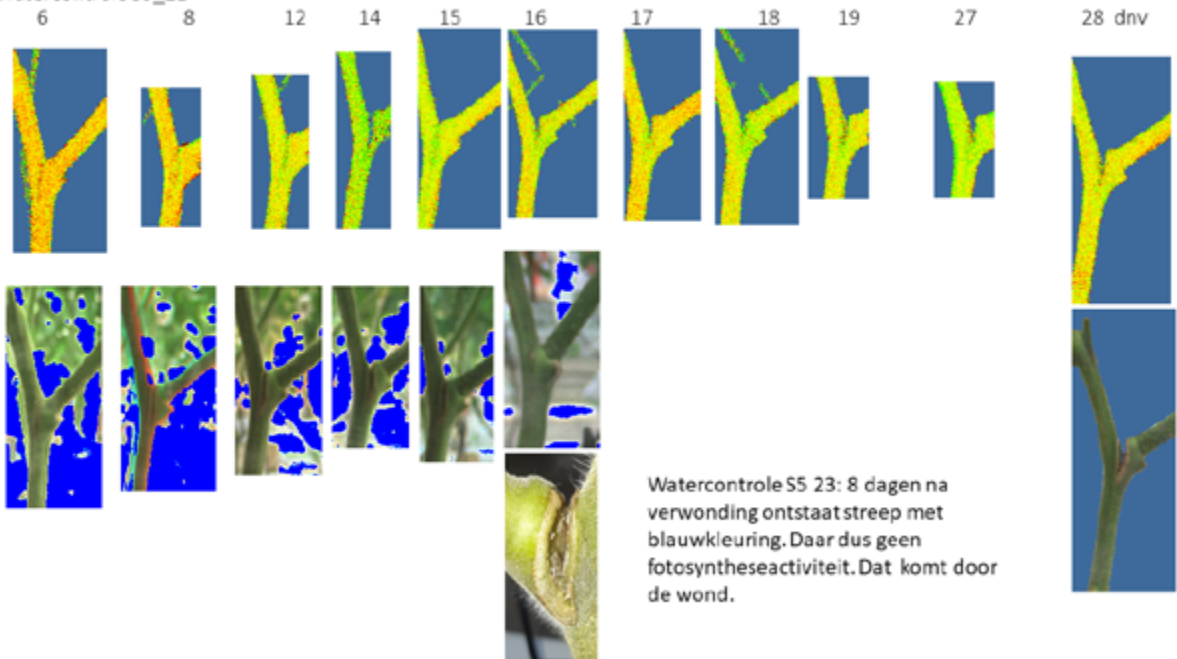


S7_19 -2 0 1 2 3 4 5 13 14 dpi
 S7_19: FvFm 1dpi bewogen, 2 dpi beginnende symptomen en beginnende streep zonder fotosyntheseactiviteit.





Watercontrole S5_21



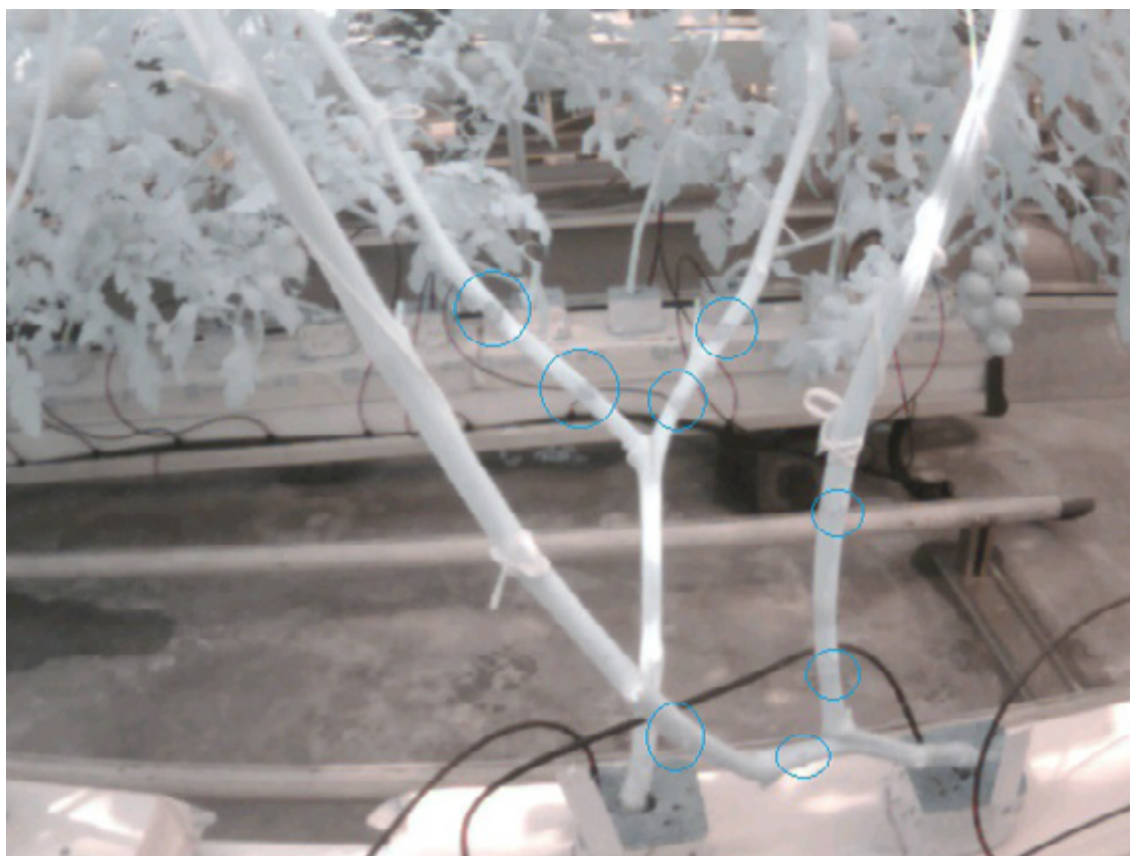
Bijlage 10 Verslag van experiment uitgevoerd met camera van Andre Otten, op verzoek van partner Holland Green Machine

Het verslag is gemaakt en aangeleverd door Andre Otten.

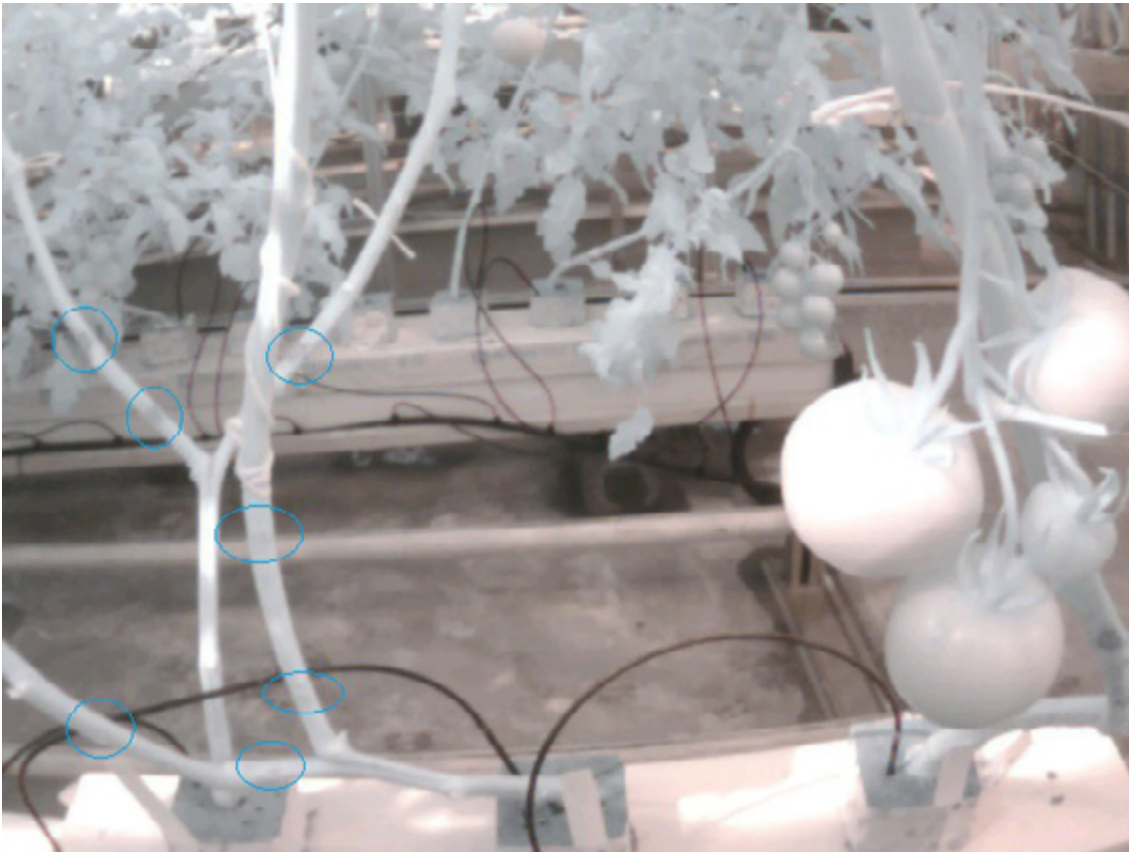
Tijdelijke Resultaten Proef –M kort beschreven

Omdat de insteek van het onderzoek niet was om de ziekte direct te herkennen op de stam, maar om naar de gezondheid van de bladeren te kijken, moest er goed gekeken worden naar welke plant, op welke foto staat. Hierdoor zijn niet alle planten even goed te beoordelen omdat de foto's van verdere afstand zijn genomen waar door de licht inval voor per oriëntatie van de planten anders is ten opzichte van de camera. Daarvoor is er gekozen om foto's te nemen waar zowel een plant met water injectie als een plant met Fusarium injectie opstaat.

Doordat er geen data is van Fusarium geïnjecteerde planten in gezonde staat kan zo een onderscheid gemaakt worden door naar de specifieke plant te kijken (met of zonder Fusarium injectie) en te beoordelen of er een verschil in is te zien.



Figuur 1 Plant Links = F3, Plant rechts = W2. Rondjes zouden de posities van de wonden zijn op basis van de toegestuurde foto's. (I_113).



Figuur 2 (I_114) Plant Links = F3, Plant midden = W2. Rondjes zouden de posities van de wonden zijn op basis van de toegestuurde foto's.



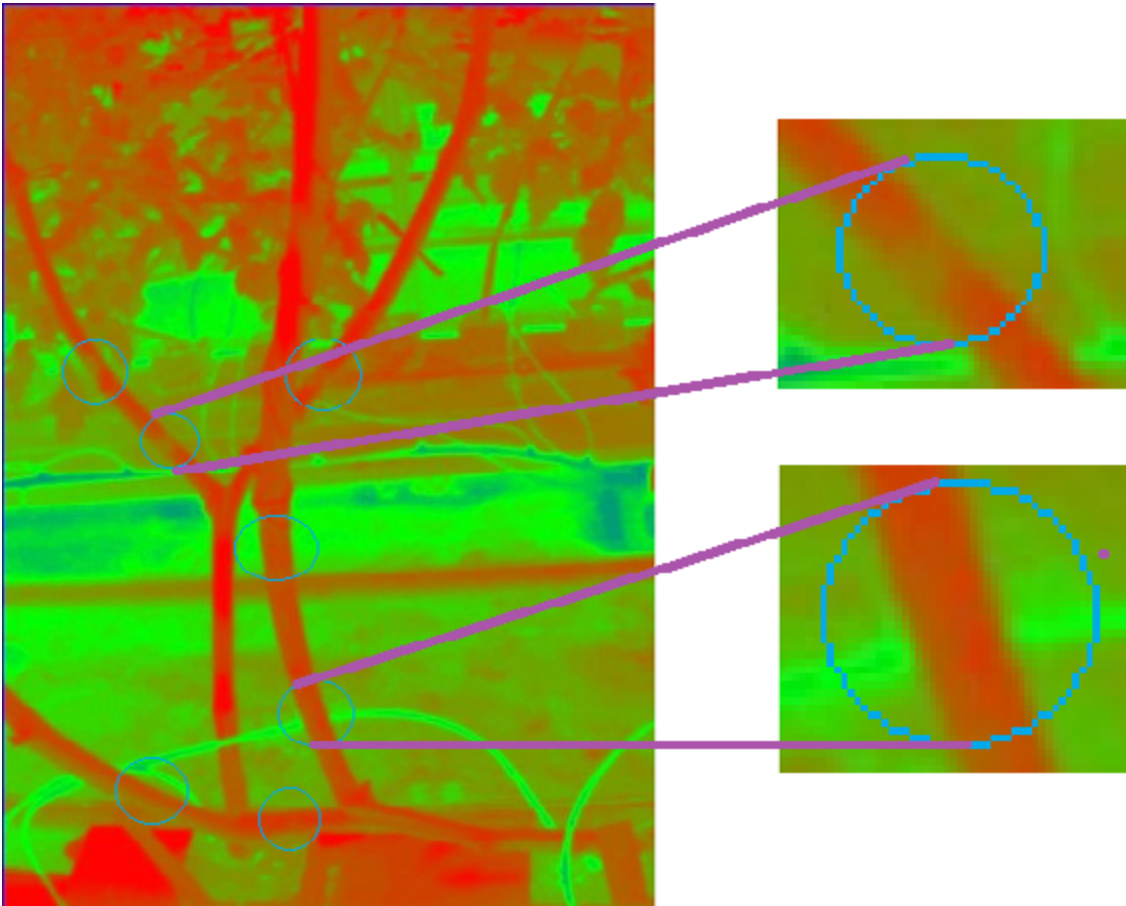
Figuur 3 Plant (I_314) Links = F3, Plant Rechts = W2. Rondjes zouden de posities van de wonden zijn op basis van de toegestuurde foto's. Foto is gemaakt met minder licht intensiteit.



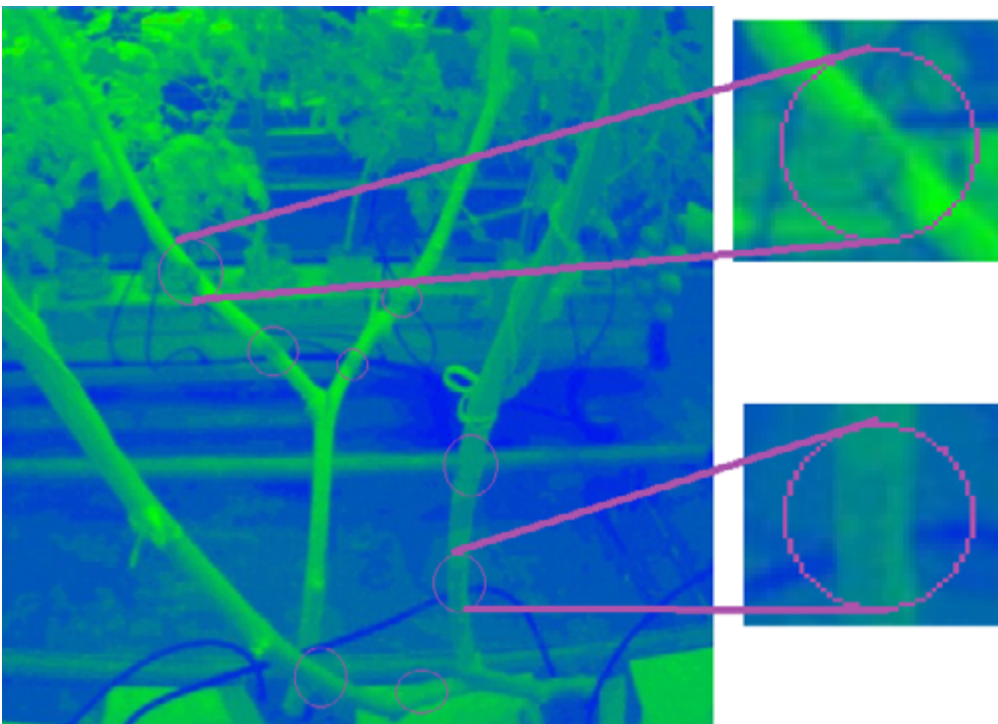
Figuur 4 (I_238) Plant Links = W9, Plant Rechts= F8. Rondjes zouden de posities van de wonden zijn op basis van de toegestuurde foto's. Op plant W9 kon geen wond RB gevonden worden op toegestuurde foto's. Foto is op zelfde dag gemaakt als Figuur 3.

In Figuur 1 /2 /3 lijken de plekken geïnjecteerd met Fusarium donkerder te verschijnen op de foto's, Omdat door de positie van de camera ook de grond mee gefotografeerd word kan dit voor verdere analyse moeilijkheden opleveren, omdat de RGB waarden overeen komen met die van de grond. Ook blijkt dat het verschil in licht intensiteit op zonnige en niet zonnige dagen verschil maakt in de resultaten in waardes, het verschil tussen plekken wel en niet geïnjecteerd blijft zichtbaar.

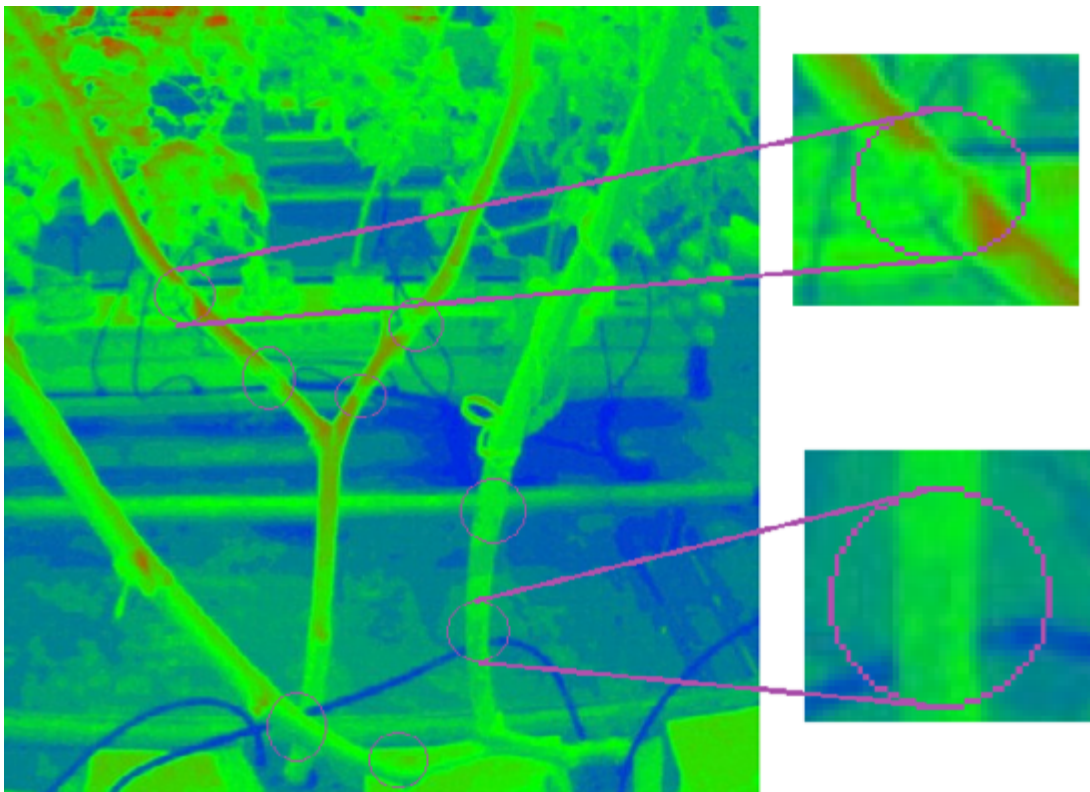
Eerst is gekeken naar de verschillen tussen Foto's op dagen met veel licht en dagen met weinig licht. Op basis van de aanwezige Lichtsensors op de unit is hier naar gekeken naar de samenstelling van het licht dat op de planten is gevallen per foto.



Figuur 5 I_114 na conversie - overbelicht. Bij F3 is de sapstroom in de stam verminderd te zijn. Dit lijkt minder het geval bij W2.



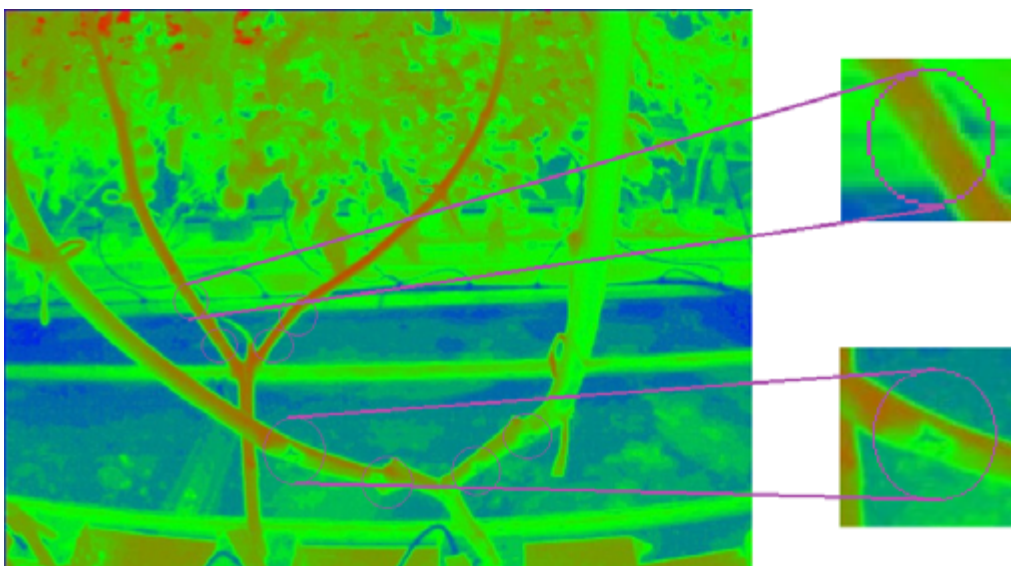
Figuur 6 I_314 - Foto met lage licht intensiteit, Verschil tussen F3 en W2 is zichtbaar op plekken met wond.



Figuur 7 I_314 - Foto met lage licht intensiteit, data kanalen genormaliseerd. Verschil te zien tussen W2 en F3.

Uit foto's met lager licht intensiteit is meer verschil te zien nadat de kanalen genormaliseerd zijn. Dit brengt met foto's waar hoge licht intensiteit is geen verbetering aan voor menselijke interpretatie.

Dit geeft een interpretatie aan voor wat als plant gezien word hoe hoger de licht intensiteit is hoe meer rood. Er kan dus niet gezegd worden dat Kleur X Bij F3 beter of slechter is dan bij W2. Door de stand van de camera valt hier nu een andere licht inval op, recht ten opzichte van de stam gemaakt zouden worden zal dit naar verwachting wel kunnen.



Figuur 8 I_245 (Links 5W, Recht F6) Vergelijkbare licht intensiteit als foto I_314, verschil zichtbaar tussen wonden met en zonder injectie.

In Figuur 8, is een vergelijkbare situatie als bij Figuur 7, beide een plant met water injectie en een plant met Fusarium injectie. Vergelijkbare resultaten zijn ook bij andere foto's te zien.

De eerste resultaten laten zien dat de camera wel verschil oppikt tussen wond soorten. Om het proces voor automatiseren beter te laten lopen zou er gekeken moeten worden naar de oriëntatie van de camera en eventuele eigen verlichting zodat er minder invloed is van buitenaf.

Ondanks dat de resultaten erg licht / oriëntatie afhankelijk zijn om de wond te detecteren en het camera systeem hiervoor niet was opgezet. Dit zou ook een mogelijkheid kunnen zijn om wonden te beproeven op ziekte verschijnselen.

De resultaten op basis van blad konden voor Fusarium niet gemaakt worden omdat er te weinig blad in zicht was en ook hier overbelichting een rol speelde. Door meer data te creëren zou dat hier zeker wel een mogelijkheid zijn om hierop in te spelen.

Concluderend:

1. Proeven zijn gedeeltelijk geslaagd en resultaten bemoedigend. Beter is nachts foto's nemen (constantere licht intensiteit).
2. Proces automatisch laten verlopen, dus geen hand getrokken kar maar een aangedreven eenheid met o.a. gps positie om foto's over elkaar te kunnen leggen om verloop in de plant beter in kaart te krijgen.
3. Onze camera is goed in staat het onderscheid tussen de verschillende stadia te maken en tussen wel en niet geïnjecteerde planten. Dit komt mede door de geavanceerde door ons ontwikkelde software.
4. Proeven zouden beter nog eens gedaan kunnen worden maar dan met aangedreven kar in een diepere kas. Daarbij moet dan de focus worden gelegd op waarneming, camera en mens, op het stadium voor ziek zijn t/m het met het oog goed waarneembaar (jullie stadium 1 nu).

Immers als je het al met het oog kunt zien heeft het al minder meerwaarde meer voor de kweker.

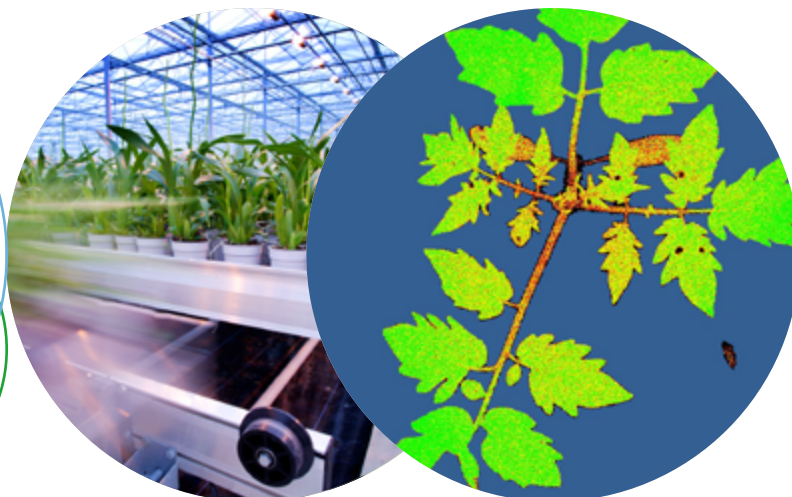
In dit stadium zullen er dus elke 5 min foto's genomen moeten worden van elke plant en deze in onze software een beeld analyse gedaan worden.

Wij verwachten hier goede resultaten uit die waardevol zijn voor de kwekers.

Ing R. Smit

Ing A. Otten

To explore
the potential
of nature to
improve the
quality of life



Wageningen University & Research,
BU Glastuinbouw
Postbus 20
2665 ZG Bleiswijk
Violierenweg 1
2665 MV Bleiswijk
T +31 (0)317 48 56 06
www.wur.nl/glastuinbouw

Rapport WPR-1114

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.800 medewerkers (6.000 fte) en 12.900 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.